

# EEN ONDERZOEK OVER DE IJZERSTOFWISSELING VAN DE RAT MET BEHULP VAN DESFERRIOXAMINE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE  
GENEESKUNDE

AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM

OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS

PROF. DR. P.W. KLEIN

EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.

DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP

WOENSDAG 16 OKTOBER 1974 TE 16.15 UUR PRECIES

DOOR

MONIQUE MARIA JEANNE CHARLES BOBECK - RUTSAERT

GEBOREN TE ANTWERPEN IN 1946

1974

BRONDER-OFFSET B.V. – ROTTERDAM

PROMOTOR: PROF. DR. B. LEIJNSE

COREFERENTEN: PROF. DR. J. GERBRANDY  
DR. H. G. VAN EIJK

## INHOUD

	pag.
INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING	7
HOOFDSTUK I LITERATUUROVERZICHT	
1. Inleiding	9
2. De structuur van Ferrioxamine B en Desferrioxamine B	10
3. Toepassing van DF als ijzeronttrekkend middel en voor de diagnostiek van de ijzervoorraad in het organisme	13
4. Onderzoekingen over de afbraak en uitscheiding via urine en faeces van intraveneus ingebracht DF en FO	18
5. Beknopt overzicht van de in de literatuur beschreven modelsystemen betreffende ijzerkinetiek en ijzerstofwisseling	22
6. Studie naar de relatie tussen DF en ferritine	28
HOOFDSTUK II MATERIALEN EN METHODEN	
1. Materialen	33
2. Methoden	33
Biologische methoden	33
Chemische methoden	34
Statistische methoden	36
3. Apparatuur	36
HOOFDSTUK III STUDIE NAAR DE INVLOED VAN DESFERRIOXAMINE EN FERRIOXAMINE OP DE IJZERVERDELING IN HET ORGANISME VAN DE RAT EN ANALYSE VAN SINGH'S METHODE BETREFFENDE DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN EEN LABIELE IJZERPOOL	
1. Inleiding	37
2. Bepaling van het ijzergehalte in de verschillende organen van normale, overladen, anaemische en sterk anaemische ratten en de invloed van DF op dit ijzergehalte	38

	pag.
3. Onderzoek betreffende de labiele ijzerpool, geme- ten volgens Singh	45
4. Excretie- en distributiepatroon van $^{59}\text{Fe}$ -Ferri- oxamine, intraveneus toegediend aan ratten	49
HOOFDSTUK IV ONDERZOEK NAAR HET IJZERONTTREKKEND VERMOGEN VAN DESFERRIOXAMINE UIT RAT- TENLEVERFERRITINE EN UIT SPIER VAN RATTEN	
1. Inleiding	51
2. Resultaten van Experiment 1	53
3. Resultaten van Experiment 2	56
4. Resultaten van Experiment 3	59
5. Resultaten van Experiment 4	62
6. Resultaten van Experiment 5	65
7. De invloed van DF op leverijzer van de rat tijdens perfusieproeven	66
8. De incorporatie van $^{59}\text{Fe}$ in de spier en de invloed van DF hierop.	67
HOOFDSTUK V ALGEMENE DISCUSSIE	69
SAMENVATTING	89
SUMMARY	92
LITERATUURLIJST	94
NASCHRIFT	98

## INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

Hoewel het verwijderen van ijzer uit het lichaam met behulp van regelmatige aderlatingen, in gevallen van ijzerstapeling, een doeltreffende methode genoemd kan worden, is het gebruik van chelaatvormers die de ijzerexcretie in de urine doen toenemen toch een therapeutische aanwinst. Voor dit doel zijn verschillende stoffen beproefd, o. a. EDTA. Het meest succesvol bleek Desferrioxamine B, verder aan te duiden als DF.

De chelaatvormer Desferrioxamine B wordt parenteraal toegediend en bindt in het lichaam Fe(III)-ionen. Het complex Ferrioxamine B wordt via de urine en de gal uitgescheiden. Over de oorsprong van het ijzer dat uitgescheiden wordt, onder invloed van DF, is weinig bekend. Het feit dat de ijzerexcretie onder invloed van DF verhoogd is bij patienten met ijzeroverlading ten opzichte van normale personen, zou erop wijzen dat het reserve-ijzer een belangrijke bron is voor DF. Het is echter ook mogelijk dat een zekere vorm van transportijzer gemakkelijk toegankelijk is voor DF.

DF wordt ook gebruikt als middel om bepaalde facetten van de ijzerstofwisseling te bestuderen. Zo bestaat er een techniek, waarmede door middel van DF de ijzervoorraad van het organisme bepaald wordt. Tegen deze werkwijze is het bezwaar aan te voeren, dat onze kennis betreffende de aangrijpingsplaatsen van DF op de ijzerstofwisseling te klein is om zonder meer een zó vergaande toepassing te rechtvaardigen. Gezien dit bezwaar en het feit dat het meten van de ijzervoorraad klinisch van groot belang is, is genoemde toepassing van DF een techniek die nauwkeurige aandacht verdient.

Wij besloten daarom over dit onderwerp een experimenteel onderzoek in te stellen. In hoofdzaak werden de volgende problemen aan de orde gesteld:

- a. In welke mate en aan welke organen wordt bij de rat na toediening van DF ijzer onttrokken?
- b. Hoe is de invloed van DF op het ferritine-ijzer?

Teneinde een diepgaand onderzoek naar het werkingsmechanisme van DF te kunnen beginnen, is een grondige kennis van de in de literatuur beschreven modelsystemen betreffende ijzerkinetiek en ijzerstofwisseling noodzakelijk.

In het literatuuroverzicht zal dus naast

- een algemene inleiding over DF en FO, eigenschappen en toepassing,
  - een overzicht van de modelsystemen waarin onze kennis van de ijzerkinetiek is samengevat,
- moeten worden gegeven.

## HOOFDSTUK I

### LITERATUUROVERZICHT

#### 1. INLEIDING

In de afgelopen 25 jaar werden vele ijzerbevattende verbindingen, waarvan het spectrum een absorptiemaximum vertoont tussen 420 en 440 nm, geïsoleerd uit cultures van micro-organismen, in de meeste gevallen schimmels (zie Tabel I.1.). Deze verbindingen worden de siderochromen genoemd. Zij worden ingedeeld in de sideromycinen en de sideraminen. De sideromycinen hebben een antibiotische activiteit, terwijl de sideraminen een bacteriegroei-bevorderende werking hebben. Griseïne, het eerste sideromycine, werd ontdekt in 1947 door Reynolds, Schatz en Waksman (1). Albomycine werd kort daarop geïsoleerd door Gause en Brazh-Nikova (2). In 1952 werden verschillende sideraminen gelijktijdig geïsoleerd, nl. ferrichroom door Neilands (3), coprogeen door Hesseltine (4) en de terregens factor door Lochhead (5).

Een intensief onderzoek, ondernomen door de Research Laboratoria van de firma Ciba en de afdelingen Speciale Plantkunde en Organische Chemie en het Federale Instituut voor Technologie in Zürich, leidde in 1960 tot de isolatie van ferrimycine en ferrioxamine uit *Actinomyces* cultures (6, 7, 8).

Het bovengenoemde antagonisme tussen de sideromycinen, die antibiotische, en de sideramines die bacteriegroei-bevorderende activiteit hebben, werd ontdekt door Zähler, Hütter en Bachman in 1960 (9).

De beste isolatietechniek voor siderochromen is de werkwijze die ontwikkeld werd voor de isolatie van cobalamines (o.a. vitamine B12), nl. extractie met phenolchloroformmengsels (10). Voor de scheiding van sidero-

chromen en de identificatie van de afzonderlijke stoffen zijn methodieken ontwikkeld, waarbij gebruik gemaakt wordt van chromatografische, electroforetische en counter current technieken.

Tabel I.1.

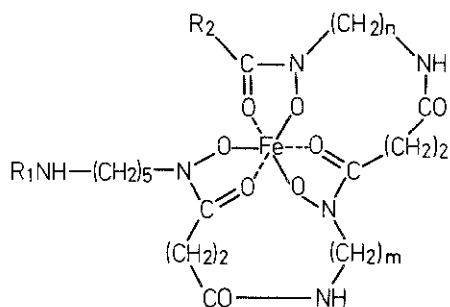
Tot nu toe geïsoleerde siderochromen  
(zie voor basisstructuur-formule van ferrioxamines, Fig. I.1.).

	Sideramines	Sideromycinen
Ferrioxamine A	$R_1 = H$ $R_2 = OCCH_3$ $m = 4$ $n = 5$ of $m = 5$ $n = 4$	Griseine
Ferrioxamine B	$R_1 = H$ $R_2 = CH_3$ $m = n = 5$	Albomycine
Ferrioxamine C		Ferrimycine A <sub>1</sub>
Ferrioxamine D <sub>1</sub>	$R_1 = CH_3CO$ $R_2 = CH_3$ $m = n = 5$	Ferrimycine A <sub>2</sub>
Ferrioxamine D <sub>2</sub>	$m = 4$ $n = 5$ $R_2 = (CH_2)_2CO$	Ferrimycine B
Ferrioxamine E	$R_1$ binding met $R_2$ $R_2 = (CH_2)_2CO$ $m = n = 5$	
Ferrioxamine F		ETH 22765 LA 5352
Ferrioxamine G	$R_1 = H$ $R_2 = CH_2CH_2COOH$ $m = n = 5$	LA 5937
Ferrichrysine	cyclohexapeptide	
Ferricrocine	cyclohexapeptide	
Ferrirhodine	cyclohexapeptide	
Ferrirubine	cyclohexapeptide	
Ferrichroom		
Coprogeen		
Terregens factor		

## 2. DE STRUCTUUR VAN FERRIOXAMINE B EN DESFERRIOXAMINE B

Onder de verscheidene sideramines, verkregen uit de *Streptomyces pilosus*, is het voornaamste product het ferrioxamine B.



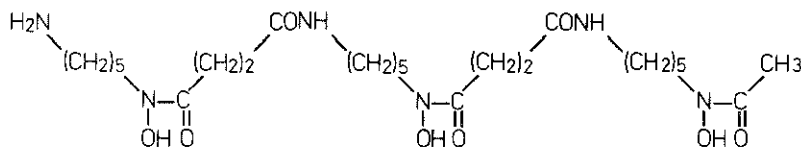


Figuur I.1.

Structuurformule van Ferrioxamines.

In de formule, weergegeven in Fig. I.1. is voor ferrioxamine B  $R_1 = H$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $m = n = 5$  (molecuulmassa = 613). Voor de andere producten is in Tabel I.1. de betekenis van  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $m$  en  $n$  aangegeven. De sideraminen ferrichrysine, ferricrocine, ferrirhodine en ferrirubine zijn ferritrihydroxamaat complexen van cyclohexapeptiden.

Het ijzervrije product van ferrioxamine B wordt desferrioxamine B genoemd. De structuurformule is weergegeven in Fig. I.2.

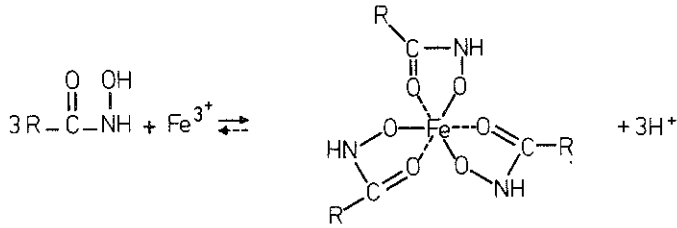


Figuur I.2.

Structuurformule van Desferrioxamine B.

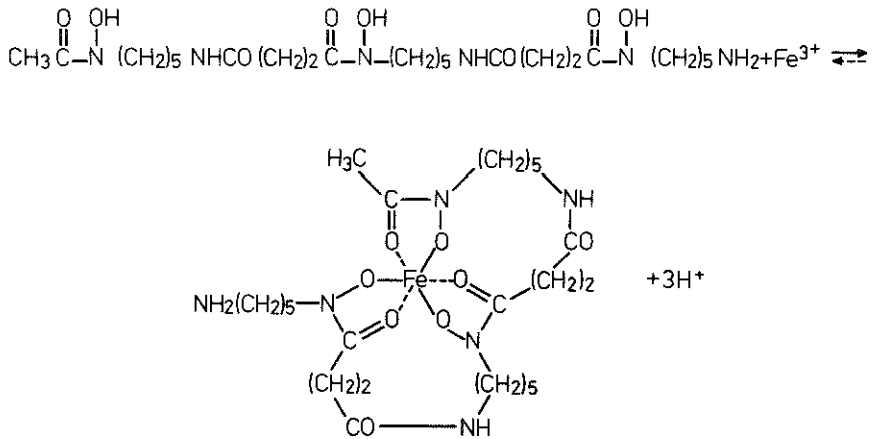
De omzetting van ferrioxamine B in desferrioxamine kan plaatsvinden door met HCl aan te zuren tot  $pH = 1$ . Vervolgens kan het ontstane desferrioxamine met ether worden uitgeschud. Ook wordt genoemde omzetting wel bereikt met behulp van 8-hydroxyquinoline. Er ontstaat dan Fe(III)oxinaat. Het ijzer kan ook verwijderd worden door het ferrioxamine in alkalisch milieu te brengen,  $pH = 10$ , er ontstaat dan  $Fe(OH)_3$ . Desferrioxamine B wordt in de literatuur wel aangeduid met DF, een gebruik dat we verder in de tekst zullen hanteren. Voor het ferrioxamine B is de afkorting FO in gebruik.

De reactie tussen het ferri-ion en desferrioxamine, een chelaatvorming, kan als volgt worden weergegeven (Fig. I. 3.).



Figuur I. 3. A.

Reactievergelijking van hydroxamaur en Fe(III) met vorming van hydroxamaur-complex.



Figuur I. 3. B.

Reactievergelijking van Desferrioxamine B en Fe(III) met vorming van Ferrioxamine B.

De evenwichtsconstante van de reactie  $\text{DF} + \text{Fe(III)} \rightleftharpoons \text{FO} + 3\text{H}^+$  werd bepaald door Schwarzenbach en bleek bij  $20^\circ \text{K} = 10^{31}$  (11).

### 3. TOEPASSING VAN DF ALS IJZERONTTREKKEND MIDDEL EN VOOR DE DIAGNOSTIEK VAN DE IJZERVORRAAD IN HET ORGANISME

Gezien de hoge waarde van de in vorige paragraaf genoemde evenwichtsconstante lag het voor de hand DF als therapeutikum te beproeven bij acute ijzerintoxicatie of bij ijzerstapelingsziekten. DF heeft in deze een duidelijk voordeel boven EDTA en DTPA. Weliswaar vormen EDTA en DTPA met ferri-ionen sterke chelaten; de evenwichtsconstanten zijn respectievelijk  $K = 10^{25}$  en  $K = 10^{29}$ . Maar in tegenstelling tot EDTA en DTPA heeft DF een veel kleinere affiniteit voor calcium. De evenwichtsconstante is voor de binding met calcium voor EDTA  $10^{11}$ , voor DTPA  $10^{10}$  en voor DF  $10^2$ . Dit betekent dat DF ijzer sterker bindt dan EDTA en DTPA en calcium daarentegen veel minder sterk. Inderdaad bleek het mogelijk ijzer te onttrekken aan het organisme door parenterale injectie van DF, zonder dat toxische bijwerkingen werden waargenomen.

In 1960 bespraken een vijftiental onderzoekers op dit gebied hun resultaten bij een "Gespräch am runden Tisch" (12). Het bleek dat DF werd toegediend bij patienten, lijdend aan idiopathische primaire haemochromatose, secundaire haemochromatose en transfusiehaemosiderose. Als optimale dosering werd een intramusculaire injectie van 1,83 mmol (1.200 mg) DF per dag gekozen. De hoeveelheid ijzer die bij deze dosis per dag werd uitgescheiden in de urine, varieerde bij genoemde patienten van 0,18 mmol tot 1,61 mmol (10 - 90 mg) per dag.

Verscheidene onderzoekers menen dat de door DF geprovoceerde ijzeruitscheiding in de urine gebruikt kan worden voor de diagnostiek van ijzerstapeling (13, 14, 15, 16). Wöhler (1964) gebruikte de gemiddelde waarde van de ijzeruitscheiding in de urine gedurende 6 uur na intramusculaire injectie van 0,76 mmol (500 mg) DF om ijzerstapeling te ontdekken. Als normale waarde geeft Wöhler een uitscheiding van 7,07  $\mu$ mol op gedurende de 6 uur. Bij patienten, lijdende aan haemochromatose, transfusiehaemosiderose, levercirrhose en porphyria cutanea tarda, vond Wöhler een ijzerexcretie in de urine die significant verhoogd was t.o.v. normaal (17). Schmid (1964) gebruikte de test als indicatie van de progressie van de ijzerstapeling. De test kan zijns inziens niet gebruikt worden in een vroeg stadium van haemochromatose. Zijn ervaring is dat bij patienten, lijdende aan een ernstige graad van primaire en secundaire haemochromatose de test sterk positief uitvalt en de ijzeruitscheiding in de urine een factor 17 hoger is

dan bij normale controlepersonen (16). Hallberg (1966) vond in zijn experimenten met normale personen een significante correlatie tussen de geïnduceerde ijzerexcretie in de urine en het ijzergehalte in de lever, dat chemisch werd bepaald in biopsiemateriaal. Bij patienten met levercirrhose vond Hallberg, dat de ijzeruitscheiding opmerkelijk hoger was dan normaal. Hiervoor gaf hij als mogelijke verklaringen, dat er ofwel een grotere toegankelijkheid zou zijn van opslagijzer voor DF, ofwel dat de verdeling van het ijzer over de organen waar ijzerstapeling plaatsvindt, gewijzigd zou zijn. Deze laatste veronderstelling steunt hij met de toelichting dat bij drie personen, waarbij histologisch een beschadiging van de lever werd geconstateerd, het ijzergehalte in de lever klein was in verhouding tot het ijzergehalte van het beenmerg. De gehalten werden chemisch bepaald op biopsiemateriaal (18).

Ploem (1965) vond significante verschillen in geïnduceerde ijzerexcretie in de urine bij patienten met normale, verhoogde of verlaagde ijzervoorraad. De hoeveelheid ijzer in de lever werd geschat op grond van de Berlijnse blauwkleuring (13). Hij vond een goede correlatie tussen de geschatte hoeveelheid haemosiderine in de parenchymcellen van de lever en de hoeveelheid ijzer in de urine na toediening van DF. Hij concludeerde dat de desferrioxamineproef een klinisch bruikbare en voor de patient weinig belastende methode van onderzoek is, die een goede indruk geeft over de hoeveelheid reserve-ijzer in het lichaam en die vooral voor de diagnose ijzerstapeling van waarde is. Een verhoogde ijzeruitscheiding in de urine na DF-injectie bij patienten met acute heptitis, werd door verscheidene onderzoekers gevonden. Als mogelijke redenen geven de auteurs op, dat bij patienten met beschadigde lever de toegankelijkheid van ijzer voor DF verhoogd is (17, 19, 20). Verscheidene onderzoekers vinden de verhoogde ijzeruitscheiding ook bij patienten met levercirrhose (21, 22). Een afwijkende mening over het verband tussen de ijzerexcretie in de urine onder invloed van parenterale DF-toediening en de aanwezige ijzerreserve huldigt Brown (23). Brown (1967) vond bij 13 patienten met verschillende vormen van ijzerstapeling geen correlatie tussen de grootte van de ijzerreserve en de ijzerexcretie in de urine tijdens de DF-therapie. Hoewel de ijzerexcretie hoger was dan bij normale personen, kon hij toch geen correlatie tussen de uitscheiding en de ijzerreserves aantonen. Hij maakte een schatting betreffende de ijzervoorraad door het aantal bloedtransfusies dat de patient toegediend kreeg in aanmerking te nemen en door het ijzergehalte van via biop-

sie verkregen leverweefsel chemisch te bepalen.

Singh (1968) beschreef een methode om kwantitatief de labiele ijzer-voorraad te meten (24). Acht dagen na een intraveneuze injectie van 10 - 13  $\mu\text{C}$   $^{59}\text{Fe}$  werd intramusculair 1,52 mmol DF (1.000 mg) gegeven. De definitie van een labiele ijzervoorraad bij Singh is niet erg scherp, vandaar dat het voorkeur verdient deze auteur te citeren.

Singh formuleert: "If a tracer dose of  $^{59}\text{Fe}$  is introduced into the plasma iron pool it will subsequently be partitioned between the red-cell pool ( $^{59}\text{Fe}$  utilization) and the storage pool. Thus, in the absence of loss of  $^{59}\text{Fe}$  from the body the amount of labile iron in the storage pool at the time of maximum utilization will be the amount injected less the amount incorporated in the red-cell mass at that time. If it is assumed that it is the chelatable iron store which is labelled with this fraction of the injected  $^{59}\text{Fe}$  and data obtained in the present study support this view, subsequent introduction of an iron chelating agent will be followed by urinary excretion of  $^{59}\text{Fe}$  and unlabelled iron in the proportions in which they are present in the labile pool. The size of the labile iron pool can then be calculated as follows:

$$\text{labile iron store (mg)} = \frac{^{59}\text{Fe in labile iron pool}}{^{59}\text{Fe in urine}} \times \text{urine iron (mg)}.$$

Certain additional assumptions are necessary. First, that  $^{59}\text{Fe}$  introduced into the plasma iron pool is partitioned between red cell and some storage pool; this seems a justifiable assumption. Secondly, that at the time of chelation there is a homogeneous labelling of the storage pool with  $^{59}\text{Fe}$  without differential chelation of labelled and unlabelled iron".

Singh bepaalde met deze techniek de labiele ijzerpool bij normale personen, patienten lijdend aan ijzergebreksanaemie en patienten lijdend aan ijzeroverlading, en vond over het algemeen duidelijke verschillen tussen deze drie groepen (zie Tabel I.2.).

Tabel I.2.

De labiele ijzerpool en enkele andere grootheden door Singh bepaald  
bij drie groepen patienten (1968) (24).

Patienten	Leeftijd, geslacht	Labiele ijzerpool	Hb (g/100 ml)	Serumijzer ( $\mu$ g/100 ml)	Latente ijzer- bindingscapa- citeit
<b>Ijzerebreksanaemie</b>					
1	44, V	64	9,8	13	403
2	28, V	28	12,0	58	184
3	54, V	16	10,8	25	294
4	56, M	59	9,7	47	463
5	70, V	285	5,7	32	843
6	48, V	54	11,7	40	---
7	63, M	22	9,5	45	585
8	50, V	140	8,9	60	510
9	60, V	125	7,8	45	---
10*	53, V	114	8,4	228	372
11	47, V	nihil	9,5	62	568
12	39, M	65	8,6	77	403
13	77, V	201	9,7	27	609
14	64, M	180	9,5	28	408
15	79, M	308	10,0	60	422
16	52, M	nihil	9,5	70	380
17	42, V	44	9,3	30	---
18	49, M	249	7,6	40	600
19	46, V	258	10,8	30	545
20	48, M	91	10,0	30	---
21	54, V	130	10,0	40	415
22	42, V	43	7,8	35	535
23	42, V	68	9,3	55	325
24	45, V	71	9,7	50	490
25	44, V	50	8,2	30	540
26	63, V	134	10,8	55	545
27	50, M	44	9,7	35	475
<b>Normaal</b>					
28	32, M	250	15,0	66	340
29	22, V	1.084	13,0	88	134
30	38, M	222	14,5	133	---
31	52, M	239	14,0	94	---
32	51, V	114	15,0	103	---
33	46, M	475	15,0	100	---
34	45, M	154	16,9	127	---
35	42, M	288	15,1	145	345
36	60, V	175	13,6	157	---
37	28, V	47	14,0	145	245
38	55, M	150	14,0	55	---
39	30, M	524	16,0	125	---

Tabel I.2. (vervolg)

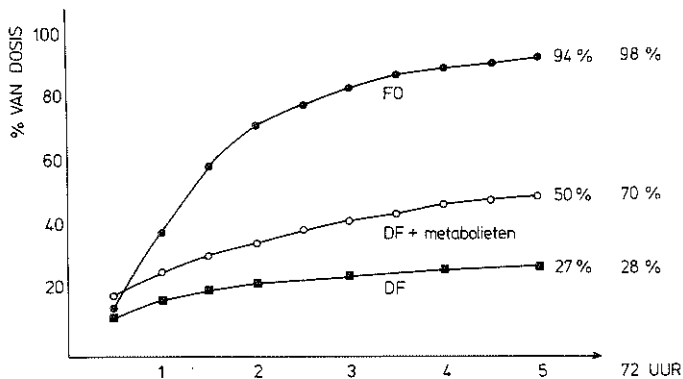
Patienten	Leeftijd, geslacht	Labiele ijzerpool	Hb (g/100 ml)	Serumijzer ( $\mu$ g/100 ml)	Latente ijzer- bindingscapa- citeit
Normaal (vervolg)					
40	54, M	212	13,6	60	---
41	46, M	434	16,8	118	257
42	40, M	607	15,7	200	145
43	28, V	260	13,6	107	313
44	62, M	137	13,0	130	---
45	66, M	177	13,1	145	221
46	46, M	105	15,7	145	245
47	30, M	610	14,6	225	160
Verhoogde ijzerstapeling					
48	82, V	743	13,0	336	156
49	88, M	1.369	7,8	270	15
Verhoogde ijzerstapeling					
50	45, M	2.643	8,2	295	146
51	42, M	4.695	7,8	250	nihil
52	58, M	3.277	8,0	---	---
53	48, V	901	6,4	115	425
54	78, V	2.503	8,2	150	90
55	72, V	1.928	6,8	223	23
56	10, M	5.929	8,2	245	55
57	5, M	4.079	11,7	185	70
58	80, M	1.134	12,1	130	50
59	58, M	1.312	11,0	290	55
60	76, V	1.145	11,2	---	---
61	12, V	3.694	11,5	195	---

\* Orale ijzertoeiening gedurende drie dagen voor uitvoering van de test.

#### 4. ONDERZOEKINGEN OVER DE AFBRAAK EN UITSCHEIDING VIA URINE EN FAECES VAN INTRAVENEUS INGEBRACHT DF EN FO

Een geheel andere toepassingsmogelijkheid van een sideramine, en wel het FO, werd door Wöhler in 1963 (25) beproefd. Hij ging na of FO geschikt was als een therapeuticum voor ijzersuppletie bij anaemieën. De sterke binding van ijzer in deze stof bleek echter een bezwaar. Nader onderzoek leverde enkele tegenstrijdige gegevens op met betrekking tot de afbraak en uitscheiding van intraveneus ingebracht DF en FO. Wöhler (25) diende met  $^{59}\text{Fe}$  gemerkt ferrioxamine intraveneus aan ratten toe en vond dat 24 uur na de injectie 90% uitgescheiden was in de urine.

Keberle (26) deed in 1964 dezelfde proeven met honden. Intraveneus werd  $152 \mu\text{mol/kg}$  lichaamsgewicht met  $^{59}\text{Fe}$  gemerkt ferrioxamine toegediend. Na 5 uur bleek 94% van de gegeven dosis in de urine te zijn uitgescheiden. Na 72 uur werd 98% van de gegeven dosis in de urine aangetroffen. FO wordt dus volgens Wöhler en Keberle volledig en onveranderd in de urine uitgescheiden. Keberle deed ook proeven met DF gemerkt met tritium. Wanneer dit DF bij de hond wordt geïnjecteerd, zag hij een geheel ander patroon. DF wordt voor een aanzienlijke hoeveelheid in het lichaam afgebroken. Slechts 28% van het intraveneus toegediend DF wordt in de urine uitgescheiden. Een en ander is weergegeven in Fig. 1.4.

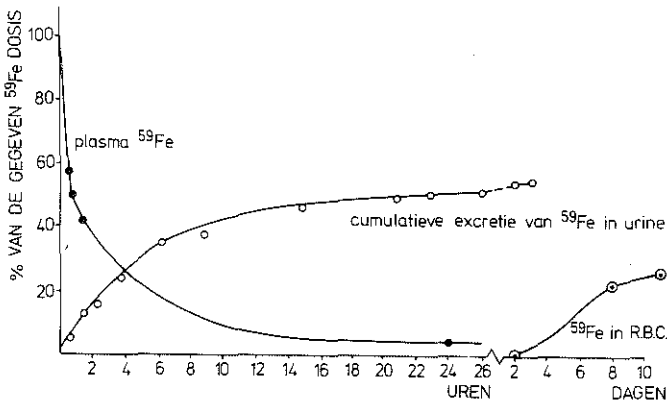


Figuur 1.4.

Excretie via de urine van DF en FO bij de hond volgens Keberle (26) na intraveneuze toediening van  $152 \mu\text{mol DF/kg}$  lichaamsgewicht, gemerkt met  $^3\text{H}$ , en van  $140 \mu\text{mol FO/kg}$  lichaamsgewicht, gemerkt met  $^{59}\text{Fe}$ .



Uitkomsten van onderzoeken met FO gemerkt met  $^{59}\text{Fe}$ , verricht door Bannerman (1962) en Fielding (1965), zijn in strijd met de zojuist genoemde resultaten, verkregen door Wöhler en Keberle. Bannerman (27) vindt bij mensen dat van intraveneus ingebracht FO, gelabeld met  $^{59}\text{Fe}$ , na drie dagen slechts 55% is uitgescheiden. Ongeveer de helft van het achtergebleven gedeelte wordt gebruikt voor haemoglobinesynthese, zie Fig. 1.5.



Figuur 1.5.

Resultaten van onderzoeken, verkregen na intraveneuze toediening van FO, gemerkt met  $^{59}\text{Fe}$ , volgens Bannerman (27).

Fielding (28) diende aan normale personen intraveneus  $84 \mu\text{mol/kg}$  lichaamsgewicht met  $^{59}\text{Fe}$  gemerkt ferrioxamine toe; 50 - 70% van de toegediende dosis werd in 72 uur via de urine uitgescheiden. De specifieke activiteit van het in de urine uitgescheiden  $^{59}\text{Fe}$ -FO is gelijk aan de specifieke activiteit van het intraveneus ingebracht  $^{59}\text{Fe}$ -FO. Dit wijst erop dat het ijzer van het toegediende FO niet uitwisselt met weefselijzer.

Hallberg (29) bestudeerde het excretiepatroon van ijzer na intraveneuze toediening van  $15,2 \mu\text{mol DF/kg}$  lichaamsgewicht. De maximale ijzerexcretie werd binnen 3 - 6 uur na de intraveneuze DF-injectie waargenomen. Hij bestudeerde eveneens het excretiepatroon van ijzer, waarbij hij gebruik maakte van DF met een spoor FO gelabeld met  $^{59}\text{Fe}$ . Dezelfde dosis DF, nl.  $15,2 \mu\text{mol DF/kg}$  lichaamsgewicht werd gebruikt. Met behulp van  $15 \mu\text{C}$   $^{59}\text{Fe}$  als  $^{59}\text{FeCl}_3$ , met een specifieke activiteit van  $5 \mu\text{C}/\mu\text{g}$  ijzer, werd FO gelabeld. De excretie van  $^{59}\text{Fe}$  verschilt aanzienlijk, aldus Hallberg,

van het excretiepatroon van  $^{56}\text{Fe}$ . De maximale excretie van  $^{59}\text{Fe}$  werd waargenomen gedurende het eerste uur na de injectie, terwijl de maximale excretie van  $^{56}\text{Fe}$  gedurende het vierde uur plaatsvindt. Dit wijst erop, volgens Hallberg, dat de maximale ijzeruitscheiding na drie uur niet te wijten is aan een vertraagde excretie van ferrioxamine, maar aan een vertraagde mobilisatie van ijzer door DF. Ons inziens trekt Hallberg verkeerde conclusies uit zijn resultaten. De  $^{59}\text{Fe}$ -excretie is afkomstig van het geïnjecteerde FO, gelabeld met  $^{59}\text{Fe}$ . Het is vanzelfsprekend dat deze excretie zeer snel verloopt. De excretie van  $^{56}\text{Fe}$ , geïnduceerd door DF, bereikt de maximale waarde na 3 - 6 uur. Het ijzer moet immers nog gemobiliseerd worden door DF. Het idee dat de ijzerexcretie "vertraagd" is en dit te wijten aan een "vertraagde" mobilisatie van ijzer door DF, is onjuist. Hallberg bestudeerde een en ander eveneens bij patienten met een ijzergebreksanaemie en bij patienten met een ijzerstapelingsziekte, en vergeleek dit met normale personen. Hij injecteerde  $15,2 \mu\text{mol DF/kg}$  lichaamsgewicht. Met behulp van  $2 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$  met een specifieke activiteit van  $5 \mu\text{C}/\mu\text{g}$  ijzer werd FO gelabeld. Er was geen significant verschil in de excretie van  $^{59}\text{Fe}$  tussen de verschillende groepen. De  $^{56}\text{Fe}$ -excretie na DF-injectie was wel significant groter bij normale personen dan bij personen met een ijzergebreksanaemie. Uit deze resultaten concludeert Hallberg dat de ijzerexcretie niet systematisch afhankelijk is van de ijzerstatus in het organisme. Aangezien echter de  $^{59}\text{Fe}$ -excretie afkomstig is van het spoor geïnjecteerde FO, gelabeld met  $^{59}\text{Fe}$ , is het erg logisch dat de excretie van  $^{59}\text{Fe}$ , gebonden aan FO, ongeveer dezelfde waarde zal hebben bij de verschillende groepen patienten.

Bij de studie naar het metabolisme van DF en FO in het organisme, dient de faecale excretie van de complexen eveneens onderzocht te worden. De faecale excretie van kleine moleculen, als DF en FO, kan op verschillende manieren tot stand komen:

1. door excretie van DF en FO langs de intestinale mucosa;
2. door desquamatie van de mucosacellen die DF en FO bevatten;
3. door DF- en FO-excretie via de gal.

Tegenstrijdige resultaten worden in de literatuur gevonden.

Wöhler vond geen excretie van FO via de gal, wanneer hij aan konijnen DF parenteraal toediende (30).

Bannerman gaf aan normale proefpersonen een intraveneuze injectie van  $0,20 \mu\text{mol FO}$ , gelabeld met  $^{59}\text{Fe}$ , waaraan nog  $0,10 \mu\text{mol DF}$  werd toegevoegd. Een verwaarloosbare hoeveelheid  $^{59}\text{Fe}$  werd in faeces gevonden

gedurende de eerste drie dagen na injectie; 55% van de ingespoten dosis  $^{59}\text{Fe}$  werd gedurende de drie dagen uitgescheiden in de urine (27).

Keberle bestudeerde bij honden het metabolisme van DF met behulp van  $^3\text{H}$  DF. Hij vond na intraveneuze injectie van  $456,6 \mu\text{mol DF/kg}$  lichaamsgewicht, gelabeld met  $^3\text{H}$ , dat DF en afbraakproducten gedeeltelijk werden uitgescheiden via de gal. Een aanzienlijke hoeveelheid activiteit werd gevonden in de gal en eveneens in de darminhoud. De excretieproducten van de gal werden onderworpen aan papierchromatografie. Analyse toonde aan dat het grootste aandeel van de activiteit in de gal afkomstig was van een afbraakproduct met onbekende structuur (26).

Gevirtz e. a. vonden in 1965 bij twee patienten met een aplastische anaemie, die vele bloedtransfusies ondergingen, een verhoogde ijzerexcretie in urine en faeces na parenterale DF-toediening. De verhoogde faecale ijzerexcretie, geïnduceerd door DF, is een excretiepatroon dat, aldus Gevirtz, van belang is voor de therapie van ijzerstapelingsziekten (31).

Brown, Hwang en Allgood vonden bij patienten met een verhoogde ijzerstapelning een verhoogde ijzeruitscheiding in faeces tijdens DF-therapie. De ijzerexcretie in de urine, geïnduceerd door DF, was echter 10 tot 15 maal groter dan de faecale ijzerexcretie. Een mogelijke bron voor de verhoogde faecale ijzeruitscheiding, geïnduceerd door parenterale DF-toediening, is de verhoogde ijzerexcretie via de gal. De door DF geïnduceerde ijzeruitscheiding via de gal werd bestudeerd bij drie patienten die een cholecystectomie ondergingen. Op de eerste postoperatieve dag werden ijzeruitscheiding in gal en urine gemeten. Deze waarden werden vergeleken met de waarden, verkregen na toediening van DF om de 12 uur. De ijzerexcretie in de gal was verhoogd na DF-toediening. De ijzerexcretie in de urine was echter sterker toegenomen dan die via de gal (23).

Figuera e. a. maten in 1968 de ijzerexcretie in de gal voor en na een subcutane injectie van DF bij normale en overladen ratten. Bij normale ratten induceert een DF-injectie van  $76 \mu\text{mol}$  een 3-voudige ijzertoeename ( $P < 0,01$ ) in de gal. Bij ratten die overladen werden met  $0,80 \text{ mmol}$  ijzer, in de vorm van ijzersorbitol, induceert de DF-injectie van  $76 \mu\text{mol}$  een 24-voudige toename, terwijl bij ratten die overladen werden met  $1,43 \text{ mmol}$  ijzer, deze DF-injectie een 32-voudige toename induceert. Een DF-injectie van  $38 \mu\text{mol}$  DF induceert een 13-voudige ijzertoeename bij de ratten, overladen met  $0,80 \text{ mmol}$  ijzer ( $P < 0,001$ ). De significant verhoogde ijzerexcretie in de gal onder invloed van DF is, aldus bovengenoemde auteurs,

waarschijnlijk de voornaamste bron van de verhoogde faecale ijzeruitscheiding, waargenomen bij patienten met een ijzerstapelingsziekte, tijdens DF-therapie (32).

Hedenberg (1969) bestudeerde eveneens de faecale ijzerexcretie. Aan twee gezonde proefpersonen werd DF ( $15,2 \mu\text{mol DF/kg}$  lichaamsgewicht) met een spoor FO, gelabeld met  $2 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$  (de specifieke activiteit is  $5 \mu\text{C}/\mu\text{g}$  ijzer), intraveneus toegediend. Een verwaarloosbare hoeveelheid  $^{59}\text{Fe}$ , nl.  $< 1\%$  van de toegediende dosis, werd in de faeces teruggevonden (33). De  $^{59}\text{Fe}$ -excretie in faeces is echter bij de experimenten van Hedenberg geen weergave van de excretie, geïnduceerd door DF, aangezien de  $^{59}\text{Fe}$ -excretie afkomstig is van het geïnjecteerde FO, gelabeld met  $^{59}\text{Fe}$ .

## 5. BEKNOPT OVERZICHT VAN DE IN DE LITERATUUR BESCHREVEN MODELSYSTEMEN BETREFFENDE IJZERKINETIEK EN IJZERSTOF- WISSELING

In de afgelopen 30 jaar werden vele onderzoeken verricht betreffende de kinetiek van de distributie van intraveneus geïnjecteerd  $^{59}\text{Fe}$ . De meeste publicaties betreffende studies met  $^{59}\text{Fe}$  hebben een beschrijvende aard. Slechts enkele pogingen werden ondernomen om de gegevens meer fundamenteel te interpreteren en dus de grootte van de metabole ijzerpools en de overgang van ijzer tussen de verschillende pools in kwantitatief opzicht in de beschouwingen te betrekken. In het navolgende zullen we een aantal gegevens uit de literatuur vermelden, voorzover deze van principieel belang zijn voor onze proefopzet.

Bepaalde belangrijke aspecten van de ijzerstofwisseling werden reeds uitgebreid weergegeven in de dissertatie van Glaser (1970): "Onderzoeken omtrent het transferrinesysteem" (34), en in de dissertatie van Tavenier (1971): "Een onderzoek naar het niet aan transferrine gebonden ijzer in plasma" (35), zodat hierop niet dieper zal worden ingegaan.

Naar aanleiding van het reeds beschreven onderzoek, verricht door Singh (24), waarbij met behulp van DF als chelaatvormer de labiele ijzerpool kwantitatief gemeten wordt bij drie groepen patienten, en waarbij door genoemde auteur een zeer vage definitie gegeven wordt van de labiele ijzerpool, is het nuttig na te gaan of in de reeds beschreven modelsystemen aandacht werd besteed aan deze "labiele pool". Het ijzer uit deze pool, aldus Singh, zou gechelateerd worden aan DF.

In 1946 deelde Greenberg en Wintrobe (36) mede, dat er een labiele pool zou bestaan die ijzer opnam, afkomstig van haemoglobine-afbraak, van orale absorptie, of ijzer dat geïnjecteerd werd. Wanneer een kleine dosis ijzer intraveneus gegeven werd aan een volwassen dier, wordt dit ijzer, aldus bovengenoemde auteurs, geïncorporeerd in de pool. Wordt daarentegen een grote dosis ijzer ingespoten, dan wordt de capaciteit van de pool overschreden en gaat een gedeelte van het ijzer over in de voorraad. Deze formulering van labiele ijzerpool is echter zo algemeen, dat ze voor ons geen aanknopingspunten biedt. Bovendien bestaat er een grote waarschijnlijkheid, dat Greenberg en Wintrobe met de labiele ijzerpool doelden op het ijzer, gebonden aan het plasma-eiwit transferrine. Immers, dit ijzerbindend plasma-eiwit werd in 1947 door Holmberg en Laurell als transferrine geïntroduceerd en bleek van groot belang in het ijzertransportsysteem.

Uit niet gepubliceerde onderzoeken van Werkman en Schretlen blijkt\*, dat in vitro, bij pH = 7,4, DF in lage concentratie (nl. 18,72  $\mu\text{mol}$ ) toegevoegd aan mengserum, niet in staat is om ijzer te onttrekken aan transferrine. Zodra DF in hogere concentratie aanwezig is (nl. 3,81 mmol), is het in vitro wel in staat bij pH = 7,4 ijzer aan transferrine te onttrekken. Bij pH = 8 gaat er echter, aldus Werkman en Schretlen, minder ijzer over van transferrine naar DF, dit tengevolge van de grotere stabiliteit van het transferrine-ijzercomplex bij pH = 8 dan bij pH = 7,4 (37).

In vitro-proeven, verricht door Wöhler (1963), geven een aanduiding dat DF, onder niet nader gespecificeerde omstandigheden, in staat is ijzer te onttrekken aan transferrine (25).

Het is Hedenberg gelukt aan te tonen, dat DF in de gebruikelijke concentratie in vivo het ijzer niet van het transferrine losmaakt. Bij normale proefpersonen diende Hedenberg intraveneus een tracer dosis  $^{59}\text{Fe}$  toe; 60 minuten later werd intraveneus 15,2  $\mu\text{mol}$  DF/kg lichaamsgewicht geïnjecteerd. Geen effect van DF werd waargenomen op de plasmaverdwijningscurve, de plasma-ijzerturnover en de ijzerexcretie in de urine (33). Indien de definitie van Singh aangehouden wordt, waarin met labiele ijzerpool bedoeld wordt het ijzer dat gechelateerd wordt aan DF, is het duidelijk dat het transferrine-ijzer de labiele pool niet kan zijn.

Er zijn in de loop der tijd talrijke modelsystemen betreffende de ijzerstofwisseling ontworpen, zoals uit Tabel I.3 blijkt.

\* Mondelinge mededeling Dr. Werkman, Katholieke Universiteit Nijmegen.

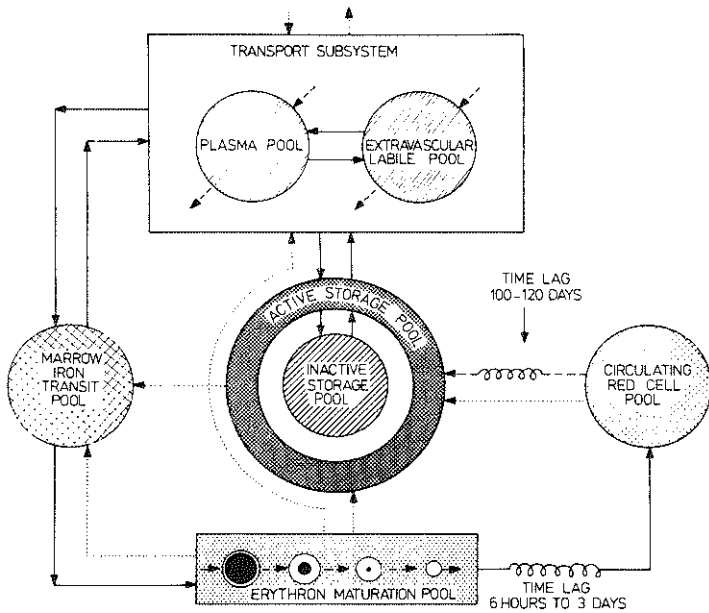
Tabel I.3.

## Overzicht van ontworpen modelsystemen betreffende de ijzerstofwisseling.

---

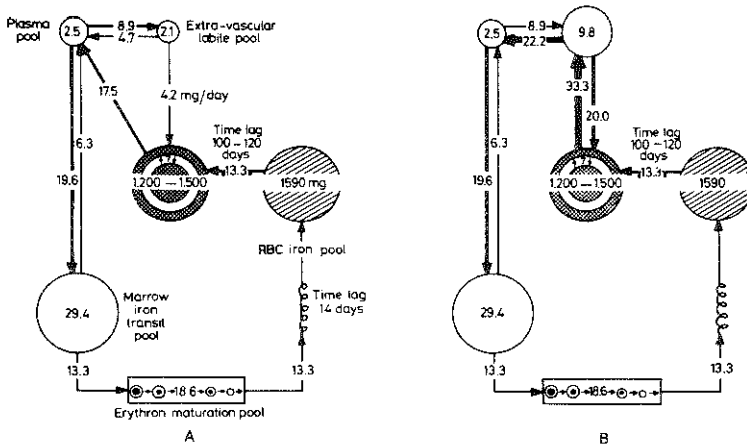
1. 1946	G.R. Greenberg, M.M. Wintrobe (36).	A labile iron pool.
2. 1950	R.L. Huff, T.G. Hennessy, R.E. Austin, J.F. Garcia, B.M. Roberts, J.H. Lawrence (38).	Plasma and red cell iron turnover in normal subjects and in patients having various hematopoetic disorders.
3. 1951	R.L. Huff, P.J. Emlinger, J.F. Garcia, J.M. Oda, M.C. Cockrell, J.H. Lawrence (39).	Ferrokinetics in normal persons and in patients having various hematopoetic disorders.
4. 1954	L. Sharney, L. Schwartz, L.R. Wasserman, S. Port, D. Leavitt (40).	Pool systems in iron metabolism with special refer- ence to Polycythemia Vera.
5. 1956	J.A. Bush, W.N. Jensen, H. Ashenbrucker, G.E. Cartwright, M.M. Wintrobe (41).	The kinetics of iron metabolism in normal growing swine.
6. 1956	J.A. Bush, W.N. Jensen, H. Ashenbrucker, G.E. Cartwright, M.M. Wintrobe (42).	The kinetics of iron metabolism in swine with various experimentally induced anaemias.
7. 1956	R.L. Huff, O.J. Judd (43).	Kinetics of iron metabolism.
8. 1959	L. Garby, W.D. Noyes (44).	Studies on hemoglobin metabolism. The kinetic prop- erties of the plasma hemoglobin pool in normal man.
9. 1959	C.A. Finch (45).	Body iron exchange in man.
10. 1961	M. Pollycove, R. Mortimer (46).	The quantitative determination of iron kinetics and hemoglobin synthesis in human subjects.
11. 1962	M. Pollycove, R. Mortimer (47).	Existence of an erythropoetic labile iron pool in animals.
12. 1963	L. Garby, W. Schneider, O. Sundquist, J.V. Vuille (48).	A ferro erythrokinetic model and its properties.
13. 1963	L. Sharney, L.R. Wasserman, L. Schwartz, D. Tandler (49).	Multiple pool analysis applied to erythrokinetics.
14. 1964	F. Hosain, C.A. Finch (50).	A study of transport iron in plasma: Ferrokinetics.
15. 1965	G.C. Nooney (51).	Iron kinetics and erythron development.
16. 1966	G.C. Nooney (52).	An erythron dependent model of iron kinetics.
17. 1966	F. Hosain, C.A. Finch (53).	A study of internal distribution of iron in man.
18. 1967	F. Hosain, C.A. Finch (54).	Blood ferrokinetics in normal man.
19. 1967	Y. Najean, C. Dresch (55).	Iron metabolism study of different kinetic models in normal conditions.
20. 1967	L. Garby, J.C. Vuille (56).	The iron pools.
21. 1967	B.A. Cheney, K. Lothe, E.H. Morgan, S.K. Sood, C.A. Finch (57).	Internal iron exchange in the rat.
22. 1968	A.K. Singh (24).	Measurement of a labile iron store.
23. 1969	J.J. Desenne, Pedro Armas (58).	A method to estimate an iron pool.
24. 1970	J.D. Cook, G. Marsaglia, J.W. Eschbach, D.D. Funk, C.A. Finch (59).	Ferrokinetics: A biological model for plasma iron exchange in man.

---



Figuur I. 6.

Schematische voorstelling van het multiple poolsysteem, ontworpen door Sharney, Wasserman, Schwartz en Tendler (1963) (49).



Figuur I. 7.

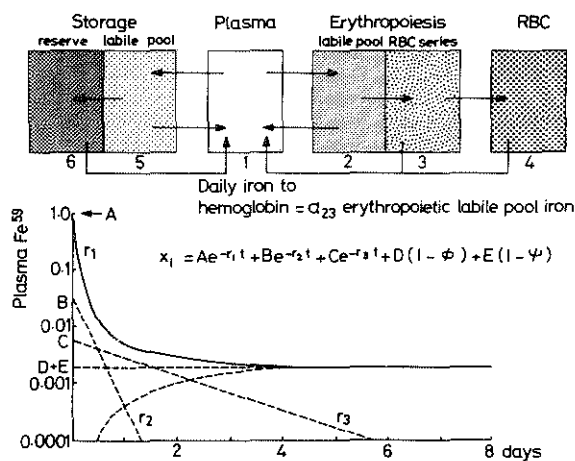
Schematische voorstelling van twee alternatieven van het multiple poolsysteem (49).

Op een drietal, zeer karakteristieke modellen, zullen we nader ingaan. Een schematische voorstelling van het multiple poolsysteem, ontworpen door Sharney, Wasserman, Schwartz en Tendler (1963), wordt weergegeven in Fig. I.6. (49).

Twee alternatieven van het multiple poolsysteem, waarin berekende kwantitatieve gegevens zijn vermeld, worden weergegeven in Fig. I.7.

De uitdrukking "pool" wordt hier op de gebruikelijke wijze benut. Er bestaat een uitwisseling van ijzer met grotere of kleinere snelheid tussen de diverse pools. Het metabole systeem bevindt zich in een dynamisch evenwicht. Het modelsysteem van de bovengenoemde auteurs biedt, evenals de andere modelsystemen van dezelfde soort, een overzichtelijk beeld van onze kennis over de ijzerstofwisseling. Het is echter duidelijk dat er geen aan-grijpingspunten voor de werking van DF zijn aan te wijzen. De uitdrukking "labiele pool" wordt wel, maar in andere zin, gebruikt. Er is geen aan-knopingspunt met Singh's definitie. Een binding van ijzer met DF is slechts mogelijk, indien het ijzer zich in de 3-waardige vorm bevindt. Hierover bevat het modelsysteem geen informatie.

In 1961 werd door Pollycove en Mortimer een model voorgesteld, weergegeven in Fig. I.8. Dit modelsysteem werd opgebouwd op grond van de verdwijningscurve uit bloed van  $^{59}\text{Fe}$ , die te meten is wanneer dit isotoop intraveneus wordt toegediend. In een serie experimenten werd intra-



Figuur I.8.

Modelsysteem betreffende de ijzerstofwisseling, ontworpen door Pollycove en Mortimer (1961) (46).



veneus 30 - 100  $\mu\text{C}$   $^{59}\text{Fe}$  in de vorm van ferrocitraat aan honden toegediend. Op verschillende intervallen werden bloedmonsters genomen. De dieren werden tenslotte opgeofferd en bloedmonsters, beenmerg, lever en milt werden op  $^{59}\text{Fe}$  onderzocht. De gegevens, dus de plasmaverdwiningscurve en de metingen in de diverse organen, wijzen, aldus bovengenoemde auteurs, op het bestaan van een erythroepoëtische labiele pool aan de membranen van onrijpe erythrons. Dit ijzer is afkomstig van plasma-ijzer, gebonden aan transferrine en kan ofwel terug overgaan naar het plasma, ofwel irreversibel overgaan naar de erythrons voor haemsynthese (46). Dit model biedt ons, evenals dat van Wasserman e. a., weinig aanknopingspunten, omdat het niet duidelijk is waarop DF mogelijk zou aangrijpen. In het modelsysteem is geen sprake van de valentie van ijzer. Door deze auteurs wordt het begrip "labiele pool" wel gebruikt, maar ook in andere zin dan door Singh.

De invloed van een DF-injectie op de verdwijningssnelheid van  $^{59}\text{Fe}$ , gebonden aan transferrine, op de ijzerexcretie in de urine en op de incorporatie van ijzer in haem werd, zoals reeds werd beschreven, onderzocht door Hedenberg. Volgens Hedenberg heeft DF geen invloed op de plasma-ijzerturnover, de ijzerexcretie in de urine van transferrine-gebonden ijzer, noch op de incorporatie van dit ijzer in de rode cellen. De vraag of ijzer, afkomstig van haemoglobine-afbraak een bron is voor DF werd door Hedenberg bevestigend beantwoord. In zijn proeven kon hij dit overigens slechts aantonen, wanneer DF werd toegediend 4 - 8 uur nadat een kunstmatige Hb-afbraak was bewerkstelligd, bijvoorbeeld door het infunderen van te oude erythrocyten of van nicotinezuur in het proefdier. Proeven over gewone Hb-afbraak deed Hedenberg niet, dit is een zwak punt.

Het valt op dat slechts in het modelsysteem van Finch (1967) sprake is van ijzer, aanwezig in spier en andere organen. Bij de overige systemen blijft het model beperkt tot het plasma, beenmerg, lever, milt en erythrocyten. Daar uit onze experimenten blijkt, dat DF in staat is om op significante wijze ijzer uit de spier en hersenen te onttrekken, zijn de onderzoekingen, verricht door Finch, voor ons doel van waarde.

Wanneer intraveneus aan ratten een speurdosis  $^{59}\text{FeCl}_3$  werd toegediend, vond Finch een behoorlijke dosis  $^{59}\text{Fe}$  terug in de spier, d. w. z. 6 - 7% van de totale dosis, nadat de ratten op verschillende tijdstippen, variërend van 2,5 uur tot 7 dagen, na de injectie werden opgeofferd. Tijdens het opofferen werden de ratten onderworpen aan een wisseltransfusie, ten einde het radioactief bloed van het proefdier te vervangen door niet-radio-

actief bloed. Spier van voor- en achterpoten werd gehomogeniseerd met koude NaCl. Uit dit homogenaat werden een drietal fracties bereid, nl. de "ferritine"-fractie, de "transferrine"-fractie en de "myoglobine"-fractie. De incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in spier en in de drie fracties staat vermeld in Tabel I.4.

Tabel I.4.

De incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in spier, respectievelijk in drie fracties, bereid uit spierhomogenaat.

	$^{59}\text{Fe}$ als % van totaal $^{59}\text{Fe}$ in organisme	$^{59}\text{Fe}$ als % van dosis, aanwezig in spier		
	totale spier	"ferritine"- fractie	"transferrine"- fractie	"myoglobine"- fractie
2,5 uur	7,3	1	97	1
7 dagen	6,2	47	18	33

Uit Tabel I.4 blijkt dat 2,5 uur na de intraveneuze injectie van de speurdosis  $^{59}\text{FeCl}_3$ , vrijwel de gehele in de spier aanwezige hoeveelheid  $^{59}\text{Fe}$  gevonden wordt in de "transferrine"-fractie. Na een week echter is er een verschuiving opgetreden en vindt men aanzienlijke hoeveelheden  $^{59}\text{Fe}$  in de "ferritine"- en "myoglobine"-fracties (57). Nagegaan moet worden of een van de drie genoemde fracties de labiele ijzerpool volgens Singh vormt.

Uit onze experimenten blijkt dat DF in staat is om op significante wijze ijzer aan de hersenen te onttrekken. Met betrekking tot de stofwisseling van het ijzer in de hersenen zijn in de literatuur weinig gegevens bekend. De uitvoerige onderzoeken, gericht op de overgang van ijzer van de bloedbaan naar de hersenen, en op de overgang van ijzer van de bloedbaan naar het liquorcompartiment en omgekeerd, door Blijenberg beschreven in zijn dissertatie, bieden wel veel informatie, die tot dusver ontbrak, maar geven ons geen aanknopingspunt voor de vraag welk ijzer door DF uit de hersenen wordt onttrokken (60).

## 6. STUDIE NAAR DE RELATIE TUSSEN DF EN FERRITINE

Gezien de in de literatuur geopperde veronderstelling, dat DF ijzer zou onttrekken aan de depots die het reserve-ijzer bevatten, is het noodza-

kelijk in dit verband aandacht aan het ferritine te schenken (61, 62, 63, 33).

In een recente publicatie in 1973 van Crichton (64) wordt nog eens uitvoerig het klassieke beeld, met enkele aanvullingen, van de bouw en de functie van ferritine uiteengezet. Hij beschrijft ferritine als een molecuul, bestaande uit een eiwitgedeelte (diameter 12 nm.) dat een ferrihydroxyfosfaat-kern omvat (diameter 7 nm.). De hoeveelheid ijzer in de micel varieert van 0 tot 4.500 ijzeratomen per molecuul. De ijzervrije eiwitmantel bestaat uit 24 identieke polypeptideketens met molecuulmassa 18.500. Volgens Niitsu zijn de polypeptideketens niet identiek. De drie belangrijkste polypeptideketens hebben een molecuulmassa van 19.000, 10.000 - 11.000, en 7.000 - 8.000 (65). Apoferritine is uiterst stabiel bij pH-waarden tussen 3 en 11, daarbuiten treedt dissociatie van de subunits op. Crichton brengt verder nog een aantal punten naar voren:

1. De ijzerincorporatie in ferritine wordt gekatalyseerd door apoferritine.

De oxidatie van Fe(II) tot Fe(III), in aanwezigheid van geschikte electronenacceptors (zoals  $O_2$ ), wordt ook gekatalyseerd door apoferritine.

2. De mobilisatie van ferritine-ijzer gaat, vergeleken bij de fysiologische snelheid, langzaam wanneer laagmoleculaire reductantia of chelators gebruikt worden.

Het enzym xanthine-oxidase maakt slechts zeer langzaam ijzer los uit ferritine.

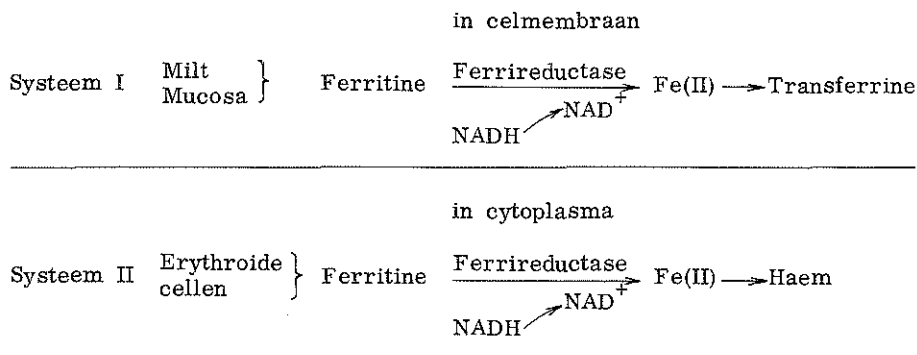
Een NADH-afhankelijk flavoproteïne, ferrireductase genaamd, is wel actief bij de mobilisatie van ijzer via reductie.

3. Hij maakt de volgende vooronderstellingen:

- a. Ferritine-ijzer wordt in de cel gebruikt om alle ijzerbevattende eiwitten te synthetiseren.
- b. Alle cellen bevatten ferritine en ferrireductase. De verdeling van ferrireductase in de cel varieert met het celtype: milt en mucosacellen hebben een membraan-gebonden ferrireductase, terwijl het bij reticulocyten uitsluitend in het cytoplasma voorkomt. De levercellen bezitten ze beide. Dit wordt weergegeven in Fig. I.9.
- c. In de erythroïde cellen zou het Fe(II) door ferritine aan het celmembraan worden opgenomen, terwijl in milt en mucosa het Fe(II) door ferritine in het cytoplasma zou worden opgenomen.

Crichton veronderstelt dat een kleine ijzerpool van laagmoleculaire ijzercomplexen in de cellen zou bestaan. Dit ijzer kan slechts kortstondig los van een eiwitbinding bestaan, indien de overgang van het ene eiwit naar

het andere te langzaam geschiedt, zou hydrolyse en polymerisatie plaatsvinden.



Lever bezit Systeem I en Systeem II

Figuur 1.9.

De mobilisatie van ferritine-ijzer in milt, mucosa, lever en erythroïde cellen via reductie met behulp van het enzym ferrireductase.

Een diepgaand onderzoek naar de rol die ferritine vervult in het ijzermetabolisme, is neergelegd in de dissertatie van Van Kreel in 1972 (66). Hij bestudeerde, in het bijzonder met leverperfusieproeven, de inbouw van aminozuren, ijzer en fosfaat in het ferritine bij de rat. Zijn experimenten omtrent de inbouw van fosfaat in het ferritine wijzen erop, dat het algemeen gangbare beeld, zoals ook nog door Crichton werd uitgelegd, van de ijzerfosfaatmicel in het ferritine veel te statisch is. Van Kreel vond dat ferritinefosfaat in een dynamisch evenwicht is met het anorganisch fosfaat in de lever.

Wat betreft de ijzerincorporatie, werd het door de perfusie-experimenten duidelijk, dat vooral de lichtere fracties veel radioactief ijzer en aminozuren incorporeren. Het ligt voor de hand dit te verklaren door aan te nemen, dat het hier om de-novo synthese gaat. De incorporatie van ijzer in de zwaardere fracties zou dan het opvullen van de ijzermicel betreffen. Uit de proeven volgt ook dat de inbouw van ijzer in ferritine niet direct geschiedt uit het ijzer dat aan transferrine gebonden is; er moet een ijzerpool bestaan tussen serumijzer en het ferritine-ijzer.

De afgifte van ijzer uit het ferritine werd eveneens door hem bestu-

deerd in vivo en met leverperfusies. De mobilisatie van ferritine-ijzer blijkt niet gemakkelijk te zijn.

Zoals uit het voorgaande blijkt zijn er, ondanks het vele onderzoek reeds sinds 1942 over ferritine verricht - zowel wat betreft de structuur, als de functie bij de ijzerstofwisseling - weinig aanknopingspunten in de literatuur bekend voor de eventuele werking van DF op ferritine.

Finch (67) deed in 1973 een aantal experimenten, waarbij hij bewust naar de aangrijpingspunten van DF zocht. Hij gebruikte daartoe de volgende vier met  $^{59}\text{Fe}$  gelabelde complexen, die selectief in lever parenchymcellen en reticulo-endotheliaalcellen gelokaliseerd worden: a) oplosbaar ferritine, b) haemoglobine, gebonden aan haptoglobine, c) geprecipiteerd ferritine, d) beschadigde rode bloedcellen. Deze vier complexen worden door de lever snel uit het bloed opgenomen. Met een ingenieuze doch ingewikkelde methode, waarvan de beschrijving buiten het bestek valt, toont Finch aan dat de complexen a en b de parenchymcellen van de lever labelen, terwijl de complexen c en d door reticulo-endotheliaalcellen worden opgenomen. Aan ratten werd intramusculair  $15,2 \mu\text{mol}$  DF twee maal daags toegediend, beginnende twee uur voor de injectie van de gelabelde complexen, en dit werd gedurende 14 dagen voortgezet. DF veroorzaakte een aanzienlijke verhoging in excretie van  $^{59}\text{Fe}$  door het lichaam, indien de stoffen a en b werden ingespoten, terwijl de verhoging in excretie van reticulo-endotheliaallabels slechts veroorzaakt werd door dat gedeelte van het ijzer, dat gerecirculeerd werd naar de parenchymcellen, nadat het door transferrine losgelaten werd.

Hij verwerpt de theorie van een gemakkelijk chelateerbare, intermediaire ijzerpool in de parenchymcellen, die afkomstig zou zijn van haemafbraak of van de overgang van ijzer van de depots naar transferrine. Hij brengt hiervoor twee argumenten naar voren:

1. De excretie - geïnduceerd door DF - van  $^{59}\text{Fe}$ , afkomstig van het gelabelde haemoglobine-haptoglobinecomplex, was slechts  $1/3$  van de verhoogde excretie van  $^{59}\text{Fe}$ , afkomstig van het met  $^{59}\text{Fe}$  gelabelde oplosbaar ferritine.
2. Wanneer met behulp van aderlatingen de mobilisatie van  $^{59}\text{Fe}$  uit de ferritinedepots bevorderd wordt, ziet men echter geen verhoogde excretie van  $^{59}\text{Fe}$ , geïnduceerd door DF.

Zijn slotconclusie is dat de bron voor het ijzer dat DF aan het organisme onttrekt, gezocht dient te worden in het ferritine-ijzer van de paren-

chymcellen van de lever. Indien organismen overladen zijn met ijzer, zou wellicht DF ook reageren met ijzer in parenchymcellen van andere organen. Wij besloten op grond van deze stelling van Finch et al. enkele proeven te verrichten over de mobilisatie van ferritine-ijzer in de lever door DF.

## HOOFDSTUK II

### MATERIALEN EN METHODEN

#### 1. MATERIALEN

##### 1. Chemicaliën.

De gebruikte chemicaliën waren in alle gevallen van pro-analysekwaliteit.

##### 2. Radioactief ijzer.

Voor alle experimenten, uitgezonderd de perfusieproeven, werd  $^{59}\text{Fe(III)}$ -chloride van N.V. Philips-Duphar gebruikt.

De oplossing was niet dragervrij. Ze bevatte 0,2 - 0,4  $\mu\text{mol } ^{56}\text{Fe}/100 \mu\text{C}$  als drager. Voor de perfusieproeven werd gebruik gemaakt van  $^{59}\text{Fe(III)}$ -citraat, geleverd door Nenimij B.V.

De oplossing bevatte 0,1 - 0,2  $\mu\text{mol } ^{56}\text{Fe}/100 \mu\text{C}$  als drager.

##### 3. Proefdieren.

Voor alle experimenten werd gebruik gemaakt van Wistar ratten.

Geslacht : mannelijk.

Gewicht : 250 - 300 g.

#### 2. METHODEN

##### Biologische methoden

##### 1. Het houden van de proefdieren in het laboratorium.

De ratten werden in stofwisselingskooien geplaatst, waardoor het opvangen van urine en faeces mogelijk werd.

## 2. Verdoving van de proefdieren.

De ratten werden verdoofd met behulp van Hypnorm (N.V. Philips-Duphar), dat intramusculair werd toegediend in een hoeveelheid, variërende van 0,1 - 0,2 ml/100 g lichaamsgewicht (concentratie-oplossing: 10 mg Fluanison/0,2 mg Fentanylbase).

## 3. Bloedvrij spoelen van de rat.

Met behulp van een canule (50 mm x 1,5 mm) werd fysiologisch zout ingebracht via het linker ventrikel in de aorta, waardoor het totaal circulerend volume vergroot werd. Hierdoor zwol het rechter atrium op, wat vervolgens doorgeknipt werd. Als antistollingsmiddel werd 0,3 ml heparine-oplossing intraveneus toegediend (Thromboliquine 5000 I.U./ml, N.V. Organon Oss).

## 4. Anaemisch maken van de ratten.

De ratten werden anaemisch gemaakt door middel van aderlatingen. Met behulp van een orbitaalpunctie werd 12 ml bloed afgenomen in een tijdsperiode van vier achtereenvolgende dagen. De haematocrietwaarde schommelde tussen 0,20 en 0,25 l/l.

De ratten werden sterk anaemisch gemaakt door de hierboven beschreven procedure gedurende drie weken te volgen met een tussenperiode van drie dagen.

## 5. Overladen van de ratten.

Ratten werden overladen met intramusculaire injecties van ijzerdextran (Imferon, Brocades - 178  $\mu$ mol ijzer per dag gedurende vier dagen) en met intramusculaire injecties van ijzer-sorbitol (Jectofer, Astra Chemicals and Pharmaceuticals - 178  $\mu$ mol ijzer per dag gedurende vier dagen).

## 6. DF-toediening.

Desferrioxamine B methaan sulfaat (molmassa 656, geleverd door de firma Ciba) werd aan ratten intramusculair toegediend.

## Chemische methoden

### IJzerbepalingen

#### a. In plasma.

Het ijzergehalte in plasma werd bepaald volgens Trinder (1956) (68). De reactie berust op de vorming van het gekleurde ferrobathophenantroline-disulfonzuurcomplex. De extinctie werd gemeten bij 535 nm.



b. In urine.

We hebben hier gebruik gemaakt van de door Tavenier et al. (1971) beschreven methode (69).

c. In organen.

Nadat de ratten, zoals hiervoor beschreven, bloedvrij waren gemaakt, werden de organen verwijderd en gedroogd gedurende 48 uur bij 80°C. Nadat het drooggewicht was bepaald, werd na homogeniseren een gedeelte van de organen nat gedeutereerd met 1 ml 12 molair HClO<sub>4</sub> (H<sup>+</sup>). Wanneer de destructie volledig was, de oplossing is dan kleurloos, werd de gecalibreerde reageerbuis met aquabidest aangevuld tot 10 ml, waarna de ijzerbepaling volgde. Hiertoe werd aan 2 ml monster 1 ml 1 molair HCl (H<sup>+</sup>) en 3 ml 0,1 molair Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> toegevoegd. Na 15 minuten werd de oplossing met behulp van 2 ml Na-acetaatbuffer 4 molair op pH = 5 gebracht, waarna 1 ml bathophenantrolinedisulfonzuur 0,42 molair werd toegevoegd, zodat de kleur ontwikkeld werd. Na 15 minuten werd de extinctie bij 535 nm gemeten.

d. Voor de isolatie van het ferritine, de scheiding van ferritine en apoferritine door middel van centrifugatie in een isokinetische sucrosegradiënt, de analyse van monsters, afkomstig van sucrosegradiëntcentrifugatie, en voor de perfusietechniek wordt verwezen naar het proefschrift van Van Kreel (1972) (66).

e. Beschrijving van de scheidingstechniek van drie fracties, de "ferritine"-fractie, de "transferrine"-fractie en de "myoglobine"-fractie, bereid uit spierhomogenaat volgens de methode van Finch (1967) (57). Spierweefsel werd gehomogeniseerd. Aan dit homogenaat werd fysiologisch zout gevoegd in een hoeveelheid, gelijk aan drie keer het gewicht aan spierweefsel. De suspensie werd gecentrifugeerd bij 12.000 g gedurende 15 minuten bij 0°C. Het precipitaat werd daarna nog twee keer met fysiologisch zout gewassen. Aan het supernatant werd 40% ammoniumsulfaat toegevoegd, waarna de "ferritine"-fractie precipiteerde. Het supernatant werd gedialyseerd tegen EDTA-Na-acetaatbuffer pH = 5,5. De buitenvloeistof leverde de "transferrine"-fractie op, dit is de ijzerfractie die aan transferrine gebonden was. De binnenvloeistof werd vacuüm gedialyseerd tegen een fosfaatbuffer 0,02 molair pH = 6,8. De geconcentreerde oplossing werd op een carboxymethylcellulosekolom gebracht. Na elutie leverde dit de "myoglobine"-fractie.

## Statistische methoden

De significanties werden berekend met de t-test van Student. De standaardafwijking werd voor een aantal waarnemingen, groter dan vijf, op de gebruikelijke wijze, via de wortel uit de variantie, berekend. Voor een aantal waarnemingen, kleiner dan vijf, werd de standaardafwijking berekend uit de spreidingsbreedte volgens voorschrift van het Nederlands Normalisatie Instituut.

De correlaties werden berekend met de correlatiecoëfficiënt (Wijkate, M.L., Verklarende Statistiek) (74).

### 3. APPARATUUR

Voor de meting van de radioactiviteit werd gebruik gemaakt van een Philips  $\gamma$  teller, type PW 4280/01-4237-4003.

Als spectrofotometer gebruikten wij de Zeiss, type PMQ II.

### HOOFDSTUK III

#### STUDIE NAAR DE INVLOED VAN DESFERRIOXAMINE EN FERRIOXAMINE OP DE IJZERVERDELING IN HET ORGA- NISME VAN DE RAT EN ANALYSE VAN SINGH'S MEET- METHODE BETREFFENDE DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN EEN LABIELE IJZERPOOL

##### 1. INLEIDING

Zoals uit het literatuuroverzicht blijkt, zou volgens sommige auteurs (Wöhler, Schmid, Hallberg en Hedenberg, Ploem) de ijzerexcretie, geïnduceerd door DF, in gevallen van ijzeroverlading significant hoger liggen dan bij normale ijzervoorraad. Dit zou erop wijzen dat de ijzerexcretie in de urine, geïnduceerd door DF, gecorreleerd kan worden met de grootte van de ijzerreserve in het lichaam (14, 16, 17, 18).

Andere auteurs (Brown, Hwang, Allgood) trekken het bestaan van deze correlatie in twijfel (23).

Er zijn slechts weinig gegevens bekend omtrent de oorsprong van de ijzerexcretie in de urine, geïnduceerd door DF. Wij meenden daarom de volgende experimenten te moeten verrichten:

1. De bepaling van het ijzergehalte in de verschillende organen bij normale ratten, bij ratten met een op kunstmatige wijze bereikte ijzerstapeling en bij anaemische ratten.
2. De invloed van DF op het ijzergehalte in de verschillende organen van normale, overladen en anaemische ratten.

Singh beschrijft een methode om de labiele ijzervoorraadpool te meten met behulp van gemerkt ijzer en DF als chelator (24). De grootte van deze pool berekent hij, zoals reeds eerder opgemerkt als volgt:

$$\text{Labile iron store (mg)} = \frac{{}^{59}\text{Fe in labile iron pool}}{{}^{59}\text{Fe in urine}} \times \text{urinary iron (mg)}.$$

De formule van Singh is gebaseerd op de veronderstelling dat er een labiele ijzerpool bestaat, waarvan de specifieke activiteit gelijk is aan de specifieke activiteit van ijzer, uitgescheiden in de urine na DF-toediening. Teneinde de formule van Singh te toetsen, is het niet voldoende de vermindering van het ijzergehalte in de verschillende organen onder invloed van DF te vergelijken met de grootte van de labiele pool, gemeten volgens Singh. Het is tevens nodig de specifieke activiteit van ijzer in de verschillende weefsels te vergelijken met de specifieke activiteit van ijzer in de urine na toediening van DF.

Wij deden met ratten de volgende experimenten:

1. Het kwantitatief bepalen van het ijzergehalte in de organen van normale ratten, van ratten met een op kunstmatige wijze bereikte ijzerstapeling en van anaemische ratten, en het vergelijken met de labiele ijzervoorraadpool, gemeten volgens de methode van Singh.
2. Het bepalen van de specifieke activiteit van ijzer in de urine en in de verschillende organen.

Zoals uit het literatuuroverzicht blijkt, bestaan over het lot van ferrioxamine in het organisme tegenstrijdige opvattingen. Indien de opvatting dat het aldus gebonden ijzer geutiliseerd kan worden, juist is, heeft dit betekenis voor de theoretische beschouwing van Singh's techniek. Vandaar dat wij ook enkele proeven deden aangaande de distributie en uitscheiding in urine van  ${}^{59}\text{Fe}$  in ratten, geïnjecteerd in de vorm van volledig met ijzer verzadigd ferrioxamine.

## 2. BEPALING VAN HET IJZERGEHALTE IN DE VERSCHILLENDE ORGANEN VAN NORMALE, OVERLADEN, ANAEMISCHE EN STERK ANAEMISCHE RATTEN, EN DE INVLOED VAN DF OP DIT IJZERGEHALTE

Teneinde een inzicht te krijgen in het gedragspatroon van DF in normale en pathologische omstandigheden, is het nodig het ijzergehalte in de

verschillende organen bij ratten te bepalen. De resultaten worden weergegeven in Tabel III.1.

Tabel III.1.

Gemiddelde waarden van het ijzergehalte in de organen van normale, anaemische, sterk anaemische en overladen ratten, uitgedrukt in  $\mu\text{mol/g}$  droogweefsel, en in de 24 uurs-urine, uitgedrukt in  $\mu\text{mol/24}$  uur. Aanduiding van de significanties tussen de verschillende reeksen waarnemingen, berekend met de t-test van Student.

	Normale		Anaemische		Sterk anaemische		Overladen	
	N = 15	S	N = 5	S	N = 5	S	N = 10	S
lever	7,6	1,0	2,6	0,4	1,0	0,1	22,1	2,9
milt	34,8	6,3	7,3	1,0	7,1	0,9	37,8	5,3
hart	5,3	0,7	5,1	0,6	5,0	0,4	8,0	1,0
nieren	7,6	0,7	5,5	0,6	1,2	0,3	7,1	0,9
hersenen	2,8	0,5	1,7	0,2	1,0	0,2	2,8	0,5
spier	2,5	0,5	3,0	1,0	0,1	0,03	10,7	1,5
urine, 24 uurs	$15 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$	$13 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$13 \cdot 10^{-3}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$30 \cdot 10^{-3}$	$9,1 \cdot 10^{-3}$
faeces, 24 uurs	15	1,9					22,6	2,9

	Normale-Anaemische	Normale-Sterk anaemische	Normale-Overladen
lever	$P < 0,0005$	$P < 0,0005$	$P < 0,0005$
milt	$P < 0,0005$	$P < 0,0005$	0,10 $< P < 0,15$
hart	0,25 $< P < 0,30$	0,15 $< P < 0,20$	$P < 0,0005$
nieren	0,25 $< P < 0,30$	$P < 0,0005$	0,05 $< P < 0,10$
hersenen	$P < 0,0005$	$P < 0,0005$	$P < 0,5$
spier	0,10 $< P < 0,15$	$P < 0,0005$	$P < 0,0005$
urine, 24 uurs	0,25 $< P < 0,30$	0,25 $< P < 0,30$	$P < 0,0005$
faeces, 24 uurs			0,0125 $< P < 0,025$

Zoals Tabel III.1. toont ligt het ijzergehalte in lever, milt en hersenen significant lager bij anaemische en sterk anaemische ratten, terwijl eveneens het ijzergehalte in nieren en spier bij de sterk anaemisch gemaakte ratten significant verschilt van het ijzergehalte bij normale ratten. Bij overladen ratten ligt het ijzergehalte in lever, hart en spier significant hoger.

Tabel III. 2

Gemiddelde waarden voor het ijzergehalte in organen van normale ratten en ratten die een dosis van 36  $\mu$ mol DF toegediend kregen. Het ijzergehalte is uitgedrukt in  $\mu$ mol/g droogweefsel. Het ijzergehalte in de urine is uitgedrukt in  $\mu$ mol/24 uurs-urine.

	Normale		Normale + 36 $\mu$ mol DF		P-waarde
	N = 15	S	N = 15	S	
lever	7,6	1,0	5,3	0,5	0,0125 < P < 0,025
milt	34,8	6,3	30,0	3,2	0,005 < P < 0,01
hart	5,3	0,7	4,6	0,7	0,005 < P < 0,01
nieren	7,6	0,7	5,0	0,5	P < 0,0005
hersenen	2,8	0,5	1,4	0,2	P < 0,0005
spier	2,5	0,5	1,4	0,2	P < 0,0005
urine, 24 uurs	$15 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$	$100 \cdot 10^{-3}$	$22 \cdot 10^{-3}$	P < 0,0005
faeces, 24 uurs	15	1,9	18,7	2,0	0,05 < P < 0,10

Tabel III. 3.

Gemiddelde waarden voor het ijzergehalte in de organen van anaemische ratten en anaemische ratten die behandeld werden met 36  $\mu$ mol DF. Het ijzergehalte is uitgedrukt in  $\mu$ mol/g droogweefsel. Het ijzergehalte in de urine is uitgedrukt in  $\mu$ mol/24 uurs-urine.

	Anaemische		Anaemische + 36 $\mu$ mol DF		P-waarde
	N = 5	S	N = 5	S	
lever	2,6	0,4	2,6	0,3	P < 0,5
milt	7,3	1,0	7,1	1,0	0,35 < P < 0,40
hart	5,1	0,6	4,6	0,5	0,05 < P < 0,10
nieren	5,5	0,6	3,2	0,5	P < 0,0005
hersenen	1,7	0,2	1,7	0,2	P < 0,5
spier	3,0	1,0	1,9	0,3	0,0125 < P < 0,025
urine, 24 uurs	$13 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$150 \cdot 10^{-3}$	$21 \cdot 10^{-3}$	P < 0,0005

Tabel III. 4.

Gemiddelde waarden voor het ijzergehalte in de organen van sterk anaemische ratten en sterk anaemische ratten die behandeld werden met 36  $\mu\text{mol DF}$ . Het ijzergehalte is uitgedrukt in  $\mu\text{mol/g}$  droogweefsel. Het ijzergehalte in de urine is uitgedrukt in  $\mu\text{mol/24 uurs-urine}$ .

	Sterk anaemische		Sterk anaemische + 36 $\mu\text{mol DF}$		P-waarde
	N = 5	S	N = 5	S	
lever	1,0	0,1	1,0	0,1	P > 0,5
milt	7,1	0,9	6,2	0,8	0,25 < P < 0,30
hart	5,0	0,4	4,8	0,3	0,15 < P < 0,20
nieren	1,2	0,3	1,1	0,3	0,30 < P < 0,35
hersenen	1,0	0,2	1,1	0,2	0,20 < P < 0,25
spier	0,1	0,03	0,1	0,03	P > 0,5
urine, 24 uurs	13.10 <sup>-3</sup>	5,2.10 <sup>-3</sup>	142.10 <sup>-3</sup>	16.10 <sup>-3</sup>	P < 0,0005

Zoals blijkt uit Tabel III.2. wordt reeds met behulp van een enkelvoudige injectie van 36  $\mu\text{mol DF}$  bij normale ratten het ijzergehalte in lever, milt, hart, nieren, hersenen en spier significant verminderd. Bij anaemische ratten levert deze DF-injectie niet hetzelfde resultaat op. Slechts het ijzergehalte in nieren en spier wordt door deze injectie significant lager. Bij sterk anaemische ratten wordt onder invloed van een DF-injectie van 36  $\mu\text{mol}$  geen significante daling van het ijzergehalte in de verschillende organen waargenomen. Bij overladen ratten wordt evenmin dit effect in dezelfde mate waargenomen als bij normale ratten. Slechts het ijzergehalte in hersenen en spier wordt bij deze ratten significant lager. De ratten werden overladen met behulp van Imferon (178,5  $\mu\text{mol}$  daags gedurende vier dagen). Het is niet onmogelijk dat ijzer, afkomstig van geïnjectieerd ijzer-dextran, gestapeld wordt in een chemische vorm die slecht toegankelijk is voor cheelaatvorming met DF. Een mogelijkheid is dat dit ijzer, parenteraal gegeven, bij voorkeur het reticulo-endotheliale systeem benadert, en dat het ijzer in dit systeem niet zo gemakkelijk gechelateerd wordt aan DF als parenchym leverijzer (33).

Teneinde dit nader te onderzoeken hebben we ratten overladen met Jectofer, waarvan gesteld wordt dat het ijzer snel geabsorbeerd wordt vanuit de plaats van injectie. Het verschil in absorptie en excretie tussen Imferon en Jectofer ligt waarschijnlijk aan het verschil in molecuulmassa. De-

Tabel III.5.

Gemiddelde waarden voor het ijzergehalte in organen van overladen ratten (714  $\mu\text{mol}$  ijzer in de vorm van ijzer-dextran; zonder DF-injectie - met injectie van 36  $\mu\text{mol}$  DF - met injectie van 360  $\mu\text{mol}$  DF). Het ijzergehalte is uitgedrukt in  $\mu\text{mol/g}$  droogweefsel. De significantie tussen de verschillende reeksen is eveneens weergegeven.

	Overladen		Overladen + 36 $\mu\text{mol}$ DF		Overladen + 360 $\mu\text{mol}$ DF	
	N = 10	S	N = 10	S	N = 10	S
lever	22,1	2,9	21,4	2,8	18,2	3,0
milt	37,8	5,3	41,0	5,5	35,3	4,9
hart	8,0	1,0	7,6	0,9	8,0	0,9
nieren	7,1	0,9	7,1	0,8	7,1	0,9
hersenen	2,8	0,5	2,0	0,3	2,1	0,3
spier	8,0	1,1	6,6	0,8	4,8	0,7
urine, 24 uren	$30 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-3}$	$125 \cdot 10^{-3}$	$22 \cdot 10^{-3}$	$2.630 \cdot 10^{-3}$	$425 \cdot 10^{-3}$
faeces, 24 uren	22,6	2,9	29,7	3,9	35,2	4,6

	Overladen - Overladen + 36 $\mu\text{mol}$ DF		Overladen - Overladen + 360 $\mu\text{mol}$ DF	
lever	0,25	$\langle P \langle 0,30$	0,25	$\langle P \langle 0,30$
milt	0,10	$\langle P \langle 0,15$	0,10	$\langle P \langle 0,15$
hart	0,15	$\langle P \langle 0,20$		$P \langle 0,5$
nieren		$P \langle 0,5$		$P \langle 0,5$
hersenen		$P \langle 0,0005$		$P \langle 0,0005$
spier	0,0005	$\langle P \langle 0,0025$		$P \langle 0,0005$
urine, 24 uren		$P \langle 0,0005$		$P \langle 0,0005$
faeces, 24 uren	0,025	$\langle P \langle 0,05$	0,01	$\langle P \langle 0,0125$

ze ligt beneden de 5000 voor het ijzer-sorbitolcomplex, terwijl deze voor ijzer-dextran ongeveer 180000 bedraagt. De "utilisatie" van het geïnjecteerde  $^{59}\text{Fe}$ -ijzer-sorbitolcomplex is "maximaal" 14 dagen na injectie, terwijl deze "maximale utilisatie" zelfs na 120 dagen niet bereikt wordt, wanneer



<sup>59</sup>Fe-Imferon geïnjectieerd wordt (Andersson, 1961) (70). Met "maximale utilisatie" bedoelt deze auteur dat de Hb-stijging zijn maximum heeft bereikt. Wanneer deze met Jectofer opgeladen ratten (1e reeks: 714  $\mu$ mol ijzer, 2e reeks: 3 x 714  $\mu$ mol ijzer) behandeld worden met DF, ziet men echter noch met een injectie van 36  $\mu$ mol, noch met een injectie van 360  $\mu$ mol, noch met 10 x herhaalde injecties van 36  $\mu$ mol DF een significante vermindering van het ijzer in de verschillende organen. De resultaten worden weergegeven in Tabel III.6. en Tabel III.7.

Tabel III.6.

Gemiddelde waarden voor het ijzergehalte in de organen van overladen ratten (714  $\mu$ mol ijzer in de vorm van ijzer-sorbitolcomplex), uitgedrukt in  $\mu$ mol/g droogweefsel, en in de urine, uitgedrukt in  $\mu$ mol/24 uur (zonder DF - met injectie van 36  $\mu$ mol DF, 360  $\mu$ mol DF en 10 x 36  $\mu$ mol DF). De significantie tussen de verschillende reeksen is weergegeven.

	Overladen 714 $\mu$ mol ijzer		Overladen + 36 $\mu$ mol DF		Overladen + 360 $\mu$ mol DF		Overladen + 10 x 36 $\mu$ mol DF	
	N = 5	S	N = 5	S	N = 5	S	N = 5	S
lever	17,6	11,7	17,1	1,6	16,6	1,5	16,8	1,4
milt	26,3	2,0	26,0	1,9	22,3	1,8	23,4	2,0
hart	7,2	0,6	7,0	0,3	7,0	0,5	7,2	0,3
nieren	14,7	1,9	14,4	1,5	15,0	1,7	14,8	1,8
hersenen	2,6	0,3	2,4	0,2	2,4	0,2	2,4	0,2
spier	3,5	0,5	3,3	0,6	3,0	0,5	3,4	0,6
urine, 24 uurs	4,5	0,7	4,4	0,7	14,0	2,1	4,4	0,8

	Overladen - Overladen + 36 $\mu$ mol DF		Overladen - Overladen + 360 $\mu$ mol DF		Overladen - Overladen + 10 x 36 $\mu$ mol DF	
	0,30 < P < 0,35	0,40 < P < 0,45	0,25 < P < 0,30	0,35 < P < 0,40	0,25 < P < 0,30	0,45 < P < 0,475
lever	0,30 < P < 0,35	0,40 < P < 0,45	0,15 < P < 0,20	0,35 < P < 0,40	0,20 < P < 0,25	0,45 < P < 0,475
milt	0,40 < P < 0,45	0,25 < P < 0,30	0,005 < P < 0,01	0,10 < P < 0,15	0,025 < P < 0,05	0,10 < P < 0,15
hart	0,25 < P < 0,30	0,35 < P < 0,40	0,25 < P < 0,30	0,05 < P < 0,10	P < 0,5	0,35 < P < 0,40
nieren	0,35 < P < 0,40	0,05 < P < 0,10	0,35 < P < 0,40	0,10 < P < 0,15	0,10 < P < 0,15	0,35 < P < 0,40
hersenen	0,05 < P < 0,10	0,25 < P < 0,30	0,10 < P < 0,15	0,05 < P < 0,10	0,10 < P < 0,15	0,35 < P < 0,40
spier	0,25 < P < 0,30	0,40 < P < 0,45	0,05 < P < 0,10	P < 0,0005	0,40 < P < 0,45	0,40 < P < 0,45
urine, 24 uurs	0,40 < P < 0,45					

Tabel III.7

Gemiddelde waarden voor het ijzergehalte in de organen van overladen ratten (3 x 714  $\mu\text{mol}$  ijzer in de vorm van ijzer-sorbitolcomplex), uitgedrukt in  $\mu\text{mol/g}$  droogweefsel, en in de urine, uitgedrukt in  $\mu\text{mol/24}$  uur (zonder DF - met injectie van 36  $\mu\text{mol}$  DF, 360  $\mu\text{mol}$  DF en 10 x 36  $\mu\text{mol}$  DF). De significantie tussen de verschillende reeksen is weergegeven.

	Overladen		Overladen +		Overladen +		Overladen +	
	3 x 714 $\mu\text{mol}$		36 $\mu\text{mol}$ DF		360 $\mu\text{mol}$ DF		10 x 36 $\mu\text{mol}$ DF	
	N = 5	S	N = 5	S	N = 5	S	N = 5	S
lever	17,0	1,0	16,8	0,9	17,0	1,0	16,9	1,5
milt	26,0	1,6	25,4	1,5	25,1	1,5	25,8	1,5
hart	10,0	0,2	10,0	0,3	10,1	0,2	10,2	0,3
nieren	16,3	0,4	16,2	0,3	16,2	0,3	16,3	0,4
hersenen	2,3	0,1	2,3	0,1	2,3	0,1	2,2	0,1
spier	3,3	0,3	3,3	0,3	3,1	0,4	3,3	0,4
urine, 24 uren	4,5	0,6	4,4	0,7	9,6	0,5	4,5	0,6

	Overladen - Overladen		Overladen - Overladen		Overladen - Overladen	
	+ 36 $\mu\text{mol}$ DF		+ 360 $\mu\text{mol}$ DF		+ 10 x 36 $\mu\text{mol}$ DF	
lever	0,35 < P < 0,40		P < 0,5		0,45 < P < 0,475	
milt	0,25 < P < 0,30		0,15 < P < 0,20		0,40 < P < 0,45	
hart	P < 0,5		0,20 < P < 0,25		0,10 < P < 0,15	
nieren	0,30 < P < 0,35		0,30 < P < 0,35		P < 0,5	
hersenen	P < 0,5		P < 0,5		0,05 < P < 0,10	
spier	P < 0,5		0,15 < P < 0,20		P < 0,5	
urine, 24 uren	0,40 < P < 0,45		P < 0,0005		0,40 < P < 0,45	

Samenvattend zijn onze conclusies uit deze experimenten:

- In het algemeen is de spier de voornaamste bron voor de onttrekking van ijzer door DF.
- Het ijzer in spier is, in tegenstelling tot het ijzer in lever, bij anaemische dieren door DF nog sterk te mobiliseren.
- Bij normale ratten is de daling van het ijzergehalte in de hersenen, geïnduceerd door DF, percentueel zeer groot.
- De ijzerexcretie in de urine is door DF significant verhoogd, maar gering vergeleken bij de faecale ijzerexcretie.

- Ratten, overladen met ijzer-sorbitol, geven een spontane ijzeruitscheiding in de urine, die 3000 maal hoger ligt dan bij normale dieren.

### 3. ONDERZOEK BETREFFENDE DE LABIELE IJZERPOOL, GEMETEN VOLGENS SINGH

De formule van Singh werd door ons met behulp van experimenten op ratten getoetst, teneinde meer inzicht te verkrijgen in het werkingsmechanisme van DF. De resultaten zijn vermeld in Tabel III.8. en III.9.

Tabel III.8.

Vergelijking tussen experimenteel bepaalde ijzergehalte in de organen van ratten, en ijzergehalte in de labiele ijzerpool, gemeten volgens Singh's methode.

	I Lever $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	II Milt $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	III Spier mol Fe/ totaal	IV Hersenen $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	V Nieren $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	Som van I, II, III, IV, V	Labiele pool ge- meten vol- gens Singh
1.	28,5	2,1	17,8	0,54	2,1	51,0	28,9
2.	50,0	3,9	16,0	0,46	2,2	72,6	65,0
3.	21,7	6,1	14,2	0,51	1,9	44,4	25,1
4.	25,0	10,7	19,6	0,60	2,1	58,0	42,8
5.	8,7	2,1	18,7	0,53	1,7	31,7	11,7
6.	20,3	3,0	17,8	0,44	1,9	43,4	24,2
7.	10,0	3,2	20,5	0,67	1,9	36,3	34,2
8.	13,5	2,6	17,8	0,46	2,0	36,4	30,5
9.	7,5	2,6	18,2	0,78	1,7	30,8	18,9
10.	16,7	3,5	17,5	0,67	1,9	40,3	31,9
11.	19,6	2,3	21,4	0,51	1,8	45,6	31,9
12.	12,6	2,3	18,7	0,64	1,8	36,0	36,4

Uit Tabel III.8. volgt dat er een significant positieve correlatie bestaat tussen leverijzer en ijzer in de labiele ijzerpool:

$$n = 12, \quad r = 0,795, \quad 0,0005 < P < 0,0025.$$

Eveneens bestaat de correlatie tussen de hoeveelheid ijzer in lever en milt samen, en de hoeveelheid ijzer in de labiele pool:

$$n = 12, \quad r = 0,803, \quad 0,0005 < P < 0,0025.$$

Zo ook bestaat de correlatie tussen het totale ijzergehalte en het ijzer in de pool:

$$n = 12, \quad r = 0,829, \quad P < 0,0005.$$

Tabel III.9.

Specifieke activiteit van ijzer in de urine en in de verschillende organen van de rat.

	Urine	Lever	Milt	Spier	Hersenen	Nieren
	dpm/ $\mu$ mol	dpm/ $\mu$ mol	dpm/ $\mu$ mol	dpm/ $\mu$ mol	dpm/ $\mu$ mol	dpm/ $\mu$ mol
3.	149400	111072	31668	----	-----	52722
4.	103236	118176	15036	----	-----	36278
7.	121824	113400	28644	5952	28656	43105
8.	114900	88968	46980	6480	38868	40610
9.	159936	114180	47148	6804	34152	56198
10.	104400	105120	45120	6984	29004	36790
11.	109704	112092	55404	6348	35292	38599
12.	165516	109464	56340	6348	26052	58286

Uit Tabel III.9. volgt dat de specifieke activiteit van ijzer in de lever op het eerste gezicht van dezelfde orde van grootte is als de specifieke activiteit van ijzer in de urine.

Er bestaat echter geen significant positieve correlatie:

$$n = 8, \quad r = 0,167, \quad 0,30 < P < 0,35.$$

Dit is een opvallend resultaat. Er bestaat echter wel een significant positieve correlatie tussen de specifieke activiteit van ijzer in de nieren en de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening:

$$n = 8, \quad r = 0,965, \quad P < 0,0005.$$

Een en ander is in strijd met Singh's uitgangspunt.

Om een beter inzicht te verkrijgen in de grootte en de aard van de labiele pool werden deze rattenexperimenten eveneens verricht op overladen ratten en op anaemische ratten. De resultaten zijn vermeld in Tabel III.10., III.11., III.12. en III.13.

Uit Tabel III.10. volgt dat er een significant positieve correlatie bestaat tussen leverijzer en ijzer in de labiele pool bij overladen ratten:

$$n = 5, \quad r = 0,864, \quad 0,025 < P < 0,05.$$

Eveneens bestaat een correlatie bij overladen ratten tussen de hoeveelheid ijzer in lever en milt samen, en de hoeveelheid ijzer in de labiele pool:

$$n = 5, \quad r = 0,817, \quad 0,025 < P < 0,05.$$

Er bestaat echter geen significant positieve correlatie bij overladen ratten tussen het totale ijzergehalte en het ijzergehalte in de labiele pool:

$$n = 5, \quad r = 0,557, \quad 0,10 < P < 0,15.$$

Deze correlatie was wel significant positief bij normale ratten.

Uit Tabel III.11. volgt dat er bij overladen ratten een significant positieve correlatie bestaat tussen de specifieke activiteit van ijzer in de lever en de specifieke activiteit van ijzer in de urine:

$$n = 5, \quad r = 0,924, \quad 0,0005 < P < 0,0025.$$

Bij normale ratten vonden wij deze correlatie niet.

Uit Tabel III.12. volgt dat er bij anaemische ratten geen significant positieve correlatie bestaat tussen leverijzer en ijzer uit de labiele pool,

$n = 4, r = 0, P > 0,5$ , noch tussen ijzer in lever en milt samen, en ijzer uit de labiele pool,  $n = 4, r = 0, P > 0,5$ , noch tussen het totale ijzer en ijzer in de labiele pool,  $n = 4, r = 0, P > 0,5$ .

Het ijzergehalte in de labiele pool, bepaald volgens Singh's methode, is bij anaemische ratten niet meetbaar. Dit is een opvallend resultaat.

Uit Tabel III.13. volgt dat er evenmin een significant positieve correlatie bestaat tussen de specifieke activiteit van ijzer in de lever en de specifieke activiteit van ijzer in de urine:

$$n = 4, \quad r = 0,039, \quad 0,475 < P < 0,4875.$$

Tabel III.10.

Vergelijking tussen experimenteel bepaalde ijzergehalte in organen van overladen ratten (714  $\mu\text{mol}$  ijzer in de vorm van ijzer-dextran), en ijzergehalte in de labiele ijzerpool, gemeten volgens Singh's methode.

	I Lever $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	II Milt $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	III Spier $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	IV Hersenen $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	Som van I, II, III, IV	Labiele pool ge- meten vol- gens Singh
1.	35,3	2,4	163,7	0,75	202,2	25,1
2.	26,8	1,1	122,3	0,59	150,8	32,0
3.	28,6	1,5	145,8	0,58	176,5	20,8
4.	71,5	2,6	131,6	0,59	206,3	55,6
5.	31,7	2,5	124,4	0,76	159,4	10,2

Tabel III. 11.

Specifieke activiteit van ijzer in de urine en in de verschillende organen van overladen ratten  
(714  $\mu\text{mol}$  ijzer in de vorm van ijzer-dextran).

	Urine dpm/ $\mu\text{mol}$	Lever dpm/ $\mu\text{mol}$	Milt dpm/ $\mu\text{mol}$	Spier dpm/ $\mu\text{mol}$	Hersenen dpm/ $\mu\text{mol}$
1.	68628	71184	32520	2473	28428
2.	113400	158004	53700	2967	36948
3.	84348	93708	53624	2981	36900
4.	16524	37800	24444	2766	32844
5.	58968	94656	29472	3199	25764

Tabel III. 12.

Vergelijking tussen experimenteel bepaalde ijzergehalte in organen van anaemische ratten,  
en ijzergehalte in de labiele pool, gemeten volgens Singh's methode.

	I Lever $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	II Milt $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	III Spier $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	IV Hersenen $\mu\text{mol Fe}/$ totaal	Som van I, II, III IV	Labiele pool ge- meten vol- gens Singh
1.	4,6	0,26	31,3	0,55	36,7	niet meetbaar
2.	3,3	0,58	37,1	0,55	41,5	niet meetbaar
3.	3,0	0,51	24,0	0,56	28,1	niet meetbaar
4.	2,5	0,42	32,9	0,40	36,2	niet meetbaar

Tabel III. 13.

Specifieke activiteit van ijzer in de urine en in de verschillende organen van anaemische ratten.

	Urine dpm/ $\mu\text{mol}$	Lever dpm/ $\mu\text{mol}$	Milt dpm/ $\mu\text{mol}$	Spier dpm/ $\mu\text{mol}$	Hersenen dpm/ $\mu\text{mol}$
1.	73680	92160	177828	7208	15420
2.	56328	104280	145836	6396	24732
3.	30132	114720	228672	7424	17112
4.	133680	112716	230028	9496	26964

#### 4. EXCRETIE- EN DISTRIBUTIEPATROON VAN $^{59}\text{Fe}$ -FERRIOXAMINE, INTRAVENEUS TOEGEDIEND AAN RATTEN

Het  $^{59}\text{Fe}$ -FO werd intraveneus aan ratten toegediend. De 24 uurs-urine werd nauwkeurig opgevangen en de specifieke activiteit van het ijzer in de urine werd bepaald. Het distributiepatroon van  $^{59}\text{Fe}$ -FO werd gevolgd. De resultaten worden weergegeven in Tabel III. 14.

Tabel III. 14

Distributie- en uitscheidingspatroon van  $^{59}\text{Fe}$ -FO in de organen van de rat, uitgedrukt als percentages van de ingespoten dosis. Standaardafwijking is eveneens weergegeven.

Compartiment en tijdstip van onderzoek	% van de geïnjecteerde dosis na 72 uur	S
erythrocyten 72 uur	5	2
lever 72 uur	2	0,4
milt 72 uur	0,07	0,02
darm 72 uur	0,10	0,02
hersenen 72 uur	0,01	---
spier 72 uur	12	2
bot 72 uur	5	1
urine, 1e dag 24 uur	69	13
faeces, 1e dag 24 uur	4	0,8

Zoals Tabel III. 14. toont wordt ongeveer 70% van het gemerkte  $^{59}\text{Fe}$ -FO binnen de eerste dag uitgescheiden via de urine. De ijzeruitscheiding na de eerste 24 uur is te verwaarlozen. De waarde van 50 - 80% is in tegenspraak met een excretie van 90 - 98%, zoals deze verkregen wordt door sommige onderzoekers (Wöhler, Keberle) (25, 26). Ze is echter wel in overeenstemming met het percentage dat Fielding en Bannerman vermelden (27, 28).

De specifieke activiteit van het ferrioxamine-ijzer in de urine, 24 uur na intraveneuze injectie, is 20% lager dan die van het geïnjecteerde monster.

De specifieke activiteit wordt uitgedrukt als dpm/ $\mu$ mol/24 uur. Er is dus uitwisseling tussen ferrioxamine-ijzer en weefselijzer. Deze uitwisseling wordt niet waargenomen in de experimenten van Fielding. Deze onderzoeker vindt een gelijke specifieke activiteit van het geïnjecteerde  $^{59}\text{Fe}$ -FO en het uitgescheiden  $^{59}\text{Fe}$ -FO.

Onze conclusie omtrent deze resultaten is dat niet alleen, zoals Fielding stelt, een gedeelte van het FO-ijzer in het lichaam geutiliseerd wordt, maar tevens dat er uitwisseling van het FO-ijzer met het weefselijzer plaatsvindt.



## HOOFDSTUK IV

### ONDERZOEK NAAR HET IJZERONTTREKKEND VERMOGEN VAN DESFERRIOXAMINE UIT RATTENLEVERFERRITINE EN UIT SPIER VAN RATTEN

#### 1. INLEIDING

Volgens Hampton kan het ijzer, opgeslagen in de ijzerdepots, voornamelijk bestaande uit ferritine en haemosiderine in lever en milt, gemakkelijk gemobiliseerd worden, bijvoorbeeld door middel van regelmatige aderalingen. De depots zijn echter inhomogeen en vertonen ook onderlinge verschillen voor wat betreft de snelheid van mobilisatie (Hampton, 1954) (71). Vele studies werden verricht om te onderzoeken in welke mate ijzer uit de depots beschikbaar is voor complexvorming met chelators (Pape, Multani, Stitt en Saltman, 1968) (72). Er bestaat een opmerkelijk verschil, afhankelijk van de gebruikte chelator, in snelheid en in hoeveelheid ijzer die bij in vitro-proeven gemobiliseerd wordt uit ferritine. Aan de hand van dialyseproeven werd door genoemde auteurs aangetoond dat met behulp van 0,1 M nitrilotriazijnzuur 44% van het ijzer verwijderd wordt, met EDTA 3% en met natriumcitraat slechts 1%. Geen ijzer kon worden aangetoond in het dialysaat, wanneer gedurende 14 dagen gedialyseerd werd tegen buffer in afwezigheid van een chelator. Er bestaat een specifieke relatie tussen de structuur van de chelator en de toegankelijkheid tot ferritine-ijzer.

Bij een onderzoek naar het werkingsmechanisme in vivo van DF werd door enkele auteurs gevonden dat er een goede correlatie bestaat tussen de hoeveelheid parenchym ijzer en de hoeveelheid ijzer die het lichaam onder invloed van DF verlaat. Deze verdwijning werd echter alleen bepaald met

$^{59}\text{Fe}$ -metingen, wat ons onvoldoende lijkt. De excretie van  $^{59}\text{Fe}$ , afkomstig van gemerkt haemoglobine-haptoglobine, bedroeg slechts 1/3 gedeelte van de ijzerexcretie, afkomstig van ferritine. Deze auteurs verwerpen de theorie van een "gemakkelijk chelateerbare, intermediaire pool" in de parenchym cellen. Zij suggereren dat ferritine-gebonden ijzer de enige ofwel de voor- naamste bron is van door DF geïnduceerde ijzerexcretie (Hershko, Cook, Finch, 1973) (67).

Het werkingsmechanisme waarmee DF ijzer aan de depots onttrekt, is niet bekend. Daarom leek het ons nuttig enkele proeven te verrichten, waarbij de invloed van DF op het ijzerhoudend eiwit ferritine in de lever werd onderzocht. Wij deden daartoe met ratten de volgende experimenten:

1. Na intraveneus toedienen van een speurdosis  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride wordt  $76\ \mu\text{mol}$  DF per dag gedurende 14 achtereenvolgende dagen aan zes normale ratten intramusculair toegediend. Vervolgens wordt het ferritine geïsoleerd uit de zes bij elkaar gevoegde rattenlevers en gescheiden in verschillende fracties met een opklimmende Fe/N-verhouding door middel van centrifugatie in een isokinetische sucrosegradiënt. Het N- en het Fe-gehalte wordt bepaald en de radioactiviteit wordt gemeten. Als controle-serie ter verkrijging van vergelijkingsmateriaal worden dezelfde bepalingen verricht bij ratten die alleen een speurdosis  $^{59}\text{Fe}$  toegediend kregen. De DF-injecties worden bij deze controle-serie uiteraard achterwege gelaten.
2. Eerst wordt  $76\ \mu\text{mol}$  DF per dag gedurende 14 dagen intramusculair aan zes normale ratten toegediend. Daarna wordt een speurdosis  $^{59}\text{Fe(III)}$ -chloride intraveneus geïnjecteerd. Voor het overige is het experiment identiek met experiment 1.
3. Intraveneus wordt een speurdosis  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride aan zes normale ratten toegediend. Vijf dagen na deze injectie wordt intramusculair  $533\ \mu\text{mol}$  DF per dag toegediend. Deze DF-injectie wordt de volgende dag herhaald. Vier dagen hierna worden de ratten opgeofferd. Vervolgens worden dezelfde analyses verricht als vermeld onder experiment 1.
4. Zes ratten worden overladen met behulp van zes Imferon-injecties, overeenkomend met  $2,67\ \text{mmol}$  Fe per injectie. Er worden twee injecties per week gegeven gedurende drie weken. Aan elke injectie wordt een speurdosis  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride toegevoegd. Vervolgens wordt intramusculair  $76\ \mu\text{mol}$  DF per dag gedurende 14 dagen geïnjecteerd. Voor het overige is het experiment identiek met experiment 1.

5. Dezelfde werkwijze als experiment 5 wordt toegepast. Na opoffering der ratten wordt haemosiderine geïsoleerd. Het Fe- en het N-gehalte wordt bepaald en de radioactiviteit wordt gemeten. Voor een gedetailleerde beschrijving van de door ons toegepaste isolatiemethode van ferritine en de scheiding in fracties door middel van centrifugatie in een isokinetische sucrosegradiënt wordt verwezen naar de dissertatie van Van Kreel (66).
6. De invloed van DF op het ijzer in de lever wordt eveneens getest met perfusieproeven.

Dit zijn alle experimenten over het onttrekken van ijzer door DF aan de lever. Door deze experimenten trachten wij de invloed van DF op de ferritinefracties na te gaan op het ogenblik dat een label homogeen over de fracties verdeeld is (experiment 1). Tevens is het nuttig de incorporatie te bestuderen van  $^{59}\text{Fe}$  in de ferritinefracties, wanneer vooraf een langdurige DF-toediening heeft plaatsgevonden (experiment 2). Eveneens moet worden gekeken of een grote DF-dosis een ander effect heeft, en zo ja, welk, op de afbraak en de synthese van ferritine (experiment 3). Bij overladen ratten dient de invloed van DF, zowel op het ferritine als op het haemosiderine, nagegaan te worden (experiment 4 en 5). Gezien het feit dat de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  en de invloed hierop van DF goed bestudeerd kan worden met behulp van leverperfusieproeven, is het nodig ook hierover enkele experimenten te verrichten (experiment 6).

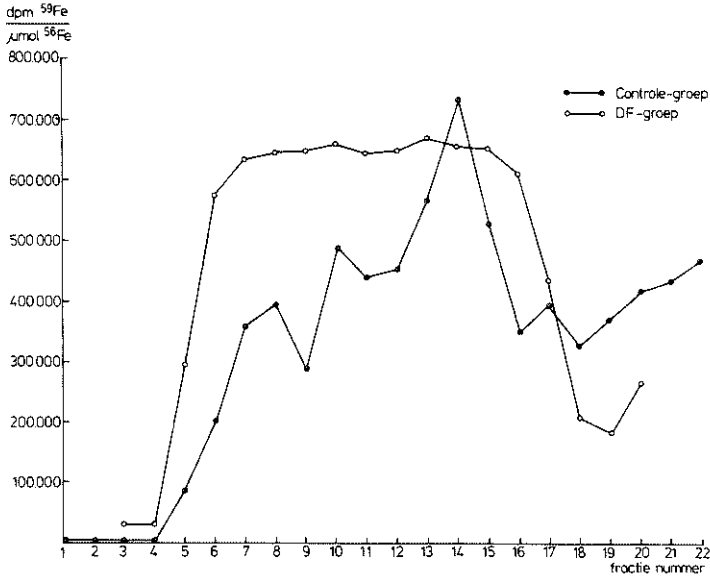
Terwijl in de literatuur geen informatie wordt gegeven omtrent het verband tussen het ijzergehalte in de spier en DF, konden wij aantonen dat DF vrij veel ijzer aan de spier onttrekt. Het leek nuttig daarover enkele proeven te verrichten.

## 2. RESULTATEN VAN EXPERIMENT 1

Zoals in § 1 van dit hoofdstuk reeds werd aangeduid, werden bij experiment 1 normale ratten intraveneus ingespoten met  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride, en wel met  $552 \cdot 10^5$  dpm. Vervolgens werd DF toegediend, zoals in § 1 besproken werd. De ratten werden opgeofferd en het ferritine werd op de aangegeven manier geïsoleerd en vervolgens geanalyseerd. De beschreven experimenten werden in duplo verricht. De resultaten van de duplo's komen overeen. De specifieke activiteit van ijzer in het serum bedroeg op het moment van opofferen  $149052 \text{ dpm}/\mu\text{mol}$ , terwijl de specifieke activiteit van ijzer in de urine, verzameld over de laatste 24 uur voor het opofferen,  $79632 \text{ dpm}/$







Figuur IV.2.

Verband tussen de specifieke activiteit in fracties van het rattenleverferritine van de controle-groep en van de DF-groep (experiment 1, blz. 53).

### 3. RESULTATEN VAN EXPERIMENT 2

Zoals in de inleiding reeds werd aangeduid, kregen normale ratten gedurende 14 dagen intramusculair 76  $\mu\text{mol}$  DF per dag toegediend. Vervolgens werd  $408 \cdot 10^5$  dpm  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride intraveneus geïnjecteerd. Ferritine werd geïsoleerd en geanalyseerd. Het bevatte 54  $\mu\text{mol}$  N, 18  $\mu\text{mol}$  Fe en 9765000 dpm  $^{59}\text{Fe}$ . De specifieke activiteit van het geïsoleerde ferritine bedroeg 542496 dpm/ $\mu\text{mol}$ . De urine werd verzameld vanaf het ogenblik dat de activiteit geïnjecteerd werd tot de ratten werden opgeofferd. De specifieke activiteit van het ijzer in serum en urine werd bepaald en bedroeg respectievelijk:

na 24 uur	2327080 dpm/ $\mu\text{mol}$	en	1003620 dpm/ $\mu\text{mol}$
na 48 uur	720180 dpm/ $\mu\text{mol}$	en	370920 dpm/ $\mu\text{mol}$
na 72 uur	572916 dpm/ $\mu\text{mol}$	en	227532 dpm/ $\mu\text{mol}$ .

Een gedeelte van het ferritine, overeenkomend met 16  $\mu\text{mol}$  N, werd door middel van gradiëntcentrifugatie gefractioneerd. De resultaten hiervan staan vermeld in Tabel IV.3.

Tabel IV.3.

Het N- en Fe-gehalte in  $\mu$ molen en de radioactiviteit in dpm van  $^{59}\text{Fe}$ , benevens de specifieke activiteit van ijzer in de ferritinefracties, verkregen door ultracentrifugatie van rattenleverferritine, geïsoleerd na allereerst toediening van  $76 \mu\text{mol DF}$  per dag gedurende 14 dagen en daarna intraveneuze injectie van  $^{59}\text{Fe(III)chloride}$ . De resultaten hebben betrekking op een fractionering van  $16 \mu\text{mol}$  ferritine-stikstof.

Fractie nummer	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	dpm $^{59}\text{Fe}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$
1.	3,22	----	5779	-----
2.	2,69	----	3041	-----
3.	1,36	----	3662	-----
4.	1,25	----	2755	-----
5.	0,88	----	11861	-----
6.	0,41	0,11	58464	531490
7.	0,49	0,29	152846	527055
8.	0,60	0,59	326105	552720
9.	0,63	0,63	349843	555306
10.	1,18	0,95	476885	501984
11.	0,71	0,88	496944	564709
12.	0,60	0,69	370255	536601
13.	0,59	0,36	207043	575119
14.	0,06	0,22	90115	409613
15.	0,08	0,13	60883	468330
16.	----	0,13	48401	372315
17.	----	0,14	38052	271800
18.	----	----	30576	-----
19.	----	----	38002	-----
20.				
21.				
22.				

Tabel IV.4.

Het N- en Fe-gehalte in  $\mu$ molen en de radioactiviteit in dpm van  $^{59}\text{Fe}$ , benevens de specifieke activiteit van ijzer in de ferritinefracties, verkregen door ultracentrifugatie van rattenleverferritine, geïsoleerd na intraveneuze toediening van  $^{59}\text{Fe(III)chloride}$ . De resultaten hebben betrekking op een fractionering van  $16 \mu\text{mol}$  ferritine-stikstof.

$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	dpm $^{59}\text{Fe}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$
----	----	-----	-----
----	----	-----	-----
----	0,063	-----	-----
----	0,02	-----	-----
0,65	0,04	-----	-----
0,66	0,05	28764	575280
0,68	0,11	59796	543600
1,14	0,32	142608	445644
1,50	0,37	190644	515244
1,42	0,65	298332	458964
1,54	0,86	414204	481632
1,85	0,86	567492	659868
1,85	0,96	572160	595992
1,56	0,96	527484	549456
0,76	0,60	287280	478800
0,65	0,29	142608	491748
0,62	0,28	88224	315084
0,59	0,18	79800	443328
0,20	0,21	84492	402336
0,19	0,13	68784	529104
0,20	0,15	57192	381276
0,20	0,21	95880	456564

Het ferritine van de controle-proef bevatte  $70 \mu\text{mol N}$ ,  $33 \mu\text{mol Fe}$  en  $16236000$  dpm. De specifieke activiteit van het geïsoleerde ferritine bedroeg  $492000$  dpm/ $\mu\text{mol}$ . De specifieke activiteit van het ijzer in het serum



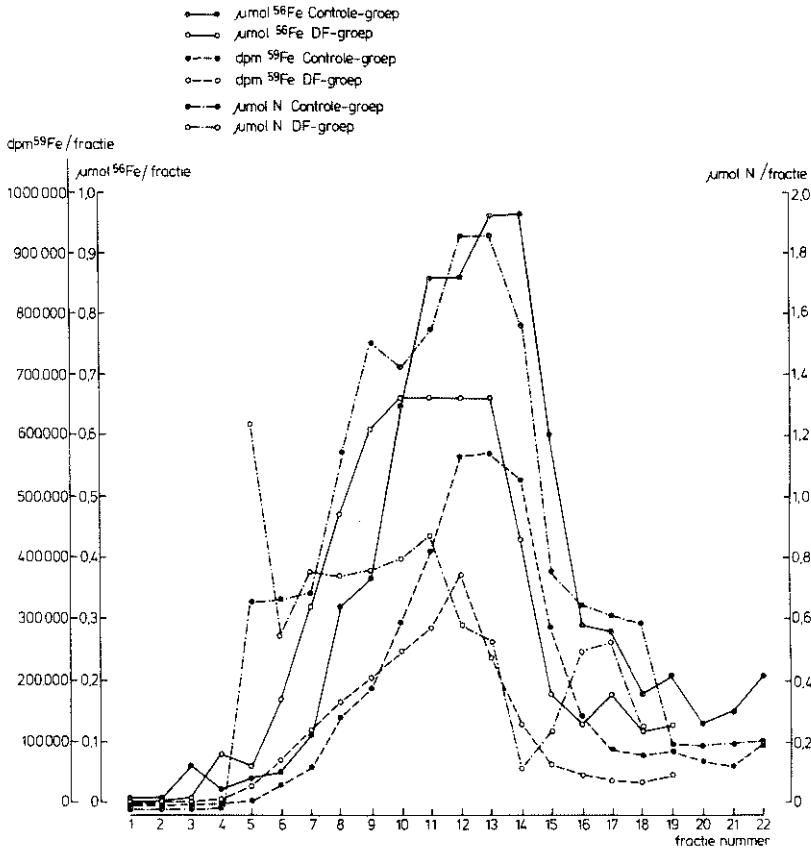




Tabel IV. 5.

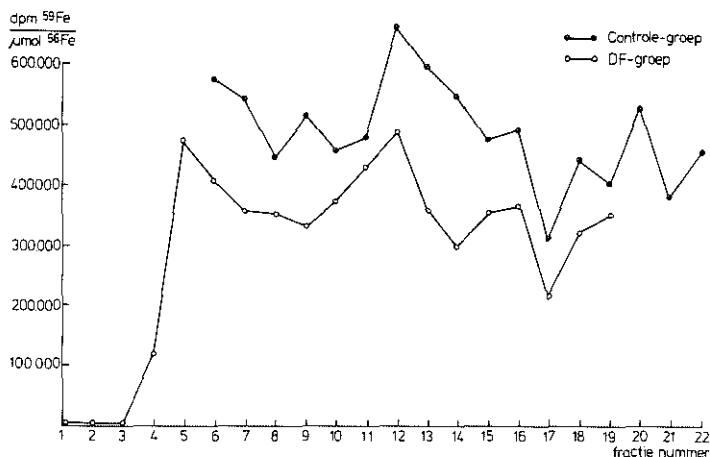
Het N- en Fe-gehalte in  $\mu$ molen en de radioactiviteit in dpm van  $^{59}\text{Fe}$ , benevens de specifieke activiteit in de fracties, verkregen door ultracentrifugatie van rattenleverferritine, geïsoleerd na intraveneuze injectie van  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride en intramusculaire injectie van 533  $\mu$ mol DF per dag gedurende twee dagen. De resultaten hebben betrekking op een fractionering van 16  $\mu$ mol ferritine-stikstof.

Fractienummer	$\mu$ mol N	$\mu$ mol Fe	dpm $^{59}\text{Fe}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$
1.	----	----	-----	-----
2.	2,90	----	-----	-----
3.	2,40	----	-----	-----
4.	2,35	0,08	9691	121137
5.	1,24	0,06	28627	477116
6.	0,55	0,17	69610	409470
7.	0,76	0,32	114250	357031
8.	0,74	0,47	165600	352340
9.	0,76	0,61	204408	335095
10.	0,80	0,66	247608	375163
11.	0,88	0,66	285336	432327
12.	0,58	0,66	322747	489010
13.	0,53	0,66	236650	358560
14.	0,12	0,43	129125	300290
15.	0,24	0,18	63389	352161
16.	0,50	0,13	47419	364761
17.	0,54	0,18	38966	216477
18.	0,26	0,12	38491	320758
19.	----	0,13	45850	352692



Figuur IV. 5.

Verband tussen het Fe- en N-gehalte in  $\mu\text{molen}$ , en de radioactiviteit van  $^{59}\text{Fe}$  in dpm in fracties van het rattenleverferritine van de controle-groep en van de DF-groep. De resultaten hebben betrekking op een fractionering van 16  $\mu\text{mol}$  ferritine-stikstof (experiment 3, blz. 59).



Figuur IV.6.

Verband tussen de specifieke activiteit in fracties van het rattenleverferritine van de controle-groep en van de DF-groep. De resultaten hebben betrekking op een fractionering van 16 μmol ferritine-stikstof (experiment 3, blz. 59).

## 5. RESULTATEN VAN EXPERIMENT 4

Ratten werden overladen met zes ijzer-dextran injecties, overeenkomend met 2,67 mmol Fe per injectie. Tevens werd een speurdosis <sup>59</sup>Fe(III)-chloride toegevoegd. Vervolgens werd gedurende 14 dagen 76 μmol DF per dag geïnjecteerd. Ferritine werd geïsoleerd en geanalyseerd. Het bevatte 215 μmol N, 78 μmol Fe en 1585350 dpm <sup>59</sup>Fe. De specifieke activiteit van het geïsoleerde ferritine bedroeg 20325 dpm/μmol. Een gedeelte van het ferritine, overeenkomend met 24 μmol N, werd door middel van gradiëntcentrifugatie gefractioneerd. De resultaten hiervan staan vermeld in Tabel IV.6. Het ferritine van de controle-groep bevatte 218 μmol N, 92 μmol Fe en 2517856 dpm <sup>59</sup>Fe. De specifieke activiteit van het geïsoleerde ferritine bedroeg 27368 dpm/μmol. Eenzelfde hoeveelheid als bij de DF-groep werd aan gradiëntcentrifugatie onderworpen. De resultaten staan vermeld in Tabel IV.7. De gegevens van Tabel IV.6. en Tabel IV.7. worden weergegeven in Fig. IV.7. en Fig. IV.8.

Tabel IV. 6.

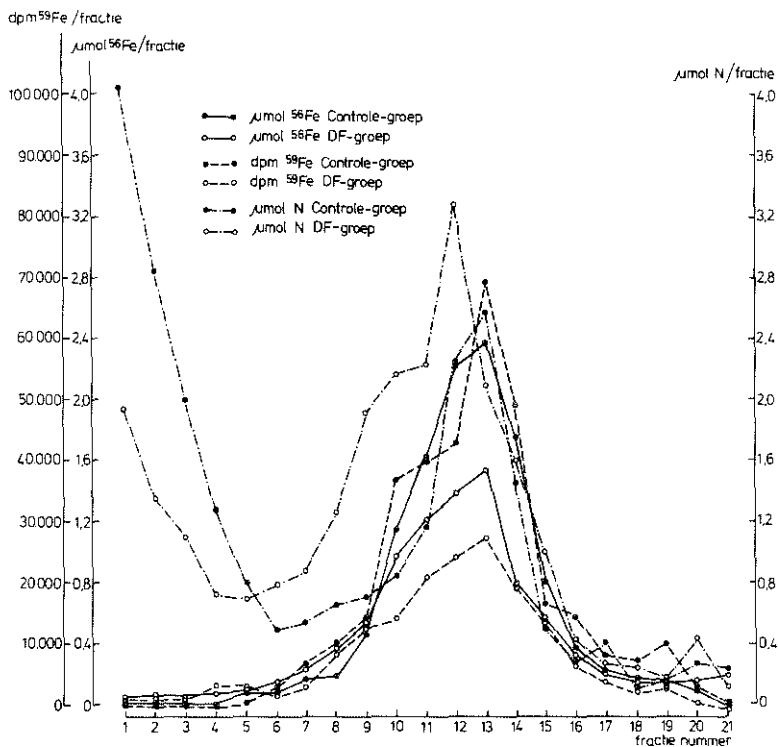
Het N- en Fe-gehalte in  $\mu$  molen en de radioactiviteit in dpm van  $^{59}\text{Fe}$ , benevens de specifieke activiteit in fracties, verkregen door ultracentrifugatie van rattenleverferritine, geïsoleerd na overladen met zes ijzer-dextran injecties, overeenkomend met 2,67 mmol Fe per injectie. Aan elke injectie is een speurdosis  $^{59}\text{Fe}$  toegevoegd. Vervolgens werd 76  $\mu\text{mol DF}$  per dag gedurende 14 dagen geïnjecteerd. De resultaten hebben betrekking op een fractionering van 24  $\mu\text{mol}$  ferritine-stikstof.

Fractie nummer	$\mu$ mol N	$\mu$ mol Fe	dpm $^{59}\text{Fe}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$
1.	1,94	-----	-----	-----
2.	1,34	0,073	-----	-----
3.	1,10	0,066	-----	-----
4.	0,72	0,073	3204	43890
5.	0,69	0,095	3204	33726
6.	0,78	0,14	1608	11485
7.	0,87	0,23	2880	12521
8.	1,26	0,36	8016	22266
9.	1,91	0,53	13776	25992
10.	2,16	0,97	14100	14536
11.	2,23	1,21	20832	17216
12.	3,29	1,37	24000	17518
13.	2,11	1,53	27552	18007
14.	1,58	0,78	19548	25061
15.	0,98	0,56	13452	24021
16.	0,41	0,32	6408	20025
17.	0,26	0,20	3528	17640
18.	0,22	0,16	2400	15000
19.	0,15	0,15	3800	23700
20.	0,27	0,15	-----	-----
21.	0,24	0,20	-----	-----

Tabel IV. 7.

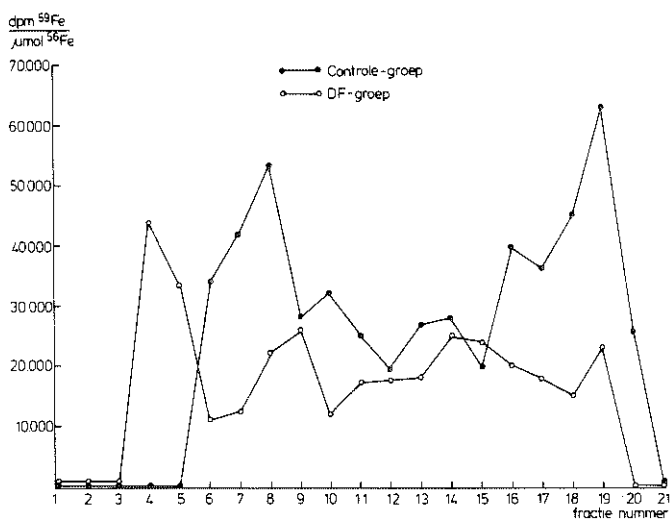
Het N- en Fe-gehalte in  $\mu$  molen en de radioactiviteit in dpm van  $^{59}\text{Fe}$ , benevens de specifieke activiteit in de fracties, verkregen door ultracentrifugatie van rattenleverferritine, geïsoleerd na overladen met zes ijzer-dextran injecties, overeenkomend met 2,67 mmol Fe per injectie, waaraan tevens een speurdosis  $^{59}\text{Fe(III)chloride}$  werd toegevoegd. De resultaten hebben betrekking op een fractionering van 24  $\mu\text{mol}$  ferritine-stikstof.

$\mu$ mol N	$\mu$ mol Fe	dpm $^{59}\text{Fe}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$
4,78	----	-----	-----
2,85	----	-----	-----
1,98	----	-----	-----
1,28	----	-----	-----
0,80	0,08	-----	-----
0,49	0,10	3419	34190
0,54	0,16	6705	41906
0,65	0,19	10063	52963
0,70	0,47	13344	28391
0,83	1,14	36723	32213
1,14	1,60	40032	25020
2,25	2,23	42575	19091
2,56	2,56	69263	27056
1,44	1,75	49039	28022
0,48	0,80	16638	20797
0,26	0,36	14011	38919
0,39	0,22	8006	36391
0,11	0,16	7214	45087
0,15	0,16	10091	63069
0,43	0,11	2877	26154
0,11	----	-----	-----



Figuur IV.7.

Verband tussen het Fe- en N-gehalte in  $\mu\text{molen}$ , en de radioactiviteit van  $^{59}\text{Fe}$  in fracties van het rattenleverferritine van de controle-groep en van de DF-groep. De ratten waren met zes ijzer-dextran injecties overladen, overeenkomend met 2,67 mmol Fe per injectie. De resultaten hebben betrekking op een fractionering van 24  $\mu\text{mol}$  ferritine-stikstof (experiment 4, blz. 62).



Figuur IV. 8.

Verband tussen de specifieke activiteit in fracties van het rattenleverferritine van de controle-groep en van de DF-groep, geïsoleerd na overlading met ijzerdextran (zes injecties - 2,67 mmol Fe per injectie). De resultaten hebben betrekking op een fractionering van 24  $\mu$ mol ferritine-stikstof (experiment 4, blz. 62).

## 6. RESULTATEN VAN EXPERIMENT 5

Ratten werden overlading op dezelfde wijze als reeds in § 5 beschreven werd. Vervolgens werd gedurende 14 dagen 76  $\mu$ mol DF per dag toegediend. Haemosiderine werd geïsoleerd en geanalyseerd. Het bevatte:

3,3 mmol N per gram haemosiderine

4,7 mmol Fe per gram haemosiderine.

De specifieke activiteit van het geïsoleerde haemosiderine bedroeg 8736 dpm/mmole.

Het haemosiderine van de controle-groep bevatte:

3,4 mmol N per gram haemosiderine

4,6 mmol Fe per gram haemosiderine.

De specifieke activiteit van het geïsoleerde haemosiderine bedroeg 10316 dpm/ $\mu$ mol.

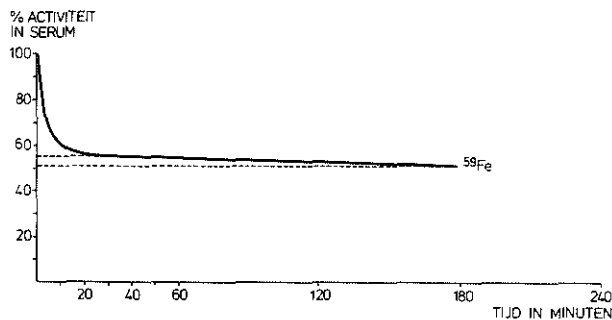
## 7. DE INVLOED VAN DF OP LEVERIJZER VAN DE RAT TIJDENS PERFUSIEPROEVEN

De perfusie-experimenten met rattenlevers werden door ons verricht volgens de methode die volledig door Van Kreel in zijn dissertatie beschreven werd (66).

1. Aan 50 ml mengserum dat met Fe(III)citraat tot 80% verzadiging was opgeladen, werd 20  $\mu\text{C}$   $^{59}\text{Fe}$ (III)citraat toegevoegd. Aan deze oplossing werd 300  $\mu\text{mol}$  DF toegevoegd. Tijdens de perfusie werd de radioactiviteit van het  $^{59}\text{Fe}$  in het serum gemeten. Het verloop tijdens de leverperfusie van de  $^{59}\text{Fe}$ -activiteit in serum, uitgedrukt in procenten van de activiteit voor de perfusie, is afgebeeld in Fig. IV.9.

Dezelfde perfusie werd uitgevoerd, doch het DF werd tijdens de perfusie acht minuten na het begintijdstip toegevoegd. Dezelfde curve werd verkregen.

2. Om een gering verschil in ijzerconcentratie zeer nauwkeurig te kunnen bepalen, werd de perfusie uitgevoerd met een Krebs-Ringer oplossing, waaraan 4% ijzervrij albumine toegevoegd werd. Bij deze oplossing werd 300  $\mu\text{mol}$  DF gevoegd. Er werd gedurende 3 uur geperfundeerd. Na de perfusie werd de oplossing lyophil gedroogd en werd het ijzergehalte bepaald. Er werd geen ijzer teruggevonden in de lyophil gedroogde perfusievloeistof.



Figuur IV.9.

Het verloop tijdens de leverperfusies van de  $^{59}\text{Fe}$ -activiteit in serum, uitgedrukt in procenten van de activiteit voor de perfusie. Het  $^{59}\text{Fe}$  werd voorafgaande aan de perfusie in de vorm van Fe(III)citraat aan transferrine gebonden, waarbij tevens de verzadiging van het transferrine op 80% werd gebracht. Aan de oplossing werd 300  $\mu\text{mol}$  DF toegevoegd.



3. Dezelfde perfusie als onder 2 vermeld werd uitgevoerd, doch als perfusievloeistof werd een mengsel van Krebs-Ringer en apotransferrine gebruikt. Eveneens werd 300  $\mu\text{mol}$  DF toegevoegd. Na drie uur perfunderen werd de vloeistof lyophiel gedroogd en het ijzergehalte bepaald. IJzer werd niet aangetoond.
4. Ratten werden overladen met behulp van ijzer-dextran injecties (4 x 178  $\mu\text{mol}$  ijzer) met het doel na te gaan of DF ijzer kan chelateren tijdens de perfusie uit de levers van overladen ratten. Gedurende drie uur werd geperfundeerd met een Krebs-Ringer oplossing die 300  $\mu\text{mol}$  DF bevatte. Na de perfusie werd de oplossing lyophiel gedroogd en het ijzergehalte bepaald. Nu werd evenmin ijzer gevonden in de vloeistof.

## 8. DE INCORPORATIE VAN $^{59}\text{Fe}$ IN DE SPIER EN DE INVLOED VAN DF HIEROP

Bij de bestudering van de invloed van DF op het ijzergehalte en de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in drie verschillende fracties, de "ferritine"fractie, de "transferrine"fractie en de "myoglobine"fractie, geïsoleerd uit spierhomogenaat, maakten wij gebruik van een artikel van Finch, die de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in de spier aan een analyse onderwierp (57). Intraveneus werd een speurdosis  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride toegediend. Vervolgens werd gedurende zeven dagen intramusculair 76  $\mu\text{mol}$  DF per dag geïnjecteerd. Op het moment van opofferen werd een wisseltransfusie verricht waarbij niet-radioactief bloed in de vena femoralis geïnjecteerd werd, terwijl uit de arteria femoralis bloed werd verwijderd dat wel  $^{59}\text{Fe}$  bevatte. Deze techniek had tot doel de radioactiviteit uit de circulatie te verwijderen tot 0,2% van de geïnjecteerde dosis. De experimenten werden vijf keer herhaald en de resultaten werden vergeleken met een controle-groep.

Bij het intraveneus toedienen van  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride werd na zeven dagen ongeveer 10% van deze label teruggevonden in de spier van normale ratten en 7% in de spier van ratten met DF behandeld. Het verschil is statistisch significant.

Na intramusculaire injectie van 76  $\mu\text{mol}$  DF per dag gedurende zeven dagen is het ijzergehalte in de spier met 20  $\mu\text{mol}$  gedaald, waarvan 0,5  $\mu\text{mol}$  (22%) in de "ferritine"fractie, 9  $\mu\text{mol}$  (52%) in de "transferrine"fractie en 6  $\mu\text{mol}$  (30%) in de "myoglobine"fractie. Voor de isolering van de drie fracties wordt verwezen naar hoofdstuk II. Van de totale hoeveelheid  $^{59}\text{Fe}$ , aan-

wezig in de spier, werd door middel van DF-injecties 30% aan dit orgaan onttrokken.

De incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in de drie fracties geeft, percentueel gezien, zowel voor de normale als voor de ratten met DF behandeld, hetzelfde beeld, zoals weergegeven in Tabel IV.8. In deze Tabel zijn de resultaten van Finch eveneens opgenomen. Uit deze drie fracties wordt onder invloed van DF ongeveer eenzelfde percentage ijzer, zowel wat betreft  $^{59}\text{Fe}$  als  $^{56}\text{Fe}$ , onttrokken.

Tabel IV.8.

De incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in spier, respectievelijk in drie fracties, bereid uit spierhomogenaat, van normale ratten en van ratten met DF behandeld, en vergelijking met de resultaten van Finch.

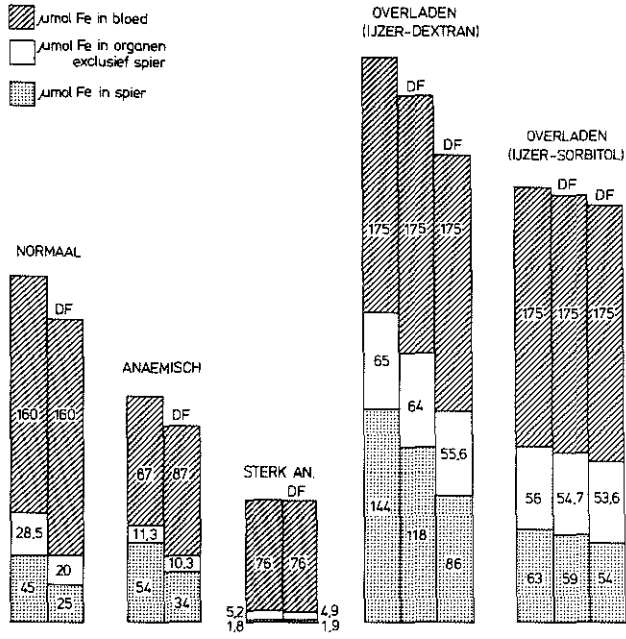
	$^{59}\text{Fe}$ als % van totaal geïnjecteerde dosis	$^{59}\text{Fe}$ als % van dosis, aanwezig in spier		
		"Ferritine"- fractie	"Transferrine"- fractie	"Myoglobine"- fractie
normale ratten	10	44	21	26,5
DF-ratten	7	45,3	19	28
resultaten van Finch	6	47	18	33

## HOOFDSTUK V

### ALGEMENE DISCUSSIE

De Fig. V.1.2.3. geven een beeld van de ijzerverdeling over het gehele organisme van de normale, anaemische, sterk anaemische en de met ijzer overladen rat, en de invloed hierop van een enkelvoudige DF-dosis. Bij de normale rat is er met behulp van een DF-injectie van 36  $\mu\text{mol}$  een vermindering van 28,5  $\mu\text{mol}$  ijzer te bemerken, dit is 12% van het totaal. Het grootste aandeel, namelijk 20  $\mu\text{mol}$  (70%), van deze vermindering wordt geleverd door de spier. De vermindering in de lever van de normale rat bedraagt 6  $\mu\text{mol}$  ijzer, dit is 22% van de totale vermindering. In de overige organen valt de zeer sterke daling van het ijzergehalte in hersenen en de daling in nieren en de milt op, terwijl de daling in de hartspier gering genoemd moet worden.

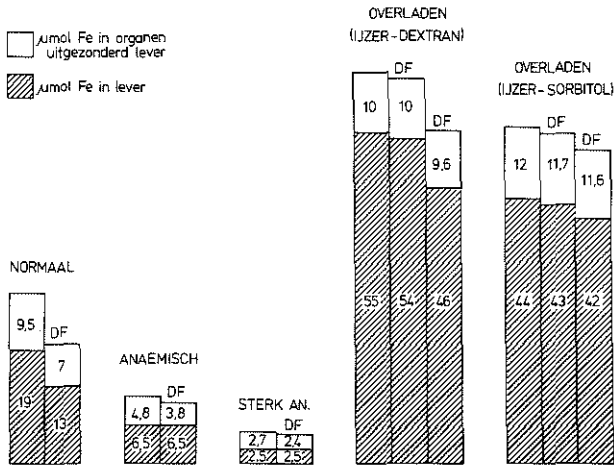
Bij de anaemische rat is het totale ijzergehalte, vergeleken bij de normale rat, met 81  $\mu\text{mol}$  ijzer, dit is 35%, gedaald. Deze daling komt voor het grootste gedeelte voor rekening van het bloedcompartiment, begrijpelijk, aangezien de anaemie in vier dagen door aderlating werd verkregen. Er is geen significant verschil tussen het ijzergehalte in de spier bij normale en anaemische dieren. Onder invloed van DF daalt het ijzergehalte in de spier met ongeveer eenzelfde bedrag als bij normale ratten, namelijk 20  $\mu\text{mol}$  ijzer, in dit geval is het echter 95% van de totale ijzerafname, namelijk 21  $\mu\text{mol}$  ijzer. In de overige organen is een zeer sterke daling van het ijzergehalte slechts in de nieren te bemerken.



Figuur V.1.

De ijzerverdeling in  $\mu\text{molen}$  in bloed, organen exclusief spier en in spier van de normale, anaemische, sterk anaemische en de met ijzer overladen rat, en de invloed hierop van een enkelvoudige DF-dosis van  $36 \mu\text{mol}$ .

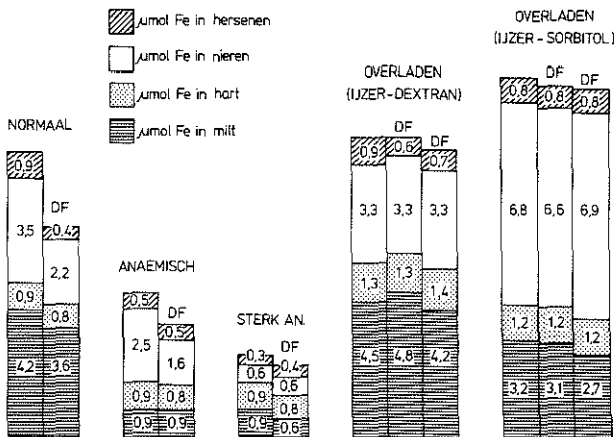
Bij de met ijzer overladen ratten is de verdeling eveneens weergegeven na toediening van een DF-dosis van  $360 \mu\text{mol}$ .



Figuur V. 2.

De ijzerverdeling in  $\mu$ molen in de organen exclusief lever en in lever van de normale, anaemische, sterk anaemische en de met ijzer overladen rat, en de invloed hierop van een enkelvoudige DF-dosis van  $36 \mu$ mol.

Bij de met ijzer overladen ratten is de verdeling eveneens weergegeven na toediening van een DF-dosis van  $360 \mu$ mol.



Figuur V. 3.

De ijzerverdeling in  $\mu$ molen in hersenen, nieren, hart en milt van de normale, anaemische, sterk anaemische en de met ijzer overladen rat, en de invloed hierop van een enkelvoudige DF-dosis van  $36 \mu$ mol. Bij de met ijzer overladen ratten is de verdeling eveneens weergegeven na toediening van een DF-dosis van  $360 \mu$ mol.

Bij de sterk anaemische ratten is het totale ijzergehalte, vergeleken bij de normale rat, met 150  $\mu\text{mol}$  ijzer, dit is met 64%, gedaald. Opvallend is dat het ijzergehalte in spier uitermate laag geworden is. Het ijzer in de spier lijkt dus met behulp van aderlatingen over een lange periode, drie weken vier keer per week, wel mobiliseerbaar te zijn. De onttrekking is dus een kwestie van tijd. Onder invloed van DF is bij deze dieren geen significante daling van het ijzergehalte in de verschillende organen waar te nemen.

Bij de ratten, overladen met ijzer-dextran, is het totale ijzergehalte met 150  $\mu\text{mol}$  ijzer toegenomen, dit is 64%. Het grootste gedeelte, namelijk 99  $\mu\text{mol}$  ijzer (42%), gaat naar de spier. De toename in de overige organen is beperkt tot de lever. De andere organen geven geen significante ijzertoe name, vergeleken bij normale ratten. Aangezien een zeker gedeelte van het geïnjecteerde ijzer-dextran, indien intramusculair toegediend, op de injectie plaats blijft, hebben we dit gedeelte niet meegerekend bij de ijzertoe name. Vergeleken bij een intraveneuze toediening van ijzer-dextran werd eenzelfde toename van het ijzergehalte in spier gevonden als bij een intramusculaire toediening, de injectieplaats buiten beschouwing gelaten.

Een enkelvoudige DF-injectie van 36  $\mu\text{mol}$  geeft een totale ijzerafname bij de overladen rat van 27  $\mu\text{mol}$  ijzer, dit is 7%. De afname in de spier be draagt 26  $\mu\text{mol}$  ijzer, dit is 96% van de totale ijzerafname. Van de overige organen is de ijzerafname zeer significant in de hersenen, doch in milt, nieren en hartspier is geen significante daling van het ijzergehalte waar te nemen. Het is opvallend dat het ijzergehalte in milt, nieren en hersenen na het geven van ijzer-dextran injecties niet toeneemt, en dat een enkelvoudige DF-dosis het ijzergehalte in milt en nieren niet beïnvloedt. Een enkelvoudige DF-injectie van 360  $\mu\text{mol}$  geeft in de overladen dieren een totale ijzeraf name van 67  $\mu\text{mol}$ , dit is 18%, waarvan er 58  $\mu\text{mol}$  ijzer uit de spier ont trokken wordt, dit is 86% van de totale ijzerafname. De ijzerafname in her senen is zeer significant.

Bij de ratten, overladen met ijzer-sorbitol, is het totale ijzergehalte met 60,5  $\mu\text{mol}$  ijzer toegenomen, dit is 26%, waarvan er 18  $\mu\text{mol}$  naar de spier gaat, dit is 8%.

Een enkelvoudige DF-dosis van 36  $\mu\text{mol}$  geeft een totale ijzervermindering van 5,3  $\mu\text{mol}$  ijzer, dit is 2%, een vermindering die statistisch niet signifi cant is, terwijl een DF-injectie van 360  $\mu\text{mol}$  een totale vermindering van 11,4  $\mu\text{mol}$  ijzer geeft, dit is 4%, een afname die statistisch evenmin significant is.

Onze waarnemingen leiden tot de volgende conclusies:

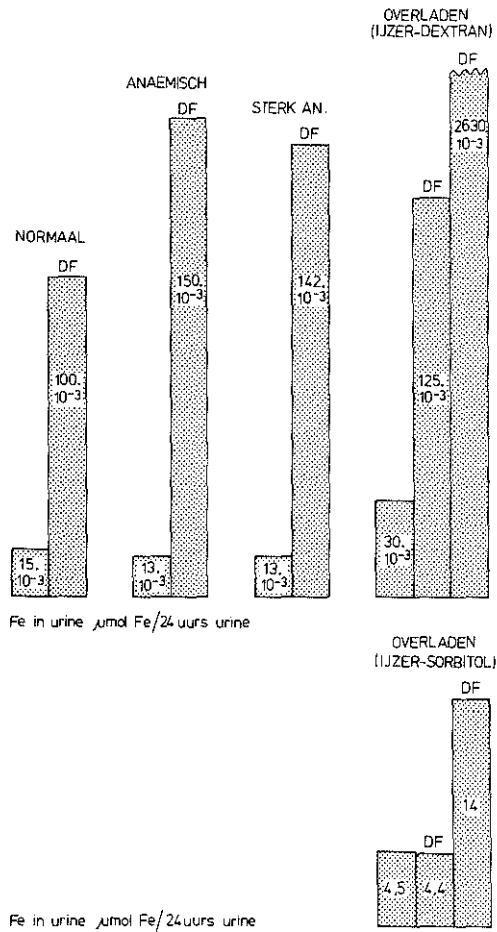
1. DF onttrekt geen ijzer aan de Hb-pool.
2. De voornaamste bron van ijzer voor DF, bij normale, anaemische ratten en ratten, overladen met ijzer-dextran, is de spier.
3. Opvallend is het feit dat de daling, geïnduceerd door DF, van het ijzergehalte in de hersenen - bij normale dieren percentueel zeer groot - bij anaemische ratten, waar het ijzer reeds sterk gedaald is, afwezig is.
4. Opmerkelijk is het feit dat het ijzer in lever bij een hemorragische anaemie goed mobiliseerbaar, het ijzer in spier niet mobiliseerbaar is. Het overgebleven ijzer in lever is bij deze anaemische dieren door DF niet te mobiliseren, het ijzer in spier is daarentegen door DF nog sterk te mobiliseren.

Onze eerste conclusie is in overeenstemming met de opvatting in de literatuur, waarbij moet worden opgemerkt dat Hedenberg aangeeft dat het Hb-compartiment wel een bron voor ijzeronttrekking door DF is, wanneer DF toegediend wordt vier tot acht uur na het bewerken van een kunstmatige Hb-afbraak (33).

Onze tweede conclusie is verrassend. In de literatuur wordt vrijwel geen aandacht besteed aan de betekenis van de ijzervoorraad in de spier. Over de invloed van DF op deze voorraad konden wij dan ook geen gegevens vinden.

Ook over het ijzer in hersenen zijn in de literatuur weinig gegevens bekend, zoals blijkt uit het proefschrift van Blijenberg. Hij verrichtte experimenten met ratten die in een pathologische toestand gebracht waren en merkt op: "In geval van overlading met ijzer lijkt de overgang vanuit de bloedbaan niet beïnvloed te zijn. In geval van anaemische toestand is duidelijk wel sprake van een verandering. Het lijkt hier zo dat de ijzerstofwisseling elders in het lichaam voorrang heeft boven het metabolisme in de hersenen. De overgang van ijzer wordt tenminste op een laag pitje gezet" (60).

Fig. V. 4. geeft de gemiddelde waarden aan van de ijzerexcretie in de urine, en de verhoogde ijzerexcretie, geïnduceerd door DF bij normale, anaemische, sterk anaemische en overladen ratten. Een enkelvoudige DF-injectie van  $36 \mu\text{mol}$  geeft bij normale ratten een significante verhoging van het ijzergehalte in de urine. De ijzerexcretie in de urine stijgt met  $85.10^{-3} \mu\text{mol}$  ijzer in de eerste 24-uurs urine na injectie, vergeleken met de normale uitscheiding van  $15.10^{-3} \mu\text{mol}$  per 24 uur.



Figuur V.4.

Gemiddelde waarden van de ijzerexcretie in de urine en de verhoogde ijzerexcretie, geïnduceerd door een enkelvoudige DF-dosis van  $36 \mu\text{mol}$ , bij de normale, anaemische, sterk anaemische en de met ijzer overladen ratten. Bij de met ijzer overladen ratten is de verhoogde excretie in urine eveneens weergegeven na een enkelvoudige DF-dosis van  $360 \mu\text{mol}$ .

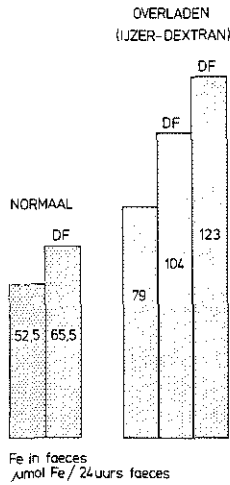
Bij anaemische ratten, waar de ijzerexcretie in de urine weinig verschilt van deze bij normale ratten, induceert een enkelvoudige DF-injectie van  $36 \mu\text{mol}$  eveneens een significante verhoging.

Bij de ratten, overladen met ijzer-dextran, is de spontane uitscheiding in de urine twee maal zo hoog als bij normale ratten. Zowel een enkelvoudige injectie van  $36 \mu\text{mol}$  als van  $360 \mu\text{mol}$  geeft een significante toe-



name van de ijzerexcretie in de urine respectievelijk met  $95 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}$  per 24 uur en met  $2,6 \mu\text{mol}$  per 24 uur.

De ratten, overladen met ijzer-sorbitol, geven een ijzeruitscheiding in de urine die 3000 maal hoger ligt dan bij normale dieren. Er is echter slechts een significante verhoging in excretie waar te nemen bij deze ratten, wanneer een enkelvoudige DF-dosis van  $360 \mu\text{mol}$  gegeven wordt en wel van  $4,5 \mu\text{mol}$  naar  $14 \mu\text{mol}$  per 24 uur. Enkele opmerkingen betreffende het verschil in absorptie en excretie tussen Imferon en Jectofer werden in hoofdstuk III gegeven.



Figuur V.5.

De ijzerexcretie in de faeces, en de invloed hierop van een enkelvoudige DF-dosis van  $36 \mu\text{mol}$  bij de normale en de met ijzer overladen ratten. De invloed op de faecale excretie van een DF-dosis van  $360 \mu\text{mol}$  is bij de overladen ratten eveneens weergegeven.

Fig. V.5. geeft de ijzerexcretie via de faeces weer bij normale en overladen ratten, en de invloed hierop van een DF-injectie. Bij normale ratten is de ijzerexcretie in faeces onder invloed van een enkelvoudige DF-injectie van  $36 \mu\text{mol}$   $65 \mu\text{mol}$ , zonder DF  $52 \mu\text{mol}$  per 24 uur. Het verschil van  $13 \mu\text{mol}$  (25%) is statistisch niet significant. Bij overladen ratten, waar de ijzerexcretie in faeces significant verhoogd is, namelijk met  $26,5 \mu\text{mol}$  (51%), vergeleken bij normale ratten, is de ijzerexcretie zowel met een injectie van  $36 \mu\text{mol}$  als van  $360 \mu\text{mol}$  significant verhoogd, en dit respectie-

velijk met 25  $\mu\text{mol}$  (32%) en 44  $\mu\text{mol}$  (56%) ijzer ten opzichte van de ijzerexcretie bij overladen ratten.

Uit onze waarnemingen blijkt dat de faecale excretie van ijzer onder invloed van DF een niet te verwaarlozen facet is bij de bestudering van de invloed van DF op het ijzermetabolisme. Uit onze resultaten blijkt dat de ijzerexcretie in de urine, geïnduceerd door DF, gering is. Wanneer we onze waarnemingen vergelijken met deze verricht op de afdeling Interne Geneeskunde I bij normale personen en bij patienten, lijdende aan haemochromatose, en met enkele waarden, genoemd door Ploem, komen we tot de volgende Tabel. Een enkelvoudige DF-injectie van 1522  $\mu\text{mol}$  werd intramusculair toegediend bij mensen, dit is 25  $\mu\text{mol}$  per kg. lichaamsgewicht. Bij ratten die een dosis van 36  $\mu\text{mol}$  ontvangen, is dat 144  $\mu\text{mol}$  per kg. lichaamsgewicht.

Tabel V. I.

De ijzerexcretie in de urine, en de invloed hierop van DF bij normale ratten, bij ratten, overladen met ijzer-dextran, bij normale personen en bij patienten, lijdende aan haemochromatose en transfusie-haemosiderose.

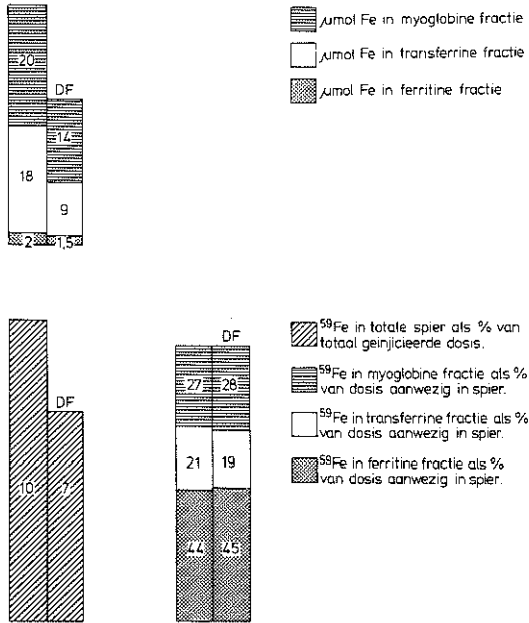
	Normale ratten	Normale personen Interne Geneeskunde I*	Normale personen Ploem	Ratten overladen ijzer-dextran	Patienten haemochromatose Interne Geneeskunde I*	Patienten transfusie-haemosiderose
ijzerexcretie $\mu\text{mol}/24$ uur	$15 \cdot 10^{-3}$	1,2	< 1,7	$30 \cdot 10^{-3}$	---	10
ijzerexcretie na DF $\mu\text{mol}/24$ uur	$100 \cdot 10^{-3}$	20	17	$125 \cdot 10^{-3}$	225	239

\* Gegevens ontleend aan een onderzoek van Drs. J.P. Goossens, internist, dat geschiedt in samenwerking met de afdeling Inwendige Geneeskunde I en Chemische Pathologie.

Uit deze Tabel blijkt dat de ijzerexcretie, geïnduceerd door DF, bij normale personen significant verhoogd is, doch kwantitatief, gezien de gegeven DF-dosis van 1522  $\mu\text{mol}$ , eveneens gering genoemd kan worden. Bij patienten met een verhoogd reserve-ijzer is de ijzerexcretie, geïnduceerd door DF, wel sterk toegenomen. De ijzerexcretie via de urine bij de rat en de verhoging ervan door DF is, indien de totale hoeveelheid ijzer in het organisme in aanmerking wordt genomen, ruw gerekend van dezelfde orde van

grootte als bij de mens.

Zoals reeds eerder opgemerkt, is het een verrassende waarneming dat ijzer, aanwezig in spier, een voorname bron vormt voor het door DF uit te drijven ijzer. Dit feit werd aan een nadere analyse onderworpen. Fig. V.6. geeft een beeld van de ijzerverdeling en de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in de spier en in de drie fracties, bereid uit spierhomogenaat volgens de methode van Finch (57), en de invloed hierop van DF-injecties van  $76 \mu\text{mol}$  per dag gedurende zeven dagen.



Figuur V.6.

De ijzerverdeling en de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in spier en in de drie fracties, de "ferritine"fractie, de "transferrine"fractie en de "myoglobine"fractie, bereid uit spierhomogenaat volgens de methode van Finch, en de invloed hierop van DF-injecties van  $76 \mu\text{mol}$  DF per dag gedurende zeven dagen.

Na de DF-toediening is het ijzergehalte in de spier met  $20 \mu\text{mol}$  gedaald, waarvan  $0,5 \mu\text{mol}$  (22%) in de "ferritine"fractie,  $9 \mu\text{mol}$  (52%) in de "transferrine"fractie en  $6 \mu\text{mol}$  (30%) in de "myoglobine"fractie. Uit deze drie fracties wordt onder invloed van DF ongeveer eenzelfde percentage ijzer,

zowel wat betreft  $^{56}\text{Fe}$  als  $^{59}\text{Fe}$ , onttrokken. Het is dus niet zo dat er specifiek één van de drie genoemde fracties meer toegankelijk is voor DF.

Twee mogelijke verklaringen kunnen voor dit resultaat gegeven worden:

1. DF onttrekt ijzer aan een bepaald compartiment, aanwezig in de spier, doch dat geen deel uitmaakt van de drie genoemde fracties. Vanuit deze drie fracties wordt dan een zeker percentage (30%) ijzer gemobiliseerd via dat compartiment.
2. DF onttrekt ijzer aan een bepaalde fractie, aanwezig in spier, die over de drie fracties gelijkmatig verspreid is. Dit zou kunnen verklaren dat een gelijk percentage aan ijzer uit de drie fracties verdwijnt.

Gezien het feit dat de scheidingstechniek van Finch zeer globaal is, en theoretisch niet zo sterk onderbouwd, lijkt ons conclusie 2 niet bij voorbaat uitgesloten. Toch lijkt conclusie 1 waarschijnlijker.

Aangezien DF in staat is na een enkelvoudige injectie van  $36 \mu\text{mol}$  bij normale ratten het ijzergehalte in lever significant te verminderen, en in de literatuur uitgebreid vermeld wordt dat het ijzer uit de depots, waar bij spieren niet worden genoemd, de voornaamste bron is voor de door DF geïnduceerde ijzerexcretie, was het noodzakelijk om de invloed van DF op het ferritine-ijzer te onderzoeken.

Bij experiment 1 in hoofdstuk IV werd na intraveneuze toediening van  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride gedurende 14 dagen  $76 \mu\text{mol}$  DF per dag intramusculair geïnjecteerd. Het ferritine uit de lever werd geïsoleerd en geanalyseerd. De waarden werden vergeleken met een controle-groep. De resultaten hiervan staan vermeld in Tabel V.2.

Tabel V.2.

Het Fe- en N-gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de specifieke activiteit van ijzer in  $\text{dpm}/\mu\text{mol}$  van ferritine, geïsoleerd uit zes levers van de DF-groep en van de controle-groep (experiment 1, blz. 53).

	Fe $\mu\text{mol}$ in ferritine uit 6 levers	N $\mu\text{mol}$ in ferritine uit 6 levers	Specifieke activiteit $\text{dpm}/\mu\text{mol}$
DF-groep	10	42	610.400
controle-groep	23	48	466.560

Er is minder ferritine aanwezig, doch met een hogere specifieke activiteit in de levers van de ratten met DF behandeld.

Voor de fractionering van het ferritine werd een isokinetische gradiëntcentrifugatie toegepast, waarvan het gebruik een betere fractionering van het ferritine mogelijk maakt. Inderdaad blijkt dat door toepassing van deze techniek, die uitgewerkt werd door Van Kreel op de afdeling Chemische Pathologie van de Erasmus Universiteit Rotterdam (1972), apoferritine en ferritine geheel gescheiden kunnen worden, terwijl een goede fractionering van het ferritine in fracties met oplopende Fe/N-verhouding wordt bereikt (66). Men vindt ongeveer dezelfde specifieke activiteit van het ijzer in alle fracties van het ferritine van ratten met DF behandeld. Tevens ligt de specifieke activiteit van het ijzer in de fracties hoger dan de specifieke activiteit van het ijzer in de controle-groep.

Deze resultaten kunnen verklaard worden door aan te nemen dat DF leidt tot een versnelde afbraak van de "oudere" ferritinefracties (met een hoog Fe/N-quotiënt), die uiteraard een lage specifieke activiteit hebben, waardoor de specifieke activiteit van het ijzer in het ferritine als geheel hoger wordt.

Onder invloed van DF wordt waarschijnlijk ook de ferritinesynthese geremd, omdat er minder ijzer voorradig is. Hierdoor wordt de ongelijkmatigheid van de specifieke activiteit van het ijzer in de ferritinefracties verminderd.

Bij experiment 2 werd eerst 14 dagen 76  $\mu\text{mol}$  DF per dag intramusculair geïnjecteerd, dan werd intraveneus  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride toegediend. De resultaten van het geanalyseerde ferritine zijn vermeld in Tabel V.3.

Tabel V.3.

Het Fe- en N-gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de specifieke activiteit van ijzer in  $\text{dpm}/\mu\text{mol}$  van ferritine, geïsoleerd uit zes levers van de DF-groep en van de controle-groep (experiment 2, blz. 56).

	Fe $\mu\text{mol}$ in ferritine uit 6 levers	N $\mu\text{mol}$ in ferritine uit 6 levers	Specifieke activiteit $\text{dpm}/\mu\text{mol}$
DF-groep	18	54	542.496
controle-groep	33	70	492.000

De specifieke activiteit van het ijzer in de fracties van het ferritine, geïsoleerd uit levers van ratten met DF behandeld, is nu gelijk aan de specifieke activiteit van ijzer in de fracties van de controle-groep. Dit kan eenvoudig verklaard worden. Onder invloed van DF is het ferritinegehalte verminderd, voornamelijk door de afbraak van de "oudere" ferritinefracties. Wanneer de toediening van DF gestaakt wordt, is er geen reden aan te nemen dat de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in beide gevallen niet identiek zou zijn.

Een merkwaardig resultaat bij dit experiment is het feit dat de specifieke activiteit van het ijzer in de urine, 24 uur na injectie van de label, zeer groot is. De specifieke activiteit van ijzer in de urine is ongeveer een factor 10 hoger dan de specifieke activiteit van ijzer in de controle-groep. Dit resultaat kunnen we verklaren door een ijzerpool in de nier aan te nemen, waarvan het ijzer voor DF toegankelijk is, zodat het naar de urine verdwijnt. Wanneer na deze DF-toediening een dosis  $^{59}\text{Fe}$  geïnjecteerd wordt, kan een hoge specifieke activiteit van ijzer in de nierpool verwacht worden, wat zich manifesteert in een hoge specifieke activiteit van ijzer in de urine. De specifieke activiteit van ijzer in de totale nier ligt een factor 8 lager dan de specifieke activiteit van ijzer in de urine. Dit wijst erop dat de ijzerpool, toegankelijk voor DF, in de nier slechts een beperkte fractie is van het totale ijzergehalte in de nier aanwezig.

Bij experiment 1 heeft deze ijzerpool in de nier een lage specifieke activiteit, omdat eerst de label gegeven wordt alvorens met de DF-injecties te starten, zodat weinig incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  mogelijk is. Onze conclusie omtrent het bestaan van een ijzerpool in de nier, waaruit ijzer naar de urine kan worden afgevoerd, wordt enigszins onderstreept door de onderzoeken naar het ijzermetabolisme van de zeelt, verricht door Van Dijk op de afdeling Chemische Pathologie van de Erasmus Universiteit Rotterdam (1973). Hij merkt op: "De hoeveelheid in de urine uitgescheiden ijzer wordt voornamelijk bepaald door het ijzer dat afkomstig is uit een in het excretie-apparaat te poneren ijzerpool. Histologische preparaten tonen kleurbaar ijzer aan in de tubuli van de nier. In de cellen van het eerste en tweede proximale segment is ijzer aanwezig dat met Berlijnsblauw kan worden gekleurd. Ook in het lumen van het eerste en tweede proximale segment kan ijzer worden aangetoond. Dit laatste is ook mogelijk - zij het in mindere mate - in meer distaal gelegen regionen van de tubulus. Of het histochemisch aantoonbare ijzer identiek is met het ijzer in de geponeerde ijzerpool, kan op grond van de verkregen experimentele resultaten niet worden uitgemaakt" (73).

Bij experiment 3 werd vijf dagen na intraveneuze toediening van  $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride intramusculair 533  $\mu\text{mol}$  DF per dag gedurende twee dagen geïnjecteerd. De resultaten van het geanalyseerde ferritine zijn vermeld in Tabel V.4.

Tabel V.4.

Het Fe- en N-gehalte in  $\mu\text{mol}$  en de specifieke activiteit van ijzer in dpm/ $\mu\text{mol}$  van ferritine, geïsoleerd uit zes levers van de DF-groep en van de controle-groep (experiment 3, blz. 59).

	Fe $\mu\text{mol}$ in ferritine uit 6 levers	N $\mu\text{mol}$ in ferritine uit 6 levers	Specifieke activiteit dpm/ $\mu\text{mol}$
DF-groep	18	51	368.732
controle-groep	33	70	492.000

Na een tijdsverloop van vijf dagen is het label homogeen over de ijzerhoudende ferritinefracties verdeeld. Na toediening van DF is minder ferritine aanwezig, vergeleken bij de controle-groep. De specifieke activiteit van ijzer in de fracties verschilt weinig van de specifieke activiteit van ijzer in de fracties van de controle-groep, eenvoudig omdat het label reeds homogeen verdeeld was, toen DF toegediend werd.

Bij experiment 4 en 5 werden ratten overladen met behulp van zes ijzer-dextran injecties, overeenkomend met 2,67 mmol ijzer per injectie. Tevens werd een speurdosis  $^{59}\text{Fe(III)}$  toegevoegd. Vervolgens werd 76  $\mu\text{mol}$  DF per dag gedurende 14 dagen geïnjecteerd. Haemosiderine en ferritine werden geïsoleerd en geanalyseerd. De resultaten staan vermeld in Tabel V.5.

Uit de resultaten blijkt dat DF in de gegeven omstandigheden geen invloed heeft op haemosiderine. Wat de gegevens betreft omtrent de invloed van DF op ferritine, moet worden vermeld dat de specifieke activiteit van ijzer in de fracties van het geïsoleerde ferritine bij de overladen ratten sterk en onregelmatig wisselt.

Tabel V. 5.

Het Fe- en N-gehalte in mmol/g droog haemosiderine en de specifieke activiteit van ijzer in dpm/mmol van haemosiderine, geïsoleerd uit levers van de DF-groep en de controle-groep. De standaardafwijking is gegeven. Het Fe- en N-gehalte in  $\mu$ molen en de specifieke activiteit van ijzer in dpm/ $\mu$ mol van ferritine, geïsoleerd uit vier levers van de DF-groep en de controle-groep (experiment 4 en 5, blz. 62 en 65).

Haemosiderine	Fe mmol/g S(N=5)		N mmol/g S(N=5)		Specifieke activiteit dpm/mmol
DF-groep	4,7	0,4	3,3	0,3	8.736
controle-groep	4,6	0,4	3,4	0,3	10.316

Ferritine	Fe $\mu$ mol in ferritine uit 4 levers	N $\mu$ mol in ferritine uit 4 levers	Specifieke activiteit dpm/ $\mu$ mol
DF-groep	78	215	20.325
controle-groep	92	218	27.368

Zoals reeds in hoofdstuk IV beschreven, werd de invloed van DF op het ijzer in de lever getest met behulp van perfusie-experimenten. De incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in het ferritine tijdens een rattenleverperfusie en de invloed hierop van DF, welke in een dosis van 300  $\mu$ mol aan het perfusiemedium werd toegevoegd, werd bestudeerd. Er is geen merkbare invloed van DF in deze omstandigheden vast te stellen. Wanneer met een ijzervrij perfusiemedium, waaraan 300  $\mu$ mol DF toegevoegd wordt, gewerkt wordt, kan na de perfusie geen ijzer in de lyophil gedroogde perfusie-oplossing aangetoond worden. De invloed van DF op het ijzer in de lever van de rat, overladen met 714  $\mu$ mol ijzer in de vorm van ijzer-dextran, is tijdens de perfusie ook nihil.

Het is een merkwaardig resultaat dat DF geen invloed heeft op het ijzer in de lever, wanneer perfusietechnieken toegepast worden. Ook Van Kreel stelde vast dat tegen de verwachting in ferritine-ijzer niet gemakkelijk mobiliseerbaar is.

Gezien het feit dat in vivo DF wel in staat is om ijzer aan de lever te onttrekken, moet de oorzaak van het negatieve resultaat bij perfusie gezocht worden in de perfusietechniek. Waarschijnlijk ontbreekt een bepaalde factor die aanwezig moet zijn om de onttrekking van ijzer mogelijk te maken.



Over de afbraak en excretie van toegediend FO bestaan in de literatuur tegenstrijdige opvattingen:

- a. FO wordt volledig en onveranderd uitgescheiden (25, 26).
- b. FO wordt slechts voor 50 - 70% uitgescheiden (27, 28).

De experimenten bij ratten met toegediend FO, gemerkt met  $^{59}\text{Fe}$ , geven het volgende resultaat:

70% van het geïnjecteerde FO wordt via de urine uitgescheiden, 24 uur na injectie, en 4% in de faeces. De specifieke activiteit van ijzer in de urine is 20% lager dan de specifieke activiteit van ijzer in het geïnjecteerde monster. Er is distributie van FO, gelabeld met  $^{59}\text{Fe}$ , over de verschillende organen, 72 uur na injectie, waarvan een groot gedeelte in spier (12%) en bot (5%), in erythrocyten (5%) en lever (2%) een kleiner gedeelte, en in milt (0,07%), hersenen (0,01%) en darm (0,10%) een zeer gering gedeelte. Er is uitwisseling tussen FO-ijzer en weefselijzer. Dit feit bemoeilijkt de meting van de ijzeronttrekkende invloed van DF, omdat deze gecompliceerd wordt door het gevormde FO dat in uitwisseling is met de ijzerpools. Bij gebrek aan exacte gegevens hebben wij bij onze proeven over de invloed van DF geen correctie voor dit fenomeen kunnen aanbrengen. De correctie zou overigens van weinig belang geweest zijn, aangezien het FO, gevormd na toediening van DF, grotendeels via de gal verwijderd wordt, terwijl het geïnjecteerde FO grotendeels via de urine wordt uitgescheiden.

Singh merkt in een publicatie op dat er een labiele ijzerpool bestaat die gemakkelijk toegankelijk is voor DF (24). Wij onderzochten het verband tussen enkele voor de hand liggende grootheden en de volgens de techniek van Singh gemeten labiele ijzerpool met behulp van correlatieberekeningen (zie Tabel V.6.).

Bij normale ratten is er een significant positieve correlatie tussen ijzer in lever en ijzer in de labiele ijzerpool. Opvallend is echter dat de correlatie tussen ijzer in alle organen en ijzer in de labiele pool ook zeer sterk positief is, wat niet zo te verwachten is wanneer de labiele ijzerpool alleen in de lever gelokaliseerd zou zijn. Merkwaardig is het feit dat bij anaemische dieren de labiele ijzerpool onmeetbaar klein geworden is. Bij overladen ratten is er geen significant positieve correlatie tussen het totale ijzergehalte in de organen en ijzer in de labiele pool. Het uitgangspunt van Singh's meetmethode van de labiele ijzerpool is het aan elkaar gelijk zijn van de specifieke activiteit van de labiele ijzerpool en de specifieke activi-

teit van ijzer in de urine na DF-toediening. De gemiddelde waarden voor de specifieke activiteit van ijzer in de lever en in de urine na DF-toediening zijn in Tabel V.7. vermeld voor de drie groepen ratten, deze lopen dus nogal uiteen.

Tabel V.6.

Gevonden correlaties tussen enkele grootheden en de labiele ijzerpool, gemeten volgens Singh's techniek.

	Normale ratten	Anaemische ratten	Overladen ratten
correlatie tussen hoeveelheid ijzer in lever en labiele ijzerpool	0,0005 < P < 0,0025	P > 0,5	0,025 < P < 0,05
Correlatie tussen hoeveelheid ijzer in lever + milt en labiele ijzerpool	0,0005 < P < 0,0025	P > 0,5	0,025 < P < 0,05
correlatie tussen hoeveelheid ijzer in organen (exclusief bloed) en labiele ijzerpool	P < 0,0005	P > 0,5	0,10 < P < 0,15

Tabel V.7.

Gemiddelde waarden voor de specifieke activiteit van ijzer in de lever en de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening.

	Specifieke activiteit in urine dpm/ $\mu$ mol	Specifieke activiteit in lever dpm/ $\mu$ mol
normale ratten	128.614	109.059
anaemische ratten	73.455	105.969
overladen ratten	68.373	91.070

Wij onderzochten ook of er bij de individuele rat een correlatie bestaat tussen de specifieke activiteit van ijzer in de lever en de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening bij de drie groepen ratten.

Tabel V. 8.

Gevonden correlaties tussen de specifieke activiteit van ijzer in de lever en de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening.

	Normale ratten	Anaemische ratten	Overladen ratten
correlatie tussen specifieke activiteit ijzer in lever en specifieke activiteit ijzer in urine	0,30 < P < 0,35	0,475 < P < 0,4875	0,0005 < P < 0,025

Hoewel de specifieke activiteit van ijzer in de lever en in de urine na DF-toediening van dezelfde orde van grootte is, mag ons inziens hieruit niet geconcludeerd worden dat de labiele ijzerpool identiek is met het leverijzer. Indien de labiele ijzerpool identiek zou zijn met het leverijzer, zou men bij de drie groepen ratten een positieve correlatie tussen de specifieke activiteit van ijzer in de lever en de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening verwachten. Deze correlatie is echter slechts positief bij de overladen ratten.

Bij normale ratten is er een sterk positieve correlatie tussen de specifieke activiteit van ijzer in de nier en de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening. Hierbij moet wel worden opgemerkt dat, in tegenstelling tot de situatie in de lever, de specifieke activiteit van ijzer in de nier een factor twee tot drie kleiner is dan de specifieke activiteit van ijzer in de urine. Desondanks ligt het voor de hand aan te nemen, gezien de genoemde correlatie, dat een fractie van het ijzer in de nier de voorloper is van het ijzer in de urine. Het is nuttig daarbij te bedenken dat bij normale ratten in 24 uur onder invloed van een enkelvoudige DF-injectie van 36  $\mu\text{mol}$  het totale ijzergehalte in de nieren met  $1300 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}$  vermindert, terwijl de ijzeruitscheiding in dezelfde periode in de urine slechts  $85 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}$  bedraagt.

De volgende vraag moet gesteld worden: bestaat er een "labiele" ijzerpool, dit is een ijzerpool die toegankelijk is voor DF en waarvan de specifieke activiteit gelijk is aan die van het in de urine uitgescheiden ijzer, en zo ja, waar is deze pool gelokaliseerd? In ieder geval zal, zoals reeds opgemerkt is, zo'n pool niet alleen in de lever gelokaliseerd kunnen zijn.

Onze argumenten hiervoor zijn:

1. Er is geen significant positieve correlatie tussen de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening en de specifieke activiteit van ijzer in de lever bij normale en anaemische dieren, hoewel de specifieke activiteit van dezelfde orde van grootte is.

2. Bij overladen ratten is er wel een significant positieve correlatie tussen de specifieke activiteit van ijzer in de lever en de specifieke activiteit van ijzer in de urine.

Uit onze resultaten van de experimenten waarmee de invloed van DF op het ferritine-ijzer werd onderzocht, blijkt echter dat DF leidt tot de afbraak van de ferritinefracties met een hoog Fe/N-quotiënt, dat wil zeggen de oudere fracties die ten opzichte van de nieuw gevormde ferritinefracties een lage specifieke activiteit voor ijzer hebben.

In ieder geval blijkt hieruit dat het totale leverijzer niet identiek is met de labiele ijzerpool.

3. Bij anaemische en overladen dieren geeft een enkelvoudige DF-injectie geen significante vermindering van het ijzergehalte in lever.

4. Bij normale ratten is er een sterk positieve correlatie tussen de specifieke activiteit van ijzer in de nier en de specifieke activiteit van ijzer in de urine, hoewel de specifieke activiteiten in nier en urine niet van dezelfde orde van grootte zijn. Dit wijst erop dat een gedeelte van het ijzer in de nier tot de labiele ijzerpool zou behoren. Ook uit onze experimenten waarbij eerst langdurig DF werd toegediend en vervolgens <sup>59</sup>Fe werd geïnjecteerd, kon worden opgemaakt dat een labiele ijzerpool in de nier aanwezig is.

5. Gezien de resultaten van onze experimenten omtrent de invloed van DF op de spier, ligt het voor de hand de labiele ijzerpool ook in de spier te lokaliseren, en wel in een bepaald compartiment welke geen deel uitmaakt van de drie geïsoleerde fracties, namelijk de "ferritine"fractie, de "transferrine"fractie en de "myoglobine"fractie, aangezien daaruit het ijzer door DF gelijkmatig verdwijnt.

6. Bij normale ratten en bij ratten, overladen met ijzer-dextran, wordt het ijzergehalte in hersenen onder invloed van DF significant verminderd.

7. Bij de methode van Singh wordt de specifieke activiteit van ijzer in de urine bepaald. De ijzeruitscheiding in de urine is na DF-toediening kwantitatief gering. Met de kwantitatief zeer belangrijke uitscheiding van ijzer via de gal houdt Singh in het geheel geen rekening.

Onze opvatting is dat, indien een labiele ijzerpool bestaat, deze verdeeld moet zijn over verschillende organen, waarbij slechts een gedeelte van het ijzer in ieder orgaan tot de labiele ijzerpool behoort. De uitdrukking "labiele pool" suggereert een metabool actieve stof of stoffen. Greenberg en Wintrobe gebruikten in 1946 deze uitdrukking voor een ijzerfractie die naderhand het transferrine-ijzer bleek te zijn, inderdaad een metabool zeer actieve ijzercomponent (36). Uit onze experimenten omtrent de invloed van DF op het ferritine-ijzer volgt in ieder geval dat door DF-toediening de "oude" ferritinefracties worden afgebroken. Het is zeer te betwijfelen of het zin heeft deze fracties de labiele ijzerpool te noemen.

In de spier vindt er een geringe incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  plaats. Onder invloed van DF wordt veel ijzer, afhankelijk van de proefopzet 40 - 60% van het totale ijzer in de spier onttrokken. Terwijl dit laatste, namelijk het onttrekken van ijzer onder invloed van DF, voor Singh het criterium voor "labiel" is, kan echter worden tegengeworpen dat de geringe incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  niet op een hoge metabole activiteit wijst.

Het is niet onmogelijk dat er één identieke ijzerfractie in alle organen bestaat, waarop DF direct aangrijpt. Het is zelfs niet uitgesloten, maar ons inziens weinig waarschijnlijk, dat deze fractie in ieder orgaan dezelfde specifieke activiteit heeft. Deze fractie zal in ieder geval dan slechts een beperkt gedeelte van het aanwezige ijzer in de organen omvatten, zoals onze experimenten bewijzen, waarbij de specifieke activiteiten in nierweefsel en in urine gemeten worden. De ijzeronttrekking door DF echter gebeurt weliswaar niet equimoleculair, doch benadert dit behoorlijk, 36  $\mu\text{mol}$  DF verwijderd bij normale ratten 28,5  $\mu\text{mol}$  ijzer. Het is aannemelijk, gezien de sterke daling van het ijzer in de spier onder invloed van DF, dat niet alleen de voor DF toegankelijke ijzerfractie verdwijnt. Onttrekking van ijzer door DF aan deze fractie leidt ongetwijfeld tot afbraak van andere ijzerbevattende stoffen in de organen. De talrijke modelsystemen betreffende de ijzerstofwisseling die in de loop der tijd werden ontworpen, bieden ons geen aanknopingspunten omtrent aangrijpingspunten voor DF.

Uit het voorgaande blijkt dat Singh met "labiel" een dubbelzinnige terminologie heeft ingevoerd. Uit onze gegevens blijkt verder dat een ijzerpool, bestaande uit eenzelfde soort moleculen, met eenzelfde specifieke activiteit in alle organen en groot genoeg om de hoeveelheid ijzer te leveren die ten gevolge van DF aan het organisme wordt onttrokken, niet aanwezig is. Toch leidt Singh's methodiek zonder twijfel tot metingen die met betrek-

king tot de omvang van de ijzerreserve in het lichaam een zekere voorspelende waarde hebben.

Wij onderzochten of er een correlatie bestaat tussen de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening en de totale hoeveelheid ijzer in het organisme, en tevens tussen de specifieke activiteit van ijzer in de urine na DF-toediening en de hoeveelheid ijzer in de lever (zie Tabel V.9.).

Tabel V.9.

Gevonden correlaties tussen de specifieke activiteit van ijzer in de urine en de totale hoeveelheid ijzer, en tussen de specifieke activiteit van ijzer in de urine en de hoeveelheid ijzer in de lever.

	Normale ratten	Anaemische ratten	Overladen ratten
correlatie tussen totale hoeveelheid ijzer en specifieke activiteit ijzer in urine	0,05 < P < 0,10	0,30 < P < 0,35	0,05 < P < 0,10
correlatie tussen hoeveelheid ijzer in lever en specifieke activiteit ijzer in urine	P < 0,0005	0,30 < P < 0,35	0,005 < P < 0,01

Bij normale en overladen ratten bestaat een significant negatieve correlatie tussen de specifieke activiteit van ijzer in de urine en de hoeveelheid ijzer in de lever. Het succes van Singh's meetmethode is ongetwijfeld gebaseerd op deze significante correlaties, zoals uit de formule van Singh blijkt, wanneer deze op de volgende manier omgevormd wordt:

$$\text{Labile iron store} = \frac{{}^{59}\text{Fe in labile iron pool}}{{}^{59}\text{Fe in urine}} \times \text{urinary iron.}$$

$$\text{Labiele ijzerpool} = {}^{59}\text{Fe in organen} \times \frac{1}{\text{specifieke activiteit van ijzer in urine}}$$

Een verklaring voor deze significanties kan op grond van onze experimentele resultaten niet gegeven worden, zonder dat een en ander een te speculatief karakter krijgt.

## SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven dat tot doel heeft meer kennis op te doen omtrent de invloed van de chelaatvormer desferrioxamine B op de ijzerstofwisseling bij de rat.

Hoofdstuk I geeft een overzicht van de literatuur betreffende de eigenschappen en toepassingen van DF en FO. Aandacht wordt geschonken aan het in de literatuur beschreven excretiepatroon, aangezien er over dit feit tegenstrijdige opvattingen bestaan.

Het onderzoek van Singh, waarbij kwantitatief bij drie groepen patienten een "labiele ijzerpool" gemeten wordt (dit is een pool waarvan het ijzer direct toegankelijk is voor DF), wordt besproken.

Tevens wordt een overzicht gegeven van de in de loop der tijd ontworpen modelsystemen betreffende ijzerkinetiek en ijzerstofwisseling, ten-einde na te gaan of er aangrijpingsplaatsen zijn aan te wijzen voor de werking van DF. Op een drietal modelsystemen wordt uitvoeriger ingegaan.

Hoofdstuk II is gewijd aan materialen en methoden die bij dit onderzoek werden gebruikt.

In hoofdstuk III wordt dieper ingegaan op de ijzerverdeling over het gehele organisme van de normale, anaemische, sterk anaemische en overladen rat. De vermindering van de hoeveelheid ijzer onder invloed van DF in de verschillende organen van deze ratten wordt bestudeerd, waarbij duidelijk wordt dat de spier een voornamelijk bron van ijzer vormt voor DF. Opvallend is het feit dat bij normale ratten de daling van het ijzer in de hersenen, geïnduceerd door DF, zeer groot is. Over de invloed van DF op de ijzervoorraad in de spier en op de hoeveelheid ijzer in de hersenen is in de literatuur vrijwel geen informatie aanwezig. Verder wordt in hoofdstuk III ingegaan op de ijzerexcretie, geïnduceerd door DF, via urine en

faeces, waarbij wordt vastgesteld dat de ijzeruitscheiding via de urine kwantitatief gering is, terwijl de faecale ijzerexcretie onder invloed van DF een belangrijke vorm van excretie is. Ook hierover wordt in de literatuur weinig vermeld. Wat het uitscheidings- en distributiepatroon van geïnjecteerde FO, gemerkt met  $^{59}\text{Fe}$ , betreft, is nagegaan in welke mate en in welke organen FO ijzer uitwisselt en in welk percentage FO uitgescheiden wordt in urine en faeces.

Tot slot wordt in dit hoofdstuk de methode van Singh, waarbij kwantitatief een "labiele ijzerpool" zou gemeten worden, onder de loep genomen. Het verband tussen enkele grootheden en de "labiele ijzerpool" wordt onderzocht.

Geconcludeerd wordt dat een "labiele ijzerpool", bestaande uit één of enkele soorten moleculen, met éénzelfde specifieke activiteit en groot genoeg om al het ijzer te bevatten dat door DF onttrokken wordt, niet aanwezig is.

In hoofdstuk IV wordt de invloed van DF op het ferritine-ijzer onderzocht. De resultaten wijzen erop dat DF leidt tot de versnelde afbraak van de "oudere" ferritinefracties (met een hoog Fe/N quotiënt) en dat waarschijnlijk onder invloed van DF de ferritinesynthese geremd wordt. Door experimenten over het verband tussen de ijzeruitscheiding in urine en DF-toediening werd het duidelijk dat er een ijzerpool in de nier bestaat waarvan het ijzer voor DF toegankelijk is en die de voorloper is van het ijzer in de urine. Deze ijzerpool omvat niet alle ijzer in de nier, maar slechts een gedeelte ervan. De bestudering van de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in het ferritine en de invloed hierop van DF tijdens een rattenleverperfusie maakt duidelijk dat er geen merkbare invloed van DF in deze omstandigheden, in tegenstelling tot de invloed van DF in vivo, bestaat.

Experimenten waarbij de incorporatie bestudeerd wordt van  $^{59}\text{Fe}$  in de spier en in drie geïsoleerde fracties, namelijk de "ferritine"fractie, de "transferrine"fractie en de "myoglobine"fractie, bereid uit spierhomogenaat volgens de methode van Finch, tonen aan dat onder invloed van DF uit deze drie fracties ongeveer éénzelfde percentage ijzer, zowel  $^{59}\text{Fe}$  als  $^{56}\text{Fe}$ , wordt onttrokken.

In de discussie is uitvoerig aandacht besteed aan de "labiele ijzerpool" volgens Singh.

Onze conclusie is dat de grondslag van de methodiek van Singh onjuist is. Het succes van Singh's meetmethode is, ons inziens, gebaseerd op de significant negatieve correlatie tussen de specifieke activiteit van ijzer



in de urine na DF-toediening en de hoeveelheid ijzer in de lever bij normale en overladen ratten. Deze correlatie maakt een ruwe schatting van de ijzerreserve in de lever mogelijk en de hypothese van een "labiele" ijzerpool, die ook geen steun vindt in de ijzermodelsystemen, is daarvoor niet noodzakelijk.

## SUMMARY

The purpose of the investigation described in this thesis is to acquire more information about the influence of the chelating agent Desferrioxamine B on the iron metabolism of rats.

Chapter I presents a survey of the literature concerning the properties and applications of Desferrioxamine (DF) and Ferrioxamine (FO). The excretion pattern of these compounds is discussed in detail as this has been studied by many workers and has to some degree yielded divergent results. The investigation of Singh is discussed. This work is concerned with the development of a method for quantitative measurement of a labile iron store in normal individuals, in patients with iron deficiency, and in patients with iron overload (a labile iron store is a pool containing iron that is direct available for DF). A review of developed model systems concerning iron kinetics and iron metabolism is given in order to examine the sites of action of DF in the organism. Three model systems are discussed in detail.

Chapter II deals with the materials and methods currently used in the course of this study.

In chapter III the results of our investigation into the iron distribution in normal rats, anaemic and iron-overloaded rats are presented. The influence of DF on the decrease of the iron content in the different organs of these rats was studied. The results obtained indicate that muscle iron forms an important source available for chelation with DF. A very large decrease of iron, induced by DF, in brain of normal rats was found. There is very little published information regarding the influence of DF on the iron store in muscle and on the iron content in brain. In chapter III we also examined the iron excretion induced by DF, in urine and faeces. It is obvious that the urinary iron excretion is quantitative negligible while the faecal iron excretion, induced by DF is a very important route of iron ex-

cretion. This is in contrast to published results from other workers who found this route of iron excretion to be of little importance. A study was made of the distribution and excretion pattern of injected FO, labelled with  $^{59}\text{Fe}$ . The distribution of ferrioxamine iron and the exchange between FO iron and body iron was investigated, as well as the excretion pattern in urine and faeces. Finally, in this chapter, experiments are described dealing with Singh's method for the quantitative measurement of a labile iron store. The correlation between liver iron, total iron in liver and spleen, total amount of iron in the organs and the labile iron store is examined. We conclude that a labile iron store, containing one or more different types of molecules, and having one identical specific activity, and which is large enough to contain all the iron that is mobilized by DF, does not exist.

In chapter IV experiments are described concerning the influence of DF on ferritin iron. The results show that DF accelerates the breakdown of the ferritin fractions with a high Fe/N ratio and they suggest that the synthesis of ferritin is delayed by DF. The experimental results of the investigation concerning the correlation between urinary iron excretion and DF administration prove the existence of a pool localized in the kidneys, containing iron that is available for DF. This iron pool contains but a fraction of the total iron amount present in the kidneys. The incorporation of radioactive iron into ferritin, and the influence of DF during rat liver perfusion experiments is also described in chapter IV. These perfusion experiments showed that there is no effect of DF under these circumstances, in contradiction to the results obtained in vivo. The incorporation of radioactive iron in muscle and in three isolated fractions, the "ferritin" fraction, the "transferrin" fraction and the "myoglobin" fraction, isolated from muscle homogenate according to the method of Finch, was investigated. The results prove that an equal percentage of iron,  $^{59}\text{Fe}$  as well as  $^{56}\text{Fe}$ , was removed by DF from the three fractions.

In the discussion special attention is given to the "labile" iron pool according to Singh. Our conclusion is that the basic principle of Singh's method is incorrect. The success of Singh's method is based upon the significant negative correlation between the specific activity of iron in urine after DF administration and the amount of iron in the liver in normal and iron overloaded rats. This correlation allows the estimation of the size of the iron store in the liver. The hypothesis of the existence of a labile iron store is not necessary.

## LITERATUURLIJST

1. Reynolds, D.M.; Schatz, A. and Waksman, S.A.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 64, 50 (1947).
2. Gause, G.F. and Brazhnikova, M.G.: Nov. Med. Akad. Med. Nauk. S.S.S.R. 23, 3 (1951).
3. Neilands, J.B.: J. Amer. Chem. Soc. 74, 4846 (1952).
4. Hesselatine, C.W.; Fidacks, C.; Whitehill, A.R.; Bohonos, N.; Hutchings, B.L. and Williams, J.H.: J. Amer. Chem. Soc. 74, 1362 (1952).
5. Lochhead, A.G.; Burton, M.O. and Thexton, R.H.: Nature 170, 282 (1952).
6. Bickel, H.; Gäumann, E.; Keller-Schierlein, W.; Prelog, V.; Vischer, E.; Wettstein, A. and Zähler, H.: Experientia 16, 129 (1960).
7. Bickel, H.; Gäumann, E.; Nussberger, G.; Reusser, P.; Vischer, E.; Voser, W.; Wettstein, A. and Zähler, H.: Helv. Chim. Acta 43, 2105 (1960).
8. Bickel, H.; Bosshardt, R.; Gäumann, E.; Reusser, P.; Vischer, E.; Voser, W.; Wettstein, A. and Zähler, H.: Helv. Chim. Acta 43, 2118 (1960).
9. Zähler, H.; Hütter, R. and Bachmann, E.: Arch. Mikrobiol. 36, 325 (1960).
10. Prelog, V.: Iron Metabolism: An International Symposium. Springer Verlag. Berlin-Göttingen. Heidelberg (1964).
11. Schwarzenbach, G. and Schwarzenbach, K.: Helv. Chim. Acta 46, 1390, No. 154 (1963).
12. Moeschlin, S.; Bickel, H.; Blumberg, A.; Frey, F.; Heilmeyer, L.; Keberle, H.; Keller, H.M.; Maier, C.; Mann, M.; Marti, H.R.; Nielsen, J.B.; Schnack, H.; Schnider, U.; Tripod, J. and Wöhler, F.: Schweizerische Med. Wochenschrift 92, 1295, No. 42 (1962).
13. Ploem, J.E.: Diagnostische proef voor ijzerstapeling bij de mens. De desferrioxamine-proef. Van Gorcum and Comp. N.V. - Dr. H.J. Prakke & H.M.G. Prakke. Utrecht-Holland (1965).
14. Ploem, J.E.; De Wael, J.; Verloop, M.C. and Punt, K.: Brit. J. Haemat. 12, 396 (1966).
15. Pawelski, S.; Topolska, P.; Roszkowski, S. and Radecka, K.: Bull. Polish Med. Science and History 8, 69 (1965).
16. Schmid, J.R.; Oechslin, R.J.; Schnider, Th. and Moeschlin, S.: Schweizerische Med. Wo-

- chenschrift 94, 1652, No. 47 (1964).
17. Wöhler, F.: *Acta Haemat.* 32, 321 (1964).
  18. Hallberg, L.; Hedenberg, L. and Weinfeld, A.: *Scand. J. Haemat.* 3, 85 (1966).
  19. Schnack, H. and Wewalka, F.: *Med. Welt* 2, 1529 (1965).
  20. Unsel, D.W.: *Med. Welt* 1, 569 (1964).
  21. Walsh, J.R.; Mass, R.E.; Smith, F.W. and Lange, V.: *Gastroenterology* 49, 134 (1965).
  22. Smith, P.M.; Studley, F. and Williams, R.: *Lancet* I, 133 (1967).
  23. Brown, E.B.; Hwang, Y.F.; Allgood, W.: *J. Lab. Clin. Med.* 69, 382 (1967).
  24. Singh, A.K.: *Brit. J. Haemat.* 14, 411 (1968).
  25. Wöhler, F.: *Acta Haemat.* 30, 65 (1963).
  26. Keberle, H.: *Annals New York Academy of Sciences* 119, 758 (1964).
  27. Bannerman, R.M.; Callender, S.T. and Williams, D.L.: *Brit. Med. J.* 2, 1573 (1962).
  28. Fielding, J.: *J. Clin. Path.* 18, 88 (1965).
  29. Hallberg, L. and Hedenberg, L.: *Scand. J. Haemat.* 2, 67 (1965).
  30. Wöhler, F.: Report, compiled by P. Imhof, on a Meeting of Clinical Investigators held in Basle, Switzerland, November 16 (1961).
  31. Gevirtz, N.R.; Tendler, D.; Lurinsky, G. and Wasserman, L.R.: *The New England Journal of Medicine* 273, 95, No. 2 (1965).
  32. Figuera, W.G. and Thompson, J.H.: *Amer. J. Physiol.* 215, 807, No. 4 (1968).
  33. Hedenberg, L.: *Scand. J. Haemat., Suppl.* 6 (1969).
  34. Glaser, B.E.A.: *Academisch Proefschrift. Faculteit der Geneeskunde, Erasmus Universiteit Rotterdam* (1970).
  35. Tavenier, P.: *Academisch Proefschrift. Faculteit der Geneeskunde, Erasmus Universiteit Rotterdam* (1971).
  36. Greenberg, G.R. and Wintrobe, M.M.: *J. Biol. Chem.* 165, 397 (1946).
  37. Werkman, H.P.T.; Schretlen, E.D.A.: *Persoonlijke mededeling. Radboudziekenhuis Nijmegen* (1974).
  38. Huff, R.L.; Hennessy, T.G.; Austin, R.E.; Garcia, J.F.; Roberts, B.M. and Lawrence, J.H.: *J. Clin. Invest.* 29, 1041 (1950).
  39. Huff, R.L.; Elmlinger, P.J.; Garcia, J.F.; Oda, J.M.; Cockrell, M.C. and Lawrence, J.H.: *J. Clin. Invest.* 30, 1512 (1951).
  40. Sharney, L.; Schwartz, L.; Wasserman, L.R.; Port, S. and Leavitt, D.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 87, 489 (1954).
  41. Bush, J.A.; Jensen, W.N.; Ashenbrucker, H.; Cartwright, G.E. and Wintrobe, M.M.: *J. Exper. Med.* 103, 145 (1956).
  42. Bush, J.A.; Jensen, W.N.; Ashenbrucker, H.; Cartwright, G.E. and Wintrobe, M.M.: *J. Exper. Med.* 103, 161 (1956).

43. Huff, R.L. and Judd, O.J.: *Advances Biol. and Med. Physics* 4, 223 (1956).
44. Garby, L. and Noyes, W.D.: *J. Clin. Invest.* 38, 1479 (1959).
45. Finch, C.A.: *J. Clin. Invest.* 38, 392 (1959).
46. Pollycove, M. and Mortimer, R.: *J. Clin. Invest.* 40, 753 (1961).
47. Pollycove, M. and Mortimer, R.: *Nature* 194, 152 (1962).
48. Garby, L.; Schneider, W.; Sundquist, O. and Vuille, J.V.: *Acta Physiol. Scand.* 59, 1, Suppl. 163 (1963).
49. Sharney, L.; Wasserman, L.R.; Schwartz, L. and Tendler, D.: *Annals New York Academy of Sciences* 108, 230 (1963).
50. Hosain, F. and Finch, C.A.: *J. Lab. Clin. Med.* 64, 905 (1964).
51. Nooney, G.C.: *Biophys. J.* 5, 755 (1965).
52. Nooney, G.C.: *Biophys. J.* 6, 601 (1966).
53. Hosain, F. and Finch, C.A.: *Acta Med. Scand.*, Suppl. 455, 256 (1966).
54. Hosain, F. and Finch, C.A.: *J. Clin. Invest.* 46, 1, No. 1 (1967).
55. Najean, Y. and Dresh, C.: *Amer. J. Physiol.* 213, 533 (1967).
56. Garby, L. and Vuille, J.C. in: *Compartments, Pools and Spaces in Medical Physiology*. Eds.: Bergner, P.E.E. and Lushbaugh, C.C. U.S. Atomic Energy Commission. Oak Ridge, 361 (1967).
57. Cheney, B.A.; Lothe, K.; Morgan, E.H.; Sood, S.K. and Finch, C.A.: *Amer. J. Physiol.* 212, 376 (1967).
58. Desenne, J.J. and Armas, P.: *Acta Cientifica Venezolana* 25, 168 (1969).
59. Cook, J.D.; Marsaglia, G.; Eschbach, J.W.; Funk, D.D. and Finch, C.A.: *J. Clin. Invest.* 49, 197 (1970).
60. Blijenberg, B.G.: *Academisch Proefschrift. Faculteit der Geneeskunde, Erasmus Universiteit Rotterdam* (1973).
61. Harker, L.A.; Funk, D.D. and Finch, C.A.: *Amer. J. Med.* 45, 105 (1968).
62. Balcerzak, S.P.; Westerman, M.P.; Heinle, E.W. and Taylor, F.H.: *Annals Int. Med.* 68, 518 (1968).
63. Cumming, R.L.C.; Millar, J.A.; Smith, J.A. and Goldberg, A.: *Brit. J. Haemat.* 17, 257 (1969).
64. Crichton, R.R.: *Febs. Letters* 34, 125, No. 2 (1973).
65. Nütsu, Y.; Ishitani, K. and Listowsky, I.: *Biochem. and Biophys. Research Communications* 55, 1134, No. 4 (1973).
66. Van Kreeel, B.K.: *Academisch Proefschrift. Faculteit der Geneeskunde. Erasmus Universiteit Rotterdam* (1972).
67. Hershko, C.; Cook, J.D. and Finch, C.A.: *J. Lab. Clin. Med.* 81, 876 (1973).
68. Trinder, P.J.: *J. Clin. Path.* 9, 170 (1956).

69. Tavenier, P.; Raaymakers, C.E.; Van Eijk, H.G. and Leijnse, B.: *Clin. Chim. Acta* 32, 63 (1971).
70. Andersson, N.S.E.: *Brit. Med. J.* 2-1, 275 (1961).
71. Hampton, J.K.: *Amer. J. Physiol.* 176, 20 (1954).
72. Pape, L.; Multani, J.S.; Stitt, C. and Saltman, P.: *Biochemistry* 7, 613 (1968).
73. Van Dijk, J.P.: *Academisch Proefschrift. Faculteit der Geneeskunde, Erasmus Universiteit Rotterdam* (1973).
74. Wijvekate, M.L.: *Verklarende Statistiek. Hoofdredactie: Prof. Dr. F.J.J. Buytendijk. Aula-Boeken. Utrecht-Antwerpen* (1961).

## N A S C H R I F T

Gaarne wil ik alle personen danken die hebben meegewerkt aan het tot stand komen van dit proefschrift.

Hooggeleerde Leijnse, hooggeachte promotor, U dank ik voor de enthousiaste wijze waarop U mij begeleid hebt bij het onderzoek en voor de vele leerzame suggesties die U mij gegeven hebt. Tevens dank ik U voor de vele tijd die U mij geschonken hebt tijdens het schrijven van dit proefschrift.

Hooggeleerde Gerbrandy, U betuig ik mijn dank voor de accurate wijze waarop U als co-referent dit proefschrift hebt beoordeeld.

Zeergeleerde Van Eijk, U dank ik voor de waardevolle medewerking die ik gedurende deze tijd van U mocht ontvangen en voor de nauwgezette wijze waarop u als co-referent het proefschrift hebt beoordeeld.

Zeergeleerde Lameijer, U ben ik zeer erkentelijk voor het feit dat U het manuscript van commentaar hebt willen voorzien.

Waardevolle hulp werd verkregen van Dr. W.F. Wiltink†.

Heel veel dank ben ik verschuldigd aan mejuffrouw A.M. Op den Kelder.

Zonder haar bijdrage zou dit proefschrift nooit tot stand gekomen zijn. Op een enthousiaste en zeer kritische wijze verrichtte zij al het experimentele werk en gaf beredeneerd commentaar op de verkregen resultaten.

Het gehele typewerk van het manuscript werd op deskundige en vlotte wijze verricht door mejuffrouw M. A. Th. Hoorman en mevrouw E.M. Schuur-Buik, waarvoor mijn hartelijke dank.

De figuren weergegeven in dit proefschrift, werden op nauwkeurige wijze verzorgd door mejuffrouw C. Swaab. Ik ben haar hiervoor zeer erkentelijk. Tevens wil ik de heer J. Kruis en de heer P. Backhuys danken voor hun bijdrage aan dit onderzoek.

Mijn ouders wil ik dankzeggen voor de gelegenheid die zij mij hebben ge-



boden mijn studie te beginnen en te voltooien en voor de opofferingen die ze zich hierbij hebben getroost.

Tot slot dank ik mijn man en mijn dochtertje Birgit voor het geduld dat zij hebben opgebracht in de lange periode dat vele huiselijke zorg ontbrak.

## CURRICULUM VITAE

Op verzoek van de Erasmus Universiteit Rotterdam,  
Faculteit der Geneeskunde.

In 1965 behaalde ik te Antwerpen het diploma van volledig middelbaar onderwijs (afdeling: Latijn - Wetenschappen) en tevens het diploma van onderwijzeres voor het lager onderwijs. In ditzelfde jaar werden door mij de universitaire studies aangevangen aan de Rijksuniversiteit te Gent met als studierichting scheikunde.

In 1968 behaalde ik de graad van kandidaat in de wetenschappen, groep scheikunde. In 1970 werd het diploma behaald van licentiaat in de wetenschappen, groep scheikunde, met als hoofdrichting Organische Chemie (Prof. Dr. M. Verzele) en als keuzevak Macromoleculaire Chemie (Prof. Dr. G. Goethals). Tevens werd een verhandeling ingediend met als wetenschappelijk onderwerp: Studie over fotocycloaddities.

In 1970 trad ik in dienst als wetenschappelijk medewerker op de afdeling Interne Geneeskunde I (Hoofd: Prof. Dr. J. Gerbrandy) van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt en was ik gedetacheerd bij de afdeling Chemische Pathologie van de Erasmus Universiteit te Rotterdam, waar onder leiding van Prof. Dr. B. Leijnse het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht.