

ERYTHROPOIETINE

enkele aspecten van de humorale regulatie van de erythropoïese

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd bewerkt op de afdeling Chemische Pathologie, in samenwerking met de afdeling Interne Geneeskunde I, aan de faculteit der geneeskunde, Erasmus Universiteit, Rotterdam.

ERYTHROPOIETINE

enkele aspecten van de humorale regulatie
van de erythropoïese

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. B. LEIJNSE

EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.

DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP

WOENSDAG 9 JUNI 1976 DES NAMIDDAGS

TE 3.00 UUR

DOOR

GERARD WAGEMAKER

GEBOREN TE DEN HAAG

1976

BRONDER-OFFSET B.V. – ROTTERDAM

Promotor : Prof.dr. B. Leijnse

Coreferenten : Prof.dr. D.W. van Bekkum
Dr. H.G. van Eijk
Dr. L.D.F. Lameijer

Er is geen enkele stelling waarvan ik
het gevoel heb dat zij zal standhou-
den en ik voel me niet zeker of ik in
het geheel wel op de goede weg ben.

A. Einstein, 1949

Aan mijn ouders

Aan G.G.

•

INHOUD

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLINGEN

Hoofdstuk I : LITERATUUROVERZICHT

Het humorale regulatiemechanisme voor de erythropoïese
Nomenclatuur
Biologische bepalingsmethoden voor erythropoïetine
De isolatie van erythropoïetine
Eigenschappen van erythropoïetinepreparaten
Het erythroïenine/erythropoïetinesysteem
Het aangrijpingspunt: de voor erythropoïetine gevoelige cel (ERC)
Klinische studies en problemen
Humorale inhibitie van de erythropoïese
Het metabolisme van erythropoïetine
Samenvatting

Hoofdstuk II : BESCHRIJVING VAN REAGENTIA EN METHODIEKEN

Reagentia
Gelfiltratie en ionenwisselaars
Dialysestudies
Dierexperimenten
Meting van telnelheden van radioactieve nucliden
Bewerking van serum en urine van patienten
Eiwitbepalingen
Statistiek, correlatierekening en regressie-analyse

Hoofdstuk III : STUDIES OVER HET EFFECT VAN ERYTHROPOÏETINE IN DE POSTHYPOXISCHE POLYCYTHEMISCHE MUIS

A. ONDERZOEK OVER DE BIOLOGISCHE BEPALINGSMETHODE VOOR ERYTHROPOÏETINE

Inleiding
De ontwikkeling van een assaysysteem voor erythropoïetine met de post-
hypoxische polycythemische muis
Het verloop van de respons op erythropoïetine als functie van de tijd na
continue en na discontinue hypoxie
De definitieve proefopzet voor het assay
De invloed van het gebruik van drie deeldoses op de ligging van de log-
dosis-respons-curve

- De respons als functie van de tijd na toediening van erythropoietine-activiteit
- Onderzoek over de mogelijkheid tot verdere toename van de gevoeligheid van het bio-assay
- De invloed van het volume van de toegediende dosis erythropoietine-activiteit
- Het verloop van de dosis-respons-relatie
- Reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid van de bepalingsmethode
- Bepaling van erythropoietine-activiteit in het serum van normale proefpersonen en in serum van patienten met aandoeningen van de erythropoiese

B. KINETIEK VAN DE RESPONS OP ERYTHROPOIETINE

- De respons op een enkelvoudige dosis erythropoietine-activiteit als functie van de tijd na hypoxie
- De respons op meerdere deeldoses erythropoietine-activiteit als functie van de tijd na toediening
- Discussie

Hoofdstuk IV : ERYTHROPOIESE, ERYTHROPOIETINEPRODUCTIE EN ERYTHROPOIETINE-UITSCHEIDING BIJ PATIENTEN MET EEN NIERTRANSPLANTAAT

Inleiding

- Opzet van het onderzoek en populatiegegevens
- Verwerking van de gegevens betreffende de erythropoiese
- Karakterisering van de erythropoiese als functie van de tijd na transplantatie
- Het verband tussen initieel hemoglobinegehalte, reticulocytose, en stijging van het hemoglobinegehalte
- De relatie tussen reticulocytose en uremie
- De erythropoietine-activiteit van het serum
- De effectiviteit van de in het serum gemeten erythropoietine-activiteit als functie van de uremie
- De uitscheiding van erythropoietine-activiteit in de urine
- Bespreking van de erythropoiese bij de patienten die een verhoogd hemoglobinegehalte ontwikkelden
- Discussie

Hoofdstuk V : STUDIES OVER DE ISOLATIE EN ZUIVERING VAN ERYTHROPOIETINE

Inleiding

Dialyse van erythropoietisch actieve urine en serum

Negatieve-druk-dialyse van erythropoietisch actieve urine

Relatieve elutievolmina en verdelingscoëfficiënten van erythropoietine
bij gelfiltratie over Sephadex G150

Negatieve-druk-dialyse van erythropoietisch actieve serum- en urine-
fracties in samenhang met gelfiltratie-experimenten

Adsorptie van serum-erythropoietine aan DEAE-Sephadex A50

Adsorptie aan een hydroxylapatiet kolom van erythropoietine-activiteit
bereid uit ratteserum

Adsorptie aan een hydroxylapatiet kolom van erythropoietine-activiteit
bereid uit menselijk serum

Discussie

Hoofdstuk VI : THEORETISCHE GEVOLGTREKKINGEN UIT HET EX- PERIMENTELE ONDERZOEK OVER DE HUMORALE REGULATIE VAN DE ERYTHROPOIESE

Inleiding

Enkele kenmerken van het terugkoppelingsmechanisme van de erythro-
poïese

De erythropoietine-targetcel interactie

De pathologie van de humorale regulatie van de erythropoïese

SAMENVATTING

SUMMARY

Appendix : GEGEVENS BETREFFENDE DE IN HOOFDSTUK III A
GENOEMDE PATIENTEN

LITERATUUR

NAWOORD

CURRICULUM VITAE

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLINGEN

De regulatie van de erythropoïese verloopt in belangrijke mate via een humorale regulator. Deze wordt erythropoïetine genoemd, en heeft een specifieke stimulerende werking op de erythropoïese, waarschijnlijk in hoofdzaak door de inductie van erythroïde differentiatie in een niet geïdentificeerde primitieve hemopoïetische cel. Bij de productie van erythropoïetine speelt de nier een niet volledig opgehelderde rol. Het hormoon gedraagt zich in serum en urine als een glycoproteïne waarvan de relatieve molecuulmassa ongeveer 30.000 bedraagt.

De veronderstelling dat een humorale factor de erythropoïese stimuleert werd in 1906 voor de eerste maal geformuleerd. Enkele jaren na de definiëring van een hormoon door Bayliss en Starling (1902) concludeerden Carnot en Deflandre (1906a, b) uit een reeks experimenten tot het bestaan van een dergelijke factor, die zij hemopoïetine noemden. Ze bestudeerden het effect van intraveneuze toediening van serum van gebloede konijnen bij normale konijnen: "... Dans un de nos cas, par exemple, un lapin neuf, dont le sang comprenait, d'une façon assez constante, 5 millions et demi d'hématies par millimètre cube, après avoir reçu, en injection intraveneuse, 9 cm³ de sérum (recueilli, chez un autre lapin, 20 heures après une saignée de 30 cm³), eut une hyperglobulie telle que le nombre des hématies atteignait 8 millions le lendemain, plus de 9 millions le surlendemain, près de 12 millions le troisième jour, ...". Dit verbazend grote effect kan zeker niet zijn veroorzaakt door erythropoïetine, terwijl hun bevinding, dat de serumfactor bij verwarming tot 56°C werd geïnactiveerd, niet tot de thans bekende eigenschappen van erythropoïetine behoort. Hun derde conclusie, dat de stimulerende activiteit van het serum 20 uur na de bloeding maximaal is, stemt echter wel ongeveer overeen met latere onderzoeken.

De bevindingen van Carnot en Deflandre konden niet worden gereproduceerd. Hierop voelden Gordon en Dubin zich in 1934 genoopt tot "critical research in the whole subject". Zij verwierpen de mogelijkheid van een humoraal regelsysteem voor de erythropoïese categorisch. Een nieuwe reeks experimenten om een substantie in het serum, die de erythropoïese zou stimuleren, aan te tonen, werd in 1950 opgezet door Reissmann. Hij benaderde het probleem met een systeem van twee parabiotische ratten, waarbij hij kon aantonen, dat het mogelijk is in één rat een normale, en in de andere een verlaagde zuurstofspanning te handhaven. In beide ratten was hyperplasie van het erythroïde beenmerg aantoonbaar. De conclusie was gewettigd, dat een humorale factor aan deze waarneming ten grondslag lag.

In 1953 publiceerde Erslev de resultaten van een reeks proeven, waarin gebloede konijnen werden gebruikt als donors van serum, en normale konijnen als acceptors hiervan. Hij toonde aan, dat na toediening van enige doses van het "anemisch serum" een significante toename van het aantal reticulocyten waar te nemen is, en, als de behandeling lang genoeg wordt voortgezet, een toename van het hemoglobinegehalte van het bloed en van het aantal erythrocyten. In hetzelfde jaar slaagde hij erin deze proeven te reproduceren met apen.

Het duurde tot 1957 voor men er in slaagde een biologische bepalingsmethode voor erythropoëtin te ontwikkelen, die voldeed aan de toenmalige eisen van gevoeligheid, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid. Het principe van deze methode is eenvoudig, en wordt nog steeds gebruikt om erythropoëtin aan te tonen en te kwantificeren. Bij een proefdier wordt de gevoeligheid voor exogeen erythropoëtin verhoogd door een verschuiving aan te brengen in de verhouding tussen zuurstofaanbod en zuurstofverbruik ten gunste van het aanbod. Hiermee wordt de endogene erythropoëtinproductie onderdrukt en een verlaagde erythropoëse geïnduceerd. De respons van het erythroïde systeem op de toediening van erythropoëtin-activiteit kan vervolgens worden gemeten met behulp van ^{59}Fe -incorporatie in de erythrocyten van het perifere bloed, waarbij wordt aangenomen dat reeds in de circulatie aanwezige, volwassen erythrocyten geen ijzer meer opnemen, zodat de ijzerincorporatie een maat is voor nieuwgevormde erythrocyten.

Fried en medewerkers gebruikten na studies met normale (Plzak et al. 1955) en gehypofysectomeerde (1956) ratten, de hongerende (1957) rat als proefdier voor het bio-assay voor erythropoëtin. Na enkele dagen voedseldeprivatie werden de ratten enige doses erythropoëtin actief materiaal toegediend, waarna de incorporatie van ^{59}Fe in de erythrocyten van het perifere bloed in verband kon worden gebracht met de grootte van de toegediende dosis. De methode werd door White en medewerkers voor het eerst gebruikt in een uitvoerig onderzoek, getiteld "Studies on erythropoëtin" (1960). De hongerende rat is inmiddels in onbruik geraakt bij het assaysysteem voor erythropoëtin-activiteit. De polycythemische muis bleek een gevoeliger en nauwkeuriger (zie hoofdstuk I en hoofdstuk III) hulpmiddel.

In de afgelopen twee decennia zijn veel bijdragen verschenen, die tot doel hadden de details van de humorale regulatie van de erythropoëse op te helderen. Goldwasser en Kung (1968, 1971) slaagden erin erythropoëtin te isoleren en zeer ver te zuiveren, maar hun opbrengst van het hormoon was te gering voor een chemische karakterisering. De belangrijke rol van de nier bij de erythropoëtinproductie, en de erythropoëtinproductie in relatie tot hemoglobineconcentratie van het bloed en erythropoëse werden uitvoerig onderzocht. Een aantal theorieën zijn geformuleerd over het werkingsmechanisme van erythropoëtin bin-

nen het hematopoïetisch systeem.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd bewerkt naar aanleiding van enkele klinische vraagstellingen. Ten behoeve van de differentiaaldiagnostiek van onder meer anemieën en polycythemieën lijkt het gewenst te beschikken over een immunochemische bepalingsmethode van erythropoïetine die routinematig kan worden uitgevoerd, bijvoorbeeld de methode van Krugers Dagneaux (1967). Na bestudering van literatuurgegevens en op grond van enige oriënterende experimenten stelden wij ons op het standpunt, dat de uitwerking van een dergelijke immunochemische techniek de zuivering en chemische karakterisering van het hormoon behoeft. Isolatie en zuivering van erythropoïetine vormde derhalve het eerste probleem.

Dit vereist het ter beschikking hebben van een biologische bepalingsmethode van voldoende gevoeligheid en nauwkeurigheid. Aangezien bij de isolatie van erythropoïetine gerekend moest worden met een geringe opbrengst (Goldwasser en Kung, 1968, geven een rendement van 2% op) leek het noodzakelijk de methode zo gevoelig mogelijk te maken. Hierbij kwam een tweede argument. Het klinisch gebruik van de erythropoïetinebepaling is slechts waardevol wanneer referentiewaarden voor fysiologisch circulerende erythropoïetinegehalten (veelal "normale waarden" genoemd) beschikbaar zijn. Uit de literatuur was gebleken, dat nog geen handzame methode bestond om dergelijke referentiewaarden vast te stellen, met name omdat de gevoeligheid van de bestaande assaysystemen daarvoor te kort schoot. Derhalve wijdden wij aandacht aan factoren, die de gevoeligheid van de biologische bepalingsmethode zouden kunnen beïnvloeden. Hiermee was het tweede probleem gesteld.

Een klinisch onderzoek, tenslotte, werd opgezet bij patienten met een transplantaat van de nier. Dit beoogde het bio-assay voor erythropoïetine te testen op de klinische bruikbaarheid ervan, en kwantitatieve gegevens te verkrijgen over de regulatie van de erythropoïese bij de mens.

LITERATUUROVERZICHT

Het humorale regulatiemechanisme voor de erythropoïese

Onder fysiologische omstandigheden is de erythropoïese in evenwicht met de afbraak van erythrocyten. Recent is het inzicht gegroeid dat een humoraal regelmechanisme de basis vormt voor dit evenwicht, waarin erythropoïetine de enige humorale regulator is, waarvan de regulerende functie ondubbelzinnig vastgesteld is. Verschillende publicaties zijn verschenen over erythropoïeseremmers, maar specificiteit noch fysiologische betekenis van deze substanties is aangetoond (zie blz. 33).

Erythropoïetine kan op dit moment het best worden gedefinieerd als een substantie, aanwezig in het plasma, die een niet geïdentificeerde hemopoïetische cel tot differentiatie in erythroïde richting aanzet. Afgezien van deze inductie tot erythroïde differentiatie versnelt het hormoon de rijping van pro-erythroblast tot erythrocyt (zie blz. 28).

De rol van de nier bij de productie van erythropoïetine is niet volledig opgehelderd. Vast staat dat de nier de belangrijkste erythropoïetinesyntheseproducent is (Jacobson et al., 1957a). De grootte van de stimulus voor de productie van erythropoïetine kan worden benaderd door het quotiënt van zuurstofaanbod en zuurstofverbruik (Fisher, 1969), waarbij op grond van perfusie-experimenten wordt aangenomen, dat het aangrijpingspunt van de stimulus eveneens in de nier ligt (Kuratowska et al., 1960, 1961, 1964). Waarschijnlijk bestaat er een complexe relatie tussen zuurstofaanbod, metabolisme van de nier, en erythropoïetinesynthese (Krantz en Jacobson, 1970). Gordon en medewerkers (zie blz. 27) menen dat de nier een enzym, erythrogenine, produceert, dat de omzetting van een plasmasubstraat tot erythropoïetine katalyseert.

Op grond van deze gegevens is het mogelijk de regulatie van de fysiologische erythropoïese op te vatten als een eenvoudig negatief feedbackmechanisme, waarbij de afnemende erythropoïetinesynthese bij stijgende zuurstofvoorziening van de nier (of stijgende hemoglobineconcentratie van het perifere bloed) de negatieve component vormt.

Een gedetailleerd cybernetisch model voor de erythropoïese werd geformuleerd door Hodgson (1970). Aangenomen werd, dat de primaire stimulus voor de erythropoïetinesynthese een verandering van de weefsel- pO_2 in de nier is. Als receptoren zouden cellen, gelegen aan de veneuze zijde van een capillair en gevoelig voor de pO_2 -veranderingen, dienst doen. Met de weefsel- pO_2 van de nier werd echter een variabele ingevoerd die niet voor directe meting toegankelijk is.

Door Mylrea en Abbrecht (1971) werd de erythropoietineproductie niet in verband gebracht met de nierweefsel- pO_2 , maar met de oxyhemoglobineconcentratie van het arteriële bloed. Indirect brachten zij toch het verband met de weefsel- pO_2 aan door een correctie aan te brengen voor

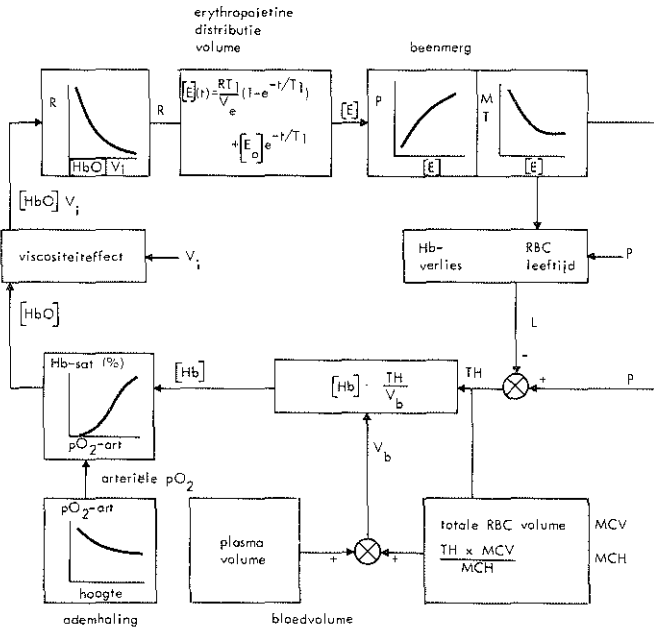


Fig. 1. Blokdiagram van het terugkoppelingsmodel voor de humurale regulatie van de erythropoiese volgens Mylrea en Abbrecht (1971).

Verklaring van de symbolen:

- $[HbO]$ = oxyhemoglobineconcentratie
- V_i = viscositeitsfactor
- R = erythropoietineproductiesnelheid
- V_e = erythropoietinedistributievolume
- T_1 = tijdsconstante voor de verdwijning van erythropoietine uit het plasma
- $[E]$ = plasma-erythropoietineconcentratie
- P = hemoglobineproductiesnelheid
- MT = rijpingstijd van de voorlopers van de erythrocyt
- L = verdwijningssnelheid van hemoglobine
- TH = totaal circulerend hemoglobine
- $[Hb]$ = hemoglobineconcentratie van het bloed
- V_b = bloedvolume
- MCV = mean corpuscular volume
- MCH = mean corpuscular hemoglobin
- pO_2 = zuurstofspanning van het bloed

de hematocriet. Het argument hiervoor was de stijging van de viscositeit van het bloed met de stijging van de hematocriet en als gevolg daarvan een afname van de bloedstroomsnelheid door de nier. In hun model is rekening gehouden met de mogelijkheid dat een bepaalde tijd moet verlopen voor de renale hypoxische stimulus een erythropoietineproductie ten gevolge heeft. De duur van dit tijdsverloop werd afgeleid uit de kinetische studies door Gordon en medewerkers over het erythrogenine-erythropoietinesysteem. Aangenomen werd verder, dat de duur van het tijdsverloop, benodigd voor de differentiatie van primitieve voorlopercel tot erythrocyt mede door de graad van stimulering met erythropoietine wordt bepaald. De invoering van deze twee tijdsverlopen geeft de erythropoiese een oscillerend karakter.

Het model van Mylrea en Abbrecht kon met behulp van een digitale computer worden gesimuleerd en vervolgens worden vergeleken met experimentele gegevens. Een vereenvoudigde versie van dit model is afgebeeld in figuur 1. Opgemerkt moet worden, dat het exponentiële verloop van de erythropoietineproductie als functie van de voor de hematocriet gecorrigeerde oxyhemoglobineconcentratie hypothetisch is. Dit geldt ook voor de verkorting van de rijpingstijd van de erythrocyt onder invloed van erythropoietine. Het exponentiële verloop van de respons van het beenmerg op erythropoietine is afgeleid uit gegevens die de toename in totale erythrocytenmassa in verband brengen met een dagelijks geïnjecteerde hoeveelheid erythropoietine.

Het terugkoppelingsmodel van Mylrea en Abbrecht is een goede samenvatting van wat tot dusver over de humorale regulatie van de erythropoiese bekend geworden is. Als zodanig vormt het een kader voor onderzoek over aspecten van deze regulatie.

Nomenclatuur

De door Carnot in 1906 gehanteerde term hemopoietine werd in 1948 vervangen door erythropoietine (Bonsdorff en Jalavisto). In de talloze publicaties die na 1950 over erythropoietine zijn verschenen worden verschillende termen gebruikt. In publicaties over de zuivering van erythropoietine wordt vaak gebruik gemaakt van de afkorting ESF (erythropoiesis stimulating factor). In de literatuur over de werking van erythropoietine op beenmergcellen wordt de afkorting EP gebruikt. Het werk van Kuratowska et al. (1965, 1968, 1969) en Gordon en Zanjani (1966, 1968, 1970) gaf aanleiding tot het gebruik van de afkorting REF (renal erythropoietic factor) naast ESF. Voor REF werd later de term erythrogenine voorgesteld. In ons eigen werk wordt vaak gebruik gemaakt van de term erythropoietine-activiteit.

Biologische bepalingmethoden voor erythropoietine

De principes waarop de biologische bepalingmethoden voor erythropoietine berusten, onderdrukking van de endogene erythropoietineproductie en meting van de erythropoïese door de meting van ^{59}Fe -incorporatie in de erythrocyten van het perifere bloed, werden reeds in de inleiding uiteengezet. Nadat Plzak en medewerkers (1955) de ^{59}Fe -incorporatie hadden benut voor een bestudering van de erythropoïese bij normale ratten, introduceerden Fried en medewerkers de gehypofysectomeerde (1956) en de hongerende (1957) rat voor het bio-assay voor erythropoietine. Hoewel aanvankelijk werd gemeend dat de hypofyse verantwoordelijk was voor de erythropoietineproductie, bleek deze veronderstelling niet juist (Jacobson, 1957a). De afgenomen erythropoïese na hypofysectomie en voedseldeprivatie vindt een verklaring in de afname van het gehele metabolisme. Deze afname leidt tot een verminderd zuurstofgebruik, waardoor een normaal Hb-gehalte in feite te hoog wordt voor de eisen die het organisme er aan stelt. De lange levensduur van de erythrocyt heeft tot gevolg, dat deze situatie enige tijd blijft bestaan, lang genoeg voor de uitvoering van een erythropoietine-assay. Het bio-assay met behulp van de hongerende rat bleek het eenvoudigst uit te voeren. Aan de gehypofysectomeerde en de hongerende rat kleven voor het bio-assay twee nadelen: de gevoeligheid bleek niet groot, en de specificiteit liet te wensen over, aangezien de gehypofysectomeerde rat reageert op de toediening van hormonen, en de hongerende rat op de toediening van eiwitten.

Spoedig werd dan ook de polycythemische muis ingevoerd als een geschikter proefdier voor het bio-assay (Jacobson et al., 1960; DeGowin et al., 1962a, b; Gordon, 1962). Polycythemie kan bij muizen op verschillende manieren worden geïnduceerd, waarbij de keuze voornamelijk schijnt te worden bepaald door de persoonlijke smaak van de onderzoeker en economische overwegingen. De verschillende methoden omvatten het verkrijgen van een polycythemie door bloedtransfusie (Jacobson et al., 1960; DeGowin et al., 1962a, b), hypobare hypoxie (Cotes en Bangham, 1961; DeGowin et al., 1962; Weintraub et al., 1963; Camiscoli, 1968) zuurstofdeficiëntie door middel van omsluiting van de muizekooien met siliconrubber membranen (Lange et al., 1966, 1968; McDonald en Lange, 1967), en polycythemie geïnduceerd door blootstelling aan koolmonoxide (Fogh, 1966), waarbij dan nog een keuze kan worden gemaakt uit continue en discontinue blootstelling. Zoals uit hoofdstuk III zal blijken werd voor ons werk gekozen voor een discontinue blootstelling aan isobare hypoxie (Wagemaker et al., 1972). Een samenvattend verslag betreffende de assaymethoden voor erythropoietine werd gepubliceerd door Cotes en Bangham (1966). De beschreven resultaten waren afkomstig uit

zeventien laboratoria. Het assay met behulp van de polycythemische muis werd beschreven als het meest gevoelige. Door Camiscoli en Gordon werd in 1970 een uitvoeriger verslag gegeven. De zeventiende zitting van het WHO Expert Committee on Biological Standardization heeft International Standard B (ISB) opgeleverd als International Reference Preparation for Erythropoietin, afgekort IRPE. Zoals in hoofdstuk III nader aangegeven zal worden, worden de erythropoietine-activiteiten van preparaten, geijkt op deze standaard, door ons opgegeven in eenheden van I.U. (ISB).

Het 1st IRPE wordt omschreven als Erythropoietin, human, urinary, for Bio-assay, waarbij 1 I.U. wordt gedefinieerd als 1,48 mg van dit preparaat. Het is op aanvraag verkrijgbaar in ampullen van tien eenheden, lyofiel gedroogd. Het preparaat bestaat niet uit zuiver erythropoietine. Deze standaard werd uitvoerig beschreven (Cotes en Bangham, 1966, 1968). De resultaten van hun vergelijkend onderzoek betreffende de log-

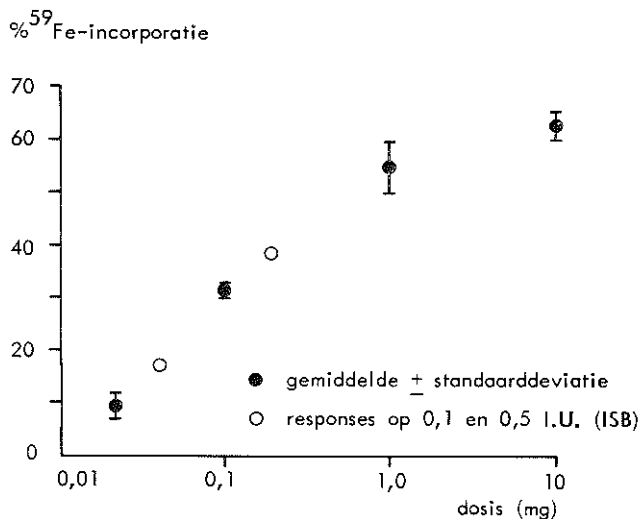


Fig. 2. Log-dosis-respons-curve voor een erythropoietinepreparaat, geïsoleerd uit menselijke urine (Keighley, 1968).

Verklaring van de symbolen:

- = respons op verschillende doseringen van het preparaat,
- = respons op respectievelijk 0,1 en 0,5 I.U. (ISB).

Tabel 1

overzicht van de belangrijkste studies over de zuivering van erythropoietine

auteurs	uitgangsmateriaal	stap- nr	methode	specifieke ac- tiviteit (I.U./ mg eiwit)	opbrengst
White et al. (1960)	plasma anemisch schaap (0,007 I.U./mg eiwit)	I	adsorptie aan DEAE-cellulose	0,3-0,9	
		II	adsorptie aan IRC-50-Resin	0,8-1,6	
		III	adsorptie aan DEAE-cellulose	1-4	22,5
		IV	adsorptie aan IRC-50-Resin	40-100	22,5
Goldwasser en Kung (1968)	plasma anemisch schaap (0,007 I.U./mg eiwit)	IV	precipitatie met ammoniumsulf.	19	20,0
		V	adsorptie aan SE-Sephadex	133	10,4
		VI	adsorptie aan calciumfosfaat	6500-8000	2,2
Allen en Moore (1968)	plasma anemisch schaap Stap I-III als White et al.	IV	polyacrylamidegelelektroforese	2,5	20
Allen en Moore (1968)	plasma anemische muizen (2,4 I.U./mg eiwit)		polyacrylamidegelelektroforese	7,9	64

dosis-respons-curven van een aantal erythropoietinepreparaten kunnen worden samengevat als: parallelle regressie, homogene hellingen. In figuur 2 is een log-dosis-respons-curve opgenomen (Keighley, 1968). De paralleliteit van de log-dosis-respons-curven van erythropoietinepreparaten van verschillende oorsprong wordt echter door sommige onderzoekers in twijfel getrokken (Dukes et al., 1969).

Naast in vivo assaymethoden bleken beenmergcultures bruikbaar te zijn voor het bestuderen van de responses op erythropoietine (Krantz et al., 1963; Ward et al., 1967; Dukes et al., 1971), waarbij de haemsynthese werd gebruikt als maat voor de erythropoïese. Enkele pogingen tot de uitwerking van een immuno-assay zijn gepubliceerd (Krugers Dagneaux et al., 1968; Lange et al., 1968, 1969, 1970; Fisher, 1971), maar de reproduceerbaarheid en specificiteit van de gebruikte methoden, respectievelijk immunoprecipitatie, hemagglutinatie-inhibitie, en radio-immuno-assay zijn onbewezen.

Isolatie van erythropoietine

De eersten die een uitvoerig onderzoek instelden naar de mogelijkheid erythropoietine uit serum te zuiveren waren White, Gurney, Goldwasser en Jacobson (1960). Hun studies leidden tot een gedeeltelijke zuivering en een karakterisering van erythropoietine als een α_2 -glycoproteïne. De methode is samengevat in tabel 1. De DEAE-cellulosestappen berusten op het gegeven dat bij 0,0375 molair NaCl alle erythropoietine-activiteit wordt geadsorbeerd in het pH-traject 4,2 - 8,5. Bij een pH 4,5 werd het hoogste gehalte aan eiwit niet geadsorbeerd. Stap IV is een methode om α_1 -glycoproteïnen te scheiden van α_2 -glycoproteïnen. De laatste worden door adsorptie van de eerste gescheiden (Schmid et al., 1958). White et al. bereikten een zuivering op eiwitbasis van 7500 maal bij een opbrengst van 22,5% van de erythropoietine-activiteit van het uitgangsmateriaal. Uit stap IV was af te leiden, dat de erythropoietine-activiteit gelocaliseerd is in de α_2 -glycoproteïne-fractie.

Goldwasser en Kung (1968, 1971) volgden de zuiveringsstappen van White et al. voor de isolatie van erythropoietine en zuiverden verder tot een specifieke erythropoietine-activiteit van 6500- 8500 I.U. (ISB) (zuivering op eiwitbasis 930.000 maal bij een opbrengst van 2% van de erythropoietine-activiteit van het uitgangsmateriaal). Uit de wisselende activiteit per mg eiwit van verschillende preparaten werd besloten dat nog geen homogeen preparaat bereikt was. In 1971 meldden de auteurs, dat een verontreiniging zou bestaan uit erythropoietine, dat geen N-acetylneuraminezuur meer bevatte. Van de actieve fractie kon niet voldoende worden verzameld voor de meest elementaire chemische analyse.

De grootste en goedkoopste bron van erythropoietine-activiteit is menselijke urine, bij voorkeur van patienten met aplastische anemie.

De zuivering van erythropoetine uit urine wordt echter gekenmerkt door twee praktische problemen: de grote hoeveelheid te verwerken materiaal en de instabiliteit van het gezuiverde materiaal. Goldwasser en Kung (1968) maakten gebruik van acetonprecipitatie en van wat zij noemden een "reverse ammonium sulfata gradient dissolution method" om urine van anemische patienten te concentreren en te fractioneren. De actieve fractie, verkregen met de ammoniumsulfatechniek werd vervolgens onderworpen aan adsorptie aan een calciumfosfaatgel, waarmee zij verder fractioneerden tot een erythropoetine-activiteit van 300 I.U./mg eiwit. Graham et al. (1963) maakten gebruik van acetonprecipitatie, DEAE-cellulosechromatografie, calciumfosfaatgeladsorptie en ammoniumsulfatprecipitatie. Hiermee bereikten zij een preparaat met een specifieke erythropoetine-activiteit van 136 I.U./mg eiwit. Lowy en Keighley (1966) maakten gebruik van ethanolprecipitatie van de erythropoetine-activiteit, gevolgd door ammoniumsulfatprecipitatie en polyacrylamidegelchromatografie, waarmee zij een fractie isoleerden met een specifieke erythropoetine-activiteit van 238 I.U./mg.

Espada en Gutnisky (1970) tenslotte maakten gebruik van precipitatie met benzoëzuur; zij geven geen opbrengst op. In ons laboratorium werd de techniek nagewerkt met urine van anemische patienten. Het preparaat bleek 170 I.U./mg vaste stof te bezitten aan erythropoetine-activiteit bij een opbrengst van 50% *). Vervolgens werd met DEAE-cellulosechromatografie, adsorptie aan hydroxylapatiet en gelfiltratie een specifieke erythropoetine-activiteit van 8000 I.U./mg eiwit bereikt, met een opbrengst van 19%.

Eigenschappen van erythropoetinepreparaten

Eén der eerste zuiveringsmethoden, die van Borsook (1959) bestond uit koken bij lage pH. Het verkregen actieve preparaat kon dan ook worden beschreven als stabiel bij hoge temperatuur in zuur milieu.

Bij de fractionering volgens Cohn kan erythropoetine-activiteit worden teruggevonden in de meeste fracties (Krugers Dagneaux, 1967). Kuratowska (1962) slaagde erin erythropoetine te isoleren uit fractie IV. Het preparaat van White et al. (1960) na stap III (zie tabel 1) had als eigenschappen: sedimentatieconstante 3,7 S, relatieve molecuulmassa 40.000 (lichtverstrooiing), 6,5% koolhydraatgehalte. De specifieke activiteit verschilde van batch tot batch.

In 1968 somden Goldwasser en Kung de eigenschappen van erythropoetine, zoals die op dat moment bekend waren geworden, als volgt op:

* Wij danken Mevr. A.M. Montfoort-Beun hartelijk voor de uitvoering van de precipitatietechniek.

- 1) erythropoietine is een eiwit dat N-acetylneuraminezuur bevat,
- 2) de hydroxylgroepen van serine en/of threonine zijn niet belangrijk voor de biologische activiteit,
- 3) SH-groepen zijn evenmin vereist voor erythropoietine-activiteit,
- 4) phenolische hydroxylgroepen en/of vrije aminogroepen zouden voor de erythropoietine-activiteit vereist zijn,
- 5) het hormoon heeft waarschijnlijk een relatieve molecuulmassa van 50.000 - 60.000.

De verwijdering van het N-acetylneuraminezuur leidt in vivo tot een volledig activiteitsverlies, maar het met sialidase behandelde preparaat is in beenmergcultures werkzaam. De auteurs veronderstelden, dat het N-acetylneuraminezuur een functie vervult bij het transport van erythropoietine via de bloedbaan. Zij achtten de betekenis van de bevinding echter twijfelachtig. De opgesomde gegevens stammen van verschillende laboratoria (Lowy en Borsook, 1962; Lowy et al., 1960; Rambach et al., 1958) en zijn verkregen door analyse van preparaten met een geringe specifieke activiteit.

Allen en Moore (1968) konden met behulp van een polyacrylamidegelelelectroforese een erythropoietisch actieve fractie isoleren. Deze fractie kwam wat electroforetisch gedrag betreft overeen met één van de cholinesterase iso-enzymen. Dit stemt overeen met de waarneming van Davis (1960), dat inspuiting van cholinesterase in proefdieren leidt tot een toename van de erythropeise. De erythropoietisch actieve band kon echter na re-electroforese opgesplitst worden in zes banden, waarvan er slechts drie esterase-activiteit bezaten. Het is onwaarschijnlijk dat cholinesterase zelf verantwoordelijk is voor de erythropoietine-activiteit, aangezien een verdere behandeling van de gebruikte proefdieren met phenylhydrazine leidt tot een afname van de cholinesterase-activiteit zonder een vergelijkbare afname van de erythropoietine-activiteit.

Een aantal auteurs maakten gebruik van de erythropoietine-activiteit om een relatieve molecuulmassa van het hormoon te bepalen zonder vergaande zuivering. Hun werk is samengevat in tabel 2. Sullivan et

Tabel 2. Bepalingen van de relatieve molecuulmassa van erythropoietine

auteur(s)	methode	rel. molecuul- massa
Rosse et al., 1963	inactivering met Röntgenstraling	27.000
Lukowsky en Painter 1968	gelfiltratie	60.000
Olesen en Fogh, 1968	gelfiltratie	62.000
Sullivan et al., 1970	gelfiltratie; ultracentrifugatie	56.000 32.600

al. vonden met behulp van hun ultracentrifugatiestudies (in een sucrogradiënt) een relatieve molecuulmassa van 32.600. Deze bevinding komt dicht bij de metingen van Rosse et al. (1963), die tot een relatieve molecuulmassa van 27.000 concludeerden.

Een bijzondere eigenschap van ver gezuiverde erythropoietinepreparaten is, dat voor de bepaling van de erythropoietine-activiteit met behulp van het bio-assay de toevoeging van ovo-albumine, gelatine of oro-somucoïd noodzakelijk is (Goldwasser en Kung, 1968). Deze auteurs veronderstelden, dat erythropoietine in verdunde oplossingen onderhevig is aan oppervlaktedenaturatie. Ook voor gezuiverde erythropoietinepreparaten uit urine veroorzaakt de toevoeging van normaal serum of oro-somucoïd een verbetering van de meetbaarheid (Moore et al., 1966).

Tenslotte zijn de experimenten van Lewis en medewerkers vermeldenswaard. In 1964 maakten deze auteurs melding van dialysestudies, waaruit zou blijken, dat erythropoietine voorkomt in een gebonden en in een vrije vorm. In 1965 werd uit chromatografieproeven geconcludeerd tot het bestaan van complexen van basische en zure eiwitten, geassocieerd met erythropoietine-activiteit. In 1967 verscheen een publicatie, waarin werd beschreven, dat enige cellulosemembranen een verhoogde permeabiliteit voor erythropoietine-activiteit vertonen bij verhoogde ionsterkte. Ook op grond hiervan concludeerden Lewis en medewerkers tot het bestaan van een dialyse-evenwicht. In 1969 verscheen een heronderzoek van de toepassing van dialyse bij de zuivering en karakterisering van erythropoietine. Dialyse in een systeem met 0,1% phenol leidde tot een volledige scheiding van dialyseerbaar en niet-dialyseerbaar erythropoietine. De meest zuivere fractie van het dialyseerbare erythropoietine bezat een sedimentatieconstante van 2S; deze fractie bezat overigens slechts een specifieke erythropoietine-activiteit van 484 I.U./mg stikstof. De erythropoietine-activiteit binnen het dialysemembraan (sedimentatieconstante 2,7S - 4,5S) werd geremd door toevoeging van normaal serum, waarbij de Lineweaver-Burk-plot resulteerde in een curve typisch voor enzyminhibitie door substraatovermaat. In 1971 verscheen een publicatie, waarin deze proefopzet was uitgebreid. Het urineconcentraat, bereid door DEAE-cellulose-chromatografie als in 1965 beschreven, werd aan dialyse onderworpen als in 1969 beschreven, aanvankelijk dertien dagen onder toevoeging van 0,1% phenol, daarna tien dagen zonder phenol. In het dialysaat was gedurende de dialyse met phenol nauwelijks erythropoietine-activiteit aan te tonen, maar na verwijdering van de phenol nam de erythropoietine-activiteit in het dialysaat dagelijks toe, tot op de drieëntwintigste dialyседag een specifieke activiteit kon worden aangetoond van 1113 I.U./mg stikstof. Binnen het dialysemembraan bleef 62% van de erythropoietine-activiteit van het uitgangsmateriaal achter, in het dialysaat bevond zich 32%. Volgens de

auteurs bevatte het dialysaat α_1 -zuur-glycoproteïne als voornaamste eiwitcomponent, en voorts één of meer steroïden. De erythropoietine-activiteit binnen het dialysemembraan had de eigenschappen van een erythropoietine-genererende factor. De interactie tussen deze factor en serum had een pH-optimum van 7,4. Dit optimum werd echter gevonden door samenvoeging van een urineconcentraat en normaal konijneserum, dat intraperitoneaal aan muizen werd toegediend. De conclusie dat dit pH-optimum behoort bij een specifieke interactie tussen een erythropoietine-genererende factor en een serum-eiwit lijkt ons enigszins voorbarig. Lewis en medewerkers interpreteren hun gegevens als volgt: "It is suggested that an ESF(s) remains inactive when bound to a glycoprotein such as α_1 -acid-glycoprotein or the corticosteroid-binding-globulin. A role of the ESF-generating factor would be to act on the complex to produce a fragment of the glycoprotein steroid complex, thereby activating the hormone".

Deze interpretatie is echter gebaseerd op summiere gegevens. Vergelijking van de specifieke erythropoietine-activiteit die Lewis en medewerkers bereikten met de specifieke erythropoietine-activiteit van Goldwasser en Kung (1968), respectievelijk 1131 I.U./mg stikstof en 8500 I.U./mg eiwit, laat zien, dat 98% van het eiwit aanwezig in Lewis' zuiverste dialysaat als verontreiniging kan worden aangemerkt.

Het erythrogenine/erythropoietinesysteem

In serum kan erythropoietine-activiteit worden gegenereerd door het te incuberen met extracten van nierweefsel. Uit studies met een neutraliserend antiserum was Zanjani (1968b) in staat te concluderen dat dit gegenereerde erythropoietine in antigene structuur niet verschilt van het erythropoietine zoals dat kan worden aangetroffen in het serum van anoxische proefdieren. Dit zijn de voornaamste bevindingen van een serie studies uitgevoerd door Gordon en medewerkers (Zanjani et al., 1967a, b, 1968a, b; Contrera et al., 1966a, b, 1968; Cantor et al., 1969; en Gordon en Zanjani, 1970). De factor (renale erythropoietische factor of REF) uit nierweefsel was in staat erythropoietine volgens een eerste orde reactie (Zanjani, 1967a) uit serum te genereren; de reactie was ion-afhankelijk, waarschijnlijk Ca^{2+} -afhankelijk. In figuur 3 is de Lineweaver-Burk-plot voor de interactie afgebeeld (Zanjani et al., 1967b).

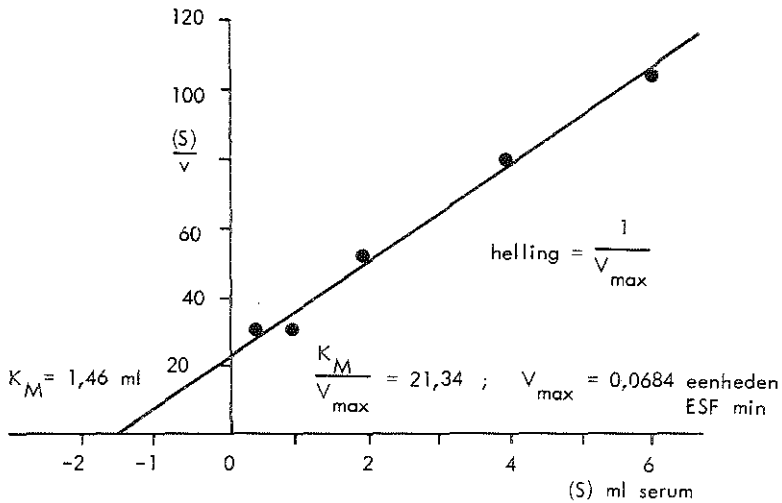
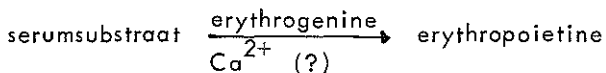


Fig. 3. Lineweaver-Burk-plot voor de vorming van erythropoietine-activiteit in het incubatiemengsel van nierextract en serum volgens Gordon en medewerkers (1970).

De REF kon worden geïsoleerd uit extracten van de lichte mitochondriënfractie van nierweefsel, welke fractie peroxisomen (DeDuve en Baudhuin, 1966) bevat. Dat de factor een enzymatisch karakter zou hebben wordt geconcludeerd uit het kinetisch gedrag van de vorming van erythropoietine in het incubatiemengsel van nierextract en serum. De auteurs voeren als tweede argument aan, dat de renale erythropoietische factor onder omstandigheden van chronische hypoxie niet continu wordt gevormd. Recent stelden zij voor REF de term erythrogenine voor (Gordon en Zanjani, 1970). Het reactiemechanisme zou zijn:



Kuratowska en medewerkers konden de resultaten van de studie over de kinetiek van de reactie niet bevestigen, en vonden een renale erythropoietische factor bovendien niet in de lichte mitochondriënfractie gelocaliseerd, maar in de kernfractie (Kuratowska et al., 1965, 1969).

Het aangrijpingspunt van erythropoietine: de voor erythropoietine gevoelige cel (ERC)

Het hemopoietisch systeem van de polycythemische muis bevat geen morfologisch identificeerbare erythroïde elementen. De toediening van serum van anemische proefdieren leidt bij de polycythemische muis echter in korte tijd tot het verschijnen van pro-erythroblasten in beenmerg en

milt (Jacobson, 1957b). Dit eenvoudige experiment wordt algemeen beschouwd als bewijs voor de inductie van erythroïde differentiatie in een niet geïdentificeerde primitieve hemopoëtische cel door erythropoëtine. Deze cel werd aanvankelijk de erythropoëtische stamcel genoemd (Filmanowicz en Gurney, 1961; Gurney et al., 1961), later ERC (erythropoëtin responsive cell) (Gurney en Fried, 1965; Gurney et al., 1965). Deze celpopulatie is derhalve gedefinieerd bij polycythemische proefdieren. Op een aantal criteria verschilt de ERC-populatie van de CFU-S-populatie* (review: Metcalf en Moore, 1971).

Een drietal modellen zijn voor de interactie tussen erythropoëtine en ERC-populatie geformuleerd. Aanvankelijk meende Lajtha (1962, 1966), dat erythropoëtine de specifieke differentiërende stimulus was voor stamcellen in de G_0 -fase van de celcyclus, waarbij cellen in cyclus niet gevoelig zouden zijn voor differentiërende stimuli. Deze opvatting is enigszins gewijzigd. In recentere publicaties (Lajtha et al., 1969, 1971) wordt de ERC-populatie gezien als een transit populatie (in cyclus) met een hoge turn-over-rate, zelfs bij de polycythemische muis. Bij een plotselinge verkleining van de ERC-populatie door differentiatie neemt de turn-over-rate van de stamcelpopulatie toe, vermoedelijk tengevolge van een lokaal opererend feedback-mechanisme. Dit model is in figuur 4 weergegeven.

In het door Kretchmar en medewerkers (1966, 1970a, b; McDonald et al., 1971) geformuleerde model wordt uitgegaan van een zestal veronderstellingen:

- 1) Erythropoëtine grijpt aan op stamcellen,
- 2) De concentratie van erythropoëtine in het milieu van de cellen is evenredig met de toegediende dosis,
- 3) De respons is evenredig met de hoeveelheid erythropoëtine die in de stamcellen is doorgedrongen of eraan wordt gebonden,
- 4) Het effect van erythropoëtine wordt bewerkstelligd in de S-fase van de celcyclus,
- 5) Werkzaam erythropoëtine is in de cel alleen aanwezig in de G_1 -fase en in de S-fase van de celcyclus,
- 6) De werkzaamheid van het erythropoëtinemolecuul is van beperkte duur, en er is een zeker tijdsverloop voor het erythropoëtinemolecuul in of aan de cel de werkzame vorm heeft aangenomen.

Deze veronderstellingen werden door Kretchmar (1966) op basis van het model van de erythropoëse van Congdon (1959) omgezet in een vijftal differentiaalvergelijkingen. Simulatie met behulp van een analoge

* Colony-forming-unit-spleen. Een suspensie van hemopoëtische cellen bevat een populatie cellen die na intraveneuze toediening aan een lethaal bestraalde muis in de milt kolonies van hemopoëtische cellen vormt (Till en McCulloch, 1961). Deze populatie cellen is een maat voor het aantal hemopoëtische stamcellen van de suspensie.

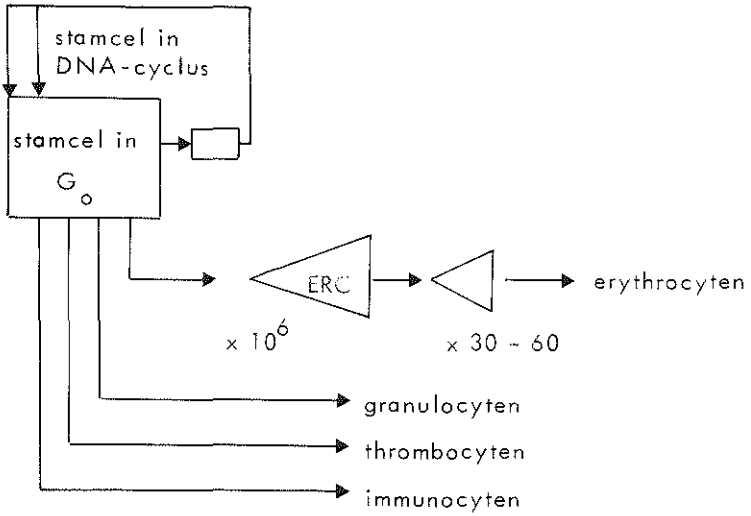


Fig. 4. Schema voor de hemopoiese volgens Lajtha (1971).
Voor verklaring zie tekst.

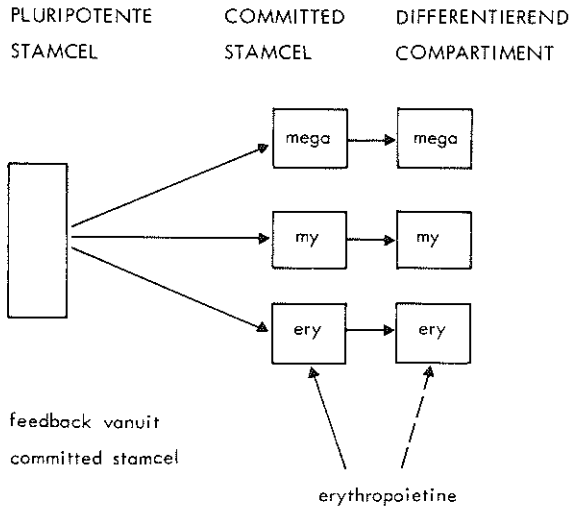


Fig. 5. Schema voor de hemopoiese volgens Stohman (1968).
Voor verklaring zie tekst.

my = myeloïde differentiatie,
mega = megakaryocytaire differentiatie,
ery = erythroïde differentiatie.

computer leverde een steady-state die niet in strijd was met experimentele gegevens. Kretchmar neemt aan dat er een minimale en een maximale tijdsduur voor G_1 bestaat, waarbij de tijdsduur, waarin erythropoietine werkzaam is langer is dan de minimale G_1 -tijdsduur.

Als het begrip stamcel wordt vervangen door ERC wordt het model van Kretchmar en medewerkers, meer dan dat van Lajtha et al. door experimentele gegevens gesteund (Schooley, 1965; Morse et al., 1968, 1970; Hodgson, 1967, 1970). De responsgrootte op toediening van erythropoietine wordt bepaald door de lengte van de G_1 -fase van de voor erythropoietine gevoelige celpopulatie. Een sterk door erythropoietine gestimuleerde populatie wordt refractair, aangezien de G_1 -fases korter worden dan het tijdsverloop dat het erythropoietine-molecuul nodig heeft voor het aannemen van de werkzame vorm; hiermee wordt uitputting van de populatie voorkomen. Hieraan kan toegevoegd worden, dat waarschijnlijk voor celdifferentiatie tenminste één celcyclus obli gaat is (review: Epifanova en Terskikh, 1969).

Stohlman en medewerkers (Morse et al., 1968; Stohlman et al., 1968; Stohlman 1970a, 1970b) onderscheiden voor de differentiatie van stamcel tot erythrocyt een pluripotent stamcellencompartiment, een in erythroïde richting "committed compartment" en een in morfologisch opzicht herkenbaar compartiment cellen, het erythron (figuur 5). De eerste twee compartimenten zijn in staat tot onafhankelijke zelfhandhaving door proliferatie. Alleen tijdens stress-erythropoïese wordt het committed compartiment vanuit het stamcellencompartiment aangevuld (Cudkowicz, 1964). De werking van erythropoietine op dit systeem komt neer op:

- 1) verkorting van de G_1 -fase in het committed compartment,
- 2) initiatie van de Hb-synthese in hetzelfde compartiment,
- 3) versnelling van de Hb-synthese in het gedifferentieerde compartiment.

De initiatie van de Hb-synthese zou neerkomen op "derepressing a repressor" in de zin van Jacob en Monod. Verder is in Stohlmans opvattingen over de regulatie van de erythropoïese het bereiken van een kritische intracellulaire hemoglobineconcentratie in het gedifferentieerde compartiment de stimulus voor het ophouden van celdelingen, wat een verklaring inhoudt voor micro-, normo-, en macrocytose onder normale en pathologische omstandigheden.

De drie hier geschetste modellen van de erythropoïese bevatten een opvallende parallel: de tussenschakeling van een compartiment cellen tussen de als pluripotent geschetste stamcel en de herkenbaar differentiërende cellen. In Lajtha's model is dit de ERC, in Kretchmars model de stamcel in G_1 , Stohlman gebruikt de term "committed cell".

Klinische studies en problemen

Het klinisch onderzoek naar de betekenis van erythropoietinespiegels in het serum van patienten wordt bemoeilijkt door het kostbare en omslachtige bio-assay, dat bovendien de meting van normale en subnormale waarden nauwelijks toelaat. De belangrijkste categorieën ziekten waarbij afwijkende waarden kunnen worden gevonden zijn de anemieën en de polycythemieën.

Bij de anemieën is de erythropoietineconcentratie van het serum verhoogd. Bij aplastische anemieën worden zeer hoge waarden gevonden. Aangenomen wordt dat dit een logisch gevolg is van het eerder beschreven regulatiemechanisme. Deze algemene regel kent twee uitzonderingen: de anemie bij hemoglobinoopathieën welke gepaard gaan met een verschuiving van de zuurstofdissociatiecurve naar links, en de anemie welke kan worden waargenomen bij chronische nierinsufficiëntie. De etiologie van deze laatste anemie is niet geheel opgehelderd. Erslev (1970) stelt dat de nierinsufficiëntie op twee manieren invloed heeft. De afname van de exocriene functie van de nier leidt tot beenmergbeschadiging door de ophoping van metabolieten, en tot een gestoord ijzermetabolisme. De insufficiëntie van de endocriene functie leidt tot een verlaagde erythropoietineproductie. De rol van extrarenale erythropoietinebronnen is niet geheel duidelijk.

Levin en Alperin (1968) gebruiken het erythropoietine-concept voor een, wat zij noemen, endocrinologische classificatie van de polycythemieën, die op basis hiervan in drie categorieën kunnen worden onderverdeeld:

- 1) polycythemie tengevolge van autonome erythropoïese (polycythemia vera rubra) met een onderdrukte erythropoietineproductie,
- 2) polycythemie tengevolge van een autonome erythropoietineproductie door renale en extrarenale tumoren. Deze polycythemie wordt door Thorling (1972) paraneoplastische erythrocytose of para-endocriene erythrocytose genoemd. Een paraneoplastische ziekte wordt door hem gedefinieerd als "tumour disease in which the tumour is derived from "non-endocrine" cells, but in which symptoms are present suggestive of an overproduction of different hormones".
- 3) polycythemie tengevolge van een secundair verhoogde erythropoietinespiegel, veroorzaakt door een relatieve hypoxie van het nierweefsel.

Hoewel voor deze indeling veel te zeggen valt geeft het ontbreken van een afgerond inzicht in het regulatiemechanisme van de erythropoïese er een hypothetisch karakter aan.

Deel I van de dissertatie van Thorling (1972) is een kritisch overzicht van alle in de literatuur verschenen gevallen van paraneoplastische

erythrocytose. Uit zijn werk is af te leiden dat in de meeste gevallen niet duidelijk is of de tumor inderdaad autonoom erythropoietine produceerde. In een aantal gevallen is het hoogst waarschijnlijk, dat de tumoren druk uitoefenden op ureter, nierweefsel of a.renalis, met als gevolg een relatieve hypoxie van de nier en een toegenomen erythropoietineproductie. Dit is met name het geval bij uterusleiomyofibromen en niercysten.

Een belangrijke omissie in de literatuur over de betekenis van erythropoietinebepalingen bij hematologische aandoeningen is het ontbreken van het gebruik van de eenheid van het IRPE voor de erythropoietineconcentratie. Dit bemoeilijkt de interpretatie van de gegevens enigszins, en maakt het onmogelijk een aantal publicaties met elkaar te vergelijken. Zoals uit hoofdstuk IV zal blijken hebben wij de erythropoietineconcentratie systematisch opgegeven in de eenheid van het IRPE.

Humorale inhibitie van de erythropoïese

Een aantal auteurs hebben erythropoïeseremmers aangetoond in het serum van polycythemische proefdieren (Krzymowski, 1961; Krzymowski en Krzymowska, 1962; Krzymowska, 1966; Reynafarje et al., 1964; Whitcomb et al., 1965; Whitcomb en Moore, 1965, 1968; Reynafarje, 1968). Erslev en Thorling (1968; Thorling en Erslev, 1968) slaagden hier echter niet in.

Kilbridge, Fried en Heller (1969) voerden proeven uit, waarbij proefdieren werden gehypertransfundeerd met rode cellen die methemoglobine bevatten. Ter vergelijking werden andere proefdieren gehypertransfundeerd met oxyhemoglobine-erythrocyten. Tot een hematocriet van 60% werd door de transfusie van oxyhemoglobine-erythrocyten het erythroïde systeem sterker geremd dan door de methemoglobine-erythrocyten. Wanneer de transfusie leidde tot hematocrietwaarden boven 60% was er geen significant verschil meer. De auteurs concludeerden dat, bij hematocrietwaarden tussen normaal en 60%, hyperoxaemie leidt tot een remming van het erythroïde systeem via een onderdrukte erythropoietineproductie, maar dat hematocrietwaarden groter dan 60% leidden tot de inschakeling van andere terugkoppelingsmechanismen, met name humorale inhibitie.

Naast de demonstratie van een humorale erythropoïeseremmer bij polycythemie is een remmende werking van uremische sera aangetoond (Markson en Rennie, 1956; Kuroyanagi en Saito, 1966; Kurtides et al., 1964; Fisher et al., 1968). Dit kon echter door andere onderzoekers niet bevestigd worden (Erslev, 1958; Gallagher et al., 1959, 1960; Naets, 1960; Markson en Moore, 1962; Lange en Gallagher, 1962; Maes et al., 1965). De relatie tussen de polycythemische en de uremische erythropoïeseremmer is niet duidelijk.

Recent werd opnieuw melding gemaakt van onderzoek over erythropoieseremmers. Lewis et al. (1969b) vonden in de urine van normale personen en anemische patienten een erythropoieseremmer die zij karakteriseerden als een eiwit met een sedimentatieconstante van 1,99S. Lindemann (1971) beschreef eveneens een erythropoieseremmer met een relatief laag molecuulgewicht in urine van normale personen en patienten met aplastische anemie. Skjaelen en Halvorsen (1971) tenslotte vonden erythropoieseremming bij muizen na inspuiting van neonataal plasma.

Het metabolisme van erythropoietine

Zoals op blz 23 opgemerkt, wordt erythropoietine uitgescheiden via de urine. Rosse en Waldmann (1964) merkten op, dat de uitscheiding in de urine evenredig is aan de serumconcentratie van het hormoon, ze schatten het dagelijks verlies via de urine op 10% van het dagelijkse totale verlies, en bepaalden de clearance van het hormoon op 0,06 - 0,67 ml/minuut. Weintraub et al. (1964) deden een soortgelijk experiment en vonden waarden van 2 - 5% en 0,1 - 0,6 ml/minuut. Hoewel de getallen mogelijk een onderschatting zijn van de werkelijke uitscheiding in de urine tengevolge van de relatieve instabiliteit van urinair erythropoietine, kan toch worden geconcludeerd, dat de nier slechts voor een klein deel verantwoordelijk is voor de verdwijning van erythropoietine uit het plasma.

De halfwaardetijd van erythropoietine in plasma is betrekkelijk kort. Stohlman en Brecher (1959, 1962) bepaalden deze bij ratten op 3 tot 5 uur. De door hen gevonden verdwijningscurve was homogeen. Contrera et al. (1965) vonden een bifasische verdwijningscurve, waarvan het eerste gedeelte een halfwaardetijd van 0,5 uur, en de tweede component een halfwaardetijd van 2,5 uur had. Het verschil tussen de curven van Stohlman en Brecher en die van Contrera et al. berust op een verschil in methode (Reissmann et al., 1965). Stohlman en Brecher volgden de verdwijning na ratten bloot te stellen aan hypoxie (16 uur) en vervolgens de hypoxie te onderbreken, terwijl Contrera en medewerkers een erythropoietinepreparaat intraveneus toedienden. Andere auteurs (Keighley, 1962; Bozzini, 1966; Naets en Wittek, 1965, 1968; en Weintraub et al., 1964) schatten de halfwaardetijd van erythropoietine in het plasma op ongeveer 1 uur bij ratten, en 7 - 10,5 uur bij honden.

Door een aantal auteurs werd de mogelijkheid van inactivering door de lever van erythropoietine onderzocht. Jacobson vergeleek de verhoogde erythropoietinespiegels bij konijnen na phlebotomie en phenylhydrazinebehandeling. De behandeling met phenylhydrazine leidde tot de hoogste erythropoietinewaarden. Jacobson (1956) nam aan dat dit berustte op

leverbeschadiging. Mirand en Prentice (1957, 1959) behandelden ratten met CCl_4 , en vonden dat blootstelling aan hypoxie bij de behandelde ratten leidde tot veel hogere erythropoëtinespiegels dan bij een onbehandelde controlegroep. Zij concludeerden dat de lever mogelijk een fysiologische rol speelt bij de inactivering van erythropoëtine. Keighley (1962) vond echter bij met CCl_4 behandelde ratten een normale erythropoëtine-verdwijningscurve. Burke en Morse (1962) perfundeerden rattevers met ratteserum met een hoge erythropoëtinespiegel en vonden dat het erythropoëtinegehalte na 2 - 3 uur perfusie afnam. Deze afname was echter verminderd bij perfusie van levers van ratten, die tevoren met CCl_4 waren behandeld. Fisher en Roheim (1962) konden echter de afname van het erythropoëtinegehalte door leverperfusie niet bevestigen. Tenslotte vonden Mirand et al. (1959) dat de toediening van erythropoëtinepreparaten via de v. porta leidt tot lagere erythropoëtinespiegels in het plasma dan toediening via de v. jugularis.

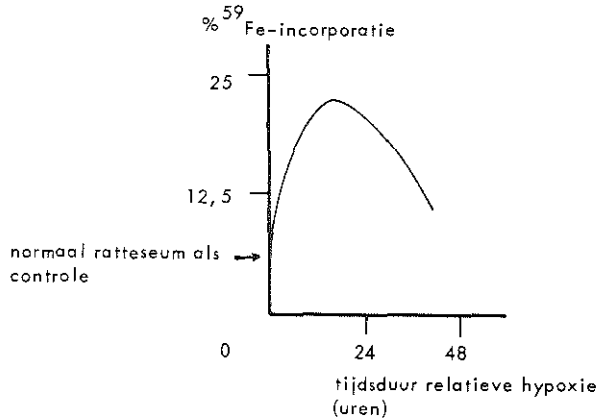


Fig. 6. Het verloop van de erythropoëtineconcentratie, uitgedrukt als $\%^{59}\text{Fe}$ -incorporatie, als functie van de tijd tijdens continue hypoxie bij de rat (Stohlman en Brecher, 1959). De curve werd samengesteld uit twee experimenten.

Een aantal auteurs onderzochten de mogelijkheid dat erythropoëtine wordt geutiliseerd door het beenmerg. Dit werk berust op twee gegevens. Stohlman en Brecher (1959a, b, 1962) namen waar, dat het blootstellen aan anemie of hypoxie van ratten leidt tot een snelstijgende erythropoëtinespiegel, met een piek bij 18 - 24 uur, welke na 48 uur weer gedaald is (figuur 6) zonder dat daarbij veranderingen zijn opgetreden in het perifere rode bloedbeeld. Dit verschijnsel is door veel auteurs bevestigd.

In de tweede plaats zijn de erythropoietineconcentraties in het serum van patiënten met een aplastisch beenmerg over het algemeen aanmerkelijk hoger dan bij patiënten met een hyperplastisch beenmerg. Het ligt voor de hand beide verschijnselen toe te schrijven aan utilisatie van erythropoietine door erythroïde cellen. Het lijkt er echter op dat het eerste verschijnsel moet worden verklaard uit een aanpassing van het organisme aan de hypoxische stimulus (Siri et al., 1966). Bovendien toonden Fried et al. (1967) aan, dat de afnemende erythropoietineconcentratie eerder berust op een afnemende productie dan op een toenemende utilisatie. De zeer hoge erythropoietineconcentraties bij patiënten met een aplastische anemie zijn onbegrepen. Sommige auteurs trekken echter het verschil in erythropoietineconcentraties bij patiënten met een aplastisch en een hypoplastisch beenmerg in twijfel (Van Dyke en Pollycove, 1962; Friederici, 1964). Hierop wordt in hoofdstuk IV nader teruggekomen.

Samenvattend kan worden opgemerkt, dat uitscheiding via de urine, inactivering door de lever, noch utilisatie door het erythroïde systeem afzonderlijk de snelle erythropoietineverdwijningscurve verklaren. De oplossing van het probleem wordt nog bemoeilijkt door het ontbreken van een afgerond inzicht bij de op blz. 33 genoemde inhiberende substanties, welke mogelijk de met behulp van biologische methoden bepaalde erythropoietineconcentraties beïnvloeden.

Samenvatting

De regulatie van de erythropoïese kan worden opgevat als een humurale feedback, waarin de nier dienst doet als sensor voor de behoefte aan circulerende erythrocyten en als producent van het hormoon erythropoietine. Erythropoietine induceert in een niet geïdentificeerde voorlopercel erythroïde differentiatie, mogelijk door initiatie van de hemoglobinesynthese. Erythropoietine is een uitsluitend in vivo gedefinieerd hormoon, waarvan de hoeveelheid het meest reproduceerbaar wordt gekwantificeerd door meting van de erythropoïese die erdoor wordt geproduceerd bij de polycythemische muis. Er bestaat een algemeen aanvaard referentiepreparaat voor erythropoietine (International Reference Preparation for Erythropoietin, IRPE).

Chemische karakteristieken van erythropoietine, zoals het α_2 -glycoproteïnekarakter ervan met relatieve molecuulmassa 30.000, zijn verkregen door onderzoek op preparaten, waarvan ten hoogste 5% van het eiwit erythropoïetisch actief was. Een zeer vergaande zuivering leverde een dermate geringe hoeveelheid eiwit op, dat de meest eenvoudige chemische karakterisering onmogelijk was.

De betekenis van erythropoietinebepalingen voor de klinische diagnostiek is onvoldoende onderzocht. Het kostbare en omslachtige bio-assay voor het hormoon bemoeilijkt routinematig onderzoek, de ongevoeligheid ervan doet referentiewaarden voor fysiologisch circulerende

erythropoietinegehalten ontbreken, en de beschikbare gegevens zijn slecht vergelijkbaar omdat de erythropoietinegehalten niet steeds in de eenheid van het IRPE worden gekwantificeerd.

Het fundamentele belang van onderzoek over erythropoietine, dat zijn weerslag vindt in de grote hoeveelheid publicaties opgesomd in dit literatuuronderzoek, berust in niet geringe mate op de modelfunctie die de regulatie van de erythropoiese vervult. Hoewel aangenomen wordt dat analoge regulaties bestaan voor de overige celtypen van de hemo-poiese zijn de experimentele gegevens niet eenduidig. Opheldering van de wijze waarop erythropoietine de inductie van erythroïde differentiatie teweegbrengt, zou weinig minder dan een doorbraak betekenen op het gebied van de regulatie van de cellulaire differentiatie.

BESCHRIJVING VAN REAGENTIA EN METHODIEKEN

Reagentia

De gebruikte reagentia waren alle van pro analysi kwaliteit, tenzij anders vermeld. Het gebruikte runderserumalbumine was No. A-4503 van de firma Sigma, en bestond uit fractie V volgens Cohn. Volgens de bijgeleverde opgave bevatte het 96 - 99% albumine. Het gebruikte ovoalbumine was No. A-5503 van dezelfde firma; volgens opgave was het electroforetisch voor 99% zuiver.

Internationale standaarden voor erythropoëetine werden ons ter beschikking gesteld door het WHO International Laboratory for Biological Standards, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, England. Dit laboratorium verschaftte ons het 1st International Reference Preparation of Erythropoietin, human, urinary, for bioassay, dat 1 I.U./1,48 mg bevatte, en later het 2nd IRPE, dat 11.U./0,5 mg bevatte (Annable et al., 1972).

Het aqua bidest. werd routinematig bereid in een glazen apparaat met een capaciteit van ongeveer 15 liter. Voor een aantal doeleinden werd het nogmaals gedestilleerd in een glazen apparaat van 2 liter, onder toevoeging van 10 ml H_2SO_4 /liter; hierbij werden de eerste en laatste 250 ml van het destillaat weggeworpen. Voor de nog te beschrijven hydroxylapatietgelchromatografie werd gebruik gemaakt van gedemineraliseerd water.

Bij het onderzoek werd gebruik gemaakt van een viertal buffers, te weten:

- 1) Tris-HCl-buffer, 0,1 molair, pH 8,2
- 2) Acetaatbuffer, 0,05 molair, pH 5,0
- 3) Fosfaatbuffer, 0,0005 - 0,2 molair, pH 6,8

De trisbuffer werd bereid volgens Gomori (1948), de acetaatbuffer volgens Walpole (1914), de fosfaatbuffer volgens Spørensen (1909).

Gelfiltratie en ionenwisselaars

Voor de isolatie van erythropoëetine door middel van gelfiltratie over Sephadex G150 werden perspex kolommen gebruikt met een lengte van 1 meter en een diameter van

3,2 cm in een gesloten systeem. De gel werd gestapeld onder een druk en met een loopsnelheid gelijk aan die welke voor het elueren werden gebruikt (respectievelijk 110 cm H₂O en 50 ml/uur). Als buffer werd voor de scheiding van serumeiwitten en voor analytische doeleinden de genoemde Trisbuffer gebruikt, waaraan NaCl tot een molariteit van 0,5 was toegevoegd. De buffer werd ontvlucht. Wanneer de kolom voor analytische doeleinden werd gebruikt werd bij de stapeling in het gelreservoir, een vultrechter, continu geroerd teneinde een zo homogeen mogelijk gelbed te verkrijgen. Elutie van de opgebrachte monsters, opgelost in ten hoogste 20 ml buffer, vond plaats van beneden naar boven.

Voor het uitvoeren van de chromatografie over DEAE/Sephadex A50 werd een kolom gebruikt van 30 cm en een diameter van 3,2 cm. De stapeling van de kolom vond plaats op dezelfde wijze als beschreven voor de Sephadex G150-kolom, echter onder een druk van 50 cm H₂O. Als buffer werd de genoemde acetaatbuffer gebruikt, pH 5,0. Elutie vond plaats door aan de buffer NaCl toe te voegen. Hierbij werd gebruik gemaakt van een gradiëntopstelling, welke bij het betreffende experiment wordt beschreven. De elutie vond plaats van boven naar beneden in verband met het krimpen van de gel bij het toenemen van de molariteit van de buffer.

Voor de bereiding van hydroxylapatietgel werd uitgegaan van onder meer calciumchloride-oplossingen. Aangezien vanwege de hygroscopische eigenschappen van CaCl₂ inwegen niet betrouwbaar kan worden geacht, werd de molariteit van de oplossingen vastgesteld door een calciumanalyse. 200 gram CaCl₂ · 2H₂O werd opgelost in 2 liter bidest. Van deze oplossing werden volumina van 0,3 en 0,4 ml gepipetteerd in maatkolfjes van 100 ml, waarna met aqua bidest. tot 100 ml werd aangevuld. De kolfjes werden goed geschud, waarna het Ca²⁺-gehalte werd bepaald*.

Hydroxylapatietgel werd bereid volgens een voorschrift van Tiselius et al. (1956), waarbij een brushier wordt omgezet in een hydroxylapatiet door hydrolyse met NaOH. De bereiding verliep als volgt. Na bepaling van de molariteit van de CaCl₂-oplossing als boven beschreven werd een Na₂HPO₄-oplossing bereid van dezelfde molariteit, eveneens met een volume van 2 liter. Voor het bijeenvoegen van de 2 oplossingen werd gebruik gemaakt van een peristaltische pomp (LKB), waarmee een gelijke stroomsnelheid van de oplossingen kon worden bereikt (nauwkeurigheid 0,4 o/oo). De stroomsnelheid bedroeg ongeveer 250 ml/uur. De twee oplossingen werden via de pomp

* complexometrische titratie met EDTA, uitgevoerd in het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam

geleid in een bekersglas van 5 liter, waarin een halve liter water was gebracht, en waarin continue werd geroerd door rotatie van een perspex plaatje ter grootte van 5 x 10 cm (rotatiesnelheid 45 rpm). De verkregen brushiet werd vervolgens volgens de methode van Tiselius door koken in alkalisch milieu omgezet in hydroxylapatiet. Op één punt weken wij van deze methode af: bij de verschillende stappen werd de opgewervelde gel een sedimentatie toegestaan van 3 i.p.v. 5 minuten. Dit was noodzakelijk om een

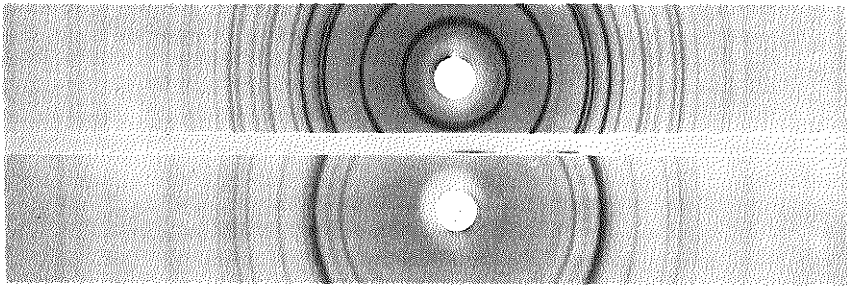


Fig. 7. Debye-Scherrer-diffractiepatronen van het gevormde brushiet (boven) en hydroxylapatiet.

goede doorloopsnelheid te verkrijgen in een kolom van 40 x 3,2 cm. De kwaliteit van de verkregen brushiet en de bereide hydroxylapatiet werd onderzocht met behulp van röntgendiffractie (Den Boer et al., 1972). De Debye-Scherrer-diffractiepatronen zijn afgebeeld in figuur 7. Ze werden vervaardigd door de heer T.L. Liem. Uit de diffractiepatronen is af te leiden dat de verkregen gels voor tenminste 90% bestaan uit brushiet, respectievelijk hydroxylapatiet. Een hogere nauwkeurigheid is met de röntgendiffractie niet te bereiken. De hydroxylapa-

tietgel werd opgenomen in gedemineraliseerd water, en gestapeld op dezelfde manier als beschreven voor Sephadex G150, onder een druk van 50 cm H₂O. De kolom werd van boven naar beneden geëluëerd met fosfaatbuffers, pH 6,8. Voor de molariteiten en de elutieschema's wordt verwezen naar de betreffende experimenten. De hydroxylapatietgel-chromatografie werd by 4°C uitgevoerd.

Dialysestudies

Dialyse werd uitgevoerd met behulp van Viskingmembranen van 0,92, 1,84 en 2,14 cm in diameter. De Viskingslang werd aan één zijde dichtgeknoopt en na het inbrengen van het te dialyseren monster eveneens aan de andere zijde. Voor de samenstelling en het volume van de oplossing waartegen werd gedialyseerd wordt verwezen naar de betreffende experimenten.

Voor negatieve drukdialyse werd gebruik gemaakt van Viskingslang met een diameter van 0,92 cm. Voor de opstelling werd een afzuigerlenmeyer gebruikt van 2 liter die kon worden afgesloten met een kurk van siliconrubber. Deze kurk was doorboord met een scheitrichter met een inhoud van 175 ml. De Viskingslang (lengte 15 - 25 cm tenzij anders vermeld), die aan één zijde was dichtgeknoopt, werd aan de andere zijde aan de uitmonding van de trechter bevestigd met behulp van een stukje Teflonslang. Het te dialyseren monster werd in de slang gebracht, waarbij de trechter als reservoir dienst deed. Het geheel (slang + trechter + stop) werd op de erlenmeyer geplaatst, waarbij de slang er binnen gebracht werd. Door afzuiging met een waterstraalpomp kon in de erlenmeyer een vacuüm worden bereikt ter grootte van 200 pascals.

Dierexperimenten

a. Bij alle experimenten met muizen werden vrouwelijke Swiss-muizen gebruikt, afkomstig van TNO/Zeist, met een gewicht van 18 - 22 gram. Voor het creëren van hypoxische omstandigheden werd een perspex (dikte 5 mm) bak met een inhoud van 54 liter geconstrueerd (0,60 x 0,45 x 0,20 m³), en later één van 36 liter (0,40 x 0,45 x 0,20 m³). In de bakken werden voorzieningen getroffen voor een ad libitum hoeveelheid voer en drinkwater, en voor continue doorstroming met een gasmengsel. Voor het induceren van isobare hypoxie (8% O₂) werd aanvankelijk perslucht en N₂ gemengd in een verhouding 2 : 3, met behulp van een zeer eenvoudige manometer. Toen dit mengsel zijn waarde had bewezen werd overgegaan op gascilinders, met als inhoud een gasmeng-

sel van 92% N₂ en 8% O₂. Later werd gebruik gemaakt van een N₂- en een O₂-cilinder, waarbij de twee gassen via een driewegkraan werden gemengd in een verhouding 92 : 8. De zuurstofbehoefte van de muizen werd berekend uit het basaal metabolisme van muizen van 18 gram, 16,0 kJ/dag, en de aanname van een respiratoir quotient van 0,8. Een gesloten ruimte, waarin 100 muizen van 20 gram, blootgesteld aan een atmosfeer van 8% O₂, dient doorstroomd te worden met een snelheid van 1,1 liter/minuut om op basis van deze gegevens te voldoen aan de zuurstofbehoefte van de muizen.

Bij het in hoofdstuk III nader te beschrijven bio-assay werden alle monsters intraperitoneaal toegediend. ⁵⁹Fe (FeCl₃ of Fe(II)citraat) werd intraveneus toegediend, nadat de oplossing door toevoeging van 0,15 molair NaCl verdund was tot 1 µCi/0,2 ml. De muizen werden over het algemeen verbloed uit de a. carotis. In het bijzonder bij experimenten waarbij meting van de hematocriet van belang was werd orbita-punctie toegepast.

De bepaling van het bloedvolume van muizen werd uitgevoerd met behulp van een ¹³¹J-albumine preparaat, dat 1 µCi ¹³¹J/2 mg menselijke albumine/0,2 ml bevatte. Hiervan werd 0,2 ml intraveneus toegediend op de boven beschreven wijze. Na tien minuten werden de muizen verbloed. Het bloedvolume werd berekend uit het aantal dpm, dat werd teruggevonden in 0,05 ml plasma, en uit de hematocriet (bepaald met behulp van een Hawksley microhematocriet centrifuge), waarbij tengevolge van het geringe bloedvolume van de muizen de toegediende 0,2 ml niet kon worden verwaarloosd. In formule betekent dit:

$$\text{Bloedvolume} = \left(\frac{100}{100 - H_t} \right) \left(\frac{\text{dpm}_{\text{inj}}}{20 \cdot \text{dpm}_{0,05 \text{ ml}}} \right) - 0,2 \text{ ml.}$$

De bloedvolumebepaling werd benut voor het verifiëren van de relatie tussen bloedvolume en gewicht bij polycythemische muizen (zie hoofdstuk III). Het lichaamsgewicht van de muizen werd vastgesteld met een Berkel weegschaal, type E, met een nauwkeurigheid van 0,5 gram.

b. Bij alle experimenten met ratten werden mannelijke Wistar-ratten (TNO/Zeist) gebruikt met een gewicht van 250 - 350 gram. Bij aankomst werden de ratten ondergebracht in gewichtsklassen met een spreiding van 25 gram. De ratten werden gebruikt voor experimenten, waarbij bij de proefdieren een anemie werd geïnduceerd, waarna plasma en urine werd verzameld. De inductie van een hemolytische anemie werd uitgevoerd door intraperitoneale toediening van 1 ml van een geneutraliseerde 1%-ige phenylhydrazineoplossing in 0,15 molair NaCl. Deze toediening werd over vier tot vijf dagen voortgezet, waarna na meting van de hematocriet de ratten werden verbloed uit de a. carotis, waarbij

heparine aan het bloed werd toegevoegd tot een concentratie van 10 I.U./ml bloed. Het plasma werd verzameld. Dit vond plaats tenminste 24 uur na de laatste phenylhydrazine-toediening. De inductie van een verbloedingsanemie werd uitgevoerd door middel van herhaalde hartpuncties onder ether- of Nembutal-anesthesie. De procedure werd gedurende vier tot vijf dagen voortgezet op geleide van de hematocriet. De ratten werden verbloed op dezelfde wijze als de met phenylhydrazine behandelde ratten. Urine van de anemische ratten werd verzameld met behulp van metabolisme kooien. De urine werd onder toevoeging van phenol tot een concentratie van ongeveer 0,2% opgevangen in een glazen bakje. Over het algemeen werd de anemie langer gehandhaafd dan voor het verzamelen van plasma. Kleine hoeveelheden bloed voor analytische doeleinden werden bij ratten afgenomen door middel van orbitapuncties.

c. Voor experimenten met konijnen werd gebruik gemaakt van New Zealand White Rabbits (TNO/Zeist), met een gewicht van 3 tot 5 kg. Een hemolytische anemie werd geïnduceerd door middel van intraperitoneale toediening van een geneutraliseerde 1%-ige phenylhydrazine-oplossing in 0,15 molair NaCl in een dosering van 15 ml/kg lichaamsgewicht/dag. Deze behandeling werd voortgezet totdat de hematocriet waarden bereikte van minder dan 15%. De konijnen werden hierna verbloed onder Nembutal-anesthesie uit de a. carotis of door middel van hartpunctie. Evenals bij ratten werd een verbloedingsanemie geïnduceerd door middel van herhaalde hartpuncties. Hierbij werd per dag op geleide van de hematocriet 20 ml bloed/kg lichaamsgewicht gepuncteerd. Het serum werd intraveneus opnieuw in de bloedbaan gebracht. De konijnen werden verbloed zodra de hematocriet waarden bereikte tussen 15 en 20%. Van deze konijnen werd heparineplasma verzameld.

Radioactiviteits metingen

Bij het onderzoek werd gebruik gemaakt van de radioactieve nucliden ^{59}Fe en ^{131}J . Meting van de activiteit vond plaats met behulp van een "Controlled Temperature Gamma Scintillation Spectrometer System" (Model 3002, Packard).

$^{59}\text{FeCl}_3$ werd betrokken van NV Philips-Duphar; het preparaat bevatte 0,2 - 0,4 $\mu\text{mol } ^{56}\text{Fe}/100 \mu\text{Ci}$ als drager. $^{59}\text{Fe(II)}$ citraat werd betrokken van het Zentralinstitut für Kernforschung, DDR; deze oplossing bevatte 0,2-0,3 $\mu\text{mol } ^{56}\text{Fe}/100 \mu\text{Ci}$ als drager.

De kanaalnummers van de gamma scintillatie spectrometer werden gekijkt met behulp van een standaardpreparaat $^{137}\text{CsCl}$, waarbij de top van de fotopiek van het ^{137}Cs werd gesteld op 0,662 MeV. Het ^{137}Cs kon worden gemeten met een efficiency van 18,4% (0,534 MeV tot 0,917

MeV), ervan uitgaande dat de gammalijn van 0,662 MeV voor 85,7% voorkomt, en de halveringstijd van het nuclide 30 jaar bedraagt. Meting van de activiteit van het ^{59}Fe vond plaats met de onderste discriminator op 1,05 MeV en de bovenste op 1,76 MeV. In dit kanaal vallen de beide fotopieken van 1,10 en 1,29 MeV. Het ^{59}Fe kon worden geteld met een efficiency van 9,2%, ervan uitgaande dat de beide gammalijnen voor respectievelijk 57% en 43% voorkomen, en de halveringstijd van het nuclide 45 dagen bedraagt. Meting van de activiteit van ^{131}J vond plaats tussen 0,255 MeV en 0,559 MeV. In dit kanaal valt uitsluitend de fotopiek van 0,364 MeV. Het ^{131}J kon worden geteld met een efficiency van 32,4%, ervan uitgaande dat deze gammalijn voorkomt voor 80%, en de halveringstijd van het nuclide 8,09 dagen bedraagt.

^{59}Fe werd gebruikt voor bestudering van de ijzerincorporatie in de erythrocyten van het perifere bloed bij muizen en ratten. Bij de muizexperimenten werd 0,2 ml bloed gehemolyseerd in 1,0 ml water; van het hemolysaat werd de activiteit gemeten. Bij de ratte-experimenten werd de activiteit van 1,0 ml bloed bepaald. ^{131}J -albumine werd gebruikt voor bloedvolumemetingen. Hiertoe werd 0,05 ml serum gebracht in 1,0 ml 0,15 molair NaCl; van deze oplossing werd de activiteit bepaald.

Bewerking van serum en urine van patienten

Voor het uitvoeren van de erythropoietinebepaling in serum- en urinemonsters afkomstig van patienten werden de monsters onderworpen aan een reeks bewerkingen.

Als routine werd op serum de volgende bewerking toegepast. Het te onderzoeken monster werd onderworpen aan dialyse tegen een vijftigvoudig volume 0,15 molair NaCl, gedurende vierentwintig uur bij een temperatuur van 4°C. Vervolgens werd het serum gecentrifugeerd (17.000 - 28.000 g), waarna het neerslag en de eventueel bovendrijvende lipideachtige substanties werden gescheiden van het supernatant, dat zonodig nog werd gefiltreerd. Dit supernatant werd gebruikt voor het bio-assay. Afhankelijk van de op klinische basis verwachte erythropoietineconcentratie werd het supernatant soms verdund met 0,15 molair NaCl.

Urine werd verzameld onder toevoeging van 0,1% phenol. De verzamelde urine werd gefiltreerd, en gedialyseerd tegen een vijftigvoudig volume aqua bidest. (24 uur, 4°C). De gedialyseerde urine werd vervolgens drooggevroren. Het drooggevroren materiaal werd opgelost in een volume 0,15 molair NaCl ter grootte van 1/10 maal het uitgangsvolume. Vervolgens werd ovo-albumine tot een concentratie van 30 g/l toegevoegd. Met deze oplossing werd het bio-assay uitgevoerd. Wanneer op

grond van klinische gegevens verwacht mocht worden dat een hoge erythropoietineconcentratie in de urine zou worden aangetroffen, werd de droogvriesprocedure achterwege gelaten maar werd aan de gedialyseerde urine NaCl toegevoegd tot een concentratie van 0,15 molair.

Eiwitbepalingen

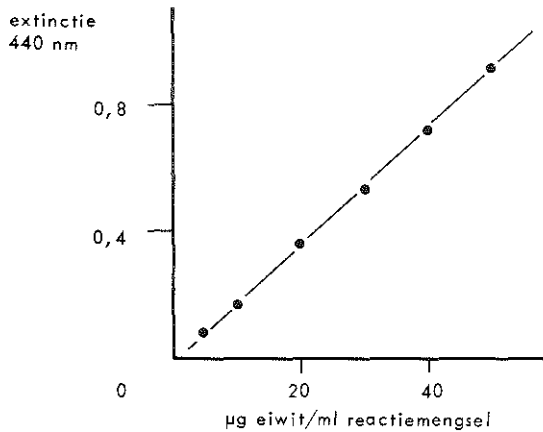


Fig. 8. IJklijn (runderserum-albumine) voor de bepaling van het bij de biureetreactie gebonden koper.

Het eiwitgehalte van een oplossing werd doorgaans bepaald door middel van de biureetreactie (Henry et al., 1957). Voor monsters, waarbij de gevoeligheid van deze reactie tekort schoot werd een micromethode gevolgd, waarbij het bij de biureetreactie gebonden koper werd bepaald (Mattenheimer, 1959). Deze bepaling is 50 maal gevoeliger dan de biureetbepaling. In figuur 8 is de ijkljn voor runderserum-albumine weer-gegeven.

Statistiek, correlatierekening en regressie-analyse

Gemiddelde, standaarddeviatie, standaarddeviatie van het gemiddelde en variatiecoëfficiënt werden berekend volgens gangbare formules (zie geraadpleegde literatuur). De significantie van het verschil tussen gemiddelden werd berekend door middel van de Student's-t-toets.

Ook de correlatiecoëfficiënten (nulde orde, partiële en meervoudige) werden berekend volgens gangbare formules. De significantie van het

verschil met 0 werd voor nulde orde en voor partiële correlatiecoëfficiënten berekend met Student's-t-toets, voor meervoudige met de F-toets.

Regressievergelijkingen werden berekend volgens de "least square" methode. Paralleliteit van regressielijnen werd aangenomen als de regressiecoëfficiënten niet significant verschillen.

Geraadpleegde literatuur:

D.S. Riggs, *The mathematical approach to physiological problems*, 1963.

Nederlands Normalisatie-instituut: *Receptbladen voor de statistische verwerking van laboratoriumgegevens*, 1968.

E. Kreyszig, *Introductory Mathematical Statistics*, 1970.

Documenta Geigy Scientific Tables, 7th Edition, 1970.

A. ONDERZOEK OVER DE BIOLOGISCHE BEPALINGSMETHODE VOOR ERYTHROPOIETINE

Inleiding

De biologische bepalingmethoden voor erythropoietine, zoals die in de literatuur worden beschreven, bestaan uit het onderdrukken van de erythropoïese van het gebruikte proefdier door onderdrukking van endogene erythropoïetineconcentratie; toediening van het op erythropoïetine-activiteit te onderzoeken monster; toediening van gemerkt ijzer; en meting van de hoeveelheid gemerkt ijzer geïncorporeerd in de erythrocyten van het perifere bloed. Aan deze procedure liggen twee vooronderstellingen ten grondslag: de aanmaak van erythrocyten wordt gereguleerd door een humoraal systeem, waarvan erythropoïetine de beperkende factor is; de in het perifere bloed gemeten incorporatie van radioactief ijzer in erythrocyten is een maat voor de erythropoïese.

Door Fried en medewerkers (1957) werden assaysystemen uitgewerkt met behulp van gehypophysectomeerde en hongerende ratten. In het eerste hoofdstuk werd reeds uiteengezet, dat specificiteit en gevoeligheid van deze systemen te wensen overlieten. De geringe gevoeligheid liet bijvoorbeeld de meting van fysiologische erythropoïetineconcentraties zonder kunstgrepen als extractie en concentratie niet toe. Een andere mogelijkheid om het quotient van zuurstofaanbod en zuurstofverbruik te wijzigen ten gunste van het aanbod is polycythemie. De polycythemische muis werd door Cotes en Bangham (1966) beschreven als het meest gevoelige proefdier voor erythropoïetine-bio-assays.

De inductie van polycythemie is voor het metabolisme van het proefdier aanzienlijk minder ingrijpend dan hypophysectomie of voedseldeprivatie. Bovendien wordt bij de polycythemische muis de erythropoïese volledig stilgelegd (Jacobson et al., 1957b), wat niet het geval is bij de gehypophysectomeerde of hongerende rat (Gallagher et al., 1961; DeGowin et al., 1962b). De respons op erythropoïetine-activiteit in ongezuiverd materiaal is bij gebruik van polycythemische muizen derhalve specifieker en gevoeliger dan bij beide genoemde rat-assays. Voor de manieren waarop een polycythemie kan worden geïnduceerd wordt verwezen naar het eerste hoofdstuk.

De gevoeligheid en de precisie, waarmee een onbekende erythropoietinespiegel kan worden gemeten, worden beïnvloed door de spreiding in de responses, de ligging van de log-dosis-respons-curve, de verhouding tussen de responses van standaard en onbekende, de stabiliteit van de gebruikte standaard, het aantal per bepaling gebruikte proefdieren, en de grootte van de blanco-respons (= respons op 0,15 molair NaCl). Door Coates (1968) werden de variabelen die van invloed zijn op de ligging van de log-dosis-(log)-respons-curve voor erythropoietine bij gebruik van de polycythemische muis opgesomd als: 1) muizenstam; 2) hoeveelheid en frequentie van de hypertransfusie of graad en duur van de hypoxie bij de voorbehandeling; 3) het aantal doses bij, en de wijze en het tijdstip van erythropoietine toediening; 4) het tijdstip en de wijze van toediening van het gemerkte ijzer; en 5) het tijdsverloop tussen toediening van het ijzer en meting van de ijzerincorporatie.

De invloed van een aantal van deze variabelen is in de literatuur beschreven. Bij de polycythemische muis bestaat na afloop van de inductie van polycythemie een voorbijgaande hoge gevoeligheid voor erythropoietine, nadat de controle-ijzer-incorporatie is gedaald tot een constant minimum tengevolge van de polycythemie (Gallagher en Lange, 1960; McDonald et al., 1971). Er bestaan slechts geringe verschillen tussen de responses na subcutane, intraperitoneale en intraveneuze toediening (Camiscoli en Gordon, 1970). Subcutane toediening geeft de grootste respons, maar het verschil met intraperitoneale toediening is niet significant. Intraveneuze toediening geeft de laagste respons. Door een groot aantal onderzoekers (Gurney, 1961; Schooley, 1962; Gallagher et al., 1963; Adamson et al., 1966; Alexanian, 1966; Fogh, 1966, 1968, 1970; Schooley, 1965) is de toegenomen respons op erythropoietine na voorafgaande toediening van erythropoietine beschreven. Dit leidde tot het gebruik van meerdere deeldoses om de gevoeligheid van het assay-systeem te vergroten. Door Lewis en medewerkers (1970) werd vastgesteld, dat een reductie van de dagelijkse periode gedurende welke de muizen aan hypoxie worden blootgesteld een verbeterde reproduceerbaarheid en een verhoogde gevoeligheid voor erythropoietine veroorzaakt. Zij achten het waarschijnlijk dat dit verschijnsel wordt veroorzaakt door een verminderde vorming van een erythropoieseremmer.

De ontwikkeling van een assaysysteem voor erythropoietine met de posthypoxische polycythemische muis

Technische gegevens over de proefopstelling voor het induceren van een polycythemie door middel van isobare hypoxie werden gegeven op blz. 42. Aanvankelijk onderzochten wij de mogelijkheid om op basis van de literatuurgegevens van hoofdstuk I de polycythemie te induceren door continue doorvoer van het gasmengsel van 8% O₂, 92% N₂.

Bij de eerste experimenten was de mortaliteit hoog. Hierbij werden de volgende observaties gedaan:

1. Hoge mortaliteit (50%) tijdens hypoxie werd voorafgegaan door een typisch gedragspatroon van de muizen. Het bestond uit hyperventilatie, ongeveer 1 uur na de blootstelling aan het gasmengsel, in een hoog tempo door de kooi lopen, frequent (tot 10 maal per minuut) omhoog springen, waarna de ademhalingsfrequentie snel terugliep tot ademstilstand intrad. Hoewel wij de doodsoorzaak niet gedetailleerd hebben bestudeerd, ligt het voor de hand te veronderstellen, dat uitputting, zuurstofschuld, en een onvoldoende gecompenseerde stoornis van het zuur-base-evenwicht belangrijke factoren zijn.
2. Het beschreven gedragspatroon kon sterk worden verminderd, en daarmee de mortaliteit, door een periode van 24 uur gewenning aan de proefopstelling met doorvoer van normale lucht.
3. Tijdens gewenning en hypoxie deed een minimaal houden van plotseling optredende visuele en auditieve prikkels de mortaliteit eveneens dalen.
4. De snelheid waarmee het gasmengsel van 8% O₂, 92% N₂ werd toegevoerd werd nooit lager dan 1,5 liter/minuut/100 muizen, en nooit hoger dan 3 liter/minuut/100 muizen ingesteld. De in hoofdstuk II genoemde snelheid van 1,1 liter/minuut/100 muizen berustte op de aanname dat alle zuurstof zou worden benut. Een minimum van 1,5 liter/minuut bleek echter essentieel. De bovengrens van 3 liter/minuut/100 muizen, waarbij een stabiel laag O₂-gehalte pas na bij benadering 45 minuten in de kooi bereikt wordt (zie berekening in de discussie van dit hoofdstuk), berust op de uit de mortaliteit afgeleide conclusie, dat een geleidelijk tot stand komen van de hypoxische conditie ook van belang is. Op basis van deze waarnemingen hanteerden wij in de praktijk een doorvoer van 2 tot 2,5 liter/minuut/100 muizen van het gasmengsel 8% O₂, 92% N₂.

Deze waarnemingen werden niet systematisch gekwantificeerd, aangezien bij het optreden van een mortaliteit van meer dan 25 muizen gedurende de eerste anderhalf uur blootstelling aan hypoxie een proef werd gestaakt. Voor de in kwantitatieve zin belangrijkste factoren, te weten de 24 uur gewenning aan de proefopstelling, en het minimaal houden van plotseling optredende prikkels, werd de overleving wel gekwantificeerd. Hiertoe werd de overleving van drie groepen muizen vergeleken gedurende de eerste 8 uur blootstelling aan hypoxie. De eerste groep werd een 24 uur durende gewenning gegeven aan de proefopstelling in een afgesloten ruimte, waarna onder dezelfde omstandigheden de doorvoer van de opstelling met het gasmengsel van 8% O₂, 92% N₂ werd uitgevoerd. Bij de tweede groep werd onder identieke omstandigheden een gewenning van 2 uur gegeven, gevolgd door de blootstelling aan hypoxie. Bij de

derde groep vond gewenning van 24 uur plaats in een rustig gehouden ruimte, waarna aan hypoxie werd blootgesteld in dezelfde, maar prikkelrijke ruimte (reiniging van een stalruimte, waarbij 200 Macrolon muizenkooien van 20 muizen/kooi werden vervangen door 2 niet over de aard van de proef ingelichte personen). Afgezien van de genoemde variaties waren de proefopstellingen en de behandeling van de muizen identiek. De mortaliteit werd elk half uur gescoord. De overlevingscurven zijn

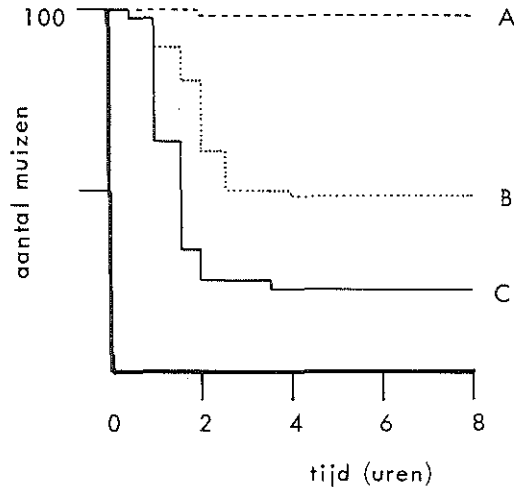


Fig. 9. Overleving van muizen als functie van de tijd blootgesteld aan 8 uur doorvoer met een gasmengsel van 8% O₂.

- A. Overleving van 100 muizen na 24 uur gewenning aan de proefomstandigheden tijdens de eerste 8 uur hypoxie, rustige omgeving,
 - B. Overleving van 100 muizen na 24 uur gewenning aan de proefomstandigheden tijdens de eerste 8 uur hypoxie, prikkelrijke omgeving,
 - C. Overleving van 100 muizen na 2 uur gewenning aan de proefomstandigheden tijdens de eerste 8 uur hypoxie, rustige omgeving.
- Voor verklaring zie tekst.

weergegeven in figuur 9. Bij de eerste groep was de overleving na twee uur hypoxie stabiel op 98%, bij de tweede na drieënhalf uur op 22%, bij de derde na vier uur op 47%. Het relatieve belang van de twee onderzochte factoren op de overleving is, hoewel de prikkelrijke ruimte slechts werd gedefiniëerd in termen van een (veel voorkomende) praktische situatie, hiermee naar onze mening voldoende gekwantificeerd. Bij continue hypoxie bedroeg de mortaliteit over een periode van negen dagen gemiddeld over een viertal proeven 13% (respectievelijk 16%, 9%, 7%, 19%).

Tabel 3

	24-uurs-% ⁵⁹ Fe- incorporatie	gemid- deld	48-uurs-% ⁵⁹ Fe- incorporatie	gemid- deld	hemato- criet
onbehandel- de muizen	34,9 40,8 36,0	38,9	65,4 64,7 55,5	61,9	46 ± 3
polycythemische muizen					66 ± 2

Bij de proeven werd de erythropoïese gemeten aan de hand van de in het perifere bloed gemeten ⁵⁹Fe-incorporatie van de erythrocyten. Over het algemeen werd de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie gemeten. De ijzerincorporatie werd hiertoe uitgedrukt als het percentage van het aantal ingespoten dpm, volgens de formule:

$$\% \text{ } ^{59}\text{Fe-incorporatie} = \frac{\text{bloedvolume} \times \text{aantal dpm/ml bloed}}{\text{aantal dpm}_{\text{inj}}},$$

waarbij het bloedvolume van de muizen werd gesteld op de algemeen gehanteerde 77 ml/kg lichaamsgewicht. Ongetwijfeld geldt voor de polycythemische muis een andere relatie tussen bloedvolume en lichaamsgewicht; hierop wordt later teruggekomen.

In eerste instantie werd de waarde van de proefopstelling met betrekking tot de inductie van de polycythemie en de daaropvolgende afname van de erythropoïese bestudeerd. Daartoe werden veertig muizen blootgesteld aan 8% O₂ gedurende een periode van negen dagen. Na afloop hiervan werden de muizen in normale lucht gebracht. Op de 1ste posthypoxische dag werd de hematocriet van zes muizen gemeten. Tot en met de 12e posthypoxische dag werd de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie gemeten, waarbij twee muizen/24 uur werden gebruikt. Tevens werden de 24-uurs- en 48-uurs-%⁵⁹Fe-incorporaties van 3 onbehandelde muizen vastgesteld, en de hematocriet van zes onbehandelde muizen gemeten. De resultaten staan vermeld in tabel 3 en figuur 10. Uit de figuur is af te leiden dat de erythropoïese bij de posthypoxische polycythemische muizen na zes dagen is afgenomen tot 1 - 2% 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie. Dit minimum blijft gehandhaafd tot de twaalfde dag. Bij de hier beschreven continue blootstelling aan isobare hypoxie verschillen de resultaten niet essentieel van hypobare hypoxie (Gordon en Camiscoli, 1970) en hypoxie door middel van selectieve membraanpermeabiliteit voor O₂ en CO₂ (Lange et al., 1968).

Aan een continue blootstelling van 8% O₂ kleven een aantal nadelen.

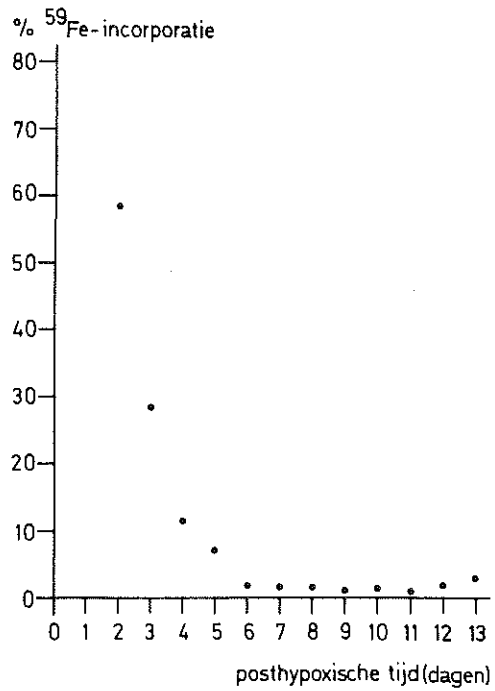


Fig. 10. Afname van de erythropoïese, uitgedrukt als 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie, na een periode van negen dagen continue hypoxie.

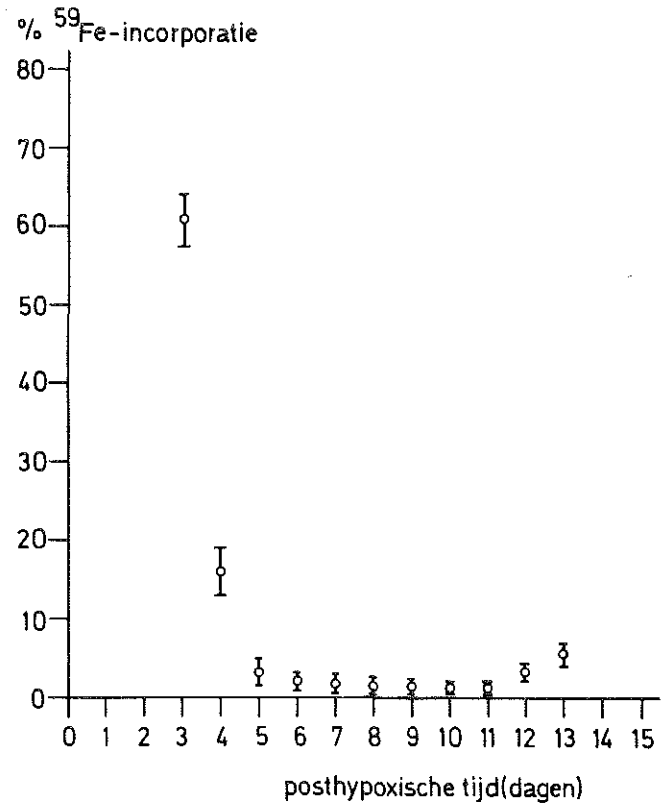


Fig. 11. Afname van de erythropoïese, uitgedrukt als 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie, na een periode van negen dagen discontinue hypoxie.

Twee ervan hangen in oorzaak samen. Onder omstandigheden van hypoxie nemen de muizen, afgezien van de laatste drie van de negen dagen, nauwelijks voedsel op. Het gevolg hiervan was een relatief hoge mortaliteit (de reeds genoemde 13%) tengevolge van een groot gewichtsverlies (tot 25% van het oorspronkelijke lichaamsgewicht). In de tweede plaats verdroegen de aan continue hypoxie blootgestelde muizen de toediening van 1 ml serum (wat noodzakelijk was voor het meten van erythropoietineconcentraties bij patiënten) slecht, vermoedelijk tengevolge van de slechte voedingstoestand. Hierbij kwamen twee praktische problemen. Continue hypoxie sluit in de praktijk het schoonmaken van de muizenkooi gedurende negen dagen uit; het bleek gezien de mortaliteit noodzakelijk dit eenmaal in de drie dagen te doen. Een tweede probleem is het zeer hoge, kostbare verbruik van het gasmengsel met 8% O₂. Om deze redenen en mede op basis van de in de inleiding van dit hoofdstuk genoemde gegevens van Lewis et al. (1970) werd besloten over te gaan tot een discontinue blootstelling aan hypoxie. Hiertoe werd het voorgaande experiment herhaald vooraan discontinue hypoxie blootgestelde muizen. Bovendien werd de gevoeligheid voor erythropoietine-activiteit van aan continue en aan discontinue hypoxie blootgestelde muizen vergeleken. Hierbij werd deze gevoeligheid gedefinieerd als de respons, uitgedrukt als 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie, op een standaarddosis (0,2 I.U. (ISB)) erythropoietine-activiteit.

Het verloop van de respons op erythropoietine als functie van de tijd na continue en na discontinue hypoxie

Een groep van 80 muizen werd blootgesteld aan een atmosfeer met 8% O₂ tijdens een periode van negen dagen, gedurende 8 uur per dag. De mortaliteit bedroeg 3%. Hierna werd de erythropoïese bestudeerd aan de hand van de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie. Hierbij werden vijf muizen per meetpunt gebruikt.

Het verloop van de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie na beëindiging van de hypoxie is aangegeven in figuur 11. Evenals na continue hypoxie daalt de erythropoïese tot omstreeks de zesde posthypoxische dag een minimum wordt bereikt dat zich handhaaft tot omstreeks de twaalfde dag. Vervolgens werd een groep van 50 muizen at random verdeeld in twee gelijke groepen. Deze werden op de beschreven wijze blootgesteld aan continue respectievelijk discontinue hypoxie. Op de derde posthypoxische dag werd aan vier muizen van elk van de groepen 0,1 I.U. (ISB) erythropoietine-activiteit toegediend in een volume van 0,1 ml. Dit werd op de vierde posthypoxische dag herhaald, waarna de muizen op de vijfde dag ⁵⁹Fe(II)citraat toegediend werd, en op de zesde posthypoxische

dag verbloeding uit de a. carotis plaatsvond. Volgens dit schema werden ook de overige muizen behandeld, echter met de eerste injectie op de vierde, vijfde of zesde posthypoxische dag. Tevens werd op elke genoem-

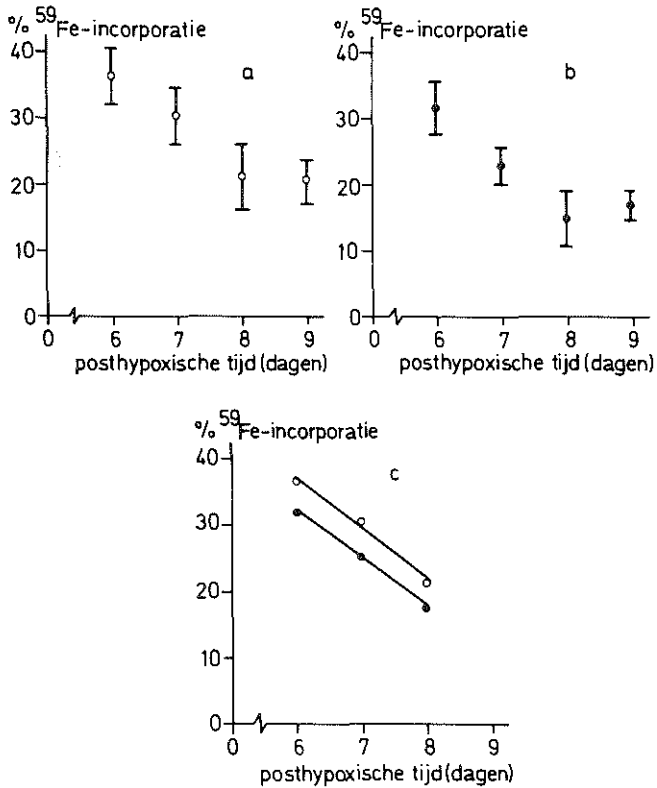


Fig. 12. Responses op 0,2 I.U. (ISB), toegediend in een volume van 0,2 ml in twee gelijke deeldoses, als functie van de posthypoxische tijd, a. na continue hypoxie; b. na discontinue hypoxie; c. beide regressielijnen in één figuur.

de begindag volgens dit schema twee muizen ingezet die 0,15 molair NaCl in plaats van erythropoetine-activiteit toegediend kregen. De resultaten zijn afgebeeld in figuur 12. Zowel bij de groep die aan continue hypoxie was blootgesteld geweest, als bij de aan discontinue hypoxie blootgestelde groep, blijken de responses af te nemen als functie van de

posthypoxische tijd. De standaarddeviaties van de aan continue hypoxie blootgestelde groep zijn, als percentages van de gemiddelden, significant ($p < 0,05$) groter dan die van de aan discontinue hypoxie blootgestelde groep. Bovendien zijn de responses van de eerste groep significant ($p < 0,05$) groter. De 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporaties van de muizen die 0,15 molair NaCl hadden toegediend gekregen waren voor de aan continue hypoxie blootgestelde groep $4 \pm 2\%$ en voor de aan discontinue hypoxie blootgestelde groep $2 \pm 1\%$. In verband met het geringe aantal waarnemingen werden voor de responses op 0,15 molair NaCl geen regressielijnen berekend. In overeenstemming met de figuren 10 en 11 namen ze slechts in zeer geringe mate en statistisch niet significant, af. De hematocriet bedroeg op de vierde posthypoxische dag respectievelijk $64 \pm 3\%$ en $59 \pm 2\%$. In figuur 12 zijn de regressielijnen samengebracht, zoals berekend uit de responses verkregen op de zesde, zevende en achtste posthypoxische dag. Voor beide geldt een statistisch significante afname ($p < 0,005$). De regressielijnen verschillen niet significant in hellingshoek; op basis waarvan paralleliteit werd aangenomen. De responses verkregen op de negende posthypoxische dag verschillen niet significant van de responses verkregen op de achtste. Dit geldt voor beide groepen.

Uit dit experiment werden de volgende conclusies getrokken. Uit de gegevens blijkt niet dat de gevoeligheid voor erythropoëtine wordt verhoogd door in plaats van continue blootstelling aan hypoxie intermitterende hypoxie toe te passen. De paralleliteit van de afname van de responses op erythropoëtine-activiteit als functie van de tijd na hypoxie leidt tot de gedachte dat de oorzaak van de afname bij beide groepen dezelfde is. Indertijd werd deze afname door ons verklaard uit een afname van het aantal ERC's (Wagemaker et al., 1972). Het argument hiervoor was dat de afname van de respons op 0,15 molair NaCl verwaarloosd kan worden bij de afname van de responses op erythropoëtine-activiteit. In hoofdstuk III B is dit denkbeeld nader onderzocht.

De definitieve proefopzet voor het assay

De definitieve proefopzet voor het assay bestond, op grond van het vermelde in de vorige paragraaf, uit: 1) inductie van polycythemie door discontinue hypoxie, te weten blootstelling aan een atmosfeer met 8% O₂ gedurende 8 uur per dag tijdens een periode van 9 dagen; 2) toediening van erythropoëtine-activiteit op de vierde en vijfde posthypoxische dag in twee gelijke deeldoses; 3) meting van de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie van de zesde tot de zevende posthypoxische dag. Dit assay-schema is aangegeven in figuur 13.

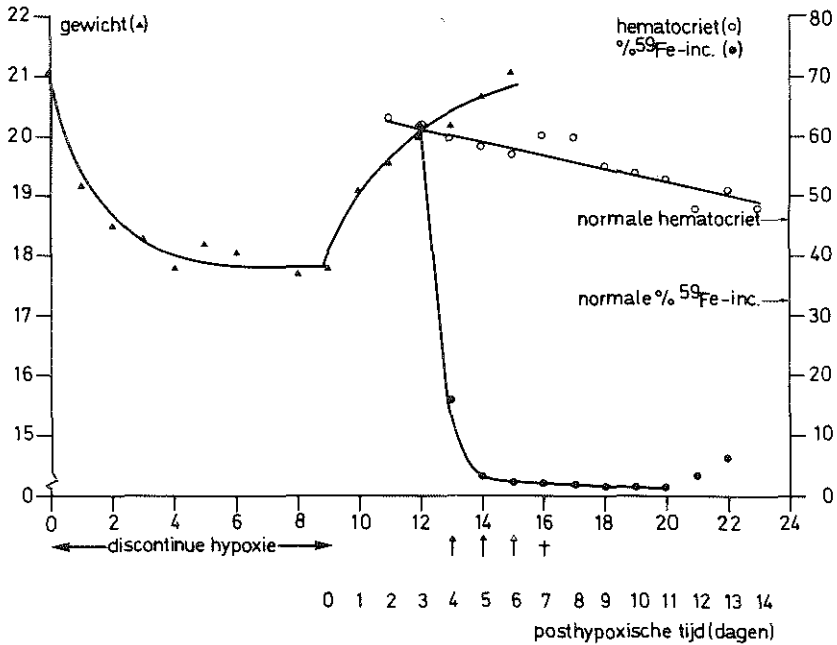


Fig. 13. Gewichtsafname tijdens hypoxie, en erythropoiese, hematocriet en gewichtstoename als functies van de posthypoxische tijd. Aangegeven zijn het definitieve assayschema en het tijdstip van de bloedvolumebepaling met ¹³¹J-albumine. Verklaring der symbolen:
 ↑ eerste en tweede deeldoses erythropoetine
 ⤴ toediening van ⁵⁹Fe
 † verbloeding uit a. carotis

Bij de voorafgaande experimenten was waargenomen, dat de muizen tijdens de blootstelling aan hypoxie een gewichtsdaling vertoonden, terwijl het gewicht weer snel toenam bij terugkeer in normale lucht. Dit werd ook gevonden voor aan discontinue hypoxie blootgestelde muizen. Bovendien werd geconstateerd, dat gelijktijdig met de afname van de erythropoiese een relatief snelle afname van de hematocriet kon worden aangetoond als functie van de tijd na hypoxie. Tenslotte neemt, zoals bij de figuren 10 en 11 reeds was opgemerkt, de erythropoiese na de twaalfde posthypoxische dag weer toe. Bij de voorgaande experimenten

waren echter de hematocrietdaling en de gewichtsvariaties onvoldoende gekwantificeerd. Teneinde hierin te voorzien werd het volgende experiment opgezet.

Honderd muizen werden blootgesteld aan discontinue hypoxie op de beschreven wijze. Tijdens de periode van hypoxie werd van dertig muizen, die aselekt werden gekozen, het gezamenlijke gewicht bepaald. Dit werd dagelijks uitgevoerd aan het eind van de periode van 8 uur hypoxie, en werd voortgezet tot en met de zesde posthypoxische dag. De erythropoïese werd, uitgedrukt als 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie, gemeten tot en met de dertiende posthypoxische dag; hierbij werden vijf muizen per meetpunt gebruikt. De hematocriet werd gemeten tot en met de veertiende posthypoxische dag; hierbij werden twee muizen per meetpunt gebruikt. De resultaten zijn aangegeven in figuur 13. Het gewicht neemt gedurende de negen dagen hypoxie af met 17% van de uitgangswaarde. Bij terugkeer in normale lucht werd de uitgangswaarde in zes dagen opnieuw bereikt. Het verloop van deze gewichtsvariaties als functies van de tijd werd benaderd met twee exponentiële functies; deze zijn aangegeven in de figuur. De daling van de hematocriet als functie van de tijd werd van de tweede tot en met de veertiende posthypoxische dag benaderd met een lineaire functie. De 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie verloopt analoog aan figuur 11, en werd benaderd met een exponentiële functie. Tenslotte zijn in de figuur de normale erythropoïese, uitgedrukt als 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie, en de normale hematocriet uit tabel 3 opgenomen.

De verkregen getallen geven aanleiding tot de volgende overwegingen. De normale groeisnelheid van muizen van 17 gram bedraagt ongeveer 1,5 gram/week (Hagemann en Schmidt, 1960), zodat geconcludeerd kan worden, dat de muizen na de periode van hypoxie sneller in gewicht toenemen dan op basis van dit gegeven kan worden verwacht. Bij het ontbreken van erythropoïese van betekenis na de vierde posthypoxische dag kan worden verwacht, dat de hematocriet daalt met een snelheid die overeenstemt met de snelheid waarmee de erythrocyten worden afgebroken, daarbij uitgaande van de prehypoxische hematocriet. De waargenomen hematocrietdaling zou, op basis van deze premies, een overleving van de erythrocyten betekenen van 45 dagen. Uit het verschil tussen de normale erythropoïese en de erythropoïese van de zesde tot en met de elfde posthypoxische dag kan tenslotte worden afgeleid, dat de door ons gehanteerde inductie van polycythemie door middel van isobare hypoxie leidt tot een ongeveer 20-voudige vermindering van de ijzerincorporatie.

Een volgend punt van onderzoek vormde de dosis-respons-relatie en de ijking van een geïsoleerd standaardpreparaat op het in hoofdstuk I en II genoemde IRPE. Hiertoe werd het volgende experiment opgezet,

dat deels ook tot doel had het in figuur 12 weergegeven experiment te bevestigen. Honderd muizen werden op de beschreven wijze blootgesteld aan discontinue hypoxie. Volgens het eerder gebruikte assayschema van twee gelijke deeldoses werden de responses bestudeerd op doses van genoemde eigen preparaat en het IRPE. Het eigen standaardpreparaat werd bereid uit de urine van een patient met PRCA (pure red cell aplasia) op blz 79 genoemd als patient 18. De urine werd gedialyseerd tegen aqua bidest, drooggevroren, en vervolgens opgelost in een volume 0,15 molair NaCl ter grootte van 1/10 van het uitgangsvolume. Op deze bereidingswijze wordt in het vijfde hoofdstuk teruggekomen.

Er werden drie groepen muizen ingezet. De eerste groep werd het eigen standaardpreparaat toegediend in verdunningen met 0,15 molair NaCl van 1/40, 1/20, en 1/10. De eerste deeldosis van 0,2 ml werd toegediend op de derde posthypoxische dag. Er werden vijf muizen per meetpunt ingezet. Ter controle diende een groep van 5 muizen, die 0,15 molair NaCl toegediend kregen. De tweede groep muizen werd het IRPE toegediend in doses van respectievelijk 0,02, 0,05, 0,10 en 0,20 I.U. (SB). Voor dit experiment werd het 2nd IRPE (Annable et al., 1972) gebruikt. Dit preparaat werd opgelost in 0,15 molair NaCl tot 1,0 I.U./ml, en daarmee ook verdund tot de gebruikte concentraties. De eerste deeldosis werd toegediend op de derde posthypoxische dag. Er werden vijf muizen per meetpunt ingezet. De controlegroep is reeds genoemd. De derde groep muizen werd het IRPE toegediend als genoemd bij de tweede groep. Hierbij werd de eerste deeldosis echter toegediend op de vierde posthypoxische dag. Ook hier werd een controlegroep van 5 muizen ingezet. Op één punt werd bij dit experiment van het normale assay-schema afgeweken. De tijdsverlopen tussen de beide deeldoses, en tussen de tweede deeldosis en de toediening van $^{59}\text{FeCl}_3$ bedroegen 22 uur

Tabel 4

eigen standaardpreparaat		IRPE		
dosis (verdunning)	respons (% ^{59}Fe -incorp.)	dosis (I.U. ISB)	respons (% ^{59}Fe -incorp.) groep b groep c	
1 : 40	8,9 ± 2,6	0,02	7,3 ± 1,8	2,6 ± 0,4
1 : 20	17,5 ± 2,4	0,05	15,0 ± 2,9	9,2 ± 1,2
1 : 10	26,2 ± 1,6	0,10	22,9 ± 1,3	17,8 ± 1,9
		0,20	30,6 ± 3,2	25,1 ± 3,9
Blanco (0,15 molair NaCl)	3,9 ± 0,6	Blanco	3,9 ± 0,6	2,2 ± 0,6

voor verklaring zie tekst

i.p.v. 24 uur. De redenen hiervoor waren organisatorisch van aard.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 4 en figuur 14. De responses op 0,15 molair NaCl zijn in overeenstemming met figuur 11, en ver-

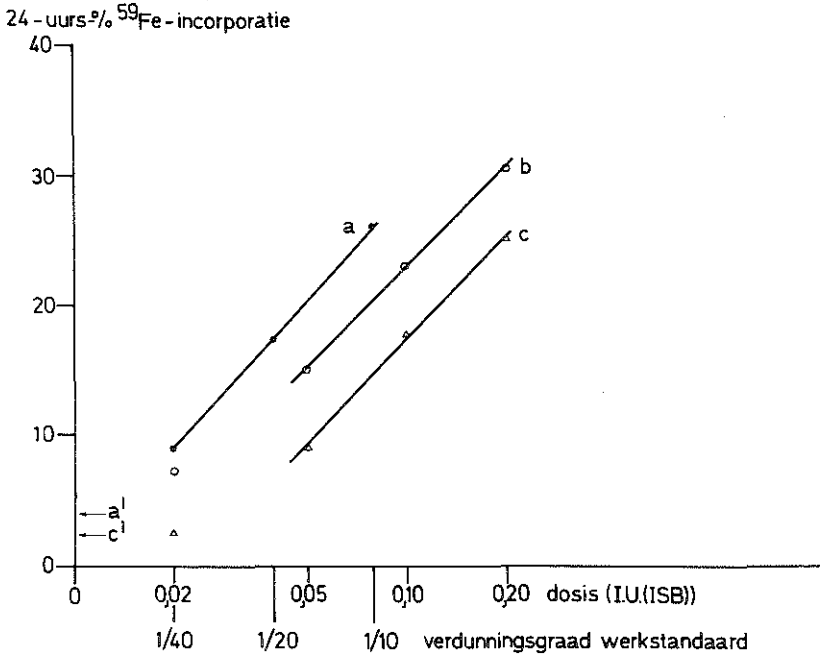


Fig. 14. Log dosis-respons-relaties voor het eigen standaardpreparaat en het IRPE. In de figuur zijn de lineaire regressielijnen aangegeven. Voor verklaring zie tekst.

Verklaring der symbolen:

- responses op het preparaat bereid uit menselijke urine
- responses op het IRPE, eerste deeldosis derde posthypoxische dag,
- △ responses op het IRPE, eerste deeldosis vierde posthypoxische dag.

Het punt a' is de controle behorend bij de curven a en b, het punt c' is de controle behorend bij curve c.

schillen 1,7% ^{59}Fe -incorporatie; het verschil is statistisch significant ($p < 0,02$). De responses op de verdunningen van de eigen standaard konden in lineair verband worden gebracht met de logarithmen van de doses. De responses op de toegediende doses van het IRPE konden bij beide groepen muizen eveneens in lineair verband worden gebracht met de logarithmen van de doses vanaf 0,05 I.U. (ISB). De hellingen van de drie regressielijnen verschillen niet significant; op basis hiervan werd paralleliteit aangenomen.

Het verschil tussen de curven b en c bedraagt gemiddeld 5,3% ^{59}Fe -incorporatie. Dit is kwantitatief in overeenstemming met figuur 12 en statistisch significant ($p < 0,02$). Het verschil bovendien significant van het verschil tussen de beide responses op 0,15 molair NaCl ($p < 0,02$), wat bevestigt, dat de afname van de responses op erythropoetine-activiteit als functie van de posthypoxische tijd niet parallel verloopt aan de afname van de responses op 0,15 molair NaCl. De responses op 0,02 I.U. (ISB) wijken bij beide groepen muizen af van de lineaire regressielijn. Bij curve b bedraagt de afwijking 2,0% ^{59}Fe -incorporatie, en bij curve c 3,8%. In de figuur zijn uitsluitend de regressielijnen van het lineaire gedeelte van de curven weergegeven.

Samenvattend zij opgemerkt, dat de hellingen van de eigen standaard en van het IRPE niet significant verschillen, zodat aan de eigen standaard een erythropoetine-activiteit in termen van I.U. (ISB) kan worden toegekend. Bovendien werd het experiment weergegeven in figuur 12 bevestigd.

Eerder werd opgemerkt, dat het bloedvolume van de posthypoxische polycythemische muis waarschijnlijk niet voldoet aan de betrekking van 0,077 liter/kg lichaamsgewicht. Dit vormde aanleiding om bij een groep van zes muizen op de zevende posthypoxische dag, zoals aangegeven in

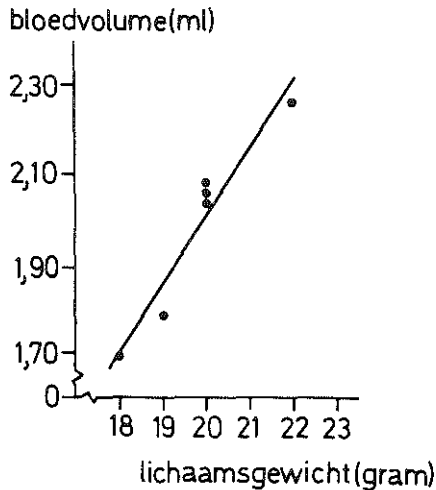


Fig. 15. Bloedvolume, bepaald met behulp van ^{131}J -albumine als functie van het lichaamsgewicht bij posthypoxische (dag 7) polycythemische muizen.

figuur 13, bloedvolumebepalingen met behulp van met ^{131}I gemerkt albumine uit te voeren, en het verband met het lichaamsgewicht te onderzoeken. Het resultaat is aangegeven in figuur 15. Bloedvolume en lichaamsgewicht waren lineair gecorreleerd ($r = 0,96$, $p < 0,01$). De afwijking van de lineaire regressielijn ligt binnen de fout waarmee het lichaamsgewicht werd vastgesteld. Het bloedvolume bedroeg $0,098 \pm 0,007$ liter/kg lichaamsgewicht. Dit getal wordt bij de hierna besproken experimenten voor de berekening van de $\%^{59}\text{Fe}$ -incorporatie gehanteerd.

De invloed van het gebruik van drie deeldoses op de ligging van de log-dosis-respons-curve

In de inleiding van dit hoofdstuk werd reeds gewezen op het verschijnsel, dat de respons op erythropoietine toeneemt na voorafgaande toediening van erythropoietine. Dit potentiërend effect van erythropoietine werd het eerst door Gurney (1961) beschreven en met name door Fogh (1966, 1968, 1970) bestudeerd. Op enkele kwantitatieve aspecten ervan wordt in hoofdstuk III B teruggekomen. Het mechanisme ervan heeft waarschijnlijk dezelfde grondslag als de reeds beschreven afnemende respons als functie van de posthypoxische tijd (zie ook hoofdstuk III B). Wij besloten van dit potentiërend effect gebruik te maken door bij het bioassay drie i.p.v. twee deeldoses toe te passen, met tijdsintervallen van twaalf uur. De lengte van deze tijdsintervallen was afgeleid uit de curve van Gurney (1961), welke het verband aangeeft tussen het tijdsinterval tussen twee deeldoses, en de daaropvolgende respons. Teneinde de invloed van het gebruik van drie deeldoses op de ligging van de dosis-respons-curve na te gaan, werd het op blz.60 beschreven experiment herhaald. Na blootstelling aan discontinue hypoxie op de beschreven wijze, werden twee groepen muizen ingezet.

De eerste groep muizen werd het IRPE toegediend in doses van respectievelijk 30, 75, 150, 300 ml.U. (ISB) in drie gelijke deeldoses van 0,2 ml. De gebruikte oplossingen van het IRPE waren dezelfde als genoemd op blz. 60. De eerste deeldosis werd toegediend op de derde posthypoxische dag. Er werden vijf muizen per meetpunt ingezet. Ter controle diende een groep van vijf muizen, die 0,15 molair NaCl toegediend kreeg. De tweede groep muizen werd het IRPE toegediend in doses van respectievelijk 6, 12,30, 75, 150 en 300 ml.U. (ISB) in drie gelijke deeldoses van 0,2 ml. De gebruikte oplossingen van het IRPE werden op dezelfde wijze bereid als genoemd op blz.60. De eerste deeldosis werd toegediend op de vierde posthypoxische dag. Er werden vijf muizen per meetpunt ingezet. Ter controle diende een groep van vijf muizen, die

0,15 molair NaCl toegediend kreeg. De tweede groep muizen werd zestien uur later ingespoten dan de eerste.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 5 en figuur 16. De responses op 0,15 molair NaCl zijn in overeenstemming met figuur 11, en verschillen 2,1% ^{59}Fe -incorporatie; het verschil is statistisch significant ($p < 0,01$). De responses op de toegediende doses konden in lineair verband worden gebracht met de logaritmen van de doses, bij curve b vanaf 0,012 I.U. (ISB). De hellingen van de beide regressielijnen verschillen niet significant; op basis hiervan werd paralleliteit aangenomen.

IRPE	respons (% ^{59}Fe -incorporatie)	
(I.U. (ISB))	groep a	groep b
0,006		3,0 \pm 0,6
0,012		5,5 \pm 1,3
0,030	16,3 \pm 3,1	12,1 \pm 1,7
0,075	23,7 \pm 1,9	20,8 \pm 3,6
0,150	32,8 \pm 4,7	28,6 \pm 2,3
0,300	38,1 \pm 3,8	33,8 \pm 3,2
0,15 molair NaCl	4,1 \pm 1,0	2,0 \pm 0,3

voor verklaring zie tekst

Het verschil tussen de beide curven bedraagt gemiddeld 3,9% ^{59}Fe -incorporatie en is statistisch significant ($p < 0,02$). Ook bij dit experiment is genoemd verschil significant groter dan het verschil tussen de beide responses op 0,15 molair NaCl ($p < 0,05$). Dit bevestigt, dat de afname van de responses op erythropoietine-activiteit ook bij gebruik van drie deeldoses niet parallel verloopt aan de afname van de responses op 0,15 molair NaCl als functie van de posthypoxische tijd. De respons op 0,006 I.U. (ISB) wijkt af van de lineaire regressielijn, doch verschilt significant van de respons op 0,15 molair NaCl ($p < 0,02$). Uit de gegevens kan worden geconcludeerd dat het gebruik van drie deeldoses leidt tot een grotere respons dan het gebruik van twee deeldoses, terwijl de gevoeligheid van de bepaling, gedefinieerd als de minimale dosis erythropoietine-activiteit die leidt tot een respons welke significant verschilt van de respons op 0,15 molair NaCl, gunstig wordt beïnvloed.

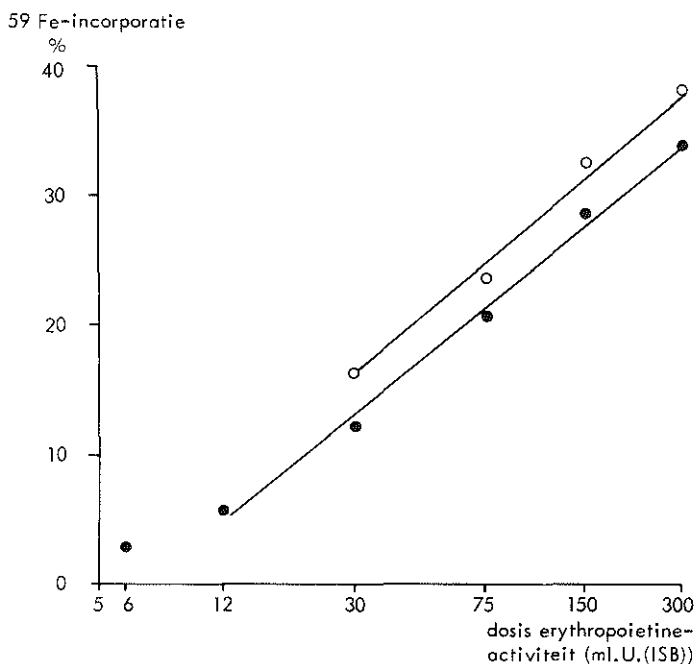


Fig. 16. Log-dosis-respons-relaties voor het IRPE. De doses werden in drie gelijke deeldoses toegediend.
○ curve a, eerste deeldosis op de derde posthypoxische dag,
● curve b, eerste deeldosis op de vierde posthypoxische dag.

De respons als functie van de tijd na toediening van erythropoietine-activiteit

Tot dusver namen wij op grond van literatuurgegevens (Erslev, 1959; Schooley en Garcia, 1962; Filmanowicz en Gurney, 1961) aan, dat toediening van erythropoietine-activiteit op de vierde en vijfde posthypoxische dag resulteert in een optimale respons bij meting van de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie van de zesde tot de zevende posthypoxische dag. De respons van het erythroïde systeem bestaat echter, zoals in het eerste hoofdstuk reeds is duidelijk gemaakt, uit een erythropoiese-"golf", die zich over enkele dagen uitstrekt. Het verdient de voorkeur om de top hiervan te meten. In het feit dat de erythropoietine-activiteit door ons in drie deeldoses werd toegediend, meenden wij reden te hebben om een en ander nader te onderzoeken. Hiertoe werd de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie op vier achtereenvolgende dagen na de toediening van erythropoietine-activiteit gemeten.

Tabel 6

dosis erythropoietine

dag nr.	0	75 ml.U. (ISB)	150 ml.U. (ISB)	300 ml.U. (ISB)
5 - 6	4,2 ± 0,4	13,9 ± 2,6	18,8 ± 1,5	21,1 ± 2,1
6 - 7	1,9 ± 0,2	20,4 ± 3,1	26,9 ± 1,9	33,1 ± 4,0
7 - 8	1,8 ± 0,4	14,3 ± 1,4	19,5 ± 2,7	22,3 ± 1,2
8 - 9	1,8 ± 0,1	6,8 ± 1,1	8,5 ± 0,9	10,1 ± 1,7
Totaal		55,4	73,7	86,6

Voor verklaring zie tekst

Erythropoietine-activiteit (75, 150 en 300 ml.U. (ISB) in drie gelijke deeldoses met volumina van 0,2 ml) werd toegediend op de vierde en vijfde posthypoxische dag, waarna de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporaties werden gemeten van de vijfde tot de negende posthypoxische dag. De verkregen ⁵⁹Fe-incorporaties zijn opgesomd in tabel 6 en weergegeven in figuur 17. Dit geldt eveneens voor het controle-experiment (responses op 0,15 molair NaCl). Het verloop als functie van de dosis is voor elk van de dagen uitgezet in figuur 18. Uit dit experiment werden de volgende conclusies getrokken. Uit tabel 6 en figuur 18 kan worden afgeleid, dat de meting van de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie op het tot dusver gekozen tijdstip inderdaad de erythropoiesegolf bij het maximum ervan meet. In de tweede plaats kan uit figuur 18 vastgesteld worden, dat in het bestudeerde deel van de dosis-respons-curve de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie in lineair verband staat tot de volledige erythropoiesegolf. Opgemerkt zij, dat meting van de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie op vier opeenvolgende dagen na toediening van erythropoietine een accuratere ijkning van onbekende monsters mogelijk zou maken dan uitsluitend meting op dag 6 - 7, gezien de hellingshoek van de dosis-respons-curve van de totale ijzerincorporatie. Van deze mogelijkheid hebben wij om praktische redenen echter geen gebruik gemaakt.

Onderzoek over de mogelijkheid tot verdere vergroting van de gevoeligheid van het bio-assay

Bij de voorgaande experimenten werd gebruik gemaakt van het potentiërend effect van erythropoietine door de toe te dienen dosis erythropoietine-activiteit, en daarmee de eventueel op erythropoietine-activi-

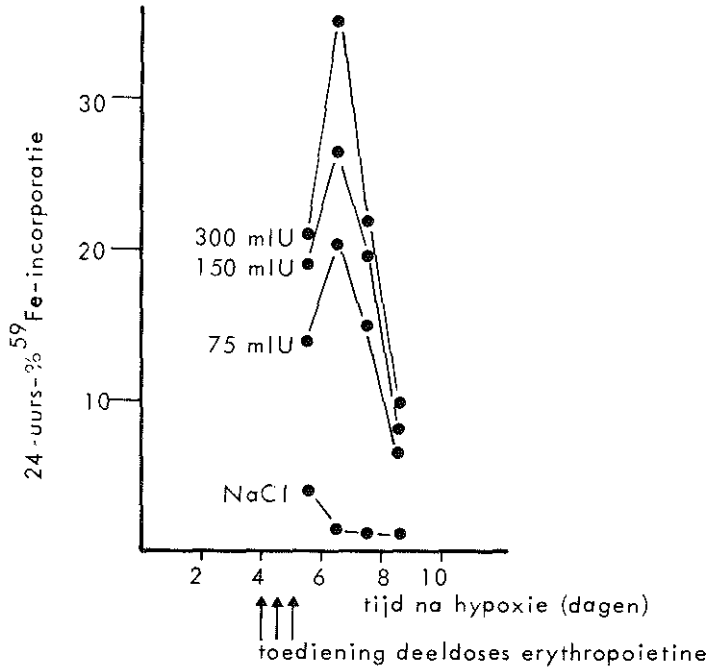


Fig. 17. 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie als functie van de tijd na toediening van erythropoietine-activiteit in drie gelijke deeldoses.

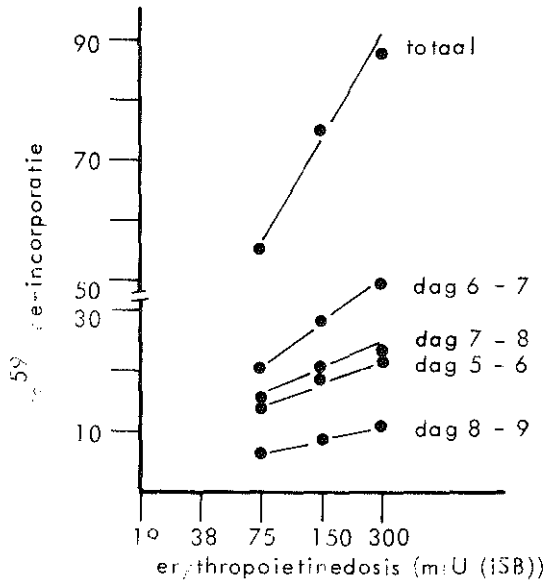


Fig. 18. Log-dosis-respons-relaties verkregen op vier verschillende tijdstippen na toediening van erythropoietine-activiteit in drie gelijke deeldoses, en voor de som van de op de vier tijdstippen verkregen 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie.

teit te onderzoeken monsters, in drie deeldoses toe te dienen. Een tweede benadering om gebruik te maken van het potentiërend effect is de toediening van een hoeveelheid erythropoietine-activiteit alvorens het eigenlijke assay te beginnen. Ongetwijfeld zou het nadeel hiervan zijn een verhoogde respons op 0,15 molair NaCl, maar hiertegenover stond de verwachting, dat de gevoeligheid van het assay eveneens zou toenemen.

Veertig muizen, op de beschreven wijze blootgesteld aan discontinue hypoxie, werden verdeeld in twee groepen: de eerste groep kreeg op de vierde posthypoxische dag het eigen standaardpreparaat, op het IRPE gelijk als beschreven op blz. 60, toegediend. De dosis bedroeg 116 ml.U. (ISB) in een volume van 0,2 ml. Op de vijfde en zesde posthypoxische dag werd het eigen standaardpreparaat toegediend in doses van respectievelijk 35, 70, 140 en 280 ml.U. (ISB) in drie gelijke deeldoses van 0,2 ml. Tussen de vier toedieningen van erythropoietine-activiteit bestonden tijdsintervallen van twaalf uur. Als controlegroep diende een groep muizen, die op de vierde posthypoxische dag 116 ml.U. (ISB) toegediend kreeg, en op de vijfde en zesde posthypoxische dag 0,15 molair NaCl i.p.v. erythropoietine-activiteit. Er werden vier muizen per meetpunt ingezet. De tweede groep muizen werd volgens hetzelfde schema behandeld. Op de vierde posthypoxische dag werd echter niet de dosis van 116 ml.U. (ISB) toegediend, doch 0,15 molair NaCl. Dit vond eveneens plaats voor de controlegroep. Ook bij deze groep werden vier muizen per meetpunt ingezet.

Tabel 7

dosis	24-uurs-% ⁵⁹ Fe-incorporatie	
	zonder voorafgaande toediening van erythropoietine	na voorafgaande toediening van 116 ml.U. (ISB)
0,15 molair NaCl	2,1 ± 0,2	11,3 ± 0,8
35 ml.U. (ISB)	2,5 ± 0,3	15,5 ± 2,3
70 ml.U. (ISB)	4,7 ± 1,0	19,1 ± 1,8
140 ml.U. (ISB)	14,0 ± 2,1	23,7 ± 0,3
280 ml.U. (ISB)	21,5 ± 0,4	31,5 ± 1,2

De resultaten zijn weergegeven in tabel 7 en figuur 19. De in de figuur aangegeven waarden werden berekend door de responses van de controlegroepen af te trekken van de responses op erythropoietine-activiteit. Bij de groep muizen, die op de vierde posthypoxische dag geen

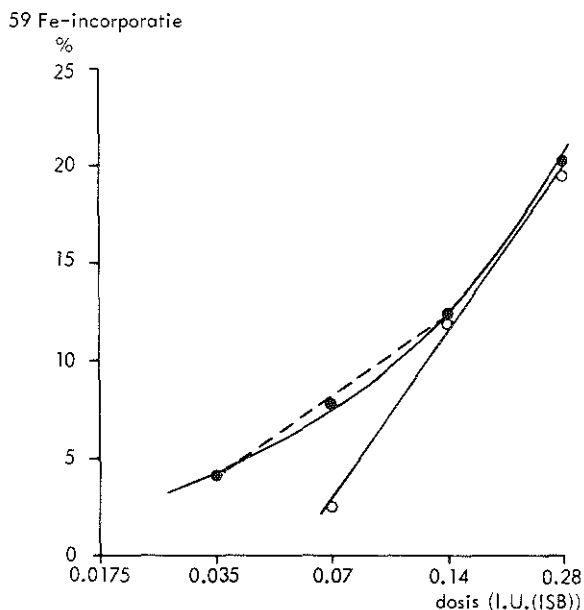


Fig. 19. Log-dosis-respons-relaties verkregen met (●) en zonder (○) voorafgaande stimulering met 0,1 I.U. (ISB). Voor details zie tekst.

dosis van 116 ml.U. (ISB) had ontvangen, waren de responses vanaf 70 ml.U. (ISB) in lineair verband te brengen met de logarithmen van de doses. De respons op 35 ml.U. (ISB) wijkt bij deze groep af van de lineaire regressielijn, maar verschilt nog juist significant ($p < 0,05$) van de respons op 0,15 molair NaCl. Vergelijking van deze regressielijn met regressielijn b van figuur 15 laat het verschil zien in gevoeligheid, veroorzaakt door een verschil in posthypoxische tijd van 1 dag. Bij de groep muizen, die op de vierde posthypoxische dag een dosis van 116 ml.U. (ISB) had ontvangen, waren de responses niet in lineair verband te brengen met de logarithmen van de doses. De log-dosis-respons-curve werd benaderd met een exponentiële functie (regressielijn a). Voor de responses op 35, 70 en 140 ml.U. (ISB) kon echter wel als lineair worden beschouwd; de regressielijn is in de figuur met een stippelijne aangegeven. Het feit dat de respons op 35 ml.U. (ISB) nog op deze lineaire regressielijn ligt en 4,2% ⁵⁹Fe-incorporatie van de respons op 0,15 molair NaCl verschilt, leidt tot de conclusie, dat de voorafgaande toediening van erythropoietine-activiteit inderdaad leidt tot een verhoogde gevoeligheid. De beide responses op 140 ml.U. (ISB) verschillen na aftrek van de responses op 0,15 molair NaCl niet significant, evenmin als de responses op 380 ml.U. (ISB). Op basis hiervan werd

voor dit traject van de regressielijnen paralleliteit aangenomen. Het is duidelijk dat bij deze hogere doses het effect van de voorafgaande stimulering met erythropoietine-activiteit teniet wordt gedaan.

Dit experiment kan gelden als een demonstratie van de mogelijkheid de gevoeligheid van het bio-assay verder op te voeren. Aangezien de winst echter betrekkelijk gering is, de dosis-respons-relatie in hellingshoek kleiner wordt en op halflogaritmische schaal niet meer lineair verloopt, hebben wij er geen gebruik van gemaakt. Uit het oogpunt van de kinetiek van de erythropoietine-targetcel interactie zou het interessant zijn dit effect van voorafgaande stimulering met erythropoietine-activiteit nader te kwantificeren. Aan dit type experimenten zijn wij echter helaas niet toegekomen.

De invloed van het volume van de toegediende dosis erythropoietine-activiteit

Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat de erythropoietine-activiteit bij intraperitoneale toediening een aantal biologische membranen dient te passeren. Hieruit kan worden verwacht, dat de respons op een gegeven hoeveelheid erythropoietine-activiteit mede afhankelijk is van het volume en de ionsterkte van de toegediende dosis. Teneinde de invloed van het volume op de respons te onderzoeken werden de volgende experimenten opgezet.

In eerste instantie werd een oriënterend experiment uitgevoerd met behulp van een preparaat, vervaardigd uit de urine van met phenylhydrazine behandelde ratten. Het preparaat was vervaardigd door de urine te dialyseren tegen een vijftigvoudig volume aquadest (4°C, 48 uur), dat driemaal werd ververst, en daarna werd gedialyseerd tegen een vijftig-

Tabel 8

concentratie als verduunningsgraad	toegediend volume	relatieve erythro- poietine-activiteit	24-uurs-% ⁵⁹ Fe- incorporatie
1/5	3 x 0,5	1	11,3 ± 2,3
1/5	3 x 1,0	2	17,6 ± 3,1
1/1	3 x 0,1	1	18,3 ± 3,5
1/1	3 x 0,2	2	24,1 ± 2,7
1/1	3 x 0,3	3	28,4 ± 3,6
0,15 molair NaCl (3 x 1,0 ml)			2,1 ± 0,4

voudig volume 0,15 molair NaCl (4°C, 24 uur). Op deze procedure wordt in het vijfde hoofdstuk nader teruggekomen. Het preparaat werd aan dertig muizen, op de beschreven wijze blootgesteld aan discontinue hypoxie, toegediend in drie doseringen en twee concentraties. Aangezien het preparaat niet was geijkt op het IRPE, worden de doses opgegeven in relatieve erythropoëtine-activiteit (zie tabel 8), waarbij aan de erythropoëtine-activiteit aanwezig in 0,3 ml van het preparaat een waarde 1 wordt toegekend. De concentraties worden om dezelfde reden aangegeven als verdunningsgraad. De doses werden toegediend in drie gelijke deeldoses. De eerste deeldosis werd toegediend op de vierde posthypoxische dag, waarna het assayschema werd gebruikt als beschreven op blz. 59. Er werden vijf muizen per meetpunt ingezet. De resultaten zijn weergegeven in tabel 8. Uit de gevonden waarden leidde wij af, dat de respons omgekeerd evenredig is met de grootte van het volume, of recht evenredig met de concentratie aan erythropoëtine-activiteit. De vraag of voor het eerste dan wel voor het tweede moet worden gekozen, is op grond van dit experiment niet te beantwoorden, en in het algemeen niet gemakkelijk te onderzoeken. Wij achtten de vraag van ondergeschikt belang, en trokken de conclusie, dat bij de bepaling van de erythropoëtine-activiteit van een willekeurig monster het volume van de gebruikte standaardoplossing gelijk zou moeten zijn aan dat van het monster. De mogelijkheid bestaat, dat de waargenomen afname van de erythropoëtine-activiteit bij toenemend volume, wordt veroorzaakt door instabiliteit van het hormoon in verdunde oplossingen. Hieraan zou tegemoet kunnen worden gekomen door een indifferent eiwit als gelatine, ovo-albumine of orosomucoïd, of serum toe te voegen (Moores et al., 1966; Goldwasser en Kung, 1968).

In het tweede experiment werd het karakter van de beschreven evenredigheid onderzocht, en de invloed van de toevoeging van het erythropoëtisch inactieve ovo-albumine. Veertig muizen werden op de beschreven wijze blootgesteld aan discontinue hypoxie. Aan zestien van deze muizen werd het eigen standaardpreparaat, op het IRPE geijkt als beschreven op blz. 60, toegediend, in doses van 350 ml.U. (ISB). Hierbij werden drie deeldoses gebruikt van volumina van respectievelijk 0,1, 0,2, 0,5 en 1,0 ml. De eerste deeldosis werd toegediend op de vierde posthypoxische dag. Ter controle diende een groep muizen die 1,0 ml en 0,15 molair NaCl toegediend kreeg. Er werden vier muizen per meetpunt ingezet. Aan de tweede zestien muizen werd erythropoëtine-activiteit toegediend in dezelfde dosering en volumina, doch met ovo-albumine tot een concentratie van 30 gram/liter toegevoegd aan de monsters. Ter controle diende een groep muizen die 1,0 ml van een oplossing van 30 gram/liter ovo-albumine in 0,15 molair NaCl i.p.v. erythropoëtine-activiteit toegediend kreeg. Ook hier werden vier mui-

Tabel 9

concentratie (l. U. (ISB)/liter)	toegediend volume(ml)	24-uurs-% ⁵⁹ Fe-incorporatie	
		zonder ovo-albumine	met ovo-albumine
1160	3 x 0,1	23,6 ± 1,4	28,8 ± 1,0
580	3 x 0,2	19,8 ± 0,3	26,2 ± 1,2
232	3 x 0,5	18,6 ± 0,4	21,5 ± 0,6
116	3 x 1,0	18,0 ± 0,8	21,3 ± 0,5
0,15 molair NaCl	3 x 1,0	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2

zen per meetpunt ingezet. De resultaten zijn aangegeven in tabel 9 en figuur 20. De curve welke ontstond na toevoeging van ovo-albumine tot een concentratie van 30 gram/liter ligt gemiddeld 4,0 %⁵⁹Fe-incorporatie hoger dan bij de groep muizen, waarbij het ovo-albumine uit de

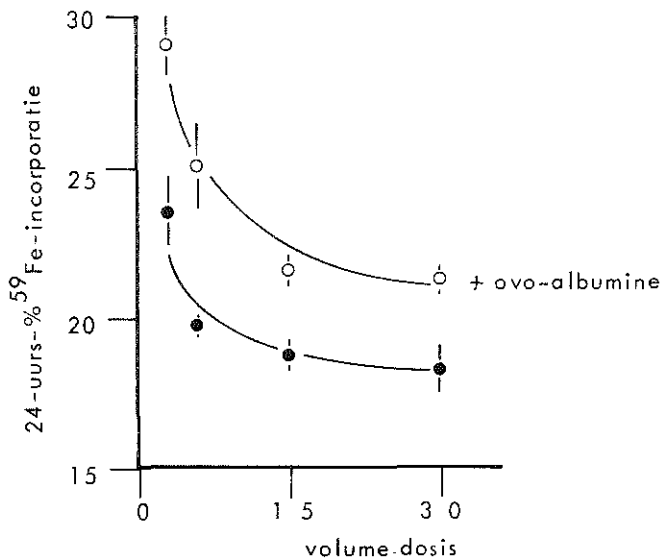


Fig. 20. Het effect van het volume van een toegediende dosis erythropoietine-activiteit (350 ml. U. (ISB)) en van de toevoeging van ovo-albumine op de grootte van de respons.

monsters was weggelaten. Dit verschil is significant ($p < 0,01$). Uit de waarden is af te leiden, dat de toevoeging van ovo-albumine geen effect heeft op de invloed van het volume van de toegediende dosis op de respons. De responses bij de beide controlegroepen verschillen niet significant, waaruit kan worden afgeleid, dat het ovo-albumine zelf geen erythropoietine-activiteit bezit, welke het verschil tussen de beide curven zou kunnen verklaren. De respons op een volume van $3 \times 1,0$ ml verschilt een factor 0,74 van de respons op $3 \times 0,1$ ml bij curve a en een factor 0,76 bij curve b. Deze waarden verschillen niet significant.

Het verloop van de dosis-respons-relatie

Het verloop van de dosis-respons-relatie bepaalt mede de nauwkeurigheid en het meetbereik van het bio-assay, reden om dit met enige zorgvuldigheid te bestuderen. In deze paragraaf wordt de dosis-respons-curve, in het bijzonder bij lage en hoge doses erythropoietine-activiteit behandeld, en in de eropvolgende de reproduceerbaarheid en de nauwkeurigheid van de bepalingmethode. De dosis-respons-relatie werd op de volgende manier vastgesteld. Een groep muizen kreeg volgens het standaardschema erythropoietine-activiteit toegediend in een tiental doseringen die uiteenliepen van 4 tot 2000 ml.U. (ISB). Er werden zeven muizen per meetpunt gebruikt. Het gebruikte erythropoietinepreparaat was op de in hoofdstuk V beschreven wijze bereid uit urine van een patient met PRCA door gelfiltratie over Sephadex G150, en op het 2nd IRPE geijkt. De verkregen dosis-respons-relatie is in figuur 21 semi-logarithmisch weergegeven. De respons op 8 ml.U. (ISB) verschilde significant ($p < 0,01$) van die op 0,15 molair NaCl, terwijl tussen 0,5 en 1.0 l.U. (ISB) een plateau bereikt schijnt te worden. Dezelfde gegevens zijn in figuur 22 op lineaire schaal weergegeven, waarbij de dosis-

Tabel 10

experiment nummer	laagste dosis (ml.U.)	significantieniveau
1	8	p 0,02
2	5	p 0,05
3	15	p 0,005
4	7	p 0,02
5	9	p 0,02
6	9	p 0,005
7	8	p 0,02
8	10	p 0,005

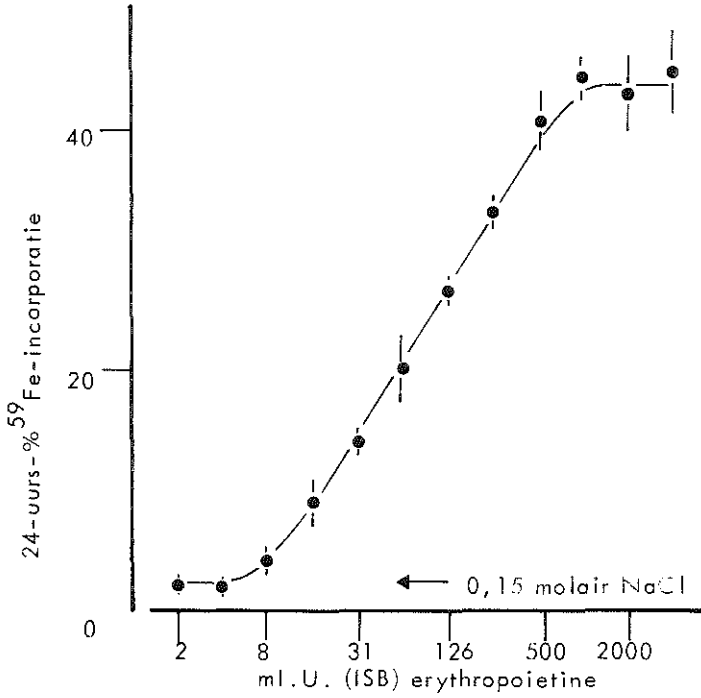


Fig. 21. Dosis-respons-relatie voor erythropoietine op semi-logarithmische schaal.

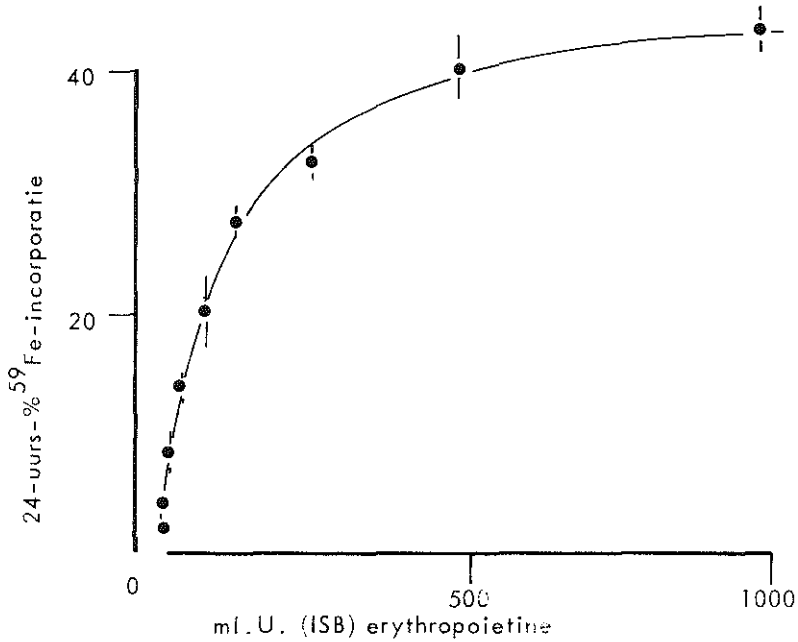


Fig. 22. Dosis-respons-relatie voor erythropoietine, benaderd door een hyperbole functie.

respons-relatie het best benaderd kan worden door een hyperbool. De vorm van de dosis-respons-relatie was zeer reproduceerbaar. Er wordt in het zesde hoofdstuk in theoretisch verband kort op teruggekomen. In een achttal experimenten werd de reproduceerbaarheid van de ondergrens van de bepalingsmethode onderzocht. Dit werd uitgevoerd door volgens het standaardschema doseringen van 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 en 20 ml.U. erythropoietine-activiteit toe te dienen van hetzelfde standaardpreparaat, en na te gaan welke van de responses significant verschilde van die op 0,15 molair NaCl. De uitkomsten van deze experimenten zijn weergegeven in tabel 10, uitgedrukt als laagste dosis, waarbij dit het geval was. Per meetpunt werden steeds vijf muizen gebruikt. Bij elk van de experimenten gaven de hogere doses eveneens responses die verschilden van de respons op 0,15 molair NaCl. Afgeleid kan worden dat de laagst aantoonbare dosis bij dit bio-assay tussen 5 en 10 ml.U. ligt. Het plateau dat de respons op erythropoietine-activiteit bereikt werd in vier experimenten nader onderzocht. Bij de eerste twee experimenten bestond het volgens het standaardschema toegediende erythropoietine uit het eerder genoemde urinaire preparaat, bij de beide andere de op dezelfde wijze verkregen erythropoietisch actieve eiwitfractie uit het serum van dezelfde patient. De resultaten van deze experimenten zijn in figuur 23 vastgelegd. Bij elk van de experimenten was de dosis-res-

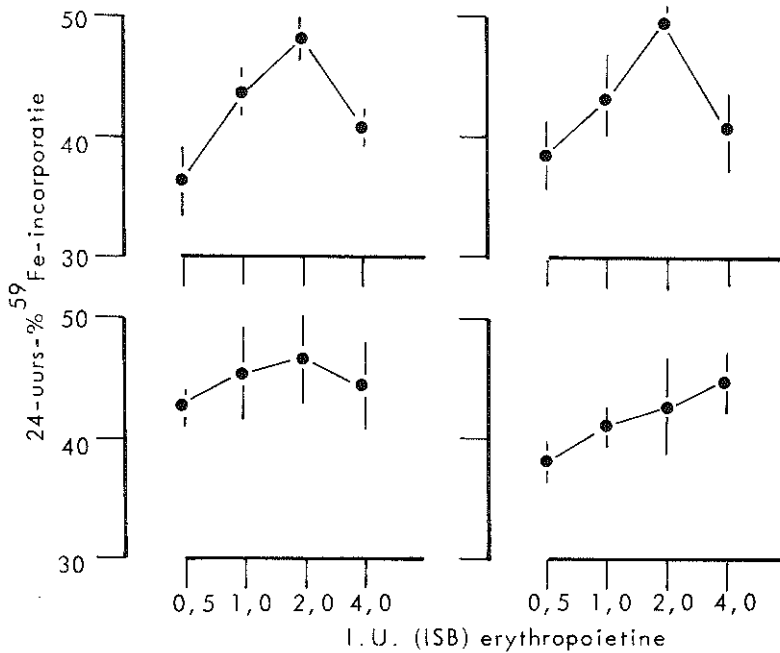


Fig. 23. Een viertal log-dosis-respons-relaties voor doses erythropoietine-activiteit $\geq 0,5$ I.U. (ISB).
Voor verklaring zie tekst.

pons-relatie volkomen vergelijkbaar met die van het eerste in deze paragraaf genoemde experiment. Uit deze laatste experimenten kan geconcludeerd worden dat het plateau voor de respons op erythropoietine bij deze methode wordt bereikt voor doses tussen 0,5 en 2,0 I.U. (ISB), waarbij opvalt dat bij drie van de vier experimenten hoge doses leidden tot een significant lagere respons ($p < 0,02$). Hoewel het in principe voorstelbaar is, en ook voorspeld wordt door de theorie van Kretschmar et al. (1966), dat bij hoge doses de gevoelige cellen refractair voor erythropoietine worden, lijkt het ons waarschijnlijker dat wij hier te maken hebben met een toxisch fenomeen. Het werd door ons niet nader onderzocht.

De hier beschreven experimenten leidden tot de conclusie dat het bio-assay een meetbereik heeft van 5 - 10 ml.U. (ISB) tot 0,5 - 1,0 I.U. (ISB) aan erythropoietine-activiteit, met een gemiddelde ondergrens van 8 ml.U. (ISB) en een bovengrens die omstreeks 1,0 I.U. (ISB) bedraagt. Bij meting van de erythropoietine-activiteit werd bij voorkeur gebruik gemaakt van het traject tussen 0,05 en 0,25 I.U. (ISB). Wij achtten het niet zinvol de bovengrens van de methode nauwkeuriger vast te stellen.

Reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid van de bepalingmethode

Een biologische bepalingmethode is alleen dan zinvol te gebruiken als de reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid ervan standaardisering van de metingen toestaan. In een reeks experimenten hebben wij dit nader onderzocht. Serum van een patient met een aplastische anemie was door middel van een zespuntsijking op het 1st IRPE gestandaardiseerd en bevatte $6,1 \times 10^3$ I.U. (ISB)/liter. Dit serum werd gebruikt voor een reeks metingen binnen één assaygroep, en voor een reeks metingen in opeenvolgende assays. Het serum werd 40 maal verdund met 0,15 molair NaCl en deze verdunning bevatte op basis van de genoemde ijking 92 ± 3 ml.U. (ISB) per 0,6 ml. De verdunning werd aan zestien groepen van vijf muizen binnen één assaygroep van 100 muizen toegediend, in drie gelijke deeldoses gescheiden door 12-uurs-intervallen, en aan groepen van vijf muizen als één van de ongeveer twintig metingen in zestien opeenvolgende assaygroepen. Bij elk van de experimenten werd een driepuntsijking ingezet met hetzelfde preparaat als genoemd op blz. 60, in doses van 40, 80 en 160 ml.U. (ISB). Het resultaat van de tweemaal zestien ijkingen is in de histogrammen van figuur 24 weergegeven. Het gebruikte standaardpreparaat werd aan het eind van de zestien assays opnieuw geijkt op het 2nd IRPE, en bleek niet significant in activiteit te zijn veranderd.

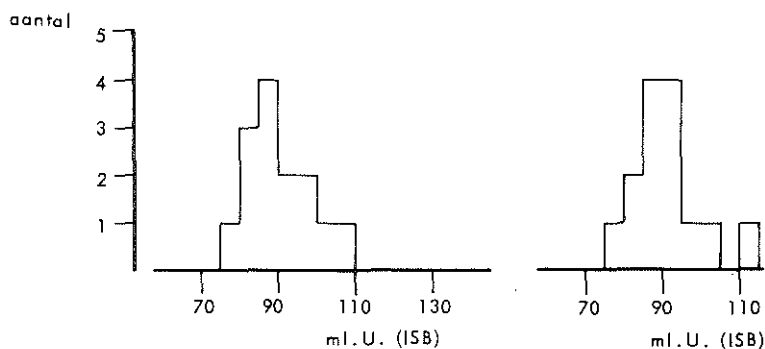


Fig. 24. Histogram van zestien bepalingen van een serummonster verdund tot 92 ± 3 l.U. (ISB) binnen één assaygroep (links), en van zestien bepalingen in evenzoveel achtereenvolgende assaygroepen (rechts).

Het gemiddelde van de zestien bepalingen binnen één assaygroep bedroeg 90, standaarddeviatie 8 ml.U. (ISB), en voor de zestien onafhankelijke assays lagen deze getallen op resp. 91 en 9. Deze gemiddelden verschillen onderling niet significant, en afzonderlijk niet significant van de vastgestelde waarde van 92 ± 3 l.U. (ISB). Opgemerkt zij dat routinematige bepaling van serum en urine monsters werd uitgevoerd door de ^{59}Fe -incorporatie op twee verdunningen te vergelijken met een drietal verdunningen van de standaard.

Op basis van de aanname van een normale verdeling van de verkregen meetpunten werden betrouwbaarheidsintervallen berekend voor gemiddelde μ en standaarddeviatie σ . Deze zijn gegeven in tabel 11. Voor de hier gegeven reeks bepalingen bedraagt de variatiecoëfficiënt 10%.

Tabel 11 frequentieverdeling	betrouwbaarheidsinterval voor gemiddelde μ en standaarddeviatie σ
figuur 23 (boven)	$6,1 < \sigma < 13,7$ $85,4 < \mu < 95,4$
figuur 23 (onder)	$6,4 < \sigma < 14,3$ $86,0 < \mu < 96,6$

Bepaling van erythropoietine-activiteit in het serum van normale proefpersonen en in serum van patienten met aandoeningen van de erythropoiese

Ter verkrijging van referentiewaarden voor het gebruik van de erythropoietinebepaling voor klinische doeleinden werd erythropoietine-activiteit bepaald in normaal menselijk serum tegen een standaardreeks bestaande uit 5, 10, 15 en 20 ml.U. (ISB), met 0,15 molair NaCl en runderserumalbumine (30 gram/liter) als controles. In een tweetal onafhankelijke experimenten werden respectievelijk een mengsel van gelijke delen van 18 normale proefpersonen, en 10 afzonderlijke sera van normale proefpersonen onderzocht. De sera werden na dialyse (4°C, 24 uur) tegen 0,15 molair NaCl en centrifugatie in een volume van 3 x 1,0 ml aan de muizen toegediend. Er werden acht muizen per meetpunt gebruikt. De uitkomsten van de bepalingen zijn in tabel 12 weergegeven.

Tabel 12

serumnummer	erythropoietine-activiteit I.U. (ISB)/liter*
1	3,5
2	3,0
3	3,0
4	3,5
5	4,5
6	4,0
7	3,0
8	<3,0**
9	<3,0
10	<3,0
mengsel (18 sera)	3,0

* afgerond op 0,5 I.U. (ISB)

** significant verschillend van 0,15 molair NaCl

Wij concludeerden eruit dat de normale erythropoietine-activiteit van menselijk serum bij benadering 2 - 5 I.U. (ISB)/liter bedraagt.

In het verloop van het in dit proefschrift beschreven onderzoek werden bepalingen verricht bij een aantal patienten met aandoeningen van

Tabel 13 Erythropoetinebepalingen bij polycythemie

PRIMAIRE POLYCYTHEMIE		SECUNDAIRE POLYCYTHEMIE	
pat.nr.	erythropoetine-activiteit	pat.nr.	erythropoetine-activiteit I.U. (ISB)/liter
1	n.a.*	6	34 ± 6
2	n.a.	7	42 ± 3
3	n.a.	8	48 ± 3
4	n.a.	9	61 ± 11
5	n.a.	10	120 ± 8
		11	68 ± 5
		12	55 ± 3

* niet aantoonbaar

Tabel 14 Erythropoetinebepalingen bij anemie

pat.nr.	diagnose	erythropoetine-activiteit I.U. (ISB)/liter
13	nierinsufficiëntie (hemodialyse)	n.a.*
14	nierinsufficiëntie (hemodialyse)	n.a.
15	nierinsufficiëntie (hemodialyse)	n.a.
16	nierinsufficiëntie (hemodialyse)	n.a.
17	anemie e.c.i.	285 ± 30
18	pure red cell aplasia (PRCA)	$(8,3 \pm 0,7) \times 10^3$
19	PRCA	$(13,3 \pm 0,4) \times 10^3$
20	PRCA	$(5,1 \pm 0,9) \times 10^3$
21	beenmergplasie	$(5,3 \pm 0,6) \times 10^3$
22	beenmergplasie	$(3,9 \pm 0,5) \times 10^3$

* niet aantoonbaar

de erythropoïese, in het bijzonder bij primaire en secundaire polycythemie, en bij beenmergaplasie, pure red cell aplasia, bij een geval van anemie e.c.i., en bij een viertal patienten met een anemie tengevolge van ernstige nierinsufficiëntie, waarvoor zij hemodialyse ondergingen. De resultaten van deze bepalingen zijn weergegeven in de tabellen 13 en 14 met vermelding van de diagnose. Gezien het fragmentarisch karakter van deze studie bij patienten zien wij af van een gedetailleerde bespreking. Vastgesteld kan worden, dat erythropoïetine niet aantoonbaar was bij primaire polycythemie en anemie tengevolge van ernstige nierinsufficiëntie, verhoogd bij patienten met een secundaire polycythemie, en zeer sterk verhoogd bij beenmergaplasie en pure red cell aplasia. Deze waarnemingen zijn volkomen in overeenstemming met literatuurgegevens, vermeld in het eerste hoofdstuk.

B. KINETIEK VAN DE RESPONS OP ERYTHROPOIETINE

De respons op een enkelvoudige dosis erythropoietine-activiteit als functie van de tijd na hypoxie

Eerder werd vastgesteld, dat de respons op erythropoietine-activiteit, toegediend in twee gelijke deeldoses met een interval van 24 uur, afneemt als functie van de tijd na beëindiging van de hypoxische condities. Om te bevestigen, dat het verschijnsel berust op verschillen in aantal ERC's (zie hoofdstuk I en hoofdstuk VI) als functie van de tijd na beëindiging van de hypoxie werd het experiment herhaald met een enkelvoudige kleine dosis erythropoietine-activiteit. Als dosis werd 0,1 I.U. (ISB) gekozen, wat voldoende groot is om een significante respons te geven, en voldoende klein om aan te nemen dat de grootte van de respons niet significant wordt beïnvloed door erythroïde differentiatie van onder invloed van langdurig circulerend erythropoietine gerecruteerde ERC's. Het experiment werd uitgevoerd door vanaf dag 0 tot en met dag 5 na hypoxie 0,1 I.U. (ISB) aan afzonderlijke groepen van 7 muizen toe te dienen, en 48 uur later de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie te meten. Het resultaat is in figuur 25 weergegeven in vergelijking tot de respons op 0,15 molair NaCl, als functie van het tijdstip waarop de ⁵⁹Fe-incorporatie gemeten werd (bovenste abscis) en als functie van de tijd waarop erythropoietine-activiteit, respectievelijk 0,15 molair NaCl werd toegediend (onderste abscis). Evenals beschreven op blz. 57 neemt de respons op erythropoietine af in de periode (dag 6 - 8) waarin geen afname meer na toediening van 0,15 molair NaCl wordt waargenomen. Het verschil tussen de responses op 0,15 molair NaCl en op erythropoietine wordt gekenmerkt door een maximum.

Interpretatie van dit maximum wordt bemoeilijkt door het in hoofdstuk I vermelde feit dat erythropoietine, afgezien van de inductie van erythroïde differentiatie, de rijping van reeds gevormde erythroïde cellen versnelt, als schematisch weergegeven in figuur 26. De praktische betekenis hiervan is, dat de waargenomen verschillen tussen de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporaties volgend op de toediening van 0,15 molair NaCl en op de toediening van erythropoietine van dag 3 tot dag 5 als minimale getallen moeten worden opgevat. Hieruit volgt dat het tijdstip van de maximale respons op erythropoietine, te weten toediening van erythropoietine op dag 2 na beëindiging van de hypoxie, onbetrouwbaar is.

Een soortgelijk verschijnsel werd waargenomen door McDonald et al. (1971) bij muizen waarbij de polycythemie was geïnduceerd door middel

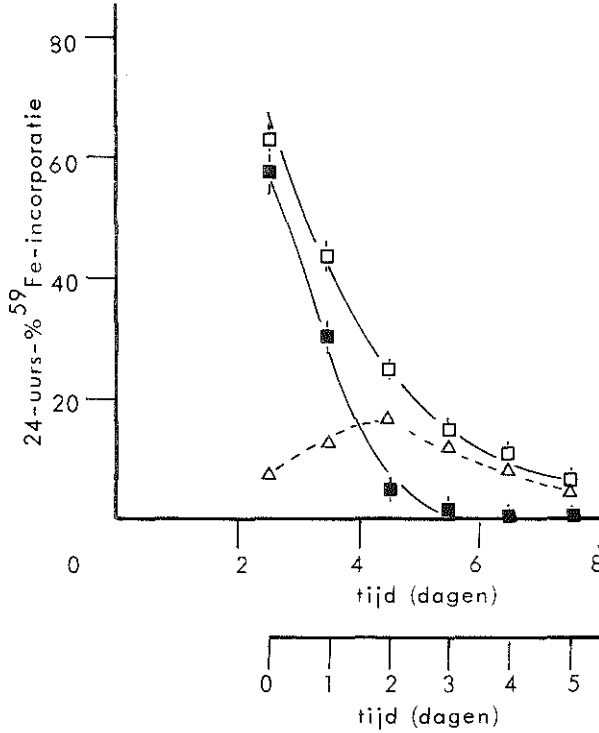


Fig. 25. 24-uurs-% ⁵⁹Fe-incorporatie in respons op een enkelvoudige dosis van 0,1 I.U. (ISB) erythropoietine (□) en 0,15 molair NaCl (●) als functie van de tijd na hypoxie. Bovenste abscis: tijdstip van de ⁵⁹Fe-incorporatie-meting, onderste abscis: tijdstip van de toediening van 0,15 molair NaCl resp. erythropoietine-activiteit. Onderbroken lijn (Δ): het verschil tussen de twee responses. Verticale lijnstukken geven de standaarddeviaties van het gemiddelde aan.

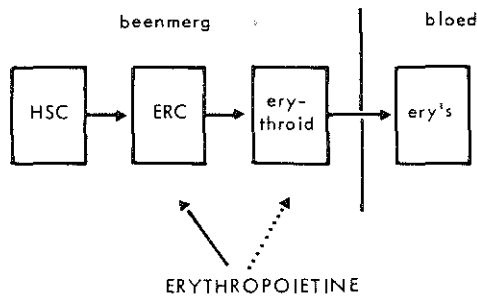


Fig. 26. Schematisch model van de werking van erythropoietine op de erythropoïese. HSC = hemopoietische stamcel; ERC = voor erythropoietine gevoelige cel; "erythroid" = compartiment van differentiërende erythroïde cellen. Erythropoietine induceert erythroïde differentiatie in het compartiment ERC en versnelt de erythroïde differentiatie van gevormde erythroïde cellen. Zie ook de hoofdstukken I en VI.

van de beperkte doorlaatbaarheid van silicone rubber membranen voor zuurstof (genoemd in hoofdstuk I). Door Okunewick en Fulton (1970) werd het echter niet gevonden. Er bestaan duidelijke verschillen tussen de proefopzet van McDonald et al. en de onze enerzijds, en die van Okunewick en Fulton anderzijds. Gezien het feit dat bij gebruik van selectieve membraanpermeabiliteit voor O_2 en CO_2 een evenwichtszuurstofspanning pas na ongeveer 7 - 9 uur wordt bereikt en de proefopstelling dagelijks wordt geopend (Lange et al., 1968) wordt in feite een situatie van intermitterende hypoxie bereikt, evenals bij onze proefopstelling. In tegenstelling hiermee gebruikten Okunewick en Fulton een proefopstelling waarmee een langdurige periode van continue hypoxie kon worden geïnduceerd. Het tweede verschil is de dosis erythropoietine. Evenals bij het hier beschreven experiment gebruikten McDonald et al. een lage dosis erythropoietine-activiteit (0,5 I.U. (ISB)), terwijl Okunewick en Fulton een dosis van 6 I.U. (ISB) gebruikten. Het is zeker dat toediening van deze dosis leidt tot een betrekkelijk langdurige circulatie van meetbare hoeveelheden erythropoietine waardoor de respons op erythropoietine mede wordt bepaald door ERC's die op het tijdstip van de toediening van erythropoietine nog niet aanwezig waren (Metcalfe en Moore, 1970). Wij komen in de discussie van dit hoofdstuk kort op deze verschillen terug.

De respons op meerdere deeldoses erythropoietine-activiteit als functie van de tijd na toediening

Eerder in dit hoofdstuk werd vastgesteld, in overeenstemming met de resultaten van de onderzoekers genoemd in de inleiding van hoofdstuk III A, waargenomen, dat het effect van toediening van erythropoietine wordt vergroot door voorafgaande toediening van erythropoietine. Wij hebben hiervan gebruik gemaakt door de gevoeligheid van het bio-assay te vergroten. In deze paragraaf worden enkele experimenten beschreven die tot doel hadden dit verschijnsel nader te kwantificeren, en het relatieve belang van elk van de door ons gebruikte deeldoses te onderzoeken.

In het eerste experiment werd aan verschillende groepen van zeven muizen 0,15 molair NaCl, 1 maal 0,1 I.U. (ISB), 2 maal 0,1 I.U. (ISB) of 3 maal 0,1 I.U. (ISB) toegediend, bij de meerdere deeldoses met intervallen van 12 uur. Dit schema is weergegeven in figuur 27 evenals de 24-uurs- ^{59}Fe -incorporatie gemeten op vijf achtereenvolgende dagen. Vastgesteld werd, dat de tweede deeldosis de grootste toename in de ijzerincorporatie veroorzaakt, terwijl de bijdrage van de derde deeldosis aan de piekwaarde gering is. Indien de piekwaarde van de 24-uurs-

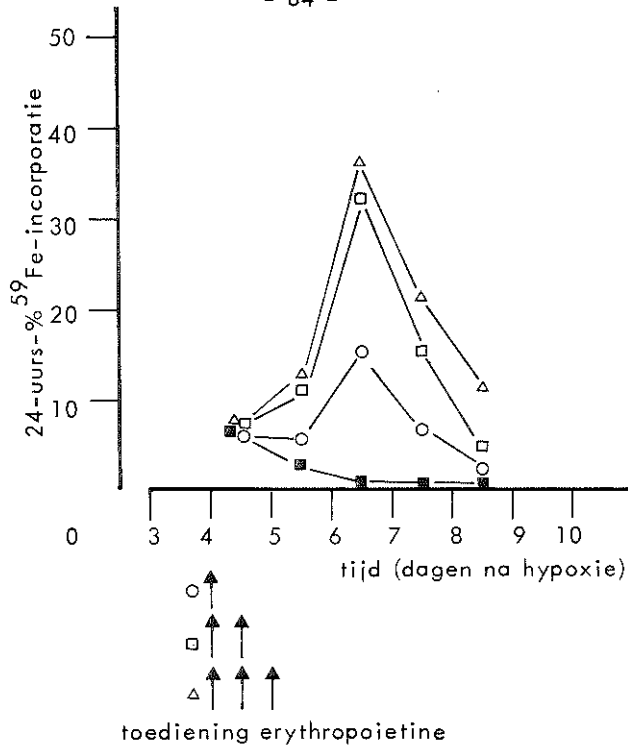


Fig. 27. 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie in respons op respectievelijk 0,1 I.U. (ISB) (○), 2 maal 0,1 I.U. (ISB) (□) en 3 maal 0,1 I.U. (ISB) (△) als functie van de tijd na hypoxie. De pijlen geven het tijdstip van toediening aan.

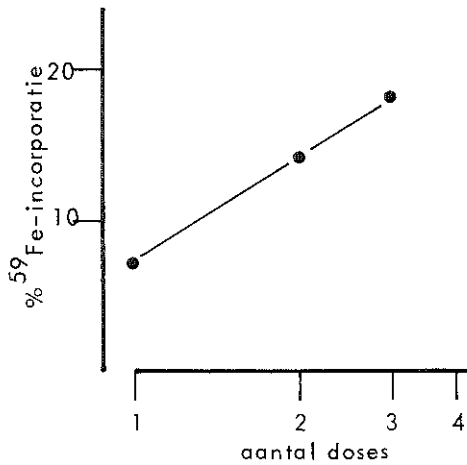


Fig. 28. Het gemiddelde van de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie verkregen gedurende 5 opeenvolgende dagen als functie van het aantal doses van 0,1 I.U. (ISB) erythropoietine.

%⁵⁹Fe-incorporatie verkregen met drie deeldoses op 10% gesteld wordt, wordt hiervan 4% veroorzaakt door de controle, 24% door de eerste deeldosis, 62% door de tweede deeldosis en slechts 10% door de derde. Ten overvloede zij hier opgemerkt, dat het routine-bio-assay op deze piekwaarde ingesteld is. Het geringe effect van de derde deeldosis is echter slechts schijnbaar. Wanneer het gemiddelde van de op vijf achtereenvolgende dagen verkregen 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie op halflogaritmische schaal tegen het aantal toegediende deeldoses uitgezet wordt (figuur 28), ontstaat een lineair verband. Het relatieve belang van de doses, berekend op dezelfde wijze als hiervoor, bedraagt 15, 25, 38 en 22% voor respectievelijk 0,15 molair NaCl, en 1, 2 en 3 maal 0,1 i.u. (ISB). Ook hier is het relatieve belang van de tweede deeldosis het grootst, maar neemt het relatieve belang van de derde aanzienlijk toe. Dit wordt veroorzaakt door het feit dat het grootste effect van de derde deeldosis niet op dag 2, maar op dag 3 na toediening valt, gerekend vanaf de eerste deeldosis.

In het tweede experiment werd de respons op twee deeldoses, toegediend met intervallen van 12 uur en van 24 uur, onderzocht. Het toedieningsschema is in figuur 29 weergegeven, evenals de 24-uurs-%⁵⁹Fe-

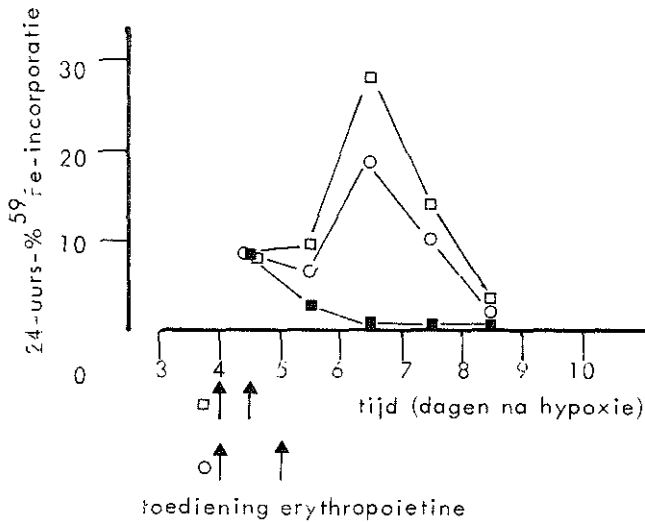


Fig. 29. 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie in respons op 0,2 i.u. (ISB) erythropoietine, toegediend in twee deeldoses met intervallen van 12 (□) en 24 (○) uur. De pijlen geven het tijdstip van toediening aan.

incorporatie, gemeten op vijf achtereenvolgende dagen. Dit experiment bevestigt het voorafgaande, in die zin, dat toediening van de tweede deeldosis 12 uur na de eerste een aanzienlijk grotere respons geeft dan toediening van de tweede deeldosis na 24 uur, wat in het vorige experiment het tijdsinterval voor toediening van de derde deeldosis was. Het potentiërend effect van de eerste dosis op een volgende dosis is kennelijk een tijdsgebonden fenomeen, dat na 24 uur weer vrijwel verdwenen is. Interpretatie van deze experimenten wordt bemoeilijkt door het feit dat erythropoietine, als toegelicht in figuur 26, meerdere effecten heeft op de erythropoiese. Nog niet genoemd is dat erythropoietine, gebaseerd op het feit dat, ook bij de hier beschreven experimenten, de respons op twee gelijke doses erythropoietine met een tijdsinterval van 12 uur groter is dan tweemaal de respons op de afzonderlijke dosis, kennelijk een toename van het aantal ERC's veroorzaakt. Het resultaat van deze experimenten dient derhalve te worden beschouwd als de resultante van ERC-toename, inductie van erythroïde differentiatie, en versnelling van erythroïde differentiatie. Geen eenduidige uitspraak kan worden gedaan over het relatieve belang van deze drie effecten van erythropoietine.

Discussie

Het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek heeft geleid tot een biologische bepalingmethode waarmee het mogelijk was erythropoietine aan te tonen in een hoeveelheid van 8 ml.U. (ISB). De extreme gevoeligheid van het bio-assay in vergelijking tot de in hoofdstuk I genoemde bio-assays behoeft enige toelichting. Factoren die de gevoeligheid duidelijk beïnvloedden waren het gebruik van drie deeldoses, toegediend met tijdsintervallen van twaalf uur, en de keuze van het tijdstip van toediening. Op grond van het experiment weergegeven in figuur 25, werd vastgesteld dat de gevoeligheid van de posthypoxische muis voor erythropoietine als functie van de tijd na hypoxie een maximum bereikt, van welk maximum wij een optimaal gebruik hebben gemaakt. Het verschijnsel is door ons geïnterpreteerd als een "overshoot" van de ERC-populatie, optredend na beëindiging van de hypoxische condities, en derhalve in afwezigheid van erythropoietine (zie ook hoofdstuk VI). Het verschijnsel is, zoals eerder vermeld, tot dusver alleen waargenomen na intermitterende hypoxie, en door ons (zie blz. 57) ook na blootstelling aan continue hypoxie van betrekkelijk korte duur. Mogelijk berusten de verschillen tussen de experimenten van McDonald et al. (1971) en de onze enerzijds, en die van Okunewick en Fulton (1970) anderzijds in hoofdzaak op het verschil in toegediende dosis erythropoietine-activiteit, zoals op blz. 83 uiteengezet.

De door ons toegepaste methode van isobare hypoxie leidt tot een lage zuurstofspanning, mogelijk lager dan bij welke andere methode ook. In figuur 30 is de, op basis van de gegevens vermeld in hoofdstuk II, berekende afname weergegeven van het zuurstofpercentage in een gesloten systeem, doorstroomd met een gasmengsel van 8% O₂ en 92% N₂

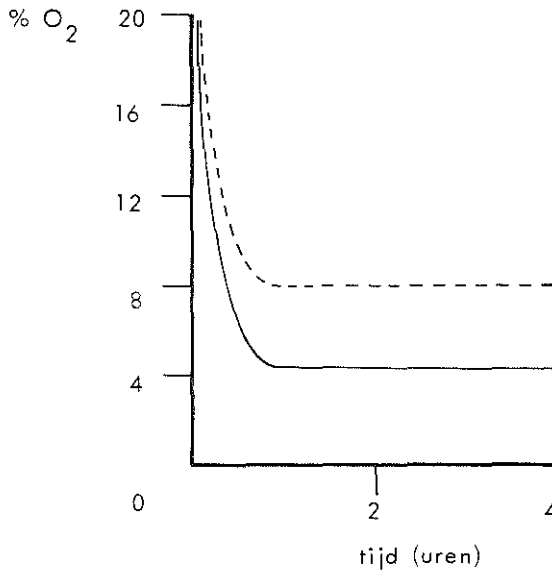


Fig. 30. Berekende afname van het zuurstofpercentage in een gesloten systeem van 52 liter waarin 100 muizen van 20 gram, dat wordt doorstroomd met een gasmengsel van 8%O₂ en 92%N₂ met een snelheid van 2,5 liter/ minuut. De onderbroken lijn geeft de afname voor hetzelfde systeem onder dezelfde condities zonder muizen.

met een snelheid van 2,5 liter/minuut, waarin 100 muizen van 20 gram. De berekeningen leiden tot de conclusie, dat een evenwichtszuurstofpercentage wordt bereikt binnen 40 minuten ter grootte van 4 tot 5% zuurstof. Waarschijnlijk wordt bij geen van de in de literatuur beschreven bio-assays een dermate lage relatieve zuurstofspanning bereikt, en het is mogelijk dat de sterke erythropoietische stimulus die ervan uitgaat van invloed is op de gevoeligheid van het bio-assay na beëindiging van de hypoxische conditie.

De gemeten referentiewaarden voor erythropoietine-activiteit aanwezig in menselijk serum van individuen zonder hematologische afwijkingen zijn in tabel 15 vergeleken met de uitkomsten van een aantal

Tabel 15

auteurs	erythropoietine-activiteit normaal menselijk serum (I.U. (ISB)/liter)	methode
Goudsmit et al., 1967	0,5 - 2,0	immunoprecipitatie
Jordan et al., 1971	6 - 60	hemagglutinatie-inhibitie
Garcia, 1973	♀ 4,3 ± 0,2 ♂ 4,9 ± 0,2	radio-immuno-assay
Lertora et al., 1975	52 - 84	radio-immuno-assay
Dunn, 1975	♀ 100 ♂ 230	foetale leverkweek
Dit proefschrift (Wagemaker et al., 1972)	2 - 5	posthypoxische polycy- themische muis

andere onderzoekingen. Wij willen hier niet gedetailleerd ingaan op de verschillen. Opgemerkt zij, dat het door ons uitgewerkte bio-assay erythropoietine-activiteit meet zoals het in vivo is gedefiniëerd, terwijl bij geen der vijf andere assays de specificiteit voor biologisch actieve erythropoietine-activiteit ondubbelzinnig is aangetoond.

ERYTHROPOIESE, ERYTHROPOIETINEPRODUCTIE EN ERYTHROPOIETINE-UITSCHEIDING BIJ PATIENTEN MET EEN NIERTRANSPLANTAAT

Inleiding

Uit de rol van de nier bij de productie van erythropoietine is begrijpelijk, dat nieraandoeningen aanleiding kunnen zijn tot stoornissen van de regulatie van de erythropoiese. Deze kunnen zowel tot een anemie als tot een erythrocytose leiden. Hoewel de fysiologie van de erythropoietineproductie niet is opgehelderd, en daarom de etiologie van een in het licht van de hemoglobineconcentratie abnormale erythropoietineproductie evenmin volledig verklaard is, kan uit een terugkoppelingsmodel als beschreven in het eerste hoofdstuk een opvatting over het ontstaan van een abnormale erythropoietineproductie worden afgeleid. Het tot stand komen van een erythrocytose vanuit een normaal hemoglobinegehalte kan worden veroorzaakt door een afgenomen zuurstofaanbod aan de nier tengevolge van een beperking van de niercirculatie. De hierop volgende verhoogde erythropoietineconcentratie kon inderdaad worden aangetoond bij een experimentele stenose van de arteria renalis (Takaku et al., 1962; Fisher et al., 1967a, b, 1968), hoewel de afwijking bij patienten zelden aanleiding geeft tot een erythrocytose. De erythrocytose, die na niertransplantatie soms wordt gevonden wordt meestal verklaard (Thorling, 1972) uit een beperking van de microcirculatie van de nier.

De anemie die zich ontwikkelt bij een chronische nierinsufficiëntie zou kunnen ontstaan als gevolg van een afnemende erythropoietineproductie, voortvloeiend uit de afname van functionerend nierweefsel. Dit kon tot dusverre echter nauwelijks worden aangetoond gezien de problemen rond het meten van verlaagde erythropoietineconcentraties van het serum. Wel werd gevonden dat bij patienten met een anemie tengevolge van nierinsufficiëntie erythropoietine niet of nauwelijks in het serum aan te tonen is (Erslev, 1970). In figuur 31 zijn de beide veronderstellingen schematisch weergegeven. De etiologie van de anemie bij chronische nierinsufficiëntie is waarschijnlijk gecompliceerder dan uitsluitend een verlaagde of afwezige erythropoietineproductie. In een samenvattende publicatie noemt Erslev (1970) drie factoren die de erythropoiese bij chronische nierinsufficiëntie nadelig beïnvloeden: verlaagde erythropoietineproductie; ophoping van toxische metaboliëten; ijzerge-

brek. Het ijzeregebrek zou worden veroorzaakt door de hemorrhagische diathese van patiënten met een uremie (Castaldi, 1966). Voorts bestaat

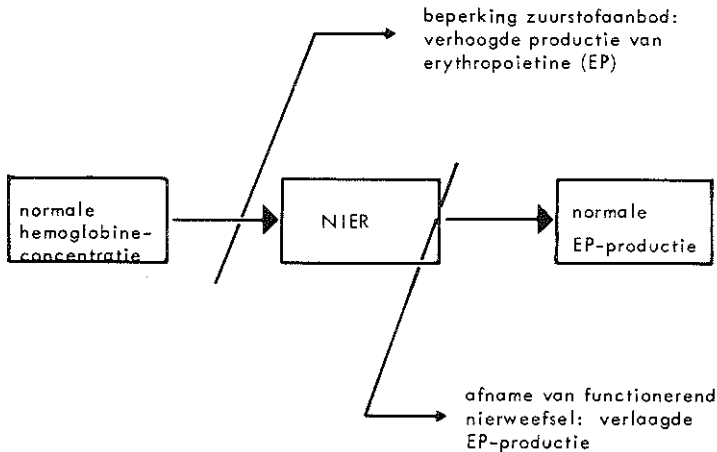


Fig. 31. Schematische voorstelling van de hypothese over het ontstaan van erythrocytose of anemie bij een nieraandoening. Beperking van het zuurstofaanbod door circulatiebeperking bij overigens intact nierweefsel leidt na verloop van tijd tot een erythrocytose, terwijl een afname van functionerend nierweefsel tot een anemie kan leiden.

er een verkorte levensduur van de erythrocyt, evenredig met het serum-ureum-gehalte (Joske et al., 1956; Shaw, 1967). Het relatieve belang van de drie door Erslev genoemde factoren is niet duidelijk aangezien het niet mogelijk is gebleken het onderdrukkend effect van de uremie op de erythropoiese te scheiden van de verlaagde of afwezige erythropoietineproductie.

De keuze van patiënten met een niertransplantaat voor bestudering van de samenhang tussen exocriene nierfunctie en erythropoiese behoeft enige toelichting. Transplantatie van een nier bij een genefrectomeerde en anemische patient wordt gevolgd door een geleidelijke verbetering van de nierfunctie en een toenemende erythropoiese, die over het algemeen leidt tot een normaal hemoglobinegehalte, en gezien het gehandhaafd blijven ervan kennelijk tot de instelling van een normale steady state erythropoiese. De normalisering van de erythropoiese wordt toegeschreven aan de erythropoietineproductie van de getransplanteerde nier. De verbetering van de nierfunctie wordt mede gekenmerkt door het op gang komen van een diurese, en een sterke daling van de ureum- en

creatinineconcentraties van het bloed. Deze veranderingen vinden plaats over een tijdsverloop van enkele weken tot maanden. Tegelijkertijd hiermee treedt een toenemende erythropoïese op, gekenmerkt door een voorbijgaande reticulocytose en een stijging van het hemoglobinegehalte van het bloed tot normale waarden zijn bereikt.

Bij patienten met een niertransplantaat bestaat er een zekere variatie in de uiteindelijk bereikte nierfunctie, terwijl er per patient een grote variatie in de nierfunctie bestaat als functie van het tijdstip na transplantatie. Aangezien er eveneens een variatie bestaat in de snelheid waarmee de erythropoïese na transplantatie op gang komt, en er per patient een grote variatie bestaat als functie van het tijdstip na transplantatie, zijn patienten met een niertransplantaat mogelijk geschikt voor bestudering van de samenhang tussen erythropoïese en nierfunctie met behulp van correlatierekening. Dit was ons uitgangspunt.

De tweede vraagstelling wordt gevormd door de scheiding van een eventueel onderdrukkend effect van de uremie op de erythropoïese en het stimulerend effect van erythropoïetine. Hiertoe werden bepalingen verricht ter vaststelling van de erythropoïetineconcentratie van het serum en de urine van de patienten in de tweede week na transplantatie. Voorts leek het ons belangrijk erythropoïetinegehalten te correleren met erythropoïese en nierfunctie. Hiertoe werd een tweede erythropoïetinebepaling verricht op serum en urine op een later te definiëren tijdstip. Tenslotte onderzochten wij of de verkregen waarde voor de erythropoïetineconcentratie van de urine voldoende goed correleerde met de waarde voor serum om gebruikt te kunnen worden als maat voor de erythropoïetineproductie.

Bij sommige patienten met een niertransplantaat treedt een erythrocytose op van voorbijgaande aard (Nies et al., 1965, Denny et al., 1966; Abbrecht en Greene, 1966; Hoffman, 1966; Westerman, 1967). De derde vraagstelling bij dit onderzoek wordt gevormd door de onduidelijkheid over de oorzaak van de erythrocytoses, al wordt een verband met afstotingsreacties verondersteld. Afstoting zou een tijdelijke verandering in de microcirculatie van de nier veroorzaken, welke leidt tot relatieve hypoxie van nierweefsel en een verhoogde erythropoïetineproductie (Kountz et al., 1963). Het leek ons zinvol om bij patienten bij wie na niertransplantatie een erythrocytose ontstond, tijdens de periode van erythrocytose erythropoïetinebepalingen te verrichten, en het verband tussen afstotingsreactie en hemoglobinstijging aan een nader onderzoek te onderwerpen.

Opzet van het onderzoek en populatiegegevens

Het onderzoek werd uitgevoerd bij 25 patienten met een niertransplantaat. De erythropoiese werd beoordeeld aan de hand van de hemoglobineconcentratie (mmol(Fe)/liter), hematocriet (%), en reticulocytenpromillage (o/oo). Deze drie variabelen werden tijdens de klinische periode dagelijks, en tijdens de poliklinische elke 3 tot 6 dagen gemeten. Ter beoordeling van de exocriene nierfunctie beperkten wij ons tot de ureum- en creatinineconcentraties (respectievelijk mmol/liter en $\mu\text{mol/liter}$) van het serum. Deze variabelen werden op dezelfde tijdstippen gemeten als de variabelen ter beoordeling van de erythropoiese. De afname van het bloed, en het verzamelen van de urine voor de erythropoietinebepalingen vond plaats rond de twaalfde dag na transplantatie, en rond het tijdstip waarop de hoogste waarde van de reticulocytose werd bereikt. De monsters werden verzameld en bewerkt als vermeld op blz.

De groep patienten bestond uit 11 vrouwen en 14 mannen. De leeftijdsverdeling van de patienten is weergegeven in het histogram van

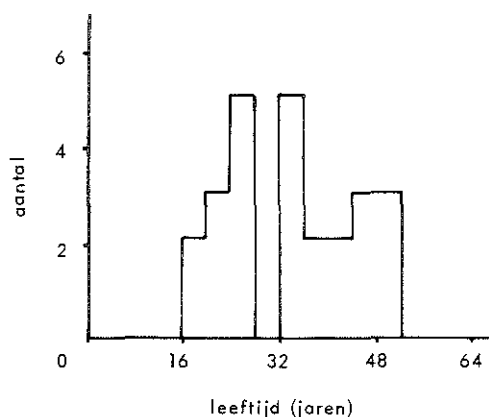


Fig. 32. Frequentieverdeling van de leeftijd van de 25 patienten die in het onderzoek zijn betrokken.

figuur 32. De gemiddelde leeftijd van de vrouwelijke patienten bedroeg 33 ± 10 , en van de mannelijke 35 ± 11 jaar. Bij de bewerking van erythropoiese en nierfunctie met behulp van correlatierekening werd geen

onderscheid gemaakt tussen mannelijke en vrouwelijke patiënten. Wel werd voor elke gehanteerde variabele nagegaan of er een significant verschil tussen de twee groepen bestond.

De patiënten werden gerangschikt naar volgorde van transplantatie; bij de 25ste getransplanteerde patient werd het onderzoek afgesloten. In de Appendix van dit proefschrift zijn de patiënten met een nummer aangeduid en enkele elementaire gegevens opgenomen die wij van belang achtten voor het onderzoek. De patiënten zijn in deze tabel onderscheiden naar het uiteindelijk bereikte hemoglobinegehalte, te weten anemisch (a), normaal (n) of polycythemisch (p). Twee patiënten ondergingen nefrectomie van het transplantaat, patient nr. 5 wegens het optreden van een nefrotisch syndroom, patient 16 wegens thrombusvorming in de a.renalis van het transplantaat. Eén patient overleed, en bij één patient konden wij niet over de gegevens van de klinische periode beschikken. Bij twee patiënten werden geen erythropoetinebepalingen verricht.

Verwerking van de gegevens betreffende de erythropoiese

De verwerking van de gegevens kan het best worden toegelicht aan de hand van figuur 33. In deze figuur zijn het gelijktijdig optreden van de karakteristieke veranderingen na transplantatie bij parameters voor erythropoiese en exocriene nierfunctie schematisch aangegeven. De grafieken zijn gebaseerd op de gegevens van patient nr. 9, bij wie het verloop van de parameters voor de nierfunctie niet wordt beïnvloed door dialyses. Het verloop van het reticulocytenpromillage kan worden gekarakteriseerd als fluctuerend met een duidelijke maximale waarde. De fluctuaties zijn in het bijzonder duidelijk tussen de 15de en 30ste dag na transplantatie. Een soortgelijk beeld werd bij alle patiënten aangetroffen. Mogelijk berust het fluctuerend karakter van de voorbijgaande reticulocytose op de in het eerste hoofdstuk kort genoemde, aan het feedback-systeem van de regulatie van de erythropoiese inherente oscillaties (Morley, 1970). In het zesde hoofdstuk wordt aan gevonden fluctuaties van de reticulocytenproductie bij deze patiënten een korte bespreking gewijd.

Als het reticulocytenpromillage wordt gehanteerd als maat voor de erythroïde productie is het noodzakelijk het te corrigeren voor het aantal circulerende erythrocyten. De eenvoudigste correctie is vermenigvuldiging van het reticulocytenpromillage (ret) met de hematocriet (ht)

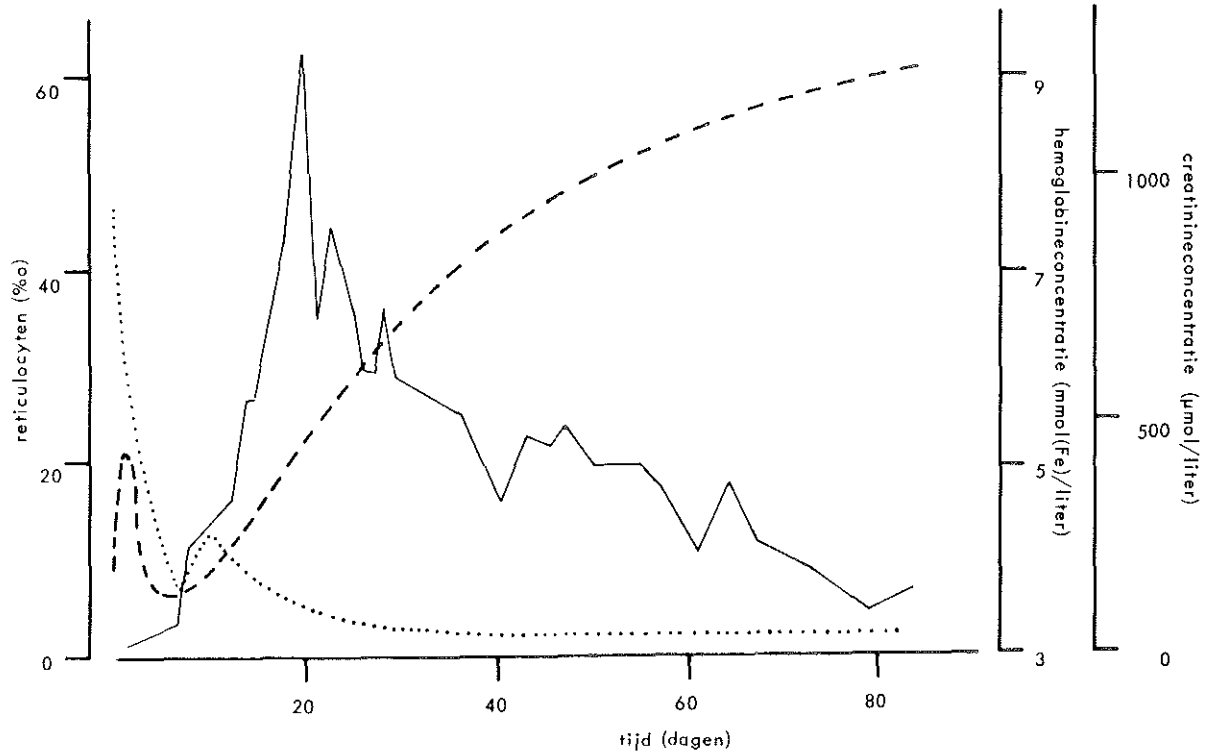


Fig. 33. Verloop van erythropoiese- en nierfunctieparameters als functie van de tijd na transplantatie. Transplantatie vond plaats op tijdstip 0.

Verklaring der symbolen:

—: reticulocytenpromillage

- - -: hemoglobineconcentratie

.....: creatinineconcentratie van het serum.

De gegevens waarop deze figuur is gebaseerd zijn afkomstig van patient nr 9, bij wie na transplantatie geen dialyses plaatsvonden

volgens Hillman en Finch (1969):

$$\text{ret}_{ht} = \frac{\text{ret} \cdot ht}{45},$$

waarmee een benaderende maat voor het totaal geproduceerde aantal reticulocyten wordt verkregen (ret_{ht}) op basis van de aanname van een constant bloedvolume en een constante rijpingstijd van de reticulocyten.

Bij een toegenomen erythropoïese treden veranderingen op in het rijpingspatroon van differentiërende erythroïde elementen in het beenmerg (Lajtha en Suit, 1965; Finch en Coleman, 1955; Reif et al., 1958; Ganzoni et al., 1969; Tarbutt, 1969; Hanna et al., 1969). Deze leiden tot een verkorting van het verblijf van deze cellen in het beenmerg, en een hiermee evenredige verlenging van de rijpingstijd van de reticulocyt. De gevolgtrekking van een toename van de rijpingstijd van de reticulocyten bij een toename van de erythropoïese maakt voor vergelijking van de erythropoïese bij verschillende patienten aan de hand van het reticulocytengetal een correctie voor verschillen in rijpingstijd gewenst. Een benadering voor verschillen in rijpingstijd kan worden gegeven uit het morfologisch beeld van de reticulocyten (Hillman en Finch, 1969). Een alternatieve methode is berekening van de tijdsduur van differentiërende erythroïde elementen als M.T.T. (Marrow Transit Time) uit ferrokinetische metingen (Finch et al., 1970; Rhyner en Ganzoni, 1972), waaraan de reticulocytrijpingstijd omgekeerd evenredig is. Wij hebben geen van beide methoden toegepast. Uit figuur 32 is duidelijk, dat de reticulocytose niet verloopt als een eenvoudige functie van de tijd, en dan ook moeilijk als zodanig met een getal gekarakteriseerd kan worden. Het verloop van de reticulocytose werd dan ook vastgelegd door een tweetal variabelen, te weten het grootste reticulocytenpromillage Ret_{ht} , dat na transplantatie werd gemeten, en het tijdsverloop na transplantatie t_{Ret} , voordat Ret_{ht} werd bereikt. Het product van beide variabelen werd beschouwd als een benaderende maat voor het totale aantal reticulocyten, dat gedurende het tijdsverloop t_{Ret} werd geproduceerd.

De hemoglobineconcentratie (zie figuur 33) vertoont een aanvankelijke daling, gevolgd door een niet-lineaire stijging tot het bereiken van een waarde die als normaal kan worden beschouwd (voor vrouwelijke patienten 7,1 - 10,2; voor mannelijke 8,4 - 11,2 mmol(Fe)/liter). Een dergelijk beeld werd bij alle patienten gevonden, die na verloop van tijd een normaal hemoglobinegehalte bereikten. De stijging van het hemoglobinegehalte als functie van de tijd werd benaderd met een rechte lijn; dit wordt in de volgende paragraaf toegelicht. Voor elk van de patienten werd de regressielijn berekend van de hemoglobinstijging tussen het laagste hemoglobinegehalte na transplantatie, en het eerst bereikte normale, waarvoor waarden werden gehanteerd die 5% boven de ondergrens van de genoemde normale waarden liggen. Uit de regressie-

lijn werd de gemiddelde hemoglobinstijging per dag afgeleid ($\mu\text{mol}(\text{Fe})/\text{liter}/\text{dag}$).

De gegevens van de patienten 13 en 16 werden niet bewerkt, omdat de tijdsduur, waarover de erythropoïese kon worden bestudeerd te kort was voor een volledige beschrijving. Van de resterende 23 patienten bleef 1 patient anemisch, en bereikten vier patienten abnormaal hoge hemoglobineconcentraties. De verdeling tussen mannelijke en vrouwelijke patienten ten aanzien van de bereikte hemoglobineconcentraties is weergegeven in tabel 16. Het verschil tussen mannen en vrouwen is

Tabel 16. Uiteindelijk bereikte hemoglobineconcentraties van de patienten

hemoglobineconcentratie (mmol(Fe)/liter)		aantal patienten	percentage
mannelijke patienten	vrouwelijke patienten		
< 7,0	-	1	4
8,4 - 11,2	7,1 - 10,2	17	68
-	> 11,0	4	16

niet significant, in overeenstemming met literatuurgegevens (Thorling, 1972). De gegevens van de groep patienten, die een normale hemoglobineconcentratie bereikte werd bewerkt met behulp van correlatierekening. Patient nr. 18 moest noodgedwongen buiten beschouwing worden gelaten, omdat de beschikbare gegevens ontoereikend waren voor een karakterisering van de reticulocytose. De vijf patienten met afwijkende hemoglobineconcentraties worden individueel besproken. Onze gedachtengang is, dat bij deze patienten een abnormale erythropoïese bestaat, die, indien de gegevens van deze patienten bij de overige zouden zijn gevoegd, aanleiding zou zijn tot een bemoeilijkte interpretatie van de correlatierekening en mogelijk tot foutieve conclusies zou leiden.

Karakterisering van de erythropoïese als functie van de tijd na transplantatie

Appendix, tabel 2 geeft de individuele waarden voor de drie parameters, aan de hand waarvan de erythropoïese werd beoordeeld, gevoegd bij de waarden voor het hemoglobinegehalte gedurende de eerste dagen na transplantatie en voor het laagste hemoglobinegehalte dat na transplantatie werd bereikt ($\text{Hb}_{1\alpha}$). Het verschil tussen mannelijke en vrouwelijke patienten is voor geen van de variabelen significant.

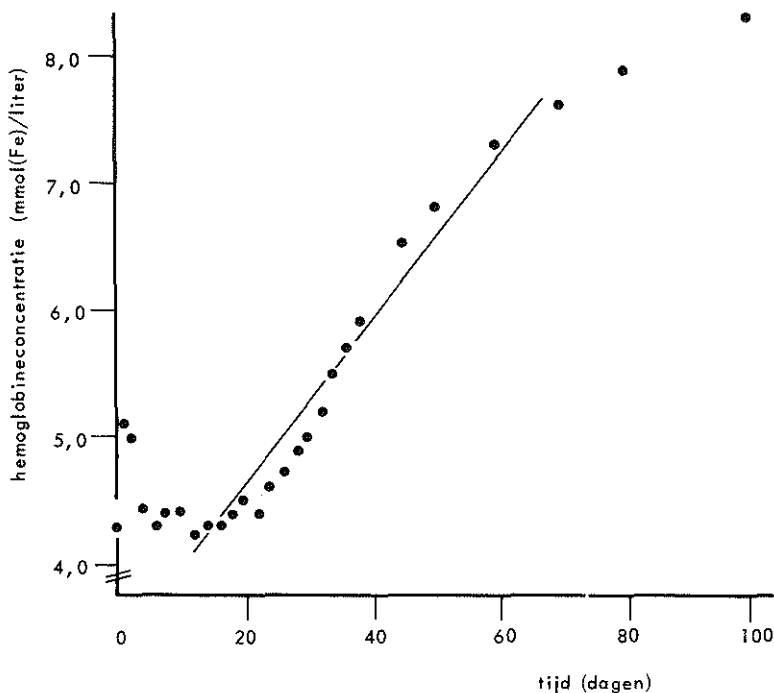


Fig. 34. Het verloop van de gemiddelde hemoglobineconcentratie als functie van de tijd. De lineaire regressielijn is als een onderbroken lijnstuk aangegeven.

In figuur 34 is het verloop van het gemiddelde hemoglobinegehalte voor de 17 patienten weergegeven als functie van de tijd na transplantatie. Het is in principe gelijk aan het verloop, zoals gegeven in figuur 33. Opvallend is de aanvankelijke snelle stijging, gevolgd door een daling, die rond de twaalfde dag na transplantatie leidt tot een minimaal hemoglobinegehalte. Na deze laagste waarde treedt een stijging op die een sigmoïdaal verloop heeft. Teneinde onnodige complicaties bij de correlatierekening te voorkomen, werd deze hemoglobinstijging bij alle patienten benaderd met een rechte lijn, zoals in de figuur geschetst. Gezien de correlatiecoëfficiënt ($r = 0,97$) voldoet de benadering goed. Uit de figuur is afleesbaar, dat de hemoglobinstijging het grootst is rond het tijdstip, dat het hoogste reticulocytenpromillage werd gemeten.

De relatie tussen erythropoïese en hemoglobineconcentratie

Vervolgens werden de correlatiecoëfficiënten berekend tussen de drie parameters voor de erythropoïese. Significant positieve correlaties

werden gevonden te bestaan tussen de hemoglobine­stijging en Ret_{ht} ($r = + 0,63$; $p < 0,01$) en tussen Ret_{ht} en t_{Ret} ($r = + 0,59$; $p < 0,02$). Een negatieve partiële correlatie werd gevonden tussen de hemoglobine­stijging en t_{Ret} ($r_{part} = - 0,70$; $p < 0,005$). Wanneer de hemoglobine­stijging wordt beschouwd als afhankelijk van de reticulocytose, dan is de variatie van de hemoglobine­stijging voor bijna 70% verklaard uit de variatie van de beide parameters die voor de reticulocytose werden ge­hanteerd ($R = 0,83$; $p < 0,001$). Hierbij is er voorlopig van uitgegaan dat het verband tussen hemoglobine­stijging en reticulocytose lineair is. Als tweede stap werden de drie parameters voor de erythropoïese in ver­band gebracht met de hemoglobineconcentraties op verschillende tijd­stippen na transplantatie, korter gezegd met Hb_n ($0 < n < 130$), n in da­gen. De correlatiecoëfficiënt als functie van de tijd is per parameter weergegeven in figuur 35. Significante negatieve correlaties werden voor iedere parameter aangetroffen met het initiële hemoglobinegehalte, d. i. het hemoglobinegehalte gedurende de eerste 48 uur na transplanta­tie, waarvoor wij hierna het Hb_1 hanteren. Hb_{38-110} is significant posi­tief gecorreleerd met de hemoglobine­stijging. Eenzelfde verloop werd aangetroffen voor Ret_{ht} , zij het met zwakkere correlaties. Op basis van de bevindingen kan worden verwacht, dat op enig moment na de 38ste dag na transplantatie een negatieve correlatie kan worden aange­toond te bestaan tussen Hb_n en Hb_1 . Het verloop van deze correlatie als functie van de tijd is weergegeven in figuur 36. De omslag van posi­tieve naar negatieve correlaties is duidelijk; de negatieve correlaties zijn echter op geen enkel tijdstip significant. Hiervoor bestaan moge­lijk twee redenen. Aangezien als vaststaand aangenomen mag worden dat Hb_n de resultante is van erythrocytenproductie, erythrocytenafbraak en bloedvolume, kan verwaarlozing van de afbraak bij aanname van een constant bloedvolume hier mogelijk van invloed zijn. In de tweede plaats is het mogelijk dat de relatie tussen Hb_n en Hb_1 niet lineair is. Voorts werden de correlatiecoëfficiënten berekend met Hb_n als afhanke­lijke, en de hemoglobine­stijging en Hb_1 als onafhankelijke variabelen, teneinde na te gaan of het initiële hemoglobinegehalte ook afgezien van de relaties ermee met de drie erythropoïese­parameters invloed heeft op Hb_n . Vanaf de 28ste dag na transplantatie verloopt deze meervoudi­ge correlatiecoëfficiënt echter identiek aan de correlatie tussen Hb_n en de hemoglobine­stijging, terwijl de correlaties voorafgaand aan dit tijd­stip niet significant zijn. De variatie van de initiële hemoglobinecon­centratie wordt reeds tussen de 20ste en de 30ste dag na transplantatie volledig gecompenseerd door de hemoglobine­stijging. Uit figuur 35 kon reeds worden afgeleid, dat relatief lage initiële hemoglobineconcentra­ties na verloop van tijd leiden tot relatief hoge hemoglobineconcentra­ties. Ten opzichte van het initiële hemoglobinegehalte bestaat er een

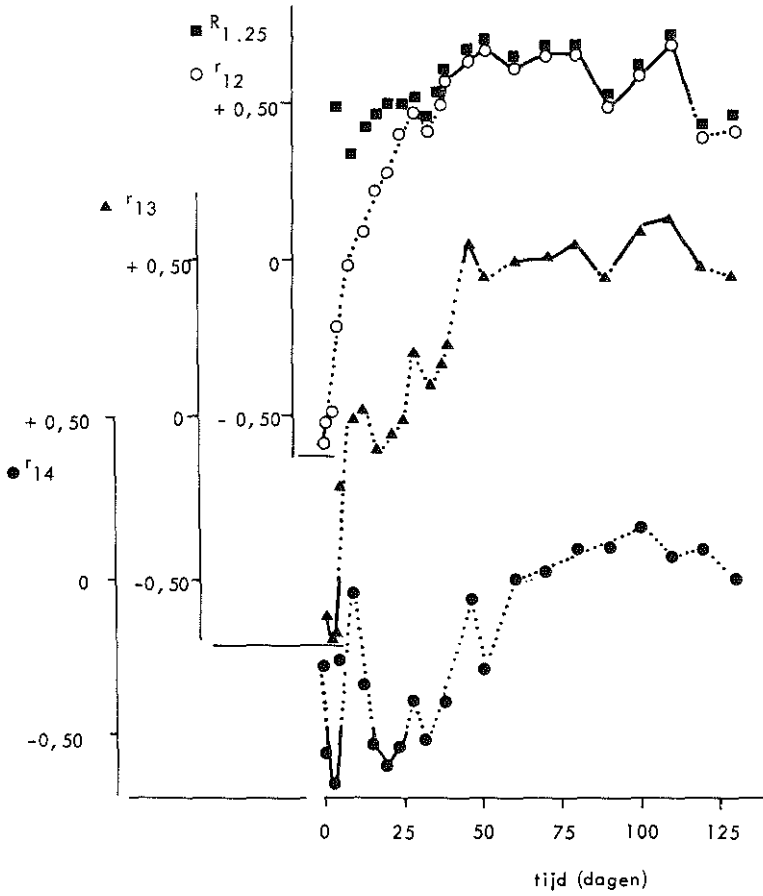


Fig. 35. Het verloop van de correlatiecoëfficiënten van Hb_n (d.i. de hemoglobineconcentratie op het tijdstip n na transplantatie, n in dagen) met de drie parameters voor de erythropoiese als functie van de tijd na transplantatie. Verklaring van de notatie: 1 = Hb_n ; 2 = Hb-stijging; 3 = Ret_{ht} ; 4 = tr_{et} ; 5 = Hb_1 . Niet significante ($p < 0,05$) delen van het verloop zijn aangegeven met onderbroken lijnstukken.

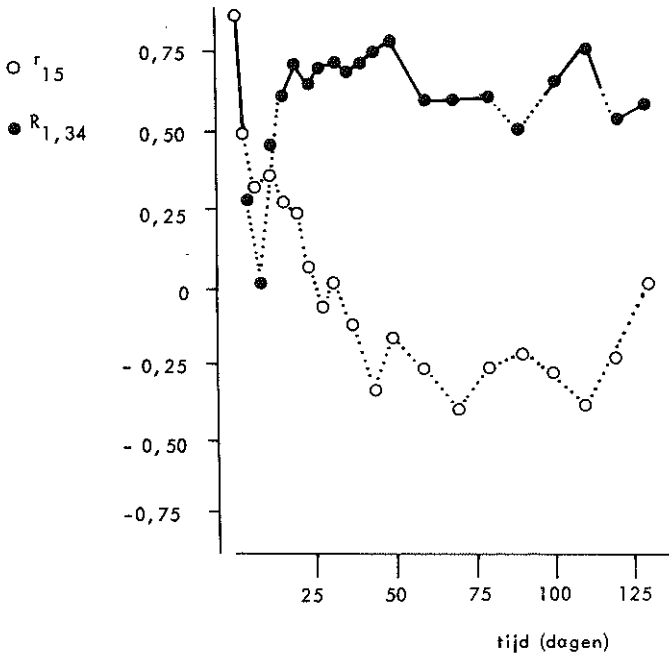


Fig. 36. Het verloop van de correlatiecoëfficiënt (r_{15}) tussen Hb_n en Hb_1 en het verloop van de meervoudige correlatiecoëfficiënt ($R_{1,34}$) tussen Hb_n als afhankelijke, en Ret_{ht} en t_{Ret} als onafhankelijke variabelen, als functies van de tijd na transplantatie.

overcompenserende hemoglobinstijging. Het effect van dit mechanisme wordt geïllustreerd aan de hand van de variatiecoëfficiënt van Hb_n , die als functie van de tijd een monotoon dalende curve oplevert tot een voor een normaal hemoglobinegehalte normale variatie is bereikt (zie figuur 37). Het aangetoonde verband tussen hemoglobinstijging en reticulocytose doet verwachten, dat Hb_n ook in ruime mate van Ret_{ht} en t_{Ret} zal afhangen. Het aantonen hiervan klemt des te meer, omdat de hemoglobinstijging uit Hb_n is berekend, en de relatie tussen Hb_n en de hemoglobinstijging betekenisloos zou kunnen zijn. Het verloop van de correlatiecoëfficiënt met Hb_n als afhankelijke, en Ret_{ht} en t_{Ret} als onafhankelijke variabelen is weergegeven in figuur 36. De correlatie is significant van de 16de tot de 115de dag na transplantatie, echter met uitzondering van de 90ste dag. Wij veronderstellen, dat deze uitzondering samenhangt met de afbraak van de eerste cohort na transplantatie gevormde erythro-

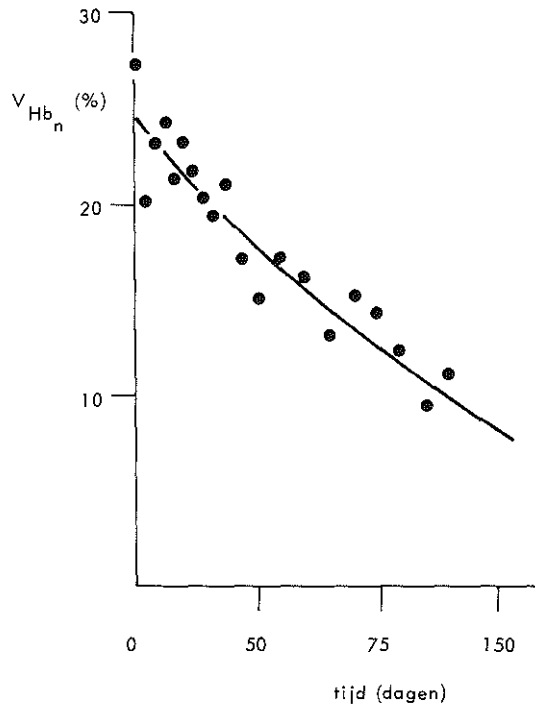


Fig. 37. De variatiecoëfficiënt van Hb_n (V_{Hb_n}) als functie van de tijd na transplantatie.

cyten.

Op basis van het model uit hoofdstuk I, blz. 18 en de bevindingen, beschreven in het derde hoofdstuk, kan niet worden verwacht dat de erythropoïese te beschrijven is als een stelsel van lineaire vergelijkingen. Aangezien de dosis-respons-relatie voor erythropoïetine (zie hoofdstuk III), zoals talloze biologische betrekkingen, in essentie een hyperbool is, hebben wij een aantal van de door ons onderzochte relaties getransformeerd tot hyperbole functies.

In figuur 38 is op deze wijze de relatie tussen Hb_1 en Ret_{ht} weergegeven, waarbij een benadering door het normale reticulocytenaantal gearceerd is aangeduid. In figuur 38 is het product $1/2 \cdot Ret_{ht} \cdot t_{Ret}$, door ons gehanteerd als benadering voor het totaal aantal geproduceerde reticulocyten, weergegeven als een reciproke functie van Hb_1 , terwijl ook hier een maat voor de normale reticulocytenproductie in een vergelijkbaar tijdsverloop gearceerd is aangegeven. Op grond van deze figuur kan worden vastgesteld, dat de reticulocytenproductie niet alleen in correlatief verband staat met Hb_1 , maar er ook in kwantitatieve zin nauwkeurig mee overeenstemt: bij een hemoglobineconcentratie van

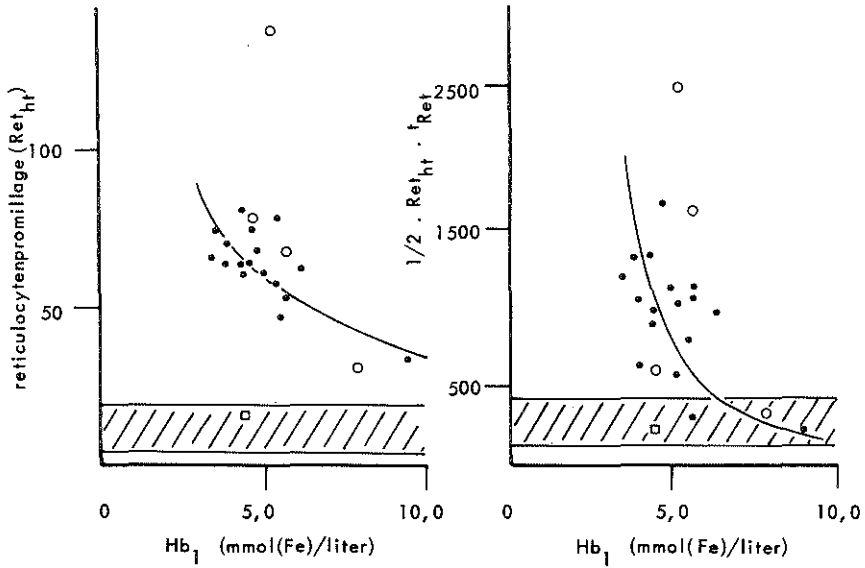


Fig. 38. Links: het verband tussen het hoogste reticulocytenpromillage Ret_{ht} en het initiële hemoglobinegehalte Hb_1 .
 Rechts: het verband tussen het product $1/2 \cdot Ret_{ht} \cdot t_{Ret}$ en het initiële hemoglobinegehalte Hb_1 .
 ● "normale" patiënten
 □ patiënten die verhoogde hemoglobineconcentraties bereikten
 □ patiënt die anemisch bleef.
 Voor de berekening van de regressielijnen werden de patiënten met afwijkende hemoglobineconcentraties uitgesloten.

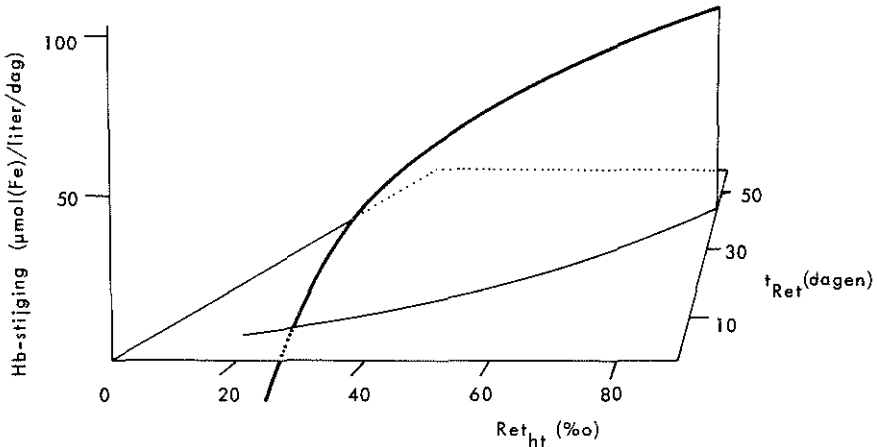


Fig. 39. Voorstelling van het verband tussen de hemoglobine-stijging en de reticulocytoparameters Ret_{ht} en t_{Ret} . De curve voldoet aan de vergelijking:

$$Hb\text{-stijging} = 155 - \frac{8267}{Ret_{ht}} + \frac{1531}{t_{Ret}} \quad (R = 0,89; p < 0,0005).$$

7,5 tot 8,0 mmol(Fe)/liter wordt volgens de regressievergelijking het gemiddelde van de normale reticulocytenproductie bereikt. De beide curven van figuur 38 verklaren 65% van de variatie van Ret_{ht} , zodat wij meenden, dat deze variabelen mogelijk nog door andere factoren beïnvloed worden. De variabelen die hierop werden onderzocht waren het laagste na transplantatie gemeten hemoglobinegehalte $Hb_{1\alpha}$, de gemiddelde daling van het hemoglobinegehalte per dag in de initiële periode na transplantatie, en de immunosuppressieve therapie. De gemiddelde Hb-daling per dag werd uitgedrukt in $\mu\text{mol(Fe)/liter/dag}$ t.o.v. Hb_0 en berekent uit de lineaire regressielijn van Hb_0 tot $Hb_{1\alpha}$. De immunosuppressieve therapie werd uitgedrukt als totale doses actinomycine c, azathioprine, prednison en hydrocortison gedurende de eerste dertig dagen na transplantatie. Het argument om de doses over 30 dagen te berekenen was, dat omstreeks de 30ste dag het hoogste reticulocytenpromillage werd gemeten ($t_{Ret} = 29$). In tabel 17 zijn de nulde-orde correlatie-

Tabel 17

	AFHANKELIJKE VARIABELEN			
	Ret_{ht}	$1/Ret_{ht}$	t_{Ret}	$1/t_{Ret}$
ONAFHANKELIJKE VARIABELEN				
Hb_1	- 0,70*	+ 0,81*	- 0,57*	+ 0,67*
$Hb_{1\alpha}$	- 0,43	+ 0,50*	- 0,32	+ 0,38
Hb-daling	+ 0,15	- 0,09	+ 0,18	- 0,07
actinomycine c	- 0,21	+ 0,16	- 0,11	+ 0,10
azathioprine	- 0,04	+ 0,06	- 0,62*	+ 0,45
prednison	- 0,05	0,00	- 0,14	- 0,04
hydrocortison	- 0,09	+ 0,10	- 0,35	+ 0,07
Ret_{ht}	--	--	+ 0,59*	- 0,71*
t_{Ret}	+ 0,59*	- 0,63*	--	--
$1/Ret_{ht}$	--	--	- 0,63*	+ 0,79*
$1/t_{Ret}$	- 0,71*		--	--

* $p < 0,05$

coëfficiënten opgesomd, met de beide parameters voor de reticulocytose als afhankelijke, en Hb_1 , $Hb_{1\alpha}$, de Hb-daling en de dosis immunosuppressiva als onafhankelijke variabelen.

$1/\text{Ret}_{\text{ht}}$ is positief gecorreleerd ($p < 0,05$) met de laagste Hb-concentratie die na transplantatie werd bereikt, en t_{Ret} is negatief gecorreleerd ($p < 0,01$) met de toegediende doses azathioprine. De berekening, die wij hier niet geven, van alle partiële en meervoudige correlatiecoëfficiënten van de 9 in tabel 17 genoemde variabelen, toonde aan dat de correlatie van $1/\text{Ret}_{\text{ht}}$ met Hb_1 wordt veroorzaakt door de correlatie van Hb_1 en Hb_2 ($r = + 0,60$; $p < 0,02$) en derhalve irrelevant is. Voorts werd erbij waargenomen dat de initiële daling van de hemoglobineconcentratie ook significant met $1/\text{Ret}_{\text{ht}}$ is gecorreleerd ($p < 0,05$). De correlatie tussen t_{Ret} en Hb_1 berust op de correlatie tussen Ret_{ht} en Hb_1 . Deze laatste bijzonderheden zijn uit tabel 18 af te lezen.

Tabel 18 Correlatiecoëfficiënten tussen reticulocytose parameters en hemoglobineconcentraties

parameters	nulde-orde	partiële	meervoudige
1. $1/\text{Ret}_{\text{ht}}$	$r_{12} = + 0,81$	$r_{12,3} = + 0,86$	$R_{1,23} = 0,86$
2. Hb_1	$r_{13} = - 0,09$	$r_{13,2} = - 0,50$	
3. Hb-daling	$r_{23} = + 0,23$		
4. $1/t_{\text{Ret}}$	$r_{14} = + 0,79$ $r_{24} = + 0,67$	$r_{24,1} = + 0,08$	

Ret_{ht} en t_{Ret} lijken op grond van de tot nu toe uitgevoerde berekeningen nauw verwant te zijn. Het is niet duidelijk welke van beide moet worden beschouwd als de afhankelijke variabele, al pleiten de gegevens ervoor t_{Ret} als mede afhankelijk van Ret_{ht} te beschouwen. Het verband werd benaderd met een hyperbool. Het verband tussen de stijging van de hemoglobineconcentratie en Ret_{ht} en t_{Ret} is in figuur 39 als driedimensionale functie gegeven. De functie verklaart 80% van de variatie van de Hb-stijging ($R = 0,89$; $p < 0,0005$) uit de reticulocytose. Uit de gevonden regressievergelijking is af te leiden, dat een Hb-daling zou optreden bij $\text{Ret}_{\text{ht}} < 24$ o/oo.

Samenvattend blijkt uit de berekeningen dat de reticulocytose in belangrijke mate wordt bepaald door het initiële hemoglobinegehalte na transplantatie, en zijdelings ook door de aanvankelijke daling van de hemoglobineconcentratie. De stijging van de hemoglobineconcentratie is nagenoeg volkomen terug te brengen tot de grootte van de optredende reticulocytose.

Het verband tussen het tijdsverloop waarna de reticulocytose een maximum bereikt en de dosis azathioprine is betekenisloos. De dosis azathioprine wordt verhoogd bij verbetering van de nierfunctie. In de volgende paragraaf wordt het verband tussen t_{Ret} en deze verbetering besproken.

De relatie tussen reticulocytose en uremie

Op grond van het overzichtsartikel van Erslev (1970) veronderstelden wij, dat de uremie* de erythropoïese mede zou beïnvloeden. Het feit dat Ret_{ht} vrijwel volledig uit Hb_1 en de Hb-daling kan worden verklaard, leidde ertoe dat onze aandacht op t_{Ret} werd gericht. Aangezien de reticulocytose in t_{Ret} is gekarakteriseerd door een tijdsverloop, meenden wij het verloop van de uremie, uitgedrukt in ureum- en creatinineconcentratie van het perifere bloed, eveneens als een tijdsverloop te moeten uitdrukken, derhalve als $t_c(cr) < x$ en $t_c(ur) < y$, waarin t het tijdsverloop na transplantatie is, $c(cr)$ en $c(ur)$ creatinine- en ureumconcentratie voorstellen, en x en y de erbij behorende bepaalde waarden. Het op deze wijze verkregen gemiddelde tijdsverloop als functie van de concentraties is afgebeeld in figuur 40. Opmerkelijk is de discongruentie in de beide verlopen: hoewel de creatinineconcentratie bij elke patient na verloop van tijd normaal ($< 140 \mu\text{mol/liter}$) wordt, is dit niet het geval voor de ureumconcentratie.

De verschillende gevonden tijdsverlopen werden per creatinine-respectievelijk ureumconcentratie gecorreleerd met t_{Ret} . Dit is weergegeven in figuur 41. Aangezien reeds een verband tussen Ret_{ht} en t_{Ret} werd vastgesteld, werd bovendien de meervoudige correlatiecoëfficiënt met t_{Ret} als afhankelijke, en Ret_{ht} en de gevonden tijdsverlopen als onafhankelijke variabelen berekend en uitgezet. De hoogste significante correlatiecoëfficiënten werden gevonden voor de tijdsverlopen $t_c(cr) < 500$ en $t_c(ur) < 40$. Deze tijdsverlopen bedragen respectievelijk 12 ± 7 en 11 ± 7 dagen. Dit verschil is niet significant. Bij de hierna volgende berekeningen wordt soms het gemiddelde van beide tijdsverlopen gehanteerd, aangeduid als $t_c(cr) < 500 / c(ur) < 40$. De relaties van t_{Ret} met Ret_{ht} en $t_c(cr) < 500 / c(ur) < 40$ zijn gegeven in de figuren 42 en 43 en in tabel 19.

Wij concludeerden uit deze gegevens dat de reticulocytose aan een vertraging onderhevig is die samenhangt met de snelheid waarmee de uremie na transplantatie vermindert.

Tabel 19 Correlaties tussen t_{Ret} als afhankelijke, en Ret_{ht} en $t_c(cr) < 500 / c(ur) < 40$ als onafhankelijke variabelen

parameters	nulde orde	partieel	meervoudig
1. t_{Ret}	$r_{12} = + 0,59$	$r_{12,3} = + 0,72$	$R_{1,23} = 0,83$
2. Ret_{ht}	$r_{13} = + 0,59$	$r_{13,2} = + 0,72$	
3. $t_c(cr) < 500 / c(ur) < 40$			

* te definiëren als renale toxemie, gepaard gaande met onder meer sterk verhoogde creatinine- en ureumconcentraties van het perifere bloed

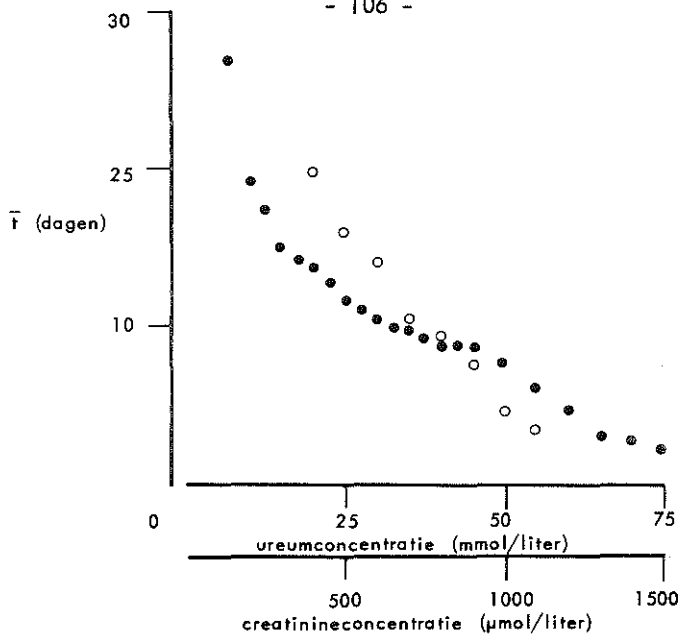


Fig. 40. Het tijdsverloop waarna een bepaalde creatinine- (●) of ureumconcentratie (○) wordt bereikt als functie van creatinine- en ureumconcentratie resp.

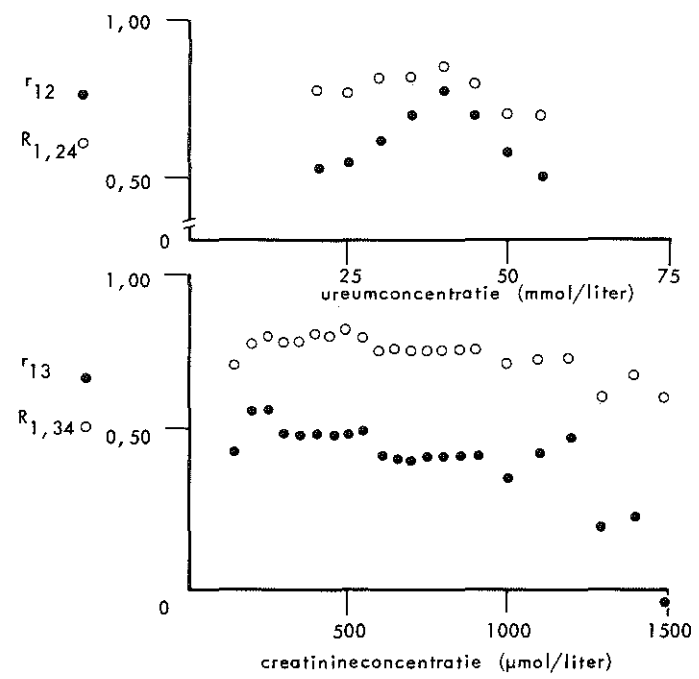


Fig. 41. De correlatiecoëfficiënt tussen het tijdsverloop t_{Ret} en de tijdsverlopen $t_{c(ur)<p}$ en $t_{c(ur)<q}$ als functie van de ureum- resp. creatinineconcentratie.
 Verklaring der notatie: 1 = t_{Ret} ; 2 = $t_{c(ur)<p}$; 3 = $t_{c(cr)<q}$; 4 = Ret_{ht}

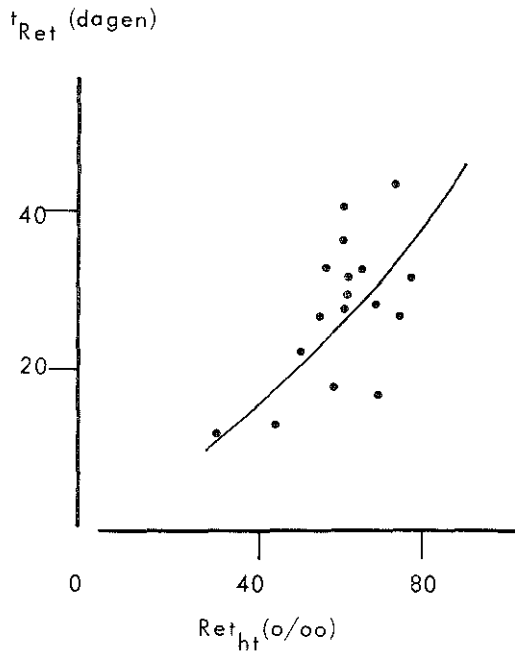


Fig. 42. Het tijdsverloop t_{Ret} als functie van het hoogste reticulocytenpromillage Ret_{ht} .

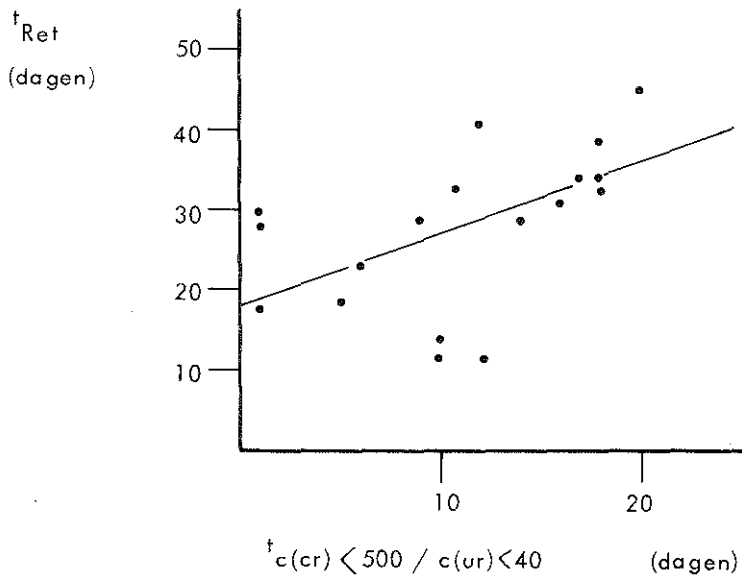


Fig. 43. Het verband tussen t_{Ret} en $t_{c(cr < 500)} / c(ur < 40)$. Voor verklaring der symbolen: zie tekst.

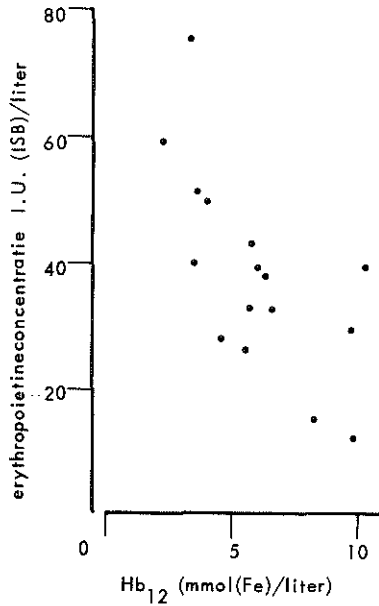


Fig. 44. Strooidiagram van het verband tussen de erythropoietine-activiteit van het plasma en de hemoglobineconcentratie rond dag 12 na transplantatie.

De erythropoietineconcentraties van het serum

Erythropoietinebepalingen op serum en urine werden verricht rond de twaalfde en de negenentwintigste dag na transplantatie. De gevonden waarden zijn vermeld in tabel 20. Op de twaalfde dag werden erythropoietineconcentraties gevonden van gemiddeld 38 ± 16 I.U. (ISB)/liter, op de negenentwintigste dag van 60 ± 23 I.U. (ISB)/liter. Het verschil is significant ($p < 0,05$). Tussen beide reeksen metingen bestaat een negatieve correlatie ($r = -0,53$; $p = 0,05$). Op dezelfde tijdstippen werden hemoglobineconcentraties waargenomen van respectievelijk $4,4 \pm 1,0$ en $5,2 \pm 0,9$ mmol(Fe)/liter. Ook het verschil tussen deze getallen is significant. Kennelijk gaat de stijging van de erythropoietineconcentratie gepaard met een stijging van de hemoglobineconcentratie. De erythropoietineconcentraties gemeten rond de twaalfde dag na transplantatie konden in direct verband met de hemoglobineconcentraties op hetzelfde tijdstip worden gebracht ($r = -0,67$; $p < 0,01$), zoals

Tabel 20

patient nr.	serum		urine	
	EP ₁₂ I.U. (ISB)/liter	EP ₂₉	EP ₁₂ I.U. (ISB)/24 uur	EP ₂₉
2	59	60	10	13
3	12	86	--*	25
4	15	68	3	17
5	50	46	8	6
6	75	26	34	16
7	33	92	13	33
9	28	47	11	17
10	39	21	12	3
11	--*	--*	--*	--*
12	51	76	6	23
14	33	56	9	13
19	26	96	4	17
21	29	80	17	26
22	43	28	15	6
23	38	63	8	20
24	40	72	5	8
25	39	47	10	13
gemiddeld + S.D.	38 ± 16	60 ± 23	11 ± 7	16 ± 8

* niet verricht

in figuur 44 vastgelegd. Dit is niet het geval voor de erythropoëtineconcentraties gemeten omstreeks de negenentwintigste dag na transplantatie. De erythropoëtineconcentraties waargenomen op de negenentwintigste dag na transplantatie waren in een eenvoudig verband ($r = + 0,58$; $p < 0,02$) te brengen met de reticulocytenpromillages, in principe Ret_{ht} . Dit verband is in figuur 45 weergegeven. Een soortgelijke relatie kon niet voor erythropoëtineconcentraties en reticulocytenpromillages op de twaalfde dag na transplantatie vastgesteld worden.

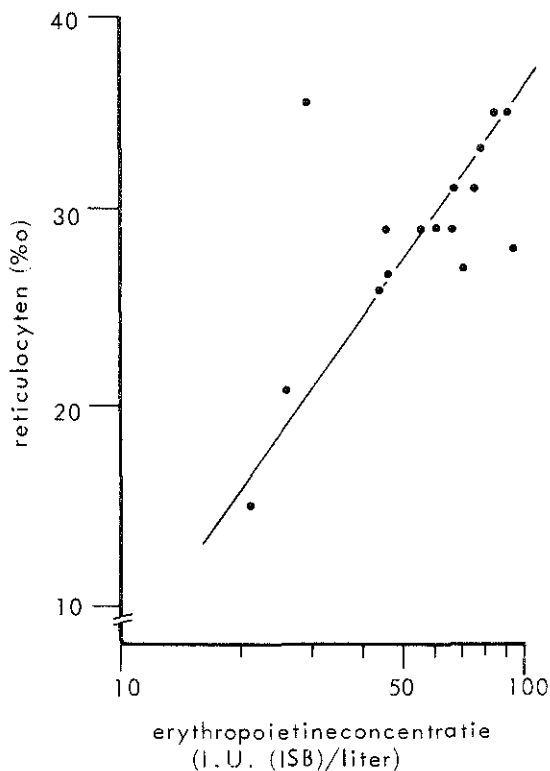


Fig. 45. Het verband tussen erythropoietine-activiteit van het plasma en het reticulocytenpromillage rond dag 30 na transplantatie.

De effectiviteit van de in het serum gemeten erythropoietine-activiteit als functie van de uremie

Deze bevindingen brachten ons ertoe een eenvoudige maat voor de effectiviteit van erythropoietine in te voeren, die wij definieerden als het reticulocytenpromillage per dag per eenheid erythropoietine-activiteit, korter gezegd $ret_{ht}/erythropoietineconcentratie$. Op de twaalfde dag na transplantatie werd een gemiddelde voor deze grootte gevonden van $0,25 \pm 0,19$, en op de negenentwintigste dag van $0,54 \pm 0,24$; het verschil is significant ($p < 0,05$). Een eenvoudige berekening leert dat deze getallen neerkomen op een productie van respectievelijk 6×10^9 en 14×10^9 reticulocyten/l.U. (ISB)/dag (aangenomen bloedvolume 5 liter, 5×10^6 erythrocyten per mm^3). De stijging van de effectiviteit van erythropoietine is des te opmerkelijker, omdat uit de halflogaritmische doses-respons-relatie verwacht kan worden dat bij toenemende erythropoietineconcentratie een afname ervan zal worden waargenomen. De door ons gemeten referentiewaarden voor erythropoietine-activiteit bij hematologisch normale volwassenen geven bijvoorbeeld een bereken-

de erythropoietine-effectiviteit van ongeveer 3 o/oo reticulocyten/l.U. (ISB)/dag (70×10^9 reticulocyten/l.U. (ISB)/dag).

Op grond van de in de vijfde paragraaf gesignaleerde vertraging in het optreden van de reticulocytose, gecorreleerd met het tijdsverloop waarna de creatinineconcentratie een waarde $< 500 \mu\text{mol/liter}$ bereikte, werd de erythropoietine-effectiviteit in verband gebracht met de graad van renale toxemie, uitgedrukt als serum-creatinineconcentratie. Op de negenentwintigste dag na transplantatie, waarop bij de meeste patiënten de nierfunctie als normaal beschouwd kan worden, kon een dergelijk verband niet worden aangetoond. Op de twaalfde dag is het echter significant ($r = -0,79$; $p < 0,0001$). Dit verband is in figuur 46 weergegeven als een hyperbool. Uit de figuur laat zich aflezen dat bij een creatinineconcentratie $< 500 \mu\text{mol/liter}$ de erythropoietine-effectiviteit slechts in geringe mate verandert. Opgemerkt zij dat rond de twaalfde dag de reticulocytenpromillages wel, en de erythropoietine-activiteit niet met de creatinineconcentratie in een significant verband te brengen was. Substitutie van de creatinineconcentratie door de ureumconcentratie geeft een identiek beeld, waarbij bij ureumconcentraties $< 40 \text{ mmol/liter}$ geen noemenswaardige afname van de effectiviteit van erythropoietine meer wordt gevonden.

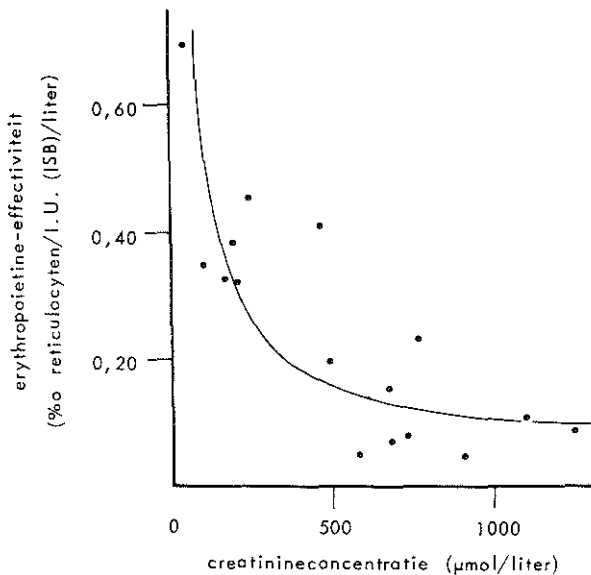


Fig. 46. Het verband tussen de effectiviteit van erythropoietine en de creatinineconcentratie rond dag 12 na transplantatie.

De uitscheiding van erythropoietine-activiteit in de urine

De uitscheiding van erythropoietine-activiteit in de urine was niet in een eenvoudige relatie te brengen met die van creatinine. Evenmin was er een verband aantoonbaar tussen de berekende clearances van erythropoietine en die van creatinine gemeten op hetzelfde tijdstip. De clearances voor erythropoietine bedroegen op de twaalfde dag na transplantatie $0,28 \pm 0,13$ liter/dag, en op de negentwintigste dag $0,26 \pm 0,13$ liter/dag. Dit verschil is niet significant en legt de nadruk op het verschil met de creatinineclearance, die in dezelfde periode gemiddeld een factor 2 - 3 toeneemt; deze toename is significant ($p < 0,05$).

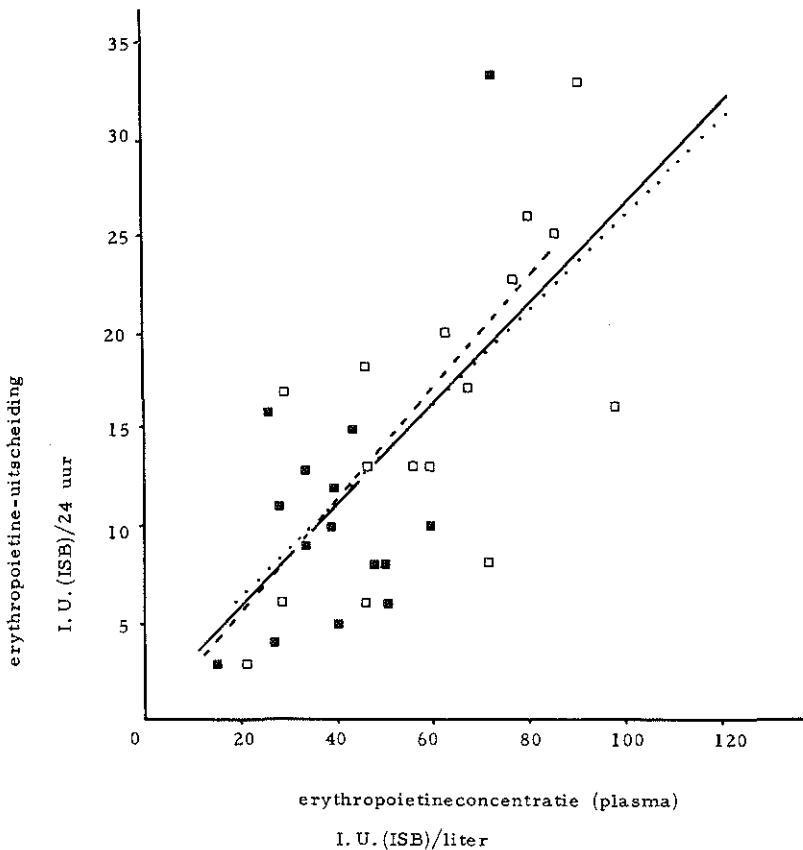


Fig. 47. Het verband tussen de erythropoietineconcentratie van het plasma en de erythropoietine-uitscheiding in de urine rond dag 12 (■) en rond dag 30 (□) na transplantatie.
— regressielijn voor alle meetpunten
- - - regressielijn voor dag 12
..... regressielijn voor dag 30

Tenslotte bleek de totale hoeveelheid erythropoietine die per 24 uur uitgescheiden wordt, opgevat te kunnen worden als een eenvoudige functie van de serumconcentratie van erythropoietine. Dit is weergegeven in figuur 47. In deze figuur is de uitscheiding op de twaalfde dag gescheiden weergegeven van die op de negenentwintigste. Aangezien de beide paren regressielijnen niet significant ($p < 0,10$) verschillen, werd de lineaire regressielijn berekend en aangegeven voor alle meetpunten. Deze regressielijn geeft aan dat per 1.U. (ISB)/liter serum gemiddeld 0,28 1.U. (ISB)/24 uur in de urine wordt uitgescheiden.

Bespreking van de erythropoïese bij patienten die een verhoogd hemoglobinegehalte ontwikkelden

Het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek was gericht op een beschrijving van de fysiologische humorale regulatie van de erythropoïese bij de mens, waarvoor als model de erythropoïese bij patienten met een niertransplantaat was gekozen, en niet op de dysregulatie die bij deze patienten eveneens kan voorkomen. In overeenstemming hiermee was het onderzoek niet ingericht op bestudering van de oorzaak van dysregulatie, en zijn de gegevens t.a.v. deze vraagstelling summier.

Bij de patient (nr. 1), bij wie een anemie bleef bestaan, werden geen erythropoïetinebepalingen verricht. De reticulocytose is niet in overeenstemming met het Hb_1 (4,5 mmol(Fe)/liter; $Ret_{ht} = 15$, $t_{Ret} = 29$). Deze waarden zijn in figuur 38 aangegeven. De nierfunctie was in deze periode niet afwijkend van de bevindingen bij de 17 bestudeerde patienten, bij wie de hemoglobineconcentratie zich binnen normale grenzen handhaafde. Vier patienten (nrs.8, 15, 17, 20) ontwikkelden een verhoogde hemoglobineconcentratie. De gegevens die wij relevant achten zijn in tabel 21 vermeld, en de erythropoïetinemetingen in tabel 22. Een deel ervan is in figuur 38 ingetekend ter vergelijking met de reeds besproken patienten. Bij patient nr. 8 werd reeds in de beginfase na transplantatie een sterk verhoogde erythropoïetineconcentratie aangetoond, die in geen enkele verhouding stond tot de betrekking met het hemoglobinegehalte vermeld op blz. 108 van dit hoofdstuk. De reticulocytose is hiermee in overeenstemming en de conclusie is dat het transplantaat bij deze patient erythropoïetine produceerde in een mate die ver boven de behoefte ligt ("inappropriate erythropoïesis" volgens Thorling, 1972). Bij patient 15 en 17 is dit in de initiële fase na transplantatie niet het geval. Erythropoïetineconcentraties en reticulocytenpromillages zijn bij deze patienten niet afwijkend van de bevindingen bij de 17 in kaart gebrachte patienten. Tijdens de polycythemische fase werd echter een duidelijk verhoogde erythropoïetineconcentratie zowel als een ten opzichte van de hemoglobineconcentratie verhoogde reticulocytenproductie waargenomen. Bij patient nr. 20 tenslotte ontstond een polycythemie zonder een duidelijk verhoogde reticulocytose en zonder dat er sprake is van een t.o.v. de hemoglobineconcentratie buitengewoon hoge erythropoïetineconcentratie, al kan opgemerkt worden dat op dag 28

Tabel 21

patient nr.	Hb ₁ mmol(Fe)/liter	Ret _{ht} o/oo	t _{Ret} dagen	t _{c(cr)<500} dagen	Hb _{pol} mmol(Fe)/liter	ret _{ht_{pol}} (Hb) o/oo	t _{pol} dagen
8	5,4	137	35	10	11,1	31 (10,7)	90 - 120
15	4,7	76	16	13	12,6	18 (10,3)	120 - 200
17	5,8	77	42	13	13,3	95 (11,8)	v.a. 100
20	8,0	30	22	3	12,0	--*	v.a. 80

* niet verricht

Tabel 22

patient nr	erythropoietine-activiteit van het serum (tijdstip) [I U. (ISB)/liter (dagen)]		
	1e meting	2e meting	3e meting (polycythemie)
8	123 (8)	213 (31)	--*
15	71 (10)	42 (16)	22 (196)
17	39 (13)	69 (21)	119 (145)
20	12 (7)	17 (28)	--*

* niet verricht

een erythropoietine-activiteit van 17 I.U. (ISB)/liter werd waargenomen bij een hemoglobineconcentratie van 7,8 mmol(Fe)/liter.

Het verband van de verhoogde hemoglobineconcentratie met afstoting van de nier is dubieus. Met name bij de patienten nr. 8 en nr. 15 lijkt de stijging van de hemoglobineconcentratie te worden voorafgegaan door een fase van (klinische) afstoting van het transplantaat, maar bij de patienten nr. 17 en nr. 20 is een dergelijke relatie niet duidelijk. Ten overvloede zij opgemerkt dat bij vrijwel alle patienten fasen van afstoting worden waargenomen zonder dat dit leidt tot een boven normale grenzen stijgende hemoglobineconcentratie. Samenvattend zij opgemerkt, dat bij 3 van de 4 patienten die een polycythemie ontwikkelden t.o.v. het hemoglobinegehalte een verhoogde erythropoietineproductie en erythropoïese werd vastgesteld.

Discussie

Met dit onderzoek is een poging gedaan een kwantitatieve beschrijving te geven van de humorale regulatie van de erythropoïese bij de mens. Als model werd de erythropoïese bij patienten met een transplantaat van de nier gekozen, in hoofdzaak omdat bij deze patienten de aanvankelijke anemie het gevolg is van de onvoldoende tot ontbrekende erythropoietineproductie, waarmee ernstige nierinsufficiëntie gepaard gaat. In de tweede plaats omdat dezelfde anemie enige garantie biedt voor goed meetbare erythropoietineconcentraties van serum en urine na transplantatie. Hierbij wordt voorondersteld dat de regulatie van de erythropoïese bij anemie niet kwalitatief verschilt van die bij het handhaven van een normale hemoglobineconcentratie.

De erythropoïese werd beschreven aan de hand van eenvoudige parameters, te weten hemoglobineconcentratie, reticulocytenproductie en stijging van de hemoglobineconcentratie. Op grond van het feit dat oorzakelijk verband tussen deze parameters bewezen geacht mag worden, werden correlatiecoëfficiënten berekend en regressie-analyses uitgevoerd om de samenhang te kwantificeren. Onze conclusies uit de gevonden betrekkingen zijn in sommige opzichten verrassend. Zowel voor het verband tussen erythropoietine-activiteit van het serum en de hemoglobineconcentratie, als voor het verband tussen de optredende reticulocytose en de hemoglobineconcentratie blijkt dat de hemoglobineconcentratie vlak na transplantatie van het grootste belang is voor het verloop van de erythropoïese. Verondersteld kan worden dat de erythropoietineproductie slechts gedeeltelijk door de hemoglobineconcentratie bepaald wordt. Het feit dat er een negatieve correlatie bestaat tussen de op de twee tijdstippen gemeten erythropoietineconcentraties doet vermoeden dat de

erythropoietineproductie ook mede door de hoeveelheid circulerend erythropoietine wordt bepaald. In het zesde hoofdstuk hebben wij de theoretische consequenties van een dergelijke product-inhibitie voor de erythropoietineproductie overwogen en meer argumenten aangevoerd. Wij verwijzen hier kortheidshalve naar dit hoofdstuk. Slechts opgemerkt zij, dat er een discrepantie is tussen het in het eerste hoofdstuk genoemde model van Mylrea en Abbrecht (1972) en de experimentele gegevens waarop het berust. Deze bestaat uit het verschijnsel, dat de erythropoietineconcentratie in het model niet en bij de hypoxische proefdieren wel daalt voordat de hemoglobineconcentratie stijgt. Het door ons voorgestelde mechanisme zou dat verklaren. Het effect van de exocriene nierfunctie is beperkt tot een vertraging in het optreden van de reticulocytose, waarvan het mechanisme bleek te berusten op een afname van de effectiviteit van erythropoietine als functie van de graad van renale toxemie, uitgedrukt als creatinine- en ureumconcentratie van het serum. Wij veronderstellen dat de verminderde effectiviteit berust op een vertraagde celcyclus, op basis van de bevindingen van McDermott en medewerkers (1974), die celcyclusparameters bepaalden van darmepitheel bij experimentele acute uremie. Met het aangetoonde verband tussen de effectiviteit van erythropoietine en renale toxemie is aangetoond, dat bij het ontstaan van de anemie bij ernstige nierinsufficiëntie de renale toxemie een rol speelt naast de verminderde erythropoietineproductie.

De getallen die wij voor de uitscheiding van erythropoietine als functie van de serumconcentratie van erythropoietine hebben gevonden stemmen overeen met de waarden die Rosse en Waldmann (1964) bij getransfundeerde anemische patienten waarnamen, en de waarden die Weintraub et al. (1964) vonden na de intraveneuze toediening van een partieel gezuiverd preparaat van schape-erythropoietine bij honden.

Bij drie van de vier patienten die een erythrocytose ontwikkelden (hier gedefinieerd als zowel een verhoogde hemoglobineconcentratie als een verhoogde reticulocytproductie) kon worden aangetoond dat deze berust op een verhoogde erythropoietineproductie. Geen uitspraak kon worden gedaan over de oorzaak van deze "inappropriate erythropoietin production". Bij twee patienten is het verband tussen afstoting van het transplantaat en hemoglobine stijging suggestief, maar niet meer dan dat. Er zij hier nogmaals op gewezen, dat periodes van afstoting frequenter voorkomen dan periodes van polycythemie. Het effect van de immunosuppressiva op de erythropoïese is moeilijk vast te stellen. Van geneesmiddelen zoals actinomycine c en azathioprine is een myelosuppressief effect te verwachten. Wij veronderstellen in het licht van de berekende correlatiecoëfficiënten, dat het effect van de immunosuppressieve therapie op de erythropoïese gering is, of dat de door de immunosuppressiva veroorzaakte variatie in de erythropoïese gering is. In geen van

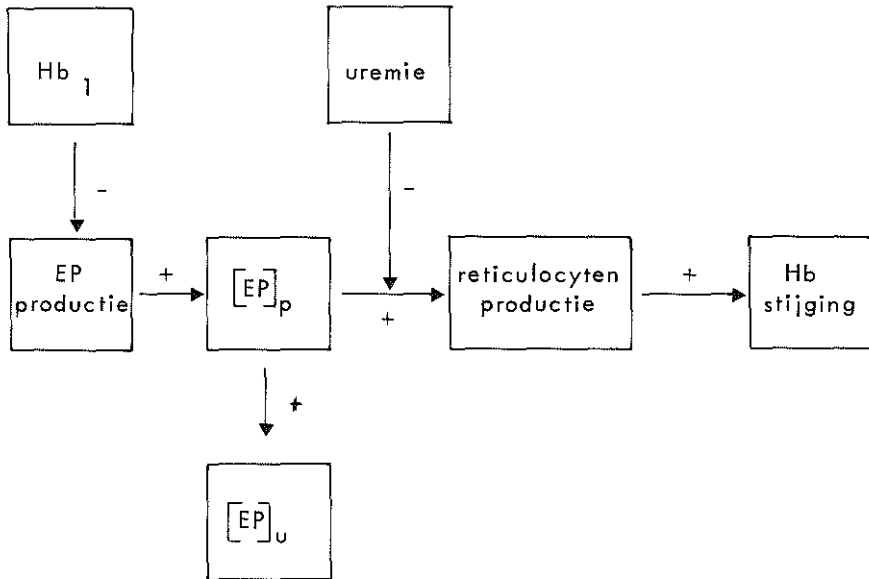


Fig. 48. Schematisch overzicht van de voornaamste conclusies uit het onderzoek over de erythropoïese bij patienten met een transplantaat van de nier.

beide gevallen doet dat afbreuk aan de door ons gevonden relaties. Twee studies met als onderwerp de erythropoïese na niertransplantatie zijn in opzet te vergelijken met dit onderzoek, te weten de studie van Denny en medewerkers (1966) en de studie van Abbrecht en Greene (1966), met respectievelijk reeksen van 10 en 7 patienten. Hun bevindingen, die zij niet in kwantitatieve zin uitwerkten, zijn in overeenstemming met de onze. Onze bevindingen en conclusies zijn in figuur 48 schematisch samengevat.

STUDIES OVER DE ISOLATIE EN ZUIVERING VAN ERYTHROPOIETINE

Inleiding

Van de pogingen erythropoietine te zuiveren, zoals die tot omstreeks 1970 in de literatuur zijn verschenen, werd een uitvoerig overzicht gegeven in het eerste hoofdstuk. Wij beperken ons hier tot de punten, die van belang zijn voor de opzet van onze zuiveringsstudies.

Het uitgangsmateriaal voor de isolatie van erythropoietine kan bestaan uit serum of urine, zowel van menselijke als van dierlijke oorsprong. Menselijk serum met een hoge erythropoietine-activiteit is logischerwijze slechts in beperkte mate beschikbaar - het betreft hier patienten lijdend aan aplastische anemie of "pure red cell aplasia" (PRCA). Zoals in het vierde hoofdstuk beschreven kunnen de erythropoietinegehalten van het serum bij deze patienten oplopen tot waarden rondom 10.000 I.U. (ISB)/liter. De urine van deze patienten is meestal in ruime mate beschikbaar. Hierbij doet zich echter een tweetal problemen voor: de relatief beperkte houdbaarheid van erythropoietine-activiteit in urine, en de "instabiliteit" van uit urine gezuiverd erythropoietine. Beide noemden we reeds in het eerste hoofdstuk. In het tweede en derde hoofdstuk hebben wij onze wijze van urine preserven uiteengezet, en hierop wordt in de volgende paragrafen teruggekomen. Het gebruik van urine heeft, naast de betrekkelijk ruime beschikbaarheid ervan wanneer menselijke urine wordt gebruikt, een voordeel. De hoge erythropoietinegehalten van urine afkomstig van patienten met aplastische anemie of PRCA, of van proefdieren met een kunstmatig geïnduceerde anemie, gevoegd bij het normaal lage eiwitgehalte van de urine, geeft een hogere specifieke erythropoietine-activiteit op eiwitbasis dan het serum van dezelfde patient of hetzelfde proefdier. De specifieke erythropoietine-activiteit van deze urines is in orde van grootte vergelijkbaar met die van het stap-III-erythropoietinepreparaat volgens White et al. (1960) (Graham et al., 1963; Lowy en Keighley, 1966). Op basis van deze gegevens is te verwachten, dat erythropoietine gemakkelijker uit urine dan uit serum geïsoleerd en gezuiverd kan worden.

Het verkrijgen van erythropoietine-rijk serum of urine van dierlijke oorsprong heeft praktische voordelen boven menselijke bronnen, in die zin, dat men een gestandaardiseerde proefopzet kan worden gewerkt, en men niet afhankelijk is van een beperkt patientenaanbod. Hiertegenover

staan het nadeel van de relatief geringe opbrengst, en de noodzaak van het continu handhaven van een proefopstelling. Daardoor zullen zuiveringsstudies van erythropoietine afkomstig van proefdiermateriaal een analytisch karakter moeten dragen, terwijl menselijke urine geschikt zou zijn voor de bereiding van erythropoietinepreparaten op relatief grote schaal.

Bij proefdieren kan een anemie worden geïnduceerd door middel van injecties met een phenylhydrazine-oplossing. Phenylhydrazine veroorzaakt een diepe hemolytische anemie, en zet een klein deel van het hemoglobine om in methemoglobine (Lowy et al., 1959; Kiese, 1965). Bekend is voorts, dat phenylhydrazine een aantal enzymen activeert en andere inhibeert, en reageert met aldehyden en ketonen. Het is mogelijk, dat phenylhydrazine op die wijze metabole verschuivingen teweegbrengt, die, afgezien van de anemie, leiden tot een hoog erythropoietinegehalte (Lowy, 1970). Wij hebben van phenylhydrazine gebruik gemaakt voor het bewerkstelligen van een anemie bij ratten en konijnen. De toedieningsschema's voor deze proefdieren zijn vermeld in hoofdstuk II. Incidenteel maakten wij ook gebruik van verbloeding voor het bereiken van een anemie (zie eveneens hoofdstuk II). Tenzij anders vermeld is het proefdiermateriaal waarvan voor de experimenten van dit hoofdstuk gebruik gemaakt is, afkomstig van met phenylhydrazine behandelde proefdieren.

De door Goldwasser en Kung (1968, 1971) uitgewerkte zuiveringsmethode voor erythropoietine uit plasma van anemische schapen is de belangrijkste leidraad geweest voor onze proefopzet. De auteurs bereikten met hun methode een preparaat dat 6500 tot 8000 I.U. (ISB)/mg eiwit aan erythropoietine-activiteit bevatte, en later (1970) een preparaat van 10.000 I.U. (ISB)/mg eiwit. De belangrijkste stap in hun zuiveringsmethode is adsorptie van de erythropoietine-activiteit aan een hydroxylapatietgel. De methode heeft een opbrengst aan erythropoietine-activiteit van 2% van de activiteit van het uitgangsmateriaal - wat de reden is van het tot dusver uitblijven van een chemische karakterisering van het hormoon.

Wij meenden een poging te moeten doen het rendement van de zuiveringsmethode te verbeteren, waarbij wij uitgingen van een tweetal principes: beperking van het aantal zuiveringsstappen vóór de adsorptie aan de hydroxylapatietgel; gebruik van een hydroxylapatietkolom als laatste zuiveringsstap i.p.v. de door Goldwasser en Kung gehanteerde suspensie van de gel. Het eerste principe is ingegeven door het grote verlies aan erythropoietine-activiteit waaraan de initiële zuiveringsstappen van White et al. (1960), die ook door Goldwasser en Kung worden gebruikt, lijden, t.w. bijna 80% van de erythropoietine-activiteit van het uitgangsmateriaal. Beperking van het aantal zuiveringsstappen,

gevoegd bij een poging om het verlies per stap zo beperkt mogelijk te houden, zou een verbetering van de methode betekenen. Het tweede principe berust op de gedachte, dat de adsorptie en elutie van een eiwit aan een gel efficiënter en beter reproduceerbaar verloopt, wanneer de gel niet is gesuspendeerd in de gebruikte buffer, maar in evenwicht met die buffer in een kolom is gebracht. Van deze gedachte zijn voor de zuivering van erythropoietine inmiddels ook Espada en Gutnisky uitgegaan. Zij slaagden erin de bevinding van Goldwasser en Kung te reproduceren, uitgaande van menselijke urine en misschien ook om het rendement van de methode te verbeteren, al zijn hun getallen op dit punt niet goed interpreteerbaar. Wij komen in de discussie van dit hoofdstuk kort op hun werk terug.

In de tweede plaats hielden wij bij onze proefopzet rekening met de dialysestudies van Lewis en medewerkers (1964, 1965, 1967, 1969a, 1971). Wij meenden op basis van deze gegevens te moeten onderzoeken in welke mate bij onze dialyse-opstellingen erythropoietine-activiteit wordt verloren. Bij de door ons gehanteerde technieken speelt dialyse tegen water een grote rol. Voorts wilden wij nagaan of negatieve-druk-dialyse, die voor de meeste eiwitten goed voldoet als concentratiemethode, en mogelijk ook bij onze studies als zodanig zou kunnen worden gebruikt, leidt tot verlies van erythropoietine-activiteit.

Bij enkele in dit hoofdstuk beschreven experimenten is de erythropoietine-activiteit van de monsters uitgedrukt als 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie, gemeten met behulp van het posthypoxisch polycythemisch muize-assay als beschreven in hoofdstuk III A. Deze experimenten dateren van de tijd dat wij niet beschikten over het International Reference Preparation for Erythropoietin. Bij het merendeel van de experimenten is de erythropoietine-activiteit uitgedrukt als I.U. (ISB)/liter. De waarden werden bereikt door vergelijking van tenminste twee verdunningen van het monster met tenminste drie verdunningen van een standaard geïjkt op het IRPE. Hierbij werden de verdunningen van monster en standaard zodanig gekozen, dat deze een vergelijkbare 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie in het lineaire deel van de log-dosis-respons-curve induceerden bij de muizen. Het behoeft geen betoog, dat in een groot aantal gevallen deze bepalingen voorafgegaan moesten worden door zogenaamde "pilot-assays".

Dialyse van erythropoietisch actieve urine en serum

Urine van met phenylhydrazine behandelde ratten werd onder toevoeging van ongeveer 2 o/oo phenol verzameld. De mogelijke doorlaatbaarheid van de gebruikte Viskingslang voor erythropoietine uit deze urine werd in een tweetal experimenten bestudeerd. In het eerste experiment werd na filtratie van de urine een zestal monsters met volumina van 10 ml in een dialyseslang met een diameter van 0,92 cm tegen een vijftigvoudig volume 0,15 molair NaCl gedialyseerd gedurende dialysetijden die varieerden van 2 - 32 uur (4°C). De teruggevonden erythropoietine-activiteit, uitgedrukt als 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie, gevonden met behulp van het bio-assay als besproken in hoofdstuk III, is vermeld in tabel 23.

Tabel 23 Dialyse van erythropoietisch actieve ratte-urine tegen een vijftigvoudig volume 0,15 molair NaCl, 4°C

dialysetijd (uren)	erythropoietine-activiteit 24-uurs-% ⁵⁹ Fe-incorporatie	% uitgangsactiviteit**
0	28,3 ± 3,5	100
2	24,1 ± 2,8	85
3	32,5 ± 4,1	115
6	29,1 ± 3,2	103
24	31,7 ± 3,8	112
6 + 18*	28,3 ± 4,1	100
24 + 8*	26,6 ± 2,1	94
gemiddelde ± s.d.	28,7 ± 3,1	102 ± 11

* dialysaat eenmaal ververst

**binnen het dialysemembraan

In het tweede experiment werd 30 ml van dezelfde urine na filtratie in een dialysemembraan met een diameter van 2,14 cm gedialyseerd tegen 100 ml water, dat na 24 uur (4°C) werd vervangen door 30 ml water. De dialyse werd na nogmaals 24 uur beëindigd. Aan de gedialyseerde urine werd NaCl toegevoegd tot een concentratie van 0,15 molair. De beide dialysaten werden lyofiel gedroogd, en elk werd opgelost in 0,15 molair NaCl. De erythropoietine-activiteit van elk van de monsters, uitgedrukt als 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie, is vermeld in tabel 24.

Tabel 24 Dialyse van erythropoietisch actieve ratte-urine tegen water, 48 uur, 4°C

monster	volume ml	erythropoietine-activiteit 24-uurs-% ⁵⁹ Fe-incorporatie
uitgangsurine	-	28,3 ± 3,5
gedialyseerde urine	30	27,9 ± 3,2
1ste dialysaat	100*	2,6 ± 0,5
2de dialysaat	30*	2,3 ± 0,3
controle (0,15 molair NaCl)	-	2,3 ± 0,4

* lyofiel gedroogd en opgelost in een volume van 10 ml 0,15 molair NaCl

Een soortgelijk experiment werd uitgevoerd voor menselijke urine. De urine was afkomstig van een patient met PRCA (tabel 14, patient nr. 18). Deze urine was, als alle in dit hoofdstuk genoemde urinemonsters, verzameld onder toevoeging van 2 tot 3 o/oo phenol, en bevatte na filtratie $1,6 \times 10^3$ I.U. (ISB)/liter aan erythropoietine-activiteit. Van deze urine werd 100 ml gedialyseerd in een Viskingmembraan met een diameter van 2,14 cm tegen 500 ml water gedurende 72 uur bij 4°C. Het dialysaat werd elke 24 uur vervangen door een vers volume van 500 ml water. De drie dialysaten werden lyofiel gedroogd, en opgelost in volumina van 10 ml 0,15 molair NaCl. Aan 5 ml van elk van de op deze wijze verkregen monsters werd ovo-albumine toegevoegd tot een concentratie van 30 gram/liter. De 7 monsters werden vervolgens onderzocht op erythropoietine-activiteit. Het resultaat is weergegeven in tabel 25. Dialyse-experimenten werden vervolgens ingezet voor erythropoietisch actief serum. Het mogelijke effect van dialyse op erythropoietine-activiteit werd onderzocht voor menselijk serum, ratteserum en konijneserum. De werkwijze verliep analoog aan die voor het experiment waarbij menselijke urine werd onderzocht. In plaats van water werd echter bij de tweede verversing gedialyseerd tegen 0,15 molair NaCl, dat niet op erythropoietine-activiteit werd onderzocht, terwijl voor menselijk serum, afkomstig van de genoemde patient, een monster van 10 ml werd gebruikt. Tabel 26 geeft de bevindingen bij dit experiment weer. In geen van de dialysaten was erythropoietine-activiteit aantoonbaar.

Tabel 25 Dialyse van erythropoietisch actieve menselijke urine tegen water, 72 uur, 4°C

monster	erythropoietine-activiteit	
	I.U. (ISB)/liter	24-uurs-% ⁵⁹ Fe-incorporatie
uitgangsurine	$(1,62 \pm 0,16) \times 10^3$	
gedialyseerde urine	$(1,57 \pm 0,13) \times 10^3$	
1ste dialysaat (+ ovo-albumine)	n.a. (n.a.)*	$2,8 \pm 0,5$ ($2,7 \pm 0,4$)
2de dialysaat (+ ovo-albumine)	n.a. (n.a.)	$2,6 \pm 0,3$ ($2,8 \pm 0,5$)
3de dialysaat (+ ovo-albumine)	n.a. (n.a.)	$2,3 \pm 0,4$ ($2,4 \pm 0,2$)
controle (0,15 molair NaCl)(+ ovo-alb.)	n.a. (n.a.)	$2,4 \pm 0,5$ ($2,5 \pm 0,5$)

* niet aantoonbaar, d.i. niet significant verschillend van de Fe-inc. na 0,15 molair NaCl.

Tabel 26 Dialyse van menselijk serum, ratteserum en konijneserum tegen water, 72 uur, 4°C

monster	erythropoietine-activiteit I.U. (ISB)/liter	
	voor dialyse	na dialyse
menselijk serum	$(8,3 \pm 0,7) \times 10^3$	$(8,3 \pm 0,9) \times 10^3$
ratteserum	$(5,2 \pm 0,7) \times 10^2$	$(5,0 \pm 0,4) \times 10^2$
konijneserum	$(6,8 \pm 0,5) \times 10^2$	$(6,6 \pm 0,8) \times 10^2$

In de vier hier beschreven experimenten leidde dialyse tegen water of tegen 0,15 molair NaCl in geen enkel geval tot een statistisch significant verlies van erythropoietine-activiteit. Het uitdialyseren van de phenol, toegevoegd aan urine in een concentratie van 2 tot 3%, beïnvloedde de erythropoietine-activiteit evenmin.

Negatieve-druk-dialyse van erythropoïetisch actieve urine

Negatieve-druk-dialyse, waarvoor de proefopzet is gegeven in hoofdstuk II, is niet vergelijkbaar met dialyse tegen een NaCl-oplossing of water. Aangezien het drukverschil tussen binnen- en buitenzijde van het membraan leidt tot uitrekking, zal de doorlaatbaarheid van het membraan veranderen. Dit is een bekend fenomeen. De doorlaatbaarheid van dialyseslang (Viskingmembraan, diameter 0,92 cm) bij negatieve-druk-dialyse voor erythropoïetine werd als volgt onderzocht. Van ratte-urine werd een monster van 100 ml genomen en onderworpen aan negatieve-druk-dialyse bij 4°C gedurende 24 uur. Het concentraat met een volume van 26 ml werd aangevuld tot het uitgangsvolume, waarna een monster van 10 ml werd getrokken. De resterende 90 ml werd opnieuw gedurende 24 uur bij 4°C aan negatieve-druk-dialyse onderworpen. Het concentraat (volume 5 ml) werd aangevuld tot 90 ml, evenals het eerste concentraat met 0,15 molair NaCl. De uitgangsurine, de beide concentraten na aanvulling tot het oorspronkelijke volume, en de dialysaten werden onderzocht op erythropoïetine-activiteit. De bevindingen zijn weergegeven in tabel 27. Uit de tabel laat zich aflezen,

Tabel 27 Negatieve-druk-dialyse van erythropoïetisch actieve ratte-urine gedurende 2 maal 28 uur, 4°C

monster	erythropoïetine-activiteit 24-uurs-% ⁵⁹ Fe-incorporatie	% uitgangs- activiteit
uitgangsurine (3 x 0,2 ml)	24,7 ± 3,8	100
1ste concentraat (3 x 0,2 ml)	17,3 ± 2,9	70
2de concentraat (3 x 0,2 ml)	11,9 ± 1,6	48
1ste dialysaat (3 x 1,0 ml)	2,9 ± 0,5	--
2de dialysaat (3 x 1,0 ml)	2,5 ± 0,6	--
controle (0,15 molair NaCl)	2,4 ± 0,4	--

dat negatieve-druk-dialyse leidt tot een verlies van erythropoïetine-activiteit in het concentraat, dat niet kon worden teruggevonden in het dialysaat. Het verlies, hier aangegeven in 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie is aanmerkelijk groter dan de getallen suggereren, aangezien een verdubbeling van de erythropoïetine-activiteit in het bio-assay leidt

tot een toename van 6 tot 7% 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie (zie hoofdstuk III A). Het verlies aan erythropoietine-activiteit bij negatieve-druk-dialyse was reproduceerbaar in een reeks soortgelijke experimenten, die wij hier niet gedetailleerd bespreken. Op blz.129 komen wij, in samenhang met gelfiltratie-experimenten, op de oorzaak van het verschijnsel terug.

Relatieve elutievolume en verdelingscoëfficiënten van erythropoietine bij gelfiltratie over Sephadex G150

Relatieve elutievolume en verdelingscoëfficiënten werden voor erythropoietine bij gelfiltratie over Sephadex G150 bepaald voor uiteenlopende doeleinden. De eerste reden was het preparatieve gebruik van de gelfiltratie voor de isolatie van erythropoietine-activiteit uit serum en urine. In de tweede plaats wilden wij nagaan of er verschil bestond t.a.v. de beide genoemde karakteristieken voor erythropoietine-activiteit afkomstig van verschillende bron (mens, rat, konijn), en in de derde plaats wilden wij over referentiewaarden beschikken om eventueel gezuiverd erythropoietine op gelfiltratie-karakteristieken te kunnen onderzoeken.

De relatieve elutievolume en verdelingscoëfficiënten werden bepaald voor erythropoietine-activiteit van serum van rat, konijn en mens, en urine van rat en mens. De proefopzet voor het verkrijgen van het dierlijke materiaal is, evenals de gelfiltratie-techniek, beschreven in hoofdstuk II. Het menselijke materiaal was verkregen van de reeds genoemde patient met PRCA. De bepaling van de relatieve elutievolume werd uitgevoerd als beschreven door Andrews (1964). Het void volume V_0 en het totale watervolume V_t werden bepaald met behulp van een mengsel bestaande uit 1% Dextran Blue 2000 (Pharmacia, Uppsala) en 0,5% phenol. De relatieve elutievolume van de erythropoietine-activiteit werden uitgedrukt als V_{ep}/V_0 , waarin V_{ep} het elutievolume van de erythropoietine-activiteit is. De verdelingscoëfficiënt K_{av} werd berekend uit de formule van Laurent en Killander (1964):

$$K_{av} = \frac{V_{ep} - V_0}{V_t - V_0}$$

De verkregen elutiediagrammen voor serum en urine van de rat zijn afgebeeld in figuur 49. De elutiediagrammen van het serum van konijn en mens verschillen niet significant van dat van ratteserum. Op het diagram voor menselijke urine wordt later in dit hoofdstuk teruggekomen. De erythropoietine-activiteit werd gemeten in achtereenvolgende mon-

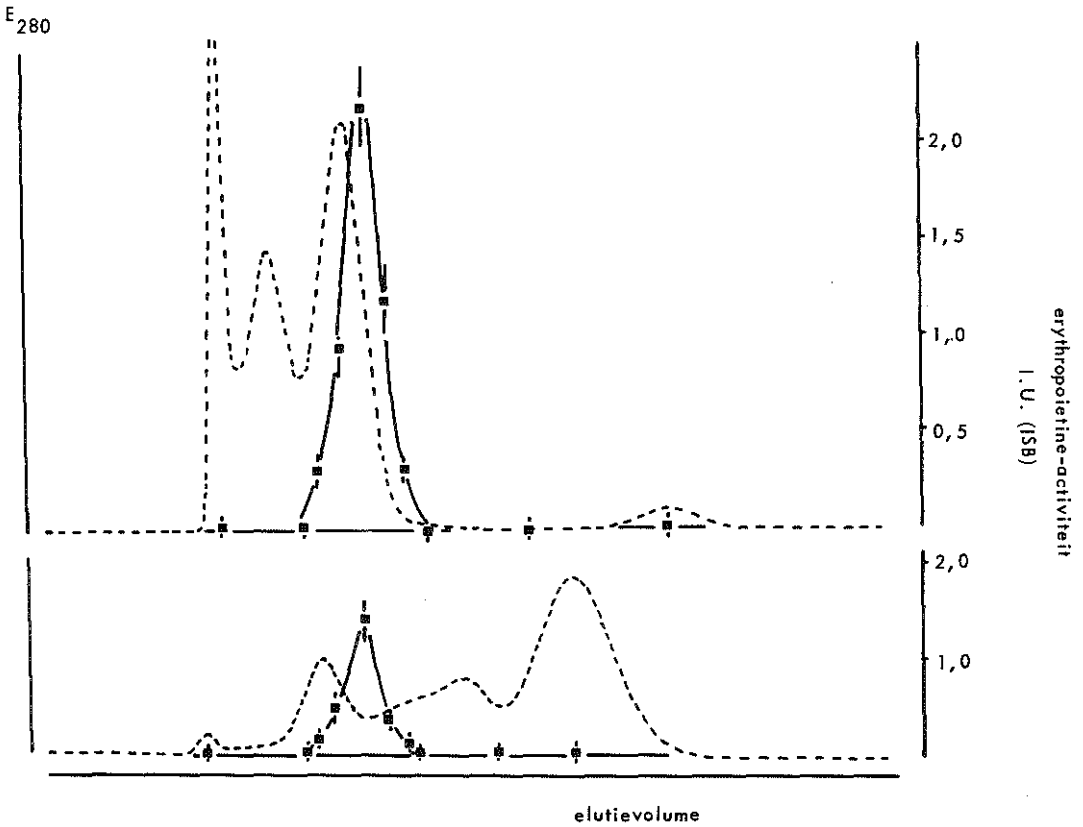


Fig. 49. Gelfiltratie over Sephadex G150 van serum (boven) en urine (onder) van de rat. Onderbroken lijn: extinctie bij 280 nm, getrokken lijn: erythropoetine-activiteit. Verticale lijnstukken: standaarddeviaties van het gemiddelde.

sters van het eluaat met volumina van 15 ml. De berekende relatieve elutievolume en verdelingscoëfficiënten zijn gegeven in tabel 28, en bedroegen gemiddeld respectievelijk 2,20 en 0,43. De verschillen tussen de vijf gevonden waarden hebben in het licht van het volume van de fracties waarin het eluaat werd verzameld, ongeveer 15 ml, geen betekenis. Eveneens in tabel 28 zijn de dispersie-zones, gedefinieerd als de verdelingscoëfficiënten van de eerste t/m de laatste fractie waarin erythropoetine-activiteit aangetoond kon worden, vermeld. Deze waarden worden vanzelfsprekend mede beïnvloed door de gevoeligheid van het bio-assay, en daarmee door de hoeveelheid erythropoetine-acti-

Tabel 28 Relatieve elutievolume en verdelingscoëfficiënten van erythropoietine bij gelfiltratie over Sephadex G150

erythropoietine-bron	relatief elutie-volume	verdelingscoëfficiënt	dispersiezone
serum rat	2,18	0,43	0,37 - 0,52
serum konijn	2,21	0,43	0,36 - 0,52
serum mens	2,16	0,42	0,35 - 0,50
urine rat	2,24	0,44	0,36 - 0,54
urine mens	2,22	0,44	0,38 - 0,55
gemiddeld	2,20	0,43	0,36 - 0,53

Tabel 29 Opbrengst aan erythropoietine-activiteit na gelfiltratie over Sephadex G150

erythropoietine-bron	erythropoietine-activiteit uitgangsmateriaal I.U. (ISB)/l	erythropoietine-activiteit na gelfiltratie I.U. (ISB)/l	opbrengst (%)
serum rat	$5,2 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$	90,4
serum konijn	$6,8 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2$	95,6
serum mens	$8,3 \times 10^3$	$7,9 \times 10^3$	95,2
urine rat	$3,2 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	90,6
urine mens	$1,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	87,5
Gemiddelde opbrengst			91,9

viteit die op de kolom was gebracht. In tabel 29 is de opbrengst aan erythropoietine-activiteit na gelfiltratie over Sephadex G150 weergegeven na verzamelen van de fractie, waarin zich de erythropoietine-activiteit zou bevinden op basis van de gegeven waarden. Deze opbrengst bleek gemiddeld 92% te bedragen. De conclusies van deze reeks gelfiltratie-experimenten zijn duidelijk. Relatieve elutievolume en verdelingscoëfficiënten van erythropoietine-activiteit, onderworpen aan gelfiltratie over Sephadex G150 verschillen voor de sera van rat, konijn en mens, en de urines van rat en mens niet significant, terwijl het verlies aan erythropoietine-activiteit bij deze isolatietechniek gering is.

Negatieve-druk-dialyse van erythropoietisch actieve serum- en urinefracties in samenhang met gelfiltratie-experimenten

De erythropoetine-activiteit bleek zich bij gelfiltratie over Sephadex G150 te manifesteren als een enkelvoudige piek, waarvan symmetrie op basis van de elutediagrammen aangenomen kan worden. Een illustratie hiervan vormt figuur 50, waarin het elutediagram van de genoemde patient met PRCA is afgebeeld. Deze figuur is afkomstig van het

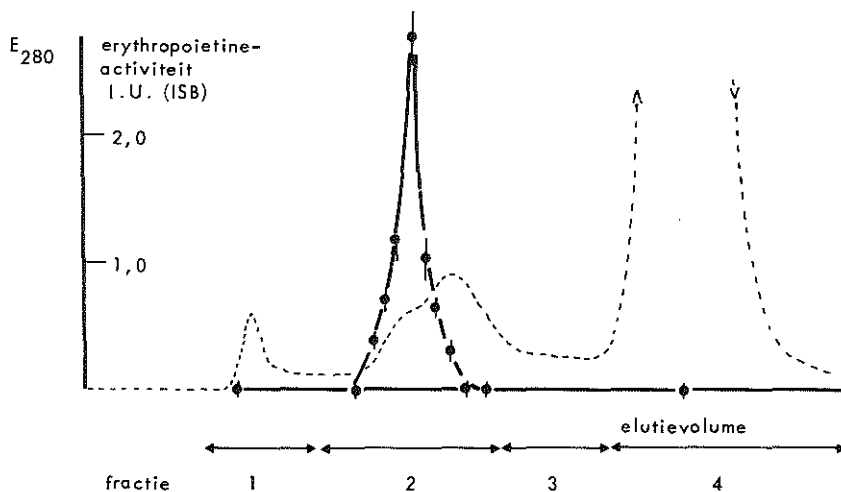


Fig. 50. Gelfiltratie over Sephadex G150 van honderdvoudig geconcentreerde urine van de mens. Onderbroken lijn: extinctie bij 280 nm, getrokken lijn: erythropoetine-activiteit. Verticale lijnstukken: standaarddeviaties van het gemiddelde.

experiment beschreven op blz. 126. De hoge opbrengst aan erythropoetine-activiteit vermeld in tabel 29 toont aan, dat tenminste 90% van het erythropoetine zich volgens dit elutiepatroon gedraagt. Wij achtten het wenselijk een verdere opbrengst-analyse uit te voeren door alle afzonderlijke eiwitfracties verkregen d.m.v. gelfiltratie van serum en urine te onderzoeken op erythropoetine-activiteit. Bij dit experiment werd tevens het effect van lyofiel drogen op erythropoetine-activiteit in serum en urine onderzocht. Een eventueel effect van lyofiel drogen zou met name in het experiment van tabel 29 een rol kunnen spelen,

waaruit al afleidbaar is, dat een dergelijk effect niet groter dan 10% kan zijn. Het experiment werd uitgevoerd met serum en urine van de genoemde patient. Monsters serum en urine werden gedurende 24 uur (4°C) gedialyseerd tegen een hondervoudig volume water, waarna ze lyo-gedroogd werden en het droge materiaal weer opgelost werd in het uitgangsvolume 0,15 molair NaCl. Enig onopgelost materiaal werd door middel van centrifugatie verwijderd. De erythropoïetine-activiteit van de op deze wijze verkregen monsters is in tabel 30 vergeleken met de

Tabel 30 Erythropoïetine-activiteit van eiwitfracties verkregen door middel van gelfiltratie over Sephadex G150 van erythropoïetisch actief menselijk serum en erythropoïetisch actieve menselijke urine, en opbrengst aan erythropoïetine-activiteit na lyofiel drogen en opnieuw oplossen in 0,15 molair NaCl

monster	gelfiltratie van serum erythropoïetine-act. I.U. (ISB)/liter	gelfiltratie van urine erythropoïetine-act. I.U. (ISB)/liter
uitgangsmateriaal	$(6,6 \pm 0,5) \times 10^3$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^2$
fractie 1	n.a.*	n.a.
fractie 2	n.a.	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^2$
fractie 3	$(6,2 \pm 0,9) \times 10^3$	n.a.
fractie 4	n.a.	n.a.
fractie 1+2+3+4	$(6,1 \pm 0,8) \times 10^3$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^2$
lyofiel gedroogd uitg. materiaal	$(6,5 \pm 0,9) \times 10^3$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^2$

* niet aantoonbaar, verschilt niet significant van de respons op 0,15 molair NaCl.

de erythropoïetine-activiteit van het oorspronkelijke serum en de oorspronkelijke urine. Het verschil is niet significant. Bij de gelfiltratie-experimenten werden voor serum vier eiwitfracties, analoog aan de eiwitpieken van figuur 49 verzameld, en voor urine eveneens vier eiwitfracties, aangegeven in het elutiediagram van figuur 50. Het verzamelen van de fracties werd zodanig ingericht, dat het gehele eluaat van V_0 tot V_t op erythropoïetine-activiteit werd onderzocht. De erythropoïetine-activiteit van elk van de fracties, en van de vier weer bijeengevoegde fracties, terugberekend op het uitgangsvolume, wordt in tabel 30 vergeleken met de erythropoïetine-activiteit van het uitgangsmateriaal.

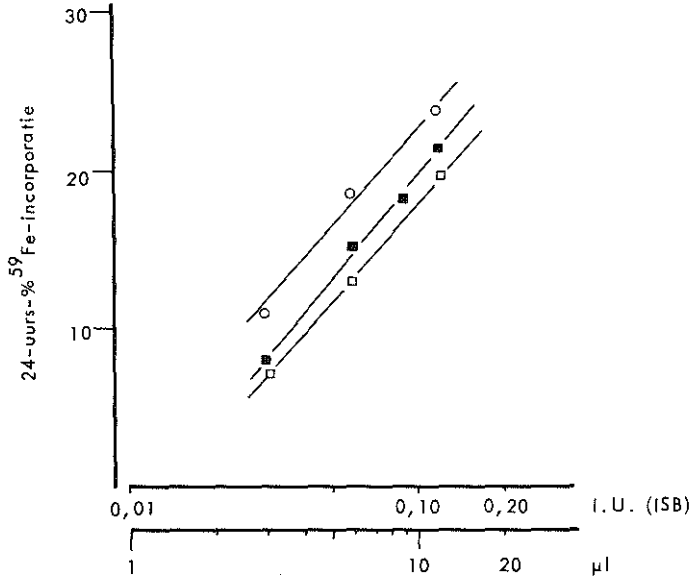


Fig. 51. Log-dosis-respons-curven voor erythropoietine-activiteit aanwezig in uitgangsmateriaal en concentraat van een negatieve-druk-dialyse onderworpen erythropoietine-preparaat, uit menselijk serum geïsoleerd door middel van gelfiltratie. □ : concentraat; O : uitgangsmateriaal; ■ : 2nd IRPE. Onderste abscis: hoeveelheid van de onderzochte monsters. Bovenste abscis: eenheden van het 2nd IRPE.

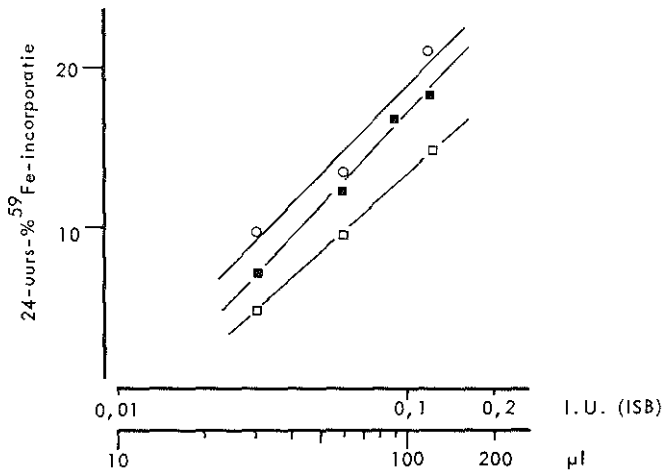


Fig. 52. Log-dosis-respons-curven voor erythropoietine-activiteit aanwezig in uitgangsmateriaal en concentraat van een aan negatieve-druk-dialyse onderworpen erythropoietine-preparaat, uit menselijke urine geïsoleerd door middel van gelfiltratie. □ : concentraat; ■ : 2nd IRPE; O : uitgangsmateriaal. Onderste abscis: hoeveelheid van de onderzochte monsters. Bovenste abscis: eenheden van het 2nd IRPE.

Aangezien de erythropoietine-activiteit zowel voor serum als voor urine zich bevindt in één fractie, overeenkomstig de elutievolume van tabel 28, en het bijeenvoegen van de vier fracties de hoeveelheid teruggevonden erythropoietine-activiteit niet significant verandert, nemen wij aan, dat al het erythropoietine zich gedraagt volgens het elutiepatroon op blz.128. Zoals al gesteld was dit voor 90% van de erythropoietine-activiteit ook bewijsbaar (zie tabellen 29 en 30). De implicatie hiervan is, dat het grootste deel van de erythropoietine-activiteit, die, zoals beschreven is op blz.129, wordt verloren tijdens negatieve-druk-dialyse ook aan dit elutiepatroon zou hebben voldaan. Uit deze gedachtengang is afleidbaar, dat het resultaat van de negatieve-druk-dialyse-experimenten reproduceerbaar moet zijn wanneer de erythropoietisch actieve eiwitfractie bereid door gelfiltratie van serum of urine wordt onderworpen aan negatieve-druk-dialyse. In een tweetal experimenten, één voor urine en één voor serum werd dit nagegaan, waarbij de door middel van negatieve-druk-dialyse verkregen fracties werden onderworpen aan analytische gelfiltratie. Bij het experiment voor serum werd een erythropoietinepreparaat, bereid door middel van gelfiltratie van serum van de genoemde patient met PRCA met een volume van 10 ml (oorspronkelijke volume ongeveer 20 ml serum), verdund tot 250 ml met water en gefiltreerd. Deze 250 ml werd gedurende 24 uur (4°C) onderworpen aan negatieve-druk-dialyse, waarna het concentraat een volume van 8 ml, en het dialysaat een volume van 240 ml had, zodat 2 ml (0,8% van het uitgangsvolume) verloren was gegaan. De binnenzijde van het dialysemembraan werd gespoeld met water, dat aan het concentraat werd toegevoegd, waarna het met water werd aangevuld tot een volume van 50 ml. Het dialysaat werd verdeeld in twee porties van 120 ml enlyofiel gedroogd, waarna de ene werd opgelost in 6 ml 0,15 molair NaCl, en de andere in 6 ml van een oplossing van ovo-albumine (30 g/l) in 0,15 molair NaCl. Deze monsters werden met behulp van het bio-assay als beschreven in hoofdstuk III A onderzocht op erythropoietine-activiteit, waarbij ze werden vergeleken met de log-dosis-responscurven van 2nd IRPE en uitgangspreparaat. De resultaten zijn weergegeven in de figuren 51 en 53, terwijl de berekende erythropoietine-activiteit van uitgangsmateriaal en concentraat in tabel 31 vermeld zijn. Samengevat komen deze resultaten neer op een aanzienlijk verlies van erythropoietine-activiteit in het concentraat, terwijl in het dialysaat na toevoeging van ovo-albumine een geringe hoeveelheid erythropoietine-activiteit aantoonbaar is, met een log-dosis-respons-curve die duidelijk afwijkt van die van 2nd IRPE, uitgangsmateriaal en concentraat, die parallel verlopen. Een identiek experiment werd uitgevoerd voor een erythropoietinepreparaat, bereid door middel van gelfiltratie van

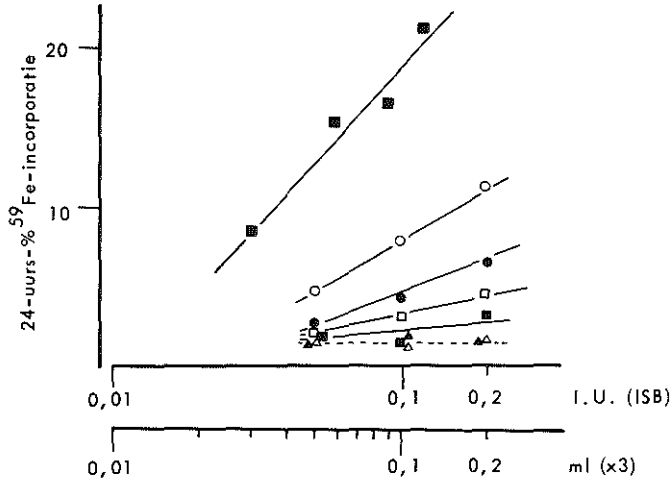


Fig. 53. Log-dosis-respons-curves voor erythropoietine-activiteit aanwezig in de dialysaten van aan negatieve-druk-dialyse onderworpen erythropoietine-activiteit, uit menselijk serum en urine geïsoleerd door middel van gelfiltratie.

- : 2nd IRPE
- : dialysaat uit serum-erythropoietine
- : dialysaat uit serum-erythropoietine + ovo-albumine
- : dialysaat uit urine-erythropoietine
- : dialysaat uit urine-erythropoietine + ovo-albumine
- ▲ : ovo-albumine in 0,15 molair NaCl
- △ : 0,15 molair NaCl

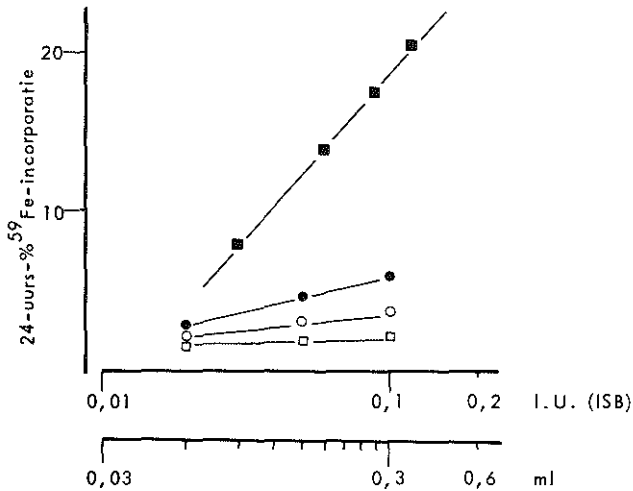


Fig. 54. Potentiërend effect van runderserum-albumine en ovo-albumine op erythropoietine-activiteit teruggevonden in het dialysaat van aan negatieve-druk-dialyse onderworpen menselijke urine.

- : dialysaat
- : dialysaat + runderserum-albumine
- : dialysaat + ovo-albumine
- : 2nd IRPE

menselijke urine. De volumina van concentraat en dialysaat bedroegen hier respectievelijk 4 en 243 ml, zodat 3 ml van het uitgangsmateriaal verloren was gegaan (1,2%). Het onderzoek op erythropoietine-activiteit is weergegeven in de figuren 52 en 53, en in tabel 31. Het resultaat is volkomen vergelijkbaar met het resultaat dat voor de erythropoietisch actieve eiwitfractie bereid uit serum werd gevonden.

Tabel 31 Erythropoietine-activiteit van uitgangsmateriaal en concentraat bij negatieve-druk-dialyse van de door gelfiltratie over Sephadex G150 verkregen erythropoietisch actieve eiwitfracties van menselijk serum (1) en menselijke urine (2)

monster	erythropoietine-activiteit I. U. (ISB)/liter
1. uitgangsmateriaal	$(13,3 \pm 0,4) \times 10^3$
concentraat	$(8,8 \pm 0,5) \times 10^3$
2. uitgangsmateriaal	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^3$
concentraat	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^3$

Tenslotte werd nagegaan of het effect van ovo-albumine reproduceerbaar is met een ander eiwit, waarvoor runderserum-albumine werd gekozen. Hiertoe werd een monster van 250 ml urine, na gedialyseerd te zijn tegen aquadest, onderworpen aan negatieve-druk-dialyse (dialysaat 241 ml, concentraat 5 ml). Het dialysaat werd lyofiel gedroogd, verdeeld in drie gelijke hoeveelheden die werden opgelost in 10 ml 0,15 molair NaCl, waarna bij twee ervan respectievelijk ovo-albumine (30 g/l) en runderserum-albumine (30 g/l) was toegevoegd. De erythropoietine-activiteit ervan is weergegeven in figuur 54.

Adsorptie van serum-erythropoietine aan DEAE-Sephadex A50

Gebaseerd op de zuiveringsmethode van White et al. (1960) en van Krugers Dagneaux (1967) adsorbeerden wij de eiwitfractie met erythropoietine-activiteit, verkregen door middel van gelfiltratie over Sephadex G150 aan een DEAE-Sephadex gel, in evenwicht met 0,05 molair acetaatbuffer pH 4,65. Voor de elutie van de geadsorbeerde eiwitten werd een gradient gebruikt met de zojuist genoemde acetaatbuffer als beginbuffer, en een acetaatbuffer van 0,05 molair, pH 4,0, waaraan 2,0 molair NaCl was toegevoegd, als eindbuffer. De proeven werden uitgevoerd met serum van de rat. De techniek kan als volgt worden beschreven. De erythropoietisch actieve eiwitfractie vrekregen door gelfiltratie werd gedialyseerd tegen de buffer genoemd als beginbuffer. Het gevormde neerslag werd verwijderd door middel van centrifugatie. Het supernatant werd op de kolom gebracht, in evenwicht met de beginbuffer. Elutie van de niet-geadsorbeerde eiwitten vond eveneens met deze buffer plaats. Deze eiwitten konden worden onderverdeeld in vier fracties. Elutie van de geadsorbeerde eiwitten met behulp van een lineaire gradient gaf vervolgens het chromatogram als geschetst in figuur 55. Alle eiwitfracties werden op erythropoietine-activiteit onderzocht. Deze bleek zich te bevinden in de in figuur 55 gearceerde piek. Het gelukte om met behulp van een niet-lineaire gradient, waarvan de opstelling schematisch is weergegeven in de figuur, een verdere scheiding van de geadsorbeerde eiwitten te bewerkstelligen. In het chromatogram van de figuur is weergegeven, hoe een kleine eiwitfractie zich scheidt van de erythropoietisch actieve eiwitfractie. Onderzoek op erythropoietine-activiteit gaf aan, dat deze kleine fractie volledig inactief is. Uit de elutiediagrammen van figuur 55 is af te leiden, dat deze zuiveringsstap leidt tot een aanzienlijk verlies van erythropoietisch inactieve eiwitten. Het rendement van de methode met betrekking tot de erythropoietine-activiteit werd bestudeerd in een vijftal experimenten. Het verlies aan erythropoietine-activiteit na deze zuiveringsstap bleek in deze vijf experimenten 35 tot 65% van de erythropoietine-activiteit van het uitgangsmateriaal te bedragen. Het grootste verlies aan erythropoietine-activiteit trad op bij de dialyse tegen de beginbuffer. Het verlies liep hier uiteen van 15 tot 60% van de erythropoietine-activiteit van de eiwitfractie verkregen door middel van gelfiltratie. Eén en ander is weergegeven in tabel 32. Op grond van deze bevindingen besloten wij de stap niet als routine-zuiveringsstap te gebruiken, waarvoor, zoals later in dit hoofdstuk ter sprake komt, ook geen noodzaak bestond.

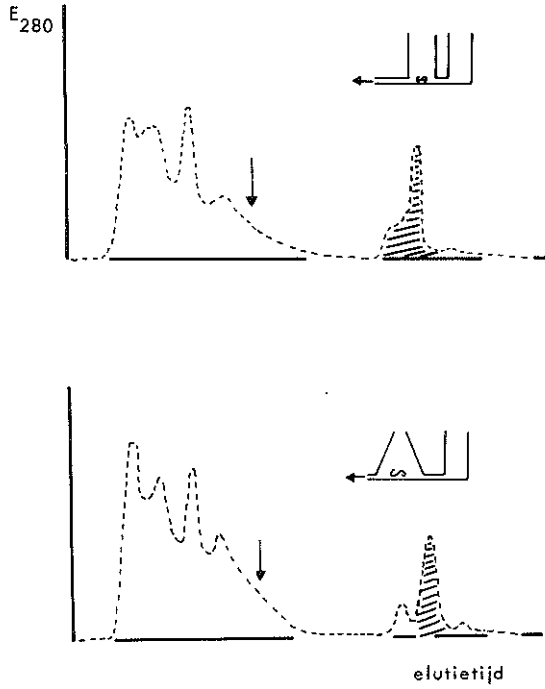


Fig. 55. Adsorptie aan DEAE-Sephadex-A50 van erythropoietine-activiteit. Boven: lineaire gradient-elutie; onder: niet-lineaire gradient-elutie. Het gearceerde gebied geeft de localisatie van de erythropoietine-activiteit aan. Voor verklaring: zie tekst.

Tabel 32 Opbrengst aan erythropoietine na adsorptie aan DEAE-Sephadex A50 van de erythropoietische actieve eiwitfractie verkregen door gelfiltratie over Sephadex G150 van serum van de rat. Overzicht van 5 experimenten

erythropoietine-activiteit van uitgangsserum	erythropoietine-activiteit na gelfiltratie	opbrengst %	erythropoietine- [*] activiteit na dialyse tegen 0,05 molair aceetaat, pH 4,65	opbrengst %	erythropoietine-activiteit na elutie van DEAE-Sephadex A50	opbrengst %
I.U. (ISB)/l	I.U. (ISB)/l		I.U. (ISB)/l		I.U. (ISB)/l	
$2,2 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	91**	$1,7 \times 10^2$	77** 85***	$1,4 \times 10^2$	64** 82***
$5,2 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$	90	$2,3 \times 10^2$	44 49	$1,9 \times 10^2$	37 83
$4,1 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	95	$2,8 \times 10^2$	68 72	$2,5 \times 10^2$	61 89
$4,9 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	88	$1,8 \times 10^2$	37 42	$1,7 \times 10^2$	36 94
$2,8 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	82	$1,2 \times 10^2$	43 52	$1,0 \times 10^2$	36 83
gemiddelde opbrengst		89		54 60		47 86

* erythropoietine-activiteit van het supernatant na centrifugatie 500 g, 10 minuten, 4°C

** uitgedrukt als percentage van de erythropoietine-activiteit van het uitgangsserum

*** uitgedrukt als percentage van de erythropoietine-activiteit na de voorafgaande bewerking

Adsorptie aan een hydroxylapatiet kolom van erythropoëtine-activiteit bereid uit ratteserum

In oriënterende experimenten werd adsorptie van de erythropoëtine-activiteit bereid uit ratteserum aan een hydroxylapatietgel beproefd (zie voor de methodiek hoofdstuk II). Het actieve eluaat verkregen door gelfiltratie van 80 ml (vier runs) ratteserum werd daartoe na dialyse en droogvriezen opgelost in 100 ml gedeïoniseerd water en vervolgens uitputtend gedialyseerd tegen gedeïoniseerd water tot een geleidingsvermogen $>15\text{k}\Omega$ werd bereikt. Een eventueel neerslag werd afgecentrifugeerd. Het monster werd op de hydroxylapatietgel, in evenwicht met gedeïoniseerd water, gebracht. Vervolgens werd geëluëerd met een stapsgewijs opklimmende concentratie van een fosfaatbuffer, pH 6,8. De aanvangsconcentratie bedroeg daarbij 5×10^{-4} molair. Een karakteristiek elutediagram is in figuur 56 weergegeven. De erythropoëtine-

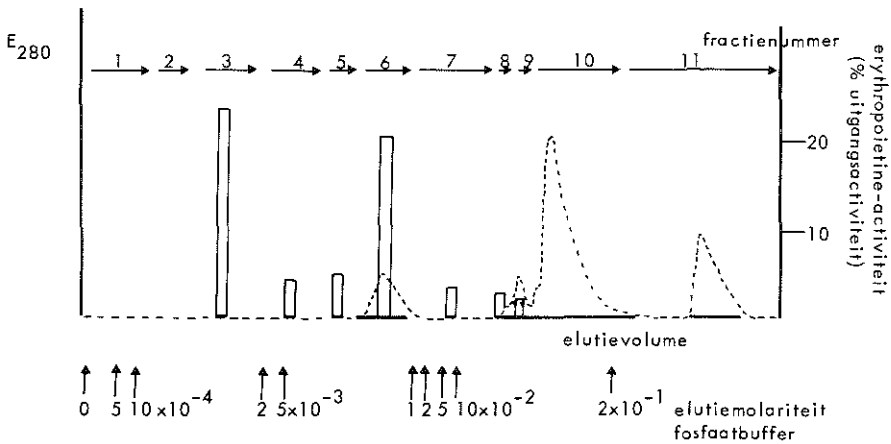


Fig. 56. Adsorptie van erythropoëtine-activiteit geïsoleerd door middel van gelfiltratie uit ratteserum aan een hydroxylapatietkolom. De verticale kolommen geven de erythropoëtine-activiteit van de aangegeven fracties weer. Onderbroken lijn: extinctie bij 280 nm.

activiteit werd gemeten na toevoeging van ovo-albumine tot een concentratie van 30 g/l, nadat de fracties d.m.v. vriesdrogen teruggebracht waren tot 15 ml. Afgeleid kan worden dat de erythropoietine-activiteit in twee volledig gescheiden fracties geëluëerd wordt. Dit gedrag van erythropoietine bij adsorptie aan een hydroxylapatietgel was zeer reproduceerbaar.

Adsorptie aan een hydroxylapatiet kolom van erythropoietine-activiteit bereid uit menselijk serum

Erythropoietine-activiteit bereid uit menselijk serum werd op soortgelijke wijze aan een hydroxylapatietgel geadsorbeerd. De erythropoietine-activiteit was bereid door gelfiltratie van Sephadex G150 van serum van de in tabel 14 genoemde patienten nr. 18 en 19, waarbij erythropoietisch actieve eluaten werden samengevoegd. Per experiment werd op de hydroxylapatiet kolom 160 I.U. (ISB) gebracht. Een karakteristiek elutediagram is weergegeven in figuur 57. Evenals bij preparaten bereid

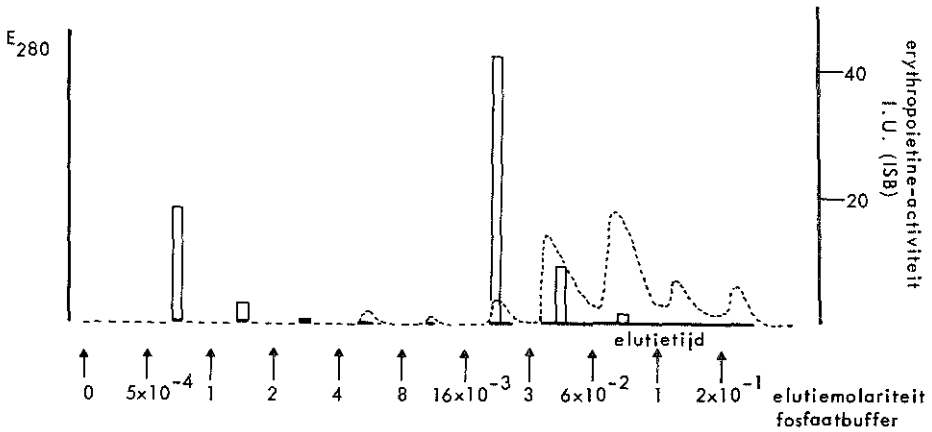


Fig. 57. Adsorptie aan een hydroxylapatietkolom van erythropoietine-activiteit geïsoleerd door middel van gelfiltratie uit menselijk serum. De verticale kolommen geven de erythropoietine-activiteit weer, de onderbroken lijn is de extinctie bij 280 nm.

uit ratteserum wordt de erythropoietine-activiteit in twee volledig gescheiden fracties geëluëerd. Experimenten als deze werden in totaal twaalf maal uitgevoerd, waarbij zeer reproduceerbaar twee volledig gescheiden fracties erythropoietine-activiteit werden gevonden. Bij deze experimenten werd de opbrengst in I.U. (ISB) (na toevoeging van 30 g/l ovo-albumine aan alle fracties) gemeten. Deze varieerde van 5 tot 29 I.U. (ISB) voor de eerste erythropoietisch actieve fractie en van 13 tot 72 I.U. (ISB) voor de tweede. De totale opbrengst varieerde van 15% tot 55% van de erythropoietine-activiteit van het uitgangsmateriaal. Een overzicht van de opbrengsten aan erythropoietine-activiteit, en de molariteiten van de fosfaatbuffer waarmee deze geëluëerd werden, is gegeven in tabel 33. De variabiliteit in de gegevens wordt in de discussie besproken. De verzamelde fracties werden samengevoegd;

Tabel 33 Opbrengst aan erythropoietine activiteit bij adsorptie van de uit menselijk serum geïsoleerde erythropoietisch actieve eiwitfractie aan hydroxyl-apatiet

exp. nr.	1ste fractie			2de fractie		
	elutiemolariteit $\times 10^{-4}$	I.U.(ISB)	%	elutiemolariteit $\times 10^{-4}$	I.U.(ISB)	%
1	5	16	10	200	23	14
2	5	19	12	60	41	25
3	10	11	7	150	29	18
4	5	5	3	300	53	33
5	15	21	13	80	13	8
6	10	29	18	160	41	25
7	5	17	11	40	72	44
8	5	27	17	160	17	10
9	5	20	12	80	37	23
10	15	13	8	80	28	17
11	5	15	9	40	46	28
12	5	10	6	40	15	9
gemiddeld		17	11		35	21
totaal		203			415	

185 I.U. (ISB) van de als eerste, en 400 I.U. (ISB) van de als tweede geëluëerde fractie werden gedialyseerd (48 uur, 4°C) tegen een in totaal 1000-voudig volume gedeïoniseerd water; na dialyse werd respectievelijk 191 I.U. (ISB) en 383 I.U. (ISB) teruggevonden. Ten opzichte van de eerste ijking werden respectievelijk 179 I.U. (ISB) en 351 I.U. (ISB) drooggevroren en opgenomen in 40 µl en 1 ml 0,15 molair NaCl. Op deze beide oplossingen werd een eiwitbepaling verricht. De 179 I.U. (ISB) van de als eerste geëluëerde fractie bevatte 37 µgram eiwit, waarmee de specifieke activiteit van dit preparaat 4800 I.U. (ISB)/mg eiwit bedraagt; dit betekent een zuiveringsgraad van bij benadering 45.000 x op eiwitbasis t.o.v. het uitgangsserum, bereikt in een tweetal zuiveringsstappen en met een rendement van gemiddeld 11%. De 351 I.U. (ISB) van de als tweede geëluëerde fractie bevatte 45 mg eiwit (specifieke activiteit 8 I.U. (ISB)/mg eiwit; zuiveringsgraad 70 x; rendement 21%). Als controle onderging 40 µgram runderserum-albumine een behandeling identiek aan de als eerste geëluëerde fractie erythropoetine-activiteit. Er werd 38 µgram van teruggevonden bij de eiwitbepaling. Het potentiërend effect van ovo-albumine (30 g/l) op het verst gezuiverde erythropoetinepreparaat is in figuur 58 weergegeven.

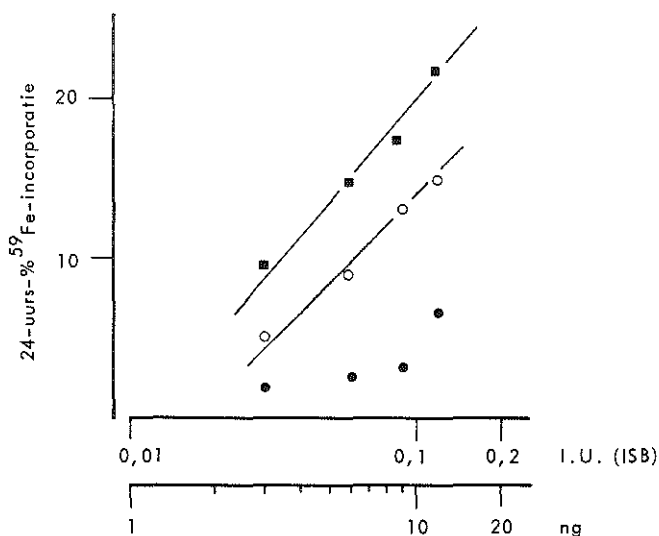


Fig. 58. Potentiërend effect van ovo-albumine op de erythropoetine-activiteit geïsoleerd door middel van adsorptie aan een hydroxylapatiet-kolom.

■ : 2nd IRPE

● : erythropoetine-preparaat

○ : erythropoetine-preparaat + ovo-albumine

De onderste abscis geeft de toegediende hoeveelheid van het preparaat aan.

Discussie

In dit hoofdstuk is een reeks experimenten beschreven die isolatie en zuivering van erythropoietine tot doel hadden. Voor erythropoietine-activiteit aanwezig in serum en urine werd achtereenvolgens bestudeerd dialyse en ultrafiltratie, gelfiltratie en voor erythropoietine-activiteit geïsoleerd uit serum adsorptie aan een hydroxylapatietgel. Bij dialyse door Visking membranen werd geen erythropoietine-activiteit verloren. Ultrafiltratie door een Visking membraan door middel van negatieve druk daarentegen leidde tot verlies van erythropoietine-activiteit uit het concentraat. Een deel van dat verlies kon teruggevonden worden in het dialysaat, na toevoeging van ovo-albumine; de dosis-respons-relatie van deze erythropoietine-activiteit verschilde van die van het uitgangsmateriaal, het concentraat en het 2nd IRPE, die onderling met betrekking tot deze parameter niet significant verschilden. Deze waarnemingen werden verricht met behulp van een door middel van gelfiltratie (zie onder) geïsoleerd erythropoietinepreparaat. Op grond hiervan veronderstellen wij dat erythropoietine door middel van ultrafiltratie in twee verschillende vormen wordt gescheiden, met klaarblijkelijke verschillen in biologische werkzaamheid. In principe zijn deze bevindingen niet in tegenspraak met de in het eerste hoofdstuk uitvoerig besproken experimenten van Lewis en medewerkers, die selectieve membraanpermeabiliteit gebruikten voor de zuivering van erythropoietine. Gelfiltratie over Sephadex G150 van erythropoietine-activiteit aanwezig in serum van konijn, rat en mens, en in urine van rat en mens liet zien dat erythropoietine-activiteit wordt geëluëerd als een enkelvoudige moleculaire entiteit met een verdelingscoëfficiënt van 0,43. Dit getal stemt overeen met de bevindingen van Lukowsky en Painter (1968). Gezien de reproduceerbaarheid van gelfiltratie, en het feit dat geen erythropoietine-activiteit wordt verloren bij het erbij noodzakelijke dialyseren en droogvriezen, werd deze methode gebruikt als eerste zuiveringsstap. De specifieke activiteit van op deze wijze uit serum en urine geïsoleerde erythropoietine-activiteit werd niet berekend; deze getallen zijn in hoofdzaak afhankelijk van de specifieke activiteit van het uitgangsmateriaal. Erythropoietine-activiteit werd vervolgens geadsorbeerd aan een hydroxylapatietgel (kolommenmethode). Elutie met een stapsgewijs in molariteit toenemende fosfaatbuffer gaf een tweetal volledig gescheiden pieken erythropoietine-activiteit. De eerste daarvan, geëluëerd met een fosfaatmolariteit in de orde van grootte van 10^{-3} molaïr bezat (tabel 34) een specifieke activiteit van ongeveer 5000 I.U. (ISB)/mg eiwit. De toevoeging van ovo-albumine aan dit preparaat was noodzakelijk voor expressie van de erythropoietine-activiteit, in overeenstemming met de

Tabel 34

	erythropoietine- activiteit I.U. (ISB)	eiwitgehalte	specifieke activiteit I.U. (ISB)/mg	zuiveringsfactor
serum	1. 179	37 µg	4800	45.000 x
	2. 351	45 mg	8	70 x

waarnemingen van Goldwasser en Kung (1968). Deze auteurs slaagden erin (1971) erythropoietine te zuiveren tot een specifieke activiteit van 8250 I.U. (ISB)/mg eiwit, met een rendement < 2%, uit schapeplasma. Uit menselijke urine werd door Espada et al. (1970, 1972) gezuiverd tot een specifieke activiteit van 8000 I.U. (ISB)/mg eiwit, met een rendement van 19%, in acht stappen. De belangrijkste contaminant in het preparaat van Goldwasser en Kung (1971) was erythropoietine zonder N-acetyl-neuraminezuur, dat in vivo niet, maar in vitro wel actief is. Het is waarschijnlijk dat ook ons preparaat, dat in twee zuiveringsstappen bereikt werd met een rendement van 11%, hiermee "verontreinigd" is.

Hydroxylapatietchromatografie is een empirische methode (Levin, 1968), waarvan de resolutie niet te voorspellen is op basis van eventueel bekende moleculaire eigenschappen. Eén van de kenmerken van de stapsgewijze elutie is een afname van het vermogen van de gel eiwit te adsorberen wanneer de fosfaatconcentratie wordt verhoogd. Het gevolg hiervan is dat de positie van een geadsorbeerd eiwit verandert bij een verandering van de fosfaatconcentratie. Op grond hiervan dient grote voorzichtigheid te worden betracht bij het afleiden van moleculaire eigenschappen uit het chromatografiegedrag van een eiwit geadsorbeerd aan hydroxylapatiet. Hier staat tegenover dat de erythropoietine-activiteit zeer reproduceerbaar in twee volledig gescheiden pieken werd geëluëerd. Het elutieprofiel wijst er bovendien niet op, dat dit verschijnsel zou worden veroorzaakt door inefficiënte elutie van de eerste piek, zodat aangenomen kan worden, dat een moleculair verschil de basis is voor de heterogeniteit van aan hydroxylapatiet geadsorbeerd erythropoietine.

Waarschijnlijk wordt een belangrijk deel van de in tabel 33 gemelde variabiliteit van de molariteit waarmee in het bijzonder de tweede piek erythropoietine-activiteit geëluëerd werd terug te voeren op variabiliteit van de specifieke weerstand van het opgebracht monster (15 - 35 kOhm/cm), op variaties in het elutieschema bestaande uit stapsgewijze toenemen-

de fosfaatconcentraties, en verschillen in het eiwitgehalte van het opgebrachte monster.

Het mechanisme waarmee ovo-albumine, zoals beschreven in dit en in het derde hoofdstuk, de biologische werking van erythropoetine potentiëert is onduidelijk. Goldwasser en Kung (1968) veronderstellen dat albumine, gelatine of orosomucoid oppervlaktedenaturatie van erythropoetine in verdunde oplossingen tegengaat. Een mogelijk alternatief is dat ovo-albumine de in vivo inactivatie van erythropoetine tegengaat, maar specifieke experimenten hierover zijn niet verricht.

THEORETISCHE GEVOLGTREKKINGEN UIT HET
EXPERIMENTELE ONDERZOEK OVER DE HUMORALE
REGULATIE VAN DE ERYTHROPOIESE

Inleiding

Het kan niet ontkend worden dat de meest logische en efficiënte regulatievorm voor het verspreid in het organisme liggend erythropoietische weefsel een humorale is. Ook voor andere differentiatielijnen van het hemopoietisch weefsel lijken regulerende humorale factoren als erythropoietine te bestaan. Waarschijnlijk wordt het hemopoietisch weefsel continu voorzien van regulators, die de vorming en het aantal van de hemopoietische eindcellen sturen. Metcalf en Moore (1970) vatten de rol van humorale regulators in de volgende veronderstelling samen: "at the intracellular level are repressor molecules produced by regulator genes; at the extracellular level are the microenvironmental inducing agents that operate sequentially in development and differentiation to limit the genetic potentialities of cells; and finally chalone and humoral regulators regulate mitotic activity and allow the system to adapt to environmental change". Het belang van onderzoek over de regulatie van de erythropoiese ligt in hoofdzaak bij de ontrafeling van de details van deze hypothese. Als zodanig vervult de erythropoiese een belangrijke modelfunctie als de enige hemopoietische differentiatielijn waarvoor een humorale regulator ondubbelzinnig vastgesteld is.

Het klinisch belang van de humorale erythropoieseregulatie is beperkt. Het onderscheid tussen primaire en secundaire polycythemie vergt slechts zelden bepaling van de erythropoietine-activiteit van het serum. Erythropoietinedeficiënties, anders dan bij nierinsufficiëntie zijn nooit aangetoond. Wanneer in de toekomst gezuiverde erythropoietinepreparaten op grote schaal ter beschikking zouden kunnen komen, kan overwogen worden hemodialysepatienten te behandelen met dergelijke preparaten, wanneer daarbij rekening wordt gehouden met het in het vierde hoofdstuk beschreven effect van de uremie op de werkzaamheid van erythropoietine.

Dit laatste hoofdstuk heeft tot doel enige gegevens samen te voegen tot veronderstellingen die in principe voor experimenteel onderzoek toegankelijk zijn. Wij zullen ons hierbij beperken tot enkele kenmerken van het terugkoppelingsmechanisme en de erythropoietine-targetcel interactie,

en geven tenslotte een overzicht van de stoornissen die in het regulatiemechanisme kunnen optreden.

Enkele kenmerken van het terugkoppelingsmechanisme van de erythropoïese

Een kwantitatieve benadering van de regulatie van de erythropoïese door middel van erythropoïetine werd in de openingsparagraaf van het eerste hoofdstuk genoemd in de vorm van het model van Mylrea en Abbrecht (1972), dat met behulp van een digitale computer kon worden vergeleken met experimentele gegevens. Zoals door Morley et al. (1970) werd uiteengezet, verloopt een dergelijk feedback-systeem noodzakelijkerwijze oscillerend door het tijdsverloop tussen de wijziging van de erythropoïetineconcentratie tengevolge van een verandering in het zuurstofaanbod, en de daaruit resulterende wijziging van de erythropoïese in de vorm van een veranderde reticulocytenproductie. Mylrea en Abbrecht voerden op grond van de experimentele gegevens van Gordon (1970) een tweede tijdsverloop in, en wel dat tussen de gewijzigde zuurstofvoorziening en de in respons daarop veranderde erythropoïetineproductie. Morley et al. (1970) namen inderdaad oscillaties waar bij de reticulocytenpromillage van honden in steady state erythropoïese. De periode van de oscillaties bedroeg 14 tot 16 dagen. Theoretisch bedraagt de periode van de oscillaties tweemaal het tijdsverloop dat er de oorzaak van is. In het geval van de erythropoïese zijn er een drietal mechanismen die het tot stand komen van oscillaties bemoeilijken. Een toenemende erythropoïese leidt tot een verkorting van de differentiatietijd van de erythroïde cellen, wat leidt tot een verkorting van het eerstgenoemde tijdsverloop. Er bestaat een kleine reserve aan reticulocyten, in functioneel opzicht eindcellen, in het beenmerg. De grote intravasculaire voorraad van in vergelijking tot de differentiatietijd lang levende erythrocyten geeft een grote verdunning van nieuwgevormde erythrocyten, tengevolge waarvan een oscillerende erythropoïese slechts in geringe mate tot uitdrukking zal komen in oscillaties van het totaal aantal circulerende erythrocyten.

Bij analyse van de erythropoïese van patienten met een niertransplantaat werd onder meer waargenomen, dat (1) de erythropoïese als reticulocytenproductie en stijging van de hemoglobineconcentratie in het bijzonder gerelateerd was aan het hemoglobinegehalte gedurende de eerste drie dagen na transplantatie, en (2) er een negatieve correlatie bestond tussen de erythropoïetinebepalingen die verricht werden rond de twaalfde en rond de dertigste dag na transplantatie, terwijl de erythropoïetineconcentraties wel in verband met genoemde, maar niet in ver-

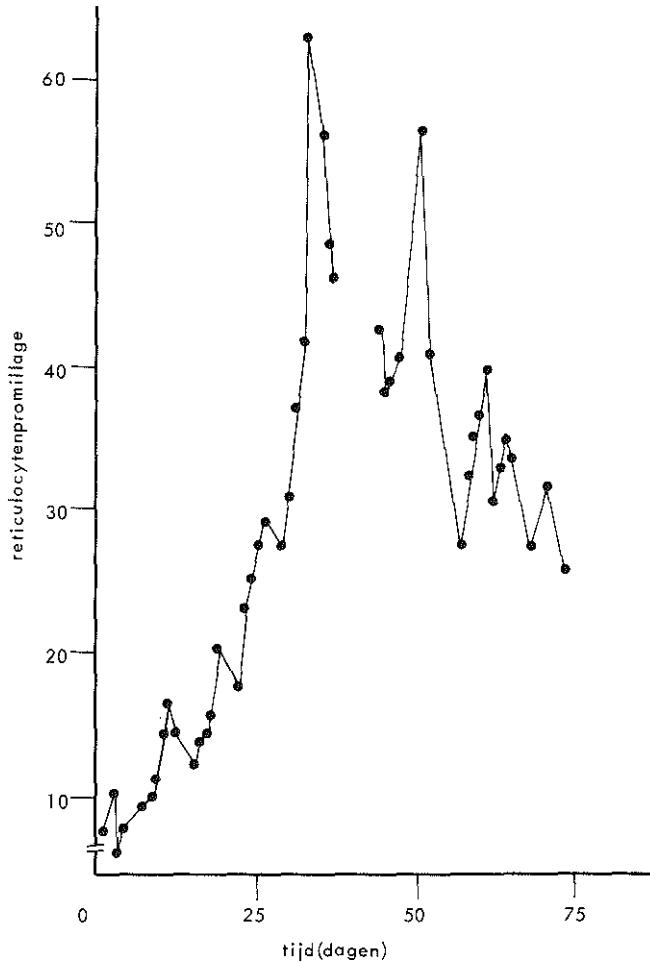


Fig. 59. Het verloop van het reticulocytenpromillage bij een patient met een transplantaat van de nier.

band met latere hemoglobineconcentraties gebracht konden worden. Deze twee waarnemingen wijzen erop, zoals werd besproken in de discussie van het vierde hoofdstuk, dat naast het hemoglobinegehalte (of de zuurstofvoorziening van de nier) een ander, ervan onafhankelijk mechanisme de erythropoietineconcentratie mede bepaalt. In overeenstemming met de waarnemingen zou dit mechanisme kunnen berusten op remming van de erythropoietineproductie door het circulerend erythropoietine. Deze gedachtegang komt overeen met de waarneming dat exogeen erythropoietine de vorming van endogeen erythropoietine remt (Zanjani et al., 1968), en met de daling, die in de erythropoietineconcentratie bij hypoxie optreedt reeds voordat de verhoogde erythropoietineconcentratie heeft kunnen leiden tot een in het perifere bloed waarneembare verhoogde erythropoiese (Fried et al., 1970).

Een dergelijke inhibitie van de productie door het product, in steady state van weinig belang, zou op zich oscillaties kunnen veroorzaken, en bovendien optreden als een mechanisme, dat in eerste instantie de oscillaties tengevolge van het tijdsverloop tussen verandering van erythropoietine- en reticulocytenproductie tegengaat *. In overeenstemming ermee namen wij betrekkelijk korte periodes van de fluctuaties van het reticulocytenaantal bij de niertransplantatiepatiënten waar (figuur 59 en figuur 60).

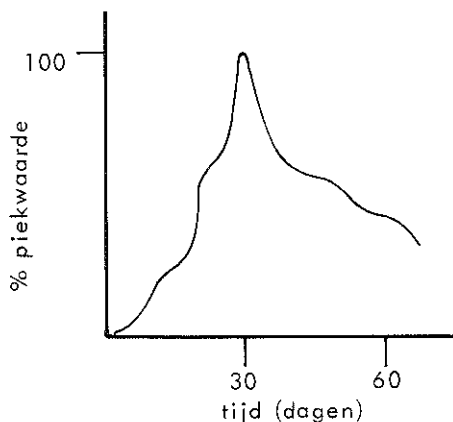


Fig. 60. Verloop van de reticulocytose bij patiënten met een transplantaat van de nier. De figuur is het gemiddelde van de genormaliseerde reticulocytose bij 17 patiënten.

De erythropoietine-targetcel interactie

De dosis-respons-relatie voor erythropoietine, zoals verkregen bij de experimenten van hoofdstuk III, is goed benaderbaar door een hyperbool, die na omzetting op semi-logarithmische schaal een sigmoïde curve geeft (figuur 61). De eenvoud van deze functie, die zonder moeite in één van de receptortheorieën te passen zou zijn, is betrekkelijk verrassend gezien de gevolgde meetmethode. Toediening van erythropoietine aan een polycythemische muis leidt tot een complex van erythroïde differentiatie en proliferatie (exponentiële toename), waarbij een deel van de hoeveelheid eindcellen tenslotte wordt gemeten aan de hand van de hoeveelheid ^{59}Fe die enkele dagen later in 24 uur in nieuwgevormde erythrocyten is ingebouwd. Dit is in figuur 62 weergegeven. Afgezien van de meetmethode is ook de werking van erythropoietine op het erythroïde systeem complex, te weten drieledig: (1) inductie van erythroïde differentiatie bij de ERC; (2) versnelling van

* indien de oscillaties als gevolg van de veronderstelde inhibitie niet in fase zijn met die tengevolge van het tijdsverloop, is hier een verklaring geschetst voor het ontstaan van de "reticulocytencrise"

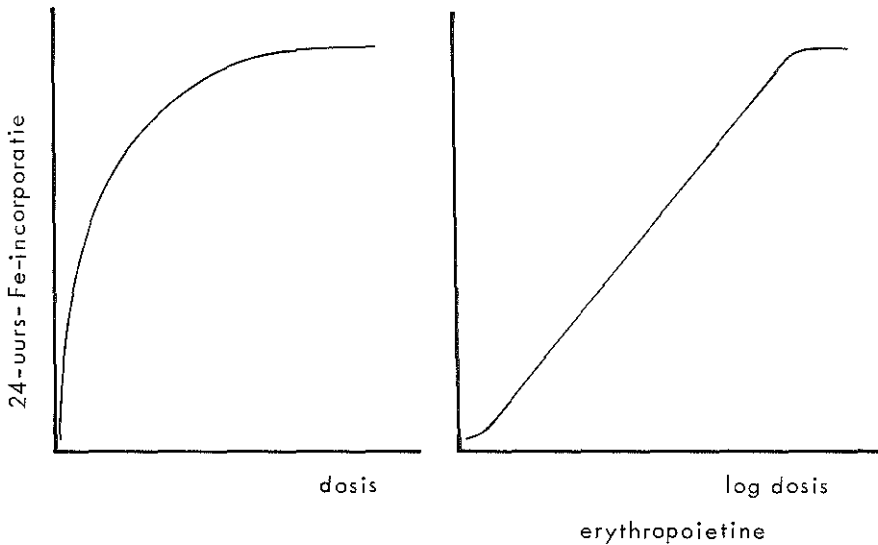


Fig. 61. De dosis-respons-relatie voor het effect van erythropoetine bij de posthypoxische polycythemische muis op lineaire (links) en op semi-logaritmische (rechts) schaal.

de erythroïde differentiatie bij rijpende erythroïde cellen; en (3) stimulering van de ERC-proliferatie.

Uit de eenvoudige betrekking tussen dosis erythropoetine en respons gemeten als ^{59}Fe -incorporatie in het perifere bloed kan in eerste instantie worden afgeleid, dat de interactie tussen erythropoetine en targetcel in biologische zin eveneens eenvoudig verloopt, d.w.z. dat de respons een eenvoudige functie is van het aantal targetcellen en de erythropoetineconcentratie. In feite is de dosis-respons-relatie weinig meer dan een directe weergave van deze interactie, aangezien: (a) bij de polycythemische muis het effect van een enkelvoudige* kleine dosis erythropoetine in verband met de korte halfwaardetijd ervan uitsluitend inductie van erythroïde differentiatie in op het moment van toediening aanwezige ERC's is; (b) de exponentiële toename van het aantal erythroïde dochtercellen van de ERC de respons uitsluitend lineair beïnvloedt: erythroïde differentiatie uit a ERC's, waarvan de dochtercellen gedurende de erythroïde differentiatie $n + p$ delingen doormaken geeft een respons van $a \cdot 2^{n+p}$ erythroïde cellen; (c) de po-

* deze redenering is gebaseerd op toediening van een enkelvoudige kleine dosis erythropoetine; in hoofdstuk III is experimenteel aangetoond dat het gebruik van meerdere gelijke deeldoses met relatief kleine tijdsintervallen slechts leidt tot geringe kwantitatieve verschillen

pulatie differentiërende erythroïde cellen zich als een homogeen kohort gedraagt; en (d) de 24-uurs-%⁵⁹Fe-incorporatie in lineair verband staat tot de totale ⁵⁹Fe-incorporatie (zie hoofdstuk III) en eveneens lineair gerelateerd is aan de totale hoeveelheid reticulocyten.

Wanneer op grond van deze argumenten geconcludeerd wordt, dat de dosis-respons-relatie voor erythropoïetine nauwkeurig de erythropoïetine-targetcel interactie weergeeft, is het aanvaardbaar de meetmethode met de polycythemische muis zowel te gebruiken voor erythropoïetinemetingen als voor de bepaling van het aantal ERC's dat op een bepaald moment aanwezig is. In dit licht is de overshoot als functie van

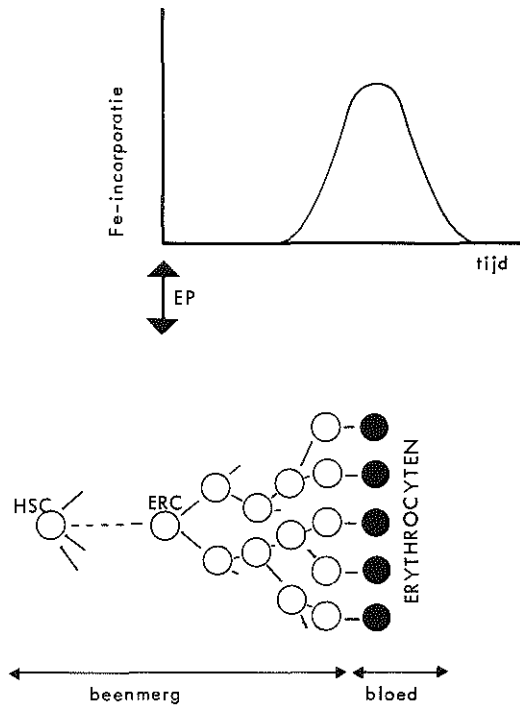


Fig. 62. De relatie tussen cellulaire erythroïde differentiatie en Fe-incorporatie gemeten in het perifere bloed bij de posthypoxische polycythemische muis.

Verklaring der symbolen:

HSC : hemopoietische stamcel

ERC : voor erythropoïetine gevoelige cel

EP : erythropoïetine

de posthypoxische tijd, die door ons voor het aantal ERC's werd waargenomen, van meer betekenis dan alleen als factor die de gevoeligheid van de biologische bepalingsmethode voor erythropoietine gunstig beïnvloedt. De overshoot treedt op in afwezigheid van erythropoietine, zodat vastgesteld kan worden dat de aanvankelijke toename en de eropvolgende afname onafhankelijk van erythropoietine optreedt. Kennelijk hebben wij hier de vinger gelegd op een terugkoppelingsmechanisme dat de grootte van het ERC-compartiment bepaalt, en dat voor nader onderzoek vatbaar is*.

De pathologie van de humorale regulatie van de erythropoiese

Door de relatief lange differentiatietijd van het erythroïde systeem en de lange levensduur van de erythrocyt is het humorale regelmechanisme van de erythropoiese slechts geschikt voor een adaptatie van het organisme op lange termijn aan een gewijzigde zuurstofvoorziening. Een indruk van de lengte van die termijn geeft ons onderzoek bij patiënten met een transplantaat van de nier, zij het dat hierbij het ongunstige effect van de aanvankelijke renale toxemie op de erythropoiese mede in beschouwing moet worden getrokken. De traagheid van de regulatie manifesteert zich eveneens in de pathologie van de erythropoiese, in die zin dat een aandoening slechts langzaam in het hemoglobinegehalte tot uitdrukking komt; hetzelfde geldt over het algemeen voor therapie.

De differentiaaldiagnostische waarde van de erythropoietinebepaling kan het best worden besproken aan de hand van het feedback-mechanisme, zoals dat in de loop van dit onderzoek werd gehanteerd. Wij zijn hierbij voor een belangrijk deel aangewezen op een theoretische afleiding, en moeten mogelijke kwantitatieve verschillen, zoals die waarschijnlijk bestaan voor de erythropoietineconcentratie bij aplastische anemie en PRCA enerzijds, en de deficiëntie-nemieën anderzijds (zie hoofdstuk IV B) in het midden laten. Het ontbreken van voldoende kwantitatieve gegevens over erythropoietineconcentraties bij verschillende ziektebeelden berust in hoofdzaak op het ontbreken van een eenvoudig toepasbare, goed gestandaardiseerde meetmethodiek. Wij verrichtten een reeks klinische bepalingen, die wel gestandaardiseerd waren, maar beperkt in aantal gebleven zijn door enerzijds het beperkte patientenaanbod, anderzijds de kostbare en bewerkelijke bepalingsmethode.

Figuur 63 is een schematisch overzicht van het feedback-mechanisme tussen nier en erythroïd weefsel, waarbij grof schematiserend een viertal categorieën erythropoietische aandoeningen is aangegeven aan de hand van de parameters hemoglobineconcentratie en erythropoietine-activiteit.

* een identieke overshoot werd inmiddels door ons aangetoond voor de CFU-S-populatie

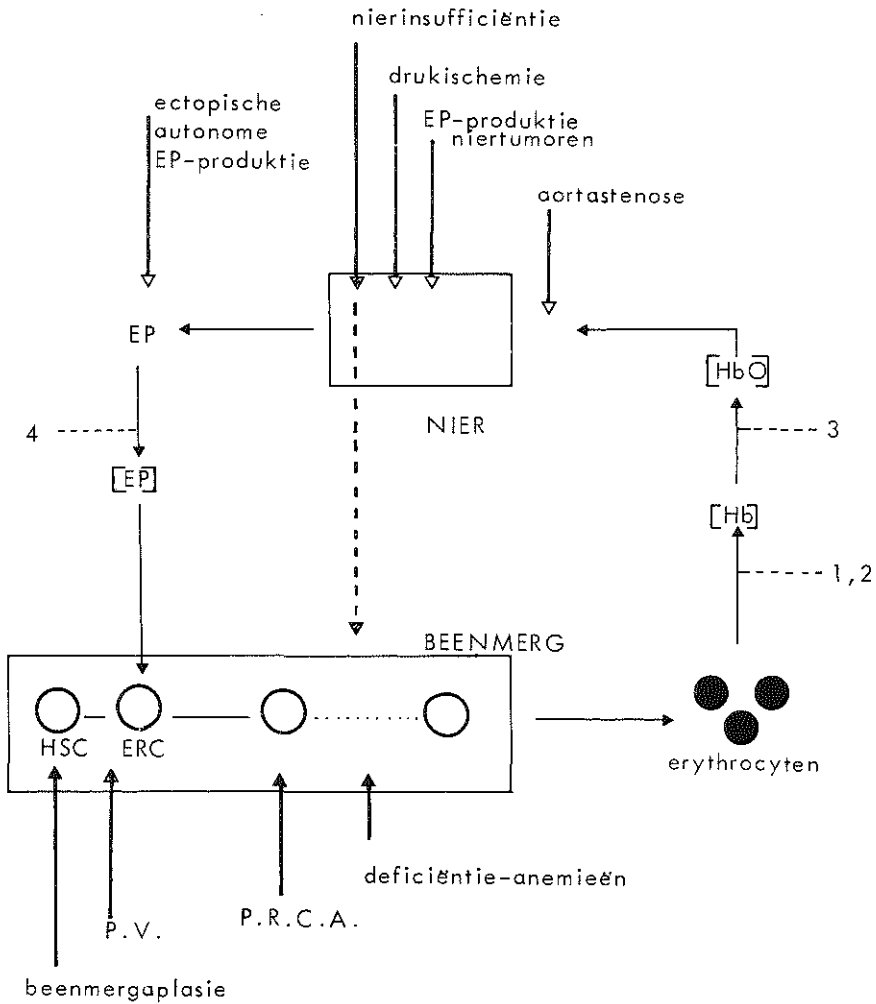


Fig. 63. Overzicht van de pathologie van de humorale regulatie van de erythropoïese.

Verklaring der symbolen:

1. plasmavolume
2. levensduur van de erythrocyt
3. arteriële pO_2
4. distributievolume en halfwaardetijd voor erythropoïetine

- ↑ : $Hb \downarrow$, $EP \downarrow$: nierinsufficiëntie
- ↑ : $Hb \uparrow$, $EP \downarrow$: polycythemie vera (P.V.)
- ↑ : $Hb \uparrow$, $EP \uparrow$: secundaire polycythemie
- ↑ : $Hb \downarrow$, $EP \uparrow$: anemie

HSC : hemopoïetische stamcel
 ERC : voor erythropoïetine gevoelige cel
 PRCA : pure red cell aplasia
 EP : erythropoïetine

Op deze vier hoofdcategorieën zijn een groot aantal verfijningen mogelijk, maar een vergaande onderverdeling valt buiten de opzet van deze tekst. Opgemerkt zij nogmaals, dat de differentiaaldiagnostische waarde van de erythropoietinebepaling in hoofdzaak berust bij het onderscheid tussen primaire en secundaire polycythemie, en, incidenteel, als aanvullende diagnostiek bij een anemie e.c.i.

SAMENVATTING

De humorale regulatie van de erythropoïese kan worden opgevat als een negatief humoraal feedback-mechanisme, waarbij erythropoïetine, geproduceerd aan de hand van een centraal gemeten behoefte aan erythrocyten, erythroïde differentiatie induceert in een morfologisch niet geïdentificeerde primitieve hemopoïetische cel, die met de operationele term ERC is aangeduid. Binnen dit eenvoudige concept werd een drietal aspecten van de humorale regulatie van de erythropoïese onderzocht.

In het derde hoofdstuk werd het effect van erythropoïetine bij de posthypoxische polycythemische muis besproken. Op basis van een relatief korte (totaal: 72 uur) intermitterende blootstelling aan een diepe (4 - 5% O₂) hypoxie, en de toediening van erythropoïetine-activiteit in drie deeldoses met intervallen van 12 uur, werd een bio-assay uitgewerkt, gekenmerkt door een lineaire log-dosis-respons-relatie van 10 tot 500 ml.U. (ISB), een kleinst aantoonbare dosis erythropoïetine-activiteit van 8 ml.U. (ISB) en een nauwkeurigheid van 10 tot 15%. De gevoeligheid van de meetmethode berust voor een belangrijk deel op een voorbijgaande hoge gevoeligheid voor erythropoïetine, die door ons werd toegeschreven aan veranderingen in de grootte van de ERC-populatie, en op de potentiëring van het effect van erythropoïetine door een voorafgaande dosis erythropoïetine. Het was mogelijk om met behulp van deze meetmethode erythropoïetine-activiteit in het serum van hematologisch normale individuen aan te tonen, op basis waarvan normaal circulerende erythropoïetine-activiteit bij de mens werd geschat op 2 tot 5 I.U. (ISB)/liter serum. In het serum van patiënten met polycythemia vera en anemie tengevolge van ernstige nierinsufficiëntie (hemodialyse) kon geen erythropoïetine-activiteit aangetroffen worden. Bij patiënten met secundaire polycythemie werd een verhoogde erythropoïetine-activiteit in het serum gevonden, en sterk verhoogde waarden werden gevonden bij patiënten met anemie tengevolge van beenmergaplasie en pure red cell aplasia. De verkregen getallen werden door ons gestandaardiseerd in de eenheid van het 2nd IRPE.

Het vierde hoofdstuk bevat een beschrijving van een onderzoek over de regulatie van de erythropoïese bij patiënten met een allotransplantaat van de nier. Bij deze patiënten bestaat een anemie tengevolge van de nierinsufficiëntie voor transplantatie, waarvan aangenomen kan worden dat deze voor een belangrijk deel op erythropoïetine-deficiëntie berust. Van transplantatie van een nier wordt verondersteld dat zowel de exocriene nierfunctie als de erythropoïetineproductie wordt genormaliseerd. Door ons werd het verband tussen de hemoglobineconcentratie, de optredende reticulocytose, en de stijging van de hemoglobineconcentratie tot normale waarden gekwantificeerd door middel van correlatierkening en regressie-analyse. De op twee verschillende tijdstippen ge-

meten erythropoietine-activiteit van het serum van deze patienten completeerde het verband tussen initieel hemoglobinegehalte en reticulocytose. Vastgesteld werd dat de werkzaamheid van erythropoietine kan worden beschreven als een functie van de in de aanvankelijke periode nog bestaande renale toxemie, uitgedrukt als ureum- en creatinineconcentratie van het serum. Deze afname van de effectiviteit van erythropoietine bij toename van de renale toxemie geeft een indicatie voor de rol van deze laatste bij de genese van de anemie bij ernstige nierinsufficiëntie. Het is het mechanisme van de na niertransplantatie vertraagd optredende reticulocytose, waarbij de grootte van de vertraging samenhangt met de snelheid waarmee de exocriene nierfunctie verbetert.

Op grond van de gegevens werd gepostuleerd dat de productie van erythropoietine mede wordt bepaald door de hoeveelheid circulerend erythropoietine. Een dergelijke product-inhibitie werd in het zesde hoofdstuk in theoretisch verband besproken, in samenhang met fluctuaties waargenomen bij de reticulocytenproductie van de patienten met een transplantaat van de nier.

In het vijfde hoofdstuk werd een reeks experimenten beschreven die tot doel hadden de isolatie en zuivering van erythropoietine te bestuderen uit serum en urine van anemische proefdieren en aplastische patienten. Bij gelfiltratie over Sephadex G150 wordt erythropoietine-activiteit geëluëerd als een homogene moleculaire entiteit met een verdelingscoëfficiënt van 0,43, een gemiddelde, verkregen uit experimenten met sera van rat, konijn en mens, en urines van rat en mens. De verschillen verkregen bij de berekening van de verdelingscoëfficiënt waren voor deze verschillende uitgangsmaterialen niet significant.

Bij negatieve-druk-dialyse van erythropoietisch actieve urine werd binnen het dialysemembraan een aanzienlijke hoeveelheid erythropoietine-activiteit verloren, die in het dialysaat slechts ten dele kon worden teruggevonden na toevoeging van het op zich erythropoietisch inactieve ovo-albumine. Uit de experimenten werd afgeleid, dat de erythropoietine-activiteit die zich bij gelfiltratie homogeen gedraagt door middel van negatieve-druk-dialyse te scheiden is in een tweetal vormen met verschillende eigenschappen voorzover het de biologische activiteit betreft.

Vervolgens werd adsorptie van de erythropoietine-activiteit aan een hydroxylapatietgel bestudeerd, aanvankelijk voor erythropoietine-activiteit door gelfiltratie bereid uit het serum van anemische ratten, later ook voor activiteit op dezelfde wijze bereid uit menselijk serum en menselijke urine. Bij elk van de experimenten werd de erythropoietine-activiteit in twee volledig gescheiden fracties geëluëerd, zodat ook hier de conclusie van twee vormen erythropoietine zich opdringt. Met behulp

van de adsorptie aan hydroxylapatiet gelukte het fracties te verkrijgen uit menselijk serum van 5000 I.U. (ISB)/mg eiwit (opbrengst: 11%) door middel van twee zuiveringsstappen.

SUMMARY

The regulation of erythropoiesis is considered to be a negative humoral control mechanism, the primary regulator being a glycoprotein called erythropoietin. This regulator is produced by the kidney in response to a need for erythrocytes. It induces erythroid differentiation in a primitive hemopoietic cell, designated as ERC (erythropoietin responsive cell), which has not been morphologically identified, and accelerates the maturation of hemoglobin producing cells. This simple concept is the basis for the work presented in this thesis and is supported by the literature data which constitute the first chapter.

In the third chapter, the effect of injection of an erythropoietin preparation into exhypoxic polycythemic mice is described. Polycythemia was induced by a short (total: 72 h) intermittent exposure (8 h/day, 9 days) to a low (4 - 5%) oxygen tension. The erythropoietin preparation was injected in three divided doses with time intervals of 12 h. This procedure resulted in a bioassay characterised by a linear log-dose-response relationship ranging from 10 to 500 ml.U. (ISB), an average smallest detectable dose of 8 ml.U.(ISB) and an accuracy of 10 - 15%. The sensitivity of the assay is partly based on a transiently increased sensitivity to erythropoietin a few days after termination of hypoxia, which was attributed to changes in the size of the ERC population, and partly on the potentiation of the effect of erythropoietin by a previous dose of erythropoietin.

This bioassay allowed measurements of erythropoietin activity in sera of normal human individuals. Reference values for circulating erythropoietin in hematologically normal humans were estimated to be 2 - 5 I.U. (ISB) per liter of plasma. The clinical relevance of the assay was investigated by measurements of erythropoietin activity in a small series of patients with disorders affecting erythropoiesis. The serum of patients with primary polycythemia and patients suffering from severe renal disease, for which they were treated with hemodialysis, did not contain detectable levels of erythropoietin activity. Serum erythropoietin activity was elevated in patients with polycythemia secondary to other diseases, and highly elevated levels of erythropoietin activity were observed in the serum of patients with bone marrow or pure red cell aplasia. The data obtained are standardized according to units established by the 2nd IRPE.

The fourth chapter deals with an investigation concerning the regulation of erythropoiesis in kidney transplanted patients. Before transplantation, these patients develop a severe anemia, probably due primarily to a deficiency of erythropoietin. Kidney transplantation is supposed to restore both exocrine kidney functions and erythropoietin production. The relationship between hemoglobin concentration, reticulocytosis and

subsequent increase in hemoglobin concentration was quantified by means of correlation and regression analysis. It was observed that erythropoiesis following renal allotransplantation is closely related to the hemoglobin level existing in the first few days after transplantation. Reticulocytosis following transplantation shows a delay; the delay is proportional to the rate at which renal toxemia, expressed as serum creatinine and urea levels, improves.

Measurements of erythropoietin levels in serum and urine at days 12 and 30 after transplantation demonstrated a relationship between erythropoietin level and hemoglobin level at the first but not at the second point of time and a relationship between erythropoietin level and reticulocyte count at the second but not at the first point of time. An inverse relationship between these two erythropoietin levels may suggest that erythropoietin production is inhibited by the level of circulating erythropoietin. This hypothesis is discussed in the sixth chapter, in relation to fluctuations shown to occur in reticulocyte production following renal transplantation.

Finally, it was observed that the effectiveness of erythropoietin, expressed as reticulocyte count per I.U. (ISB) erythropoietin, could be described as a function of renal toxemia, i.e., the effectiveness of erythropoietin decreases rapidly as renal toxemia increases. This fact explained the delayed reticulocyte response mentioned earlier and is an indication of the role of renal toxemia in the pathogenesis of anemia in states of severe renal failure.

The fifth chapter contains a description of experiments designed to study the isolation and purification of erythropoietin from serum and urine of animals with phenylhydrazine induced anemia and of patients with bone marrow or pure red cell aplasia.

Gel filtration revealed that erythropoietin is eluted as a single homogeneous molecular entity with a partition coefficient of 0.43; this is the average figure obtained from experiments performed with rat, rabbit and human serum, and rat and human urine. Slight differences in partition coefficients for these different sources of erythropoietin activity were within the limits of the experimental error.

Ultrafiltration of urine rich in erythropoietin activity through Visking dialysis membranes by means of negative pressure resulted in a relatively large loss of erythropoietin activity, part of which could be recovered from the filtrate after addition of ovoalbumin, which in itself does not possess erythropoietic activity. It was further demonstrated that the erythropoietin activity which is eluted as a single homogeneous peak by gel filtration may be separated into two forms of erythropoietin activity, apparently with different biological activity, by ultrafiltration. Subsequently, adsorption of erythropoietin activity to a hydroxy-apatite column was studied. It was demonstrated that erythropoietin activity which is eluted as a single peak by gel filtration is invariably eluted

from hydroxy-apatite as two completely separated fractions, again indicating two forms of erythropoietin activity.

Adsorption of erythropoietin activity isolated by gel filtration from human serum to hydroxy-apatite resulted in a fraction with a specific activity of approximately 5000 I.U. (ISB)/mg protein, with a recovery of 11% of the initial erythropoietin activity. This highly purified erythropoietin required the addition of ovalbumin for expression of its erythropoiesis stimulating activity. It might be emphasized that this result was obtained with two purification steps.

APPENDIX

APPENDIX

Gegevens over de patienten vermeld in hoofdstuk IV

Tabel 1. geslacht en uiteindelijk bereikte hemoglobineconcentratie van de 25 bij het onderzoek betrokken patienten.
De nummering geeft de volgorde van transplantatie aan.

nr.	Hb- concentratie	geslacht	nr.	Hb- concentratie	geslacht
1	a	m	14	n	v
2	n	v	15	p	v
3	n	m	16	-**	m
4	n	m	17	p	v
5	n	m	18	-***	m
6	n	m	19	n	m
7	n	m	20	p	v
8	p	v	21	n	v
9	n	v	22	n	v
10	n	m	23	n	m
11	n	m	24	n	m
12	n	v	25	n	v
13	-*	m			

a : verlaagde hemoglobineconcentratie

n : hemoglobineconcentratie binnen normale grenzen

p : verhoogde hemoglobineconcentratie

m : mannelijk

v : vrouwelijk

* overleden

** nefrectomie

*** onvoldoende gegevens

Tabel 2 hemoglobineconcentratie tijdens de eerste dagen na transplantatie parameters voor de reticulocytose, en stijging van de hemoglobineconcentratie bij 17 patiënten met een transplantaat van de nier

nr.	Hb ₀	Hb ₁	Hb ₂	Hb _{1α}	Ret _{ht} o/oo	†Ret dagen	Hb-stijging μmol(Fe)/1/dag
		mmol(Fe)/liter					
2	3,6	3,9	3,8	2,9	64	42	71
3	4,3	4,7	4,3	3,6	75	45	83
4	4,0	4,5	4,5	4,0	71	30	84
5	4,3	5,4	5,5	3,1	58	28	77
6	4,3	5,5	4,8	3,0	46	14	79
7	5,0	5,7	4,6	4,0	78	28	88
9	3,9	5,1	4,9	3,8	61	19	103
10	6,2	9,5	8,7	4,6	33	12	34
11	3,9	5,8	5,9	3,9	53	23	61
12	4,9	4,9	3,9	2,9	68	34	93
14	3,4	4,6	6,0	3,2	64	33	70
19	3,2	3,5	4,4	3,2	63	38	47
21	2,6	3,8	4,8	2,6	73	18	139
22	2,5	4,3	3,4	2,0	81	33	105
23	6,3	6,3	5,4	3,1	64	31	59
24	4,8	4,5	4,4	2,7	60	34	80
25	2,9	4,4	4,8	2,8	64	29	69

Tabel 3 immunosuppressieve therapie gedurende de eerste dertig dagen na transplantatie

patient nr.	actinomycine C kg	azathioprine mg*	prednison mg*	hydrocortison mg
2	1200	2000	2800	600
3	800	3100	1800	800
4	1200	4100	3100	1000
5	1000	4000	2400	800
6	1200	4200	2900	800
7	1200	4500	3500	900
9	1200	3700	3700	650
10	800	3400	3100	800
11	1400	4000	4200	800
12	1200	3600	4100	700
14	1000	3100	3500	800
19	200	1900	3300	700
21	200	4500	2700	700
22	400	2800	3700	600
23	400	2500	3700	800
24	800	3500	3900	800
25	0	3600	3200	800

* afgerond

NAWOORD

In de eerste plaats wil ik mijn ouders dankzeggen. Zij hebben de mogelijkheid geschapen voor mijn studie in de geneeskunde, en gaven mij de vrijheid deze op mijn eigen wijze te doen verlopen.

Veel dank ben ik verschuldigd aan Prof.dr. B. Leijnse voor de geboden gelegenheid het in dit proefschrift beschreven onderzoek uit te voeren, en voor zijn belangstelling en kritisch commentaar bij de voltooiing van het manuscript.

Dr. H.G. van Eijk en Dr. L.D.F. Lameijer zij dank gezegd voor de uitstekende samenwerking bij de uitvoering van delen van het onderzoek. Evenals Prof.dr. D.W. van Bekkum hebben zij het manuscript als coreferenten van waardevolle aantekeningen voorzien.

Veel dank gaat uit naar de heer P. Backhuys wiens toegewijde en bekwame assistentie voor het onderzoek van grote waarde is geweest, en naar Mevr. J.A.T. Nooteboom-den Herder voor de uiteindelijke vormgeving van het manuscript.

Tenslotte ben ik dank verschuldigd aan Dr. A. Ford (Gezondheidsorganisatie TNO) voor correctie van de Summary, aan Mevr. Y.C.H.C. Schönherr-Scholtes en Mej. W. Stok voor hun hulp bij het onderzoek bij patienten met een niertransplantaat, en voorts aan de heer J. Kruis voor werkzaamheden van uiteenlopende aard.

Dit proefschrift is, als enkele andere, voortgekomen uit een keuzepacticum in het derde studiejaar. Het keuzepacticum beoogde volgens de studiegids 1967/1968 van de toenmalige Medische Faculteit Rotterdam "een aantal studenten te activeren tot belangstelling voor wetenschappelijk onderzoek". Reeds voordat de eerste keuzepactica werden uitgevoerd was deze eenvoudig geformuleerde doelstelling vervangen. De reden daarvan ligt misschien voor de hand. In de direct eropvolgende fase tot het artsexamen, bestaat de studie uitsluitend uit het leren hanteren van reeds bestaande kennis in een studierooster dat geen ruimte laat voor wetenschappelijk onderzoek. Het is mogelijk dat in deze tijd hierover niet wordt getreurd. De geneeskunde is echter gebaat bij een groep tot wetenschappelijk onderzoek opgeleide geneeskundigen. Het zou toe te juichen zijn dat de zeer kleine groep studenten die zich tot onderzoek willen bekwamen daartoe een studieverloop kunnen kiezen waarin deze wens niet in conflict komt met de opleiding tot arts.

- Abbrecht, P.H. and Greene, J.A. - *Ann.Int.Med.* 65 (1966), 908.
- Adamson, J.W., Alexanian, R., Martinez, C. et al. -
Blood 28 (1966) 354.
- Alexanian, R. - *Blood* 28 (1966) 344.
- Allen, R.C., Moore, D.J. and Fisher, J.W. - *Ann.N.Y.Acad.Sci.*
149 (1968) 63.
- Andrews, P. - *Biochem. J.* 91 (1964) 222.
- Annable, L., Cotes, P.M. and Murrett, M.V. - *Bull.WHO* 47 (1972)
99.
- Bayliss, W.M. and Starling, E.E. - *J. Physiol.(London)* 28 (1902) 325.
- Boer, N.C. den, Bakker, N.J. en Leijnse, B. - *Ned.T. Geneesk.*
116 (1972) 373.
- Bonsdorff, E. and Jalavisto, E. - *Acta Physiol.Scandinav.* 16 (1948)
150.
- Borsook, H. - In: *Kinetics of cellular proliferation*; ed. by F. Stohlman
Jr. New York, Grune and Stratton, 1959, p. 357.
- Bozzini, C.E. - *Acta Physiol. Latinoam.* 16 (1966) 313.
- Burke, W.T. and Morse, B.S. - In: *Erythropoiesis*; ed. by L.O.
Jacobson and M. Doyle. New York, Grune and Stratton, 1962,
p. 111.
- Camiscoli, J.F., Weintraub, A.H. and Gordon, A.S. - *Ann. N.Y.*
Acad.Sci. 149 (1968) 40.
- Camiscoli, J.F. and Gordon, A.S. - In: *Regulation of hematopoiesis*;
ed. by A.S. Gordon. 1 (1970) 369.
- Cantor, L.N., Zanjani, E.D., Wong, K.K. et al. - *Proc.Soc.Exp.*
Biol.Med. 130 (1969) 950.
- Carnot, P. and Deflandre, C. - *Compt.Rend.Acad.Sci.* 143 (1906a)
384.
- Carnot, P. and Deflandre, C. - *Compt.Rend.Acad.Sci.* 143 (1906b)
432.
- Castaldi, P.A., Rozenberg, M.C. and Stewart, J.H. - *The Lancet*
II (1966) 66.
- Congdon, C.C. - In: *Prog. Hematol.* 2 (1959) 21.
- Contrera, J.F., Camiscoli, J.F., Weintraub, A.H. et al. -
Blood 25 (1965) 809.
- Contrera, J.F. and Gordon, A.S. - *Science* 152 (1966a) 653.
- Contrera, J.F., Gordon, A.S. and Weintraub, A.H. - *Blood* 28
(1966b) 330.
- Contrera, J.F. and Gordon, A.S. - *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 149 (1968)
114.
- Cotes, P.M. and Bangham, D.R. - *Nature* 191 (1961) 1065.
- Cotes, P.M. and Bangham, D.R. - *Bull.WHO* 35 (1966)
751.
- Cotes, P.M. - *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 149 (1968) 12.
- Cudkovic, G., Burnett, M. and Sheares, G.M. - *Science* 144 (1964)
866.
- Davis, J.E. - *Proc.Soc.Exp Biol.Med.* 104 (1960) 698.

- Denny, W.F., Flanigan, W.J. and Zukoski, C.F. - *J.Lab.Clin.Med.* 67 (1966) 386.
- Dorado, M., Langton, A.A., Brandan, N.C. et al. - *Biochem. Med.* 6 (1972) 238.
- Dorado, M., Espada, J., Langton, A.A. et al. - *Biochem. Med.* 10 (1974) 1.
- Dukes, P.P., Hammond, D. and Shore, N.A. - *J.Lab.Clin.Med.* 74 (1969) 250.
- Dukes, P.P., Hammond, D., Shore, N.A. et al. - *Isr. J. Med.Sci.* 7 (1971) 919.
- Dunn, C.D.R., Jarvis, J.H. and Greenman, J.M. - *Exp.Hemat.* 3 (1975) 65.
- DeDüve, C. and Baudhuin, P. - *Physiol. Rev.* 46 (1966) 323.
- Dyke, D.C. van and Pollycove, M. - In: *Erythropoiesis*; ed. by L.O. Jacobson and M. Doyle. New York, Grune and Stratton, 1962, p. 340.
- Epifanova, O.I. and Terskikh, V.V. - *Cell Tissue Kinet.* 2 (1969), 75.
- Erslev, A.J. - *Blood* 8 (1953) 349.
- Erslev, A.J. - *Arch. Internal Med.* 101 (1958) 407.
- Erslev, A.J. - *Blood* 14 (1959) 386.
- Erslev, A.J. and Thorling, E.B. - *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 149 (1968) 173.
- Erslev, A.J. - *Arch. Internal Med.* 126 (1970) 774.
- Espada, J. and Gutnisky, A. - *Acta Physiol. Latinoam.* 20 (1970) 122.
- Espada, J. and Gutnisky, A. - *Biochem. Med.* 3 (1970) 475.
- Espada, J., Langton, A.A. and Dorado, M. - *Biochem.Biophys.Acta* 285 (1972) 427.
- Filmanowicz, E. and Gurney, C.W. - *J.Lab.Clin.Med.* 57 (1961) 65.
- Finch, C.A. and Coleman, D.H. - *Sang.* 26 (1955) 232.
- Finch, C.A., Deubelbeiss, K., Cook, J.D. et al. - *Medicine* 17 (1970) 49.
- Fisher, J.W., Sammels, A.I. and Langston, J.W. - *J.Pharm.Exp.Ther.* 157 (1967a) 618.
- Fisher, J.W. and Sammels, A.I. - *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 125 (1967b) 482.
- Fisher, J.W., Sammels, A.I. and Langston, J.W. - *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 149 (1968) 308.
- Fisher, J.W. - In: *The biological basis of medicine*; ed. by E.E. Bittar and N. Bittar. London, New York, Academic Press, 3 (1969) p. 41.
- Fisher, J.W., Thompson, J.F. and Espada, J. - In: *Erythropoiesis, regulatory mechanisms and developmental aspects*; ed. by Y. Matoth. New York, London, Academic Press, 1971, p. 51.
- Fisher, S. and Roheim, P.S. - *Nature* 200 (1963) 899.
- Fogh, J. - *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 18 (1966) 33.
- Fogh, J. - *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 149 (1968) 217.
- Fogh, J. - *Blood* 35 (1970) 476.

- Fried, W., Plzak, L., Jacobson, L.O. et al. - *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 92 (1956), 203.
- Fried, W., Plzak, L., Jacobson, L.O. et al. - *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 94 (1957) 237.
- Fried, W., Johnson, C. and Heller, P. - *Clin.Res.* 15 (1967) 276.
- Fried, W., Johnson, O. and Heller, P. - *Blood* 36 (1970) 607.
- Friederici, L. - *Blut* 10 (1964), 1.
- Gallagher, N.I., McCarthy, J.M., Hart, K.T. et al. - *Blood* 14 (1959) 662.
- Gallagher, N.I. and Lange, R.D. - *Clin.Res.* 8 (1960) 280.
- Gallagher, N.I., McCarthy, J.M. and Lange, R.D. - *Ann. Internal Med.* 52 (1960) 1201.
- Gallagher, N.I., Hagan, D.Q., McCarthy, J.M. et al. - *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 106 (1961) 127.
- Gallagher, N.I., Seifert, G.L., Callinan, J.L. et al. - *J.Lab.Clin.Med.* 61 (1963) 258.
- Ganguly, M. and Westphal, U. - *J.Biol.Chem.* 243 (1968) 6130.
- Ganzoni, A., Hillman, R.S. and Finch, C.A. - *Brit.J. Haemat.* 16 (1969) 119.
- Garcia, J.F. - In: *Symposium Radioimmunoassay and related procedures in clinical medicine and research, Istanbul (Turkey), Int. Atomic Energy Agency, 1973, p. 1.*
- Goldwasser, E. and Kung, C. K.H. - *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 149 (1968) 49.
- Goldwasser, E. and Kung, C. K. H. - *Proc.Nat.Acad.Sci.* 68 (1971) 697.
- Gomori, G. - *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 68 (1948) 354.
- Gordon, A.S. and Dubin, M. - *Am.J.Physiol.* 107 (1934) 704.
- Gordon, A.S. and Weintraub, A.H. - In: *Erythropoiesis*; ed. by L.O. Jacobson and M. Doyle. New York, Grune and Stratton, 1962, p. 1.
- Gordon, A.S., Katz, R., Zanjani, E.D. et al. - *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.* 123 (1966) 475.
- Gordon, A.S., Zanjani, E.D. and McLaurin, W.D. - *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.* 129 (1968) 871.
- Gordon, A.S. and Zanjani, E.D. - In: *Regulation of hematopoiesis*; ed. by A.S. Gordon. 1 (1970) 413.
- Goudsmit, R., Krugers Dagneaux, P.G.L.C. and Krijnen, H.W. - *Folia Med. Neerl.* 10 (1967) 39.
- DeGowin, R.L., Hofstra, D. and Gurney, C.W. - *J.Lab.Clin.Med.* 60 (1962a) 846.
- DeGowin, R.L., Hofstra, D. and Gurney, C.W. - *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.* 48 (1962b) 110.
- Graham, L.A., Winzler, R.J. and Charles, H.E. - *Endocrinology* 73 (1963) 475.
- Gurney, C.W., Wackman, N. and Filmanowicz, E. - *Blood* 17 (1961) 531.

- Gurney, C.W. and Fried, W. - Proc.Nat.Acad.Sci 54 (1965) 1148.
- Gurney, C.W., Hofstra, D. and Mangelik, A. - In: La greffe des cellules hématopoïétiques allogéniques. Coll. Int.Centre Nat. Rech.Sci. 1965, p. 147.
- Gutnisky, A., Malgor, L., Nohr, M.L. et al. - Ann.N.Y.Acad.Sci 149 (1968) 564.
- Hagemann, E. and Schmidt, G. - In: Ratte und Maus. Berlin, De Gruyter and Co., 1960, p. 203.
- Hanna, I.R.A., Tarbutt, R.G. and Lamerton, A.F. - Brit.J. Haemat. 16 (1969) 381.
- Henry, R.J., Sobel, C. and Berkman, S. - Anal.Chem. 29 (1957) 1441.
- Hillman, R.S. and Finch, C.H. - Brit.J. Haemat. 17 (1969) 313.
- Hodgson, G. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125 (1967) 1206.
- Hodgson, G. - Unpublished observation cited by Lukowsky and Painter. 1968.
- Hodgson, G.S. - In: Regulation of hematopoiesis; ed. by A.S. Gordon. 1 (1970) 327.
- Hoffman, G.O. - Ann. N.Y.Acad.Sci. 149 (1968) 504.
- Jacob, F. and Monod, J. - Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 26 (1961) 193.
- Jacobson, E.M., Davis, A.K. and Alphen, E.L. - Blood 11 (1956) 937.
- Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W. et al. - Nature 179 (1957a) 305.
- Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Pizak, L. et al. - Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 94 (1957b) 243.
- Jacobson, L.O., Goldwasser, E. and Gurney, C.W. - In: CIBA Foundation Symp. on Haematopoiesis; ed. by G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor. Boston, Little, Brown and Co., 1960, p. 423.
- Jordan, T.A., Lange, R.D. and McDonald, T.P. - Lab.Med. 25 (1971) 32.
- Joske, R.A., McAlister, J.M. and Pauterd, T.A.J. - Clinical Sci. 15 (1956) 511.
- Keighley, G. - In: Erythropoiesis; ed. by L.O. Jacobson and M. Doyle. New York, Grune and Stratton, 1962, p. 106.
- Keighley, G. - Ann. N.Y.Acad.Sci. 149 (1968) 18.
- Kiese, M. - Ann.N.Y. Acad.Sci. 123 (1965) 141.
- Kilbridge, T.M., Fried, W. and Heller, P. - Blood 33 (1969) 104.
- Kountz, S.L., Williams, M.A., Williams, P.L. et al. - Nature 199 (1963) 257.
- Krantz, S.B., Gallien-Lartigue, O. and Goldwasser, E. - J.Biol. Chem. 238 (1963) 4085.
- Krantz, S.B. and Jacobson, L.O. - Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis. Chicago, London, University of Chicago Press, 1970. 330 p.
- Kretchmar, A.L. - Science 152 (1966) 367.

- Kretchmar, A.L., McDonald, T.P. and Lange, R.D. - *J.Lab.Clin. Med.* 75 (1970a) 74.
- Kretchmar, A.L., McDonald, T.P. and Lange, R.D. - In: *Symp.Hemop. Cell Prol.*; ed. by F. Stohlman Jr. 1970b, p. 150.
- Kruger Dagneaux, P.G.L.C. - Proefschrift GU Amsterdam, 1967.
- Kruger Dagneaux, P.G.L.C., Goudsmit, R. and Krijnen, H.W. - *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 149 (1968) 294.
- Krzymowska, H. - *Acta Physiol. Polon.* 17 (1966) 1.
- Krzymowski, T. - In: VIII. European Congr. Haematol., Vienna, 1961, p. 277. Abstract.
- Krzymowski, T. and Krzymowska, H. - *Blood* 19 (1962) 38.
- Kuratowska, Z., Lewartowski, B. and Michalak, E. - *Bull.Acad. Polon.Sci.* 8 (1960) 77.
- Kuratowska, Z., Lewartowski, B. and Michalak, E. - *Blood* 18 (1961) 527.
- Kuratowska, Z., Kowalski, E., Kipruski, B. et al. - *Acta Biochim. Polon.* 9 (1962) 189.
- Kuratowska, Z., Lewartowski, B. and Lipiński, B. - *J.Lab.Clin.Med.* 64 (1964) 226.
- Kuratowska, Z. - *Bull.Acad.Polon. Sci.* 13 (1965) 385.
- Kuratowska, Z. - *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 149 (1968) 128.
- Kuratowska, Z. and Kopeč, M. - *Brit.J. Haemat.* 16 (1969) 465.
- Kuroyanagi, T. and Saito, M. - *Tohoku J.Exptl.Med.* 88 (1966) 117.
- Kurtides, E.S., Rambach, W.A., Alt, H.L. et al. - *J.Lab.Clin.Med.* 63 (1964) 469.
- Lajtha, L.G. and Suit, H.D. - *Brit.J. Haemat.* 1 (1955) 55.
- Lajtha, L.G. - In: *Erythropoiesis*; ed. by L.O. Jacobson and M. Doyle. New York, Grune and Stratton, 1962, p. 140.
- Lajtha, L.G. - *J.Cell.Comp.Physiol. (Suppl.1)* (1963) 143.
- Lajtha, L.G. - *J.Cell.Physiol. Suppl.* 167 (1966) 133.
- Lajtha, L.G., Pozzi, L.V., Schofield, R. et al. - *Cell Tissue Kinet.* 2 (1969) 39.
- Lajtha, L.G., Gilbert, C.W. and Guzman, E. - *J. Haemat.* 20 (1971) 343.
- Lange, R.D. and Gallagher, N.I. - In: *Erythropoiesis*; ed. by L.O. Jacobson and M. Doyle. New York, Grune and Stratton, 1962, p. 361.
- Lange, R.D., Simmons, M.L. and Dibreluis, N.R. - *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.* 122 (1966) 761.
- Lange, R.D., Simmons, M.L. and McDonald, T.P. - *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 149 (1968) 34.
- Lange, R.D., McDonald, T.P. and Jordan, T. - *J.Lab.Clin.Med.* 73 (1969) 78.
- Lange, R.D., McDonald, T.P. and Jordan, T.A. - In: *Hemopoietic Cellular Proliferation*; ed. by F. Stohlman Jr. New York, Grune and Stratton, 1970, p. 122.

- Laurent, F.C. and Killander, J. - *J. Chromatography* 14 (1964) 317.
- Lertora, J.J.L., Dargon, P.A., Rege, A.B. et al. - *J. Lab.Clin.Med.* 86 (1975) 140.
- Levin, O. - In: *Methods in Enzymology*. New York, London, Academic Press, V (1962) p. 27.
- Levin, W.C. and Alperin, J.B. - *Am.J. Med.Sci.* 256 (1968) 131.
- Lewis, J.P., Gallagher, N.I., Carmody, S.E. et al. - *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.* 116 (1964) 742.
- Lewis, J.P., Gallagher, N.I., Carmody, S.E. et al. - *Biochem. Biophys. Acta* 104 (1965) 218.
- Lewis, J.P., Alford, D.A., Dickinson, M.M. et al. - *J.Lab.Clin. Med.* 70 (1967) 862.
- Lewis, J.P., Alford, D.A., Moores, R.R. et al. - *J.Lab.Clin.Med.* 73 (1969a) 154.
- Lewis, J.P., Neal, W.A., Moores, R.R. et al. - *J.Lab.Clin.Med.* 74 (1969b) 608.
- Lewis, J.P., Neal, W.A., Alford, D.A. et al. - *Am.J.Vet.Res.* 31 (1970) 891.
- Lewis, J.P., Alford, D.A., Neal, W.A. et al. - *Scand.J.Haemat.* 8 (1971) 200.
- Lindemann, R. - *Brit.J. Haemat.* 21 (1971) 623.
- Lowy, P.H., Keighley, G., Borsook, H. et al. - *Blood* 14 (1959) 262.
- Lowy, P.H., Keighley, G. and Borsook, H. - *Nature* 185 (1960) 102.
- Lowy, P.H. and Borsook, H. - In: *Erythropoiesis*; ed. by L.O. Jacobson and M. Doyle. New York, Grune and Stratton, 1962, p. 33.
- Lowy, P.H. and Keighley, G. - *Clin.Chim. Acta* 13 (1966) 491.
- Lowy, P.H. and Keighley, G. - *Biochim.Biophys. Acta* 160 (1968) 413.
- Lowy, P.H. - In: *Regulation of Hematopoiesis*; ed. by A.S. Gordon. 1 (1970) 395.
- Lukowsky, W. and Painter, R.H. - *Canad.J. Biochem.* 46 (1968) 733.
- Maes, A.A., Donati, R.M. and Gallagher, N.I. - *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.* 119 (1965) 802.
- Markson, J.L. and Rennie, J.B. - *Scot. Med.J.* 1 (1956) 320.
- Markson, J.L. and Moore, J.M. - *Brit.J. Haemat.* 8 (1962) 414.
- Mattenheimer, H. - *J.Physiol.Chem.* 316 (1959) 202.
- McDermott, F.T., Daltz, M.K. and Galbraith, A.J. - *Cell Tissue Kinet.* 7 (1974) 31.
- McDonald, T.P. and Lange, R.D. - *J.Lab.Clin.Med.* 70 (1967) 48.
- McDonald, T.P., Lange, R.D. and Kretchmar, A.L. - *J.Lab.Clin. Med.* 77 (1971) 134.
- Meister, A. - In: *Biochemical Preparations*; ed. by E.G. Ball. 2 (1952) 18.
- Metcalf, D. and Moore, M.A.S. - *Hemopoietic cells (Frontiers of Biology, vol.24)*. Amsterdam, North-Holland Publ.Comp., 1971.

- Mirand, E.A., Prentice, T.C. and Slaunwhite, W.R. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 77 (1959) 677.
- Moore, R.R., Gardner Jr, E., Wright, C.-S. et al. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123 (1966) 618.
- Morley, A., King-Smith, E.A. and Stohlman Jr, F. - In: Hemopoietic cellular proliferation; ed. by F. Stohlman Jr. New York, Grune and Stratton, 1970. p. 3.
- Morse, B.S. and Stohlman Jr, F. - J. Clin. Invest. 45 (1966) 1241.
- Morse, B.S., Rencricca, N.J. and Stohlman Jr, F. - Blood 35 (1970) 761.
- Mylred, K.C. and Abbrecht, P.H. - J. Theor. Biol. 33 (1971) 279.
- Naets, J.P. - Nature 184 (1959) 371.
- Naets, J.P. and Wittek, M. - Nature 206 (1965) 726.
- Naets, J.P. and Wittek, M. - Acta Haemat. 39 (1968) 42.
- Nies, B.A., Cohn, R. and Schrier, S.L. - New Engl. J. Med. 273 (1965) 785.
- Okunewick, J.P. and Fulton, D. - Blood 36 (1970) 231.
- Olesen, H. and Fogh, J. - Scand. J. Haemat. 5 (1968) 211.
- Plzak, L.F., Fried, W., Jacobson, L.O. et al. - J. Lab. Clin. Med. 46 (1955) 671.
- Prentice, T.C. and Mirand, E.A. - Exp. Med. Surg. 14 (1956) 226.
- Prentice, T.C. and Mirand, E.A. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95 (1957) 231.
- Rambach, W.A., Cooper, J.A.D. and Alt, H.L. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98 (1958) 602.
- Reiff, R.H., Nutter, J.Y., Donohue, D.M. et al. - Am. J. Clin. Path. 30 (1958) 199.
- Reissmann, K.R. - Blood 5 (1950) 372.
- Reissmann, K.R., Diedrich, D.A., Ito, K. et al. - J. Lab. Clin. Med. 65 (1965) 967.
- Reynafarje, C., Ramos, J., Faura, J. et al. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116 (1964) 649.
- Reynafarje, C. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 149 (1968) 472.
- Rhyner, K. and Ganzoni, A. - Europ. J. Clin. Invest. 2 (1972) 96.
- Rosse, W.F., Berry, R.J. and Waldmann, T.A. - J. Clin. Invest. 42 (1963) 124.
- Rosse, W.F. and Waldmann, T.A. - J. Clin. Invest. 43 (1964) 1348.
- Schmid, K., McNair, M.B. and Burgi, A.F. - J. Biol. Chem. 230 (1958) 853.
- Schooley, J.C. and Garcia, J.F. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110 (1962) 636.
- Schooley, J.C. - Blood 25 (1965) 795.
- Shaw, A.B. - Brit. Med. J. 2 (1967) 213.

- Siri, W.E., Dyke, van, D.C., Winchell, H.S. et al. - *J. Appl. Physiol.* 21 (1966) 73.
- Skjælen, P. and Halvorsen, S. - *Acta paediatrica Scand.* 60 (1971) 301.
- Sørensen, S.P.L. - *Biochem.Z.* 21 (1909) 131.
- Stohlman Jr, F. and Brecher, G. - *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 100 (1959) 40.
- Stohlman Jr, F., Brecher, G. and Moores, R.R. - In: *Erythropoiesis*; ed. by L.O. Jacobson and M. Doyle. New York, Grune and Stratton, 1962. p. 162.
- Stohlman Jr, F., Ebbe, S., Morse, B. et al. - *Ann. N.Y.Acad.Sci* 149 (1968) 156.
- Stohlman Jr, F. - In: *Regulation of hematopoiesis*; ed. by A.S. Gordon. 1 (1970) 317.
- Sullivan, M.B., Chiba, Y., Gleich, G.J. et al. - *J.Lab.Clin.Med.* 75 (1970) 771.
- Takaku, F., Hirashima, K. and Nakao, K. - *J.Lab.Clin.Med.* 59 (1962) 815.
- Tarbutt, R.G. - *Brit.J. Haemat.* 16 (1969) 1.
- Thorling, E.B. and Erslev, A.J. - *Blood* 31 (1968) 332.
- Thorling, E.B. - *Scand.J. Haemat.* 1972, suppl. 17. Thesis Copenhagen.
- Till, J.E. and McCulloch, E.A. - *Radiat.Res.* 14 (1961) 213.
- Tiselius, A., Hjertén, S. and Levin, Ö. - *Arch.Biochem.Biophys.* 65 (1956) 132.
- Wagemaker, G., Eijk, H.G. van and Leijnse, B. - *Clin.Chim.Acta* 36 (1972) 357.
- Walpole, G.S. - *J.Chem.Soc.* 105 (1914) 2501.
- Ward, H.P. - *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 125 (1967) 370.
- Weintraub, A.H., Gordon, A.S. and Camiscoli, J.F. - *J.Lab.Clin. Med.* 62 (1963) 743.
- Weintraub, A.H., Gordon, A.S., Becker, E.L. et al. - *Am.J.Physiol.* 207 (1964) 523.
- Westerman, M.P., Jenkins, J.L., Dekker, A. et al. - *The Lancet* II (1967) 755.
- Whitcomb, W.H. and Moore, M. - *J.Lab.Clin.Med.* 66 (1965) 641.
- Whitcomb, W.H., Moore, M., Dille, R. et al. - *J.Clin.Invest.* 44 (1965) 110.
- Whitcomb, W.H. and Moore, M. - *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 149 (1968) 462.
- White, W.F., Gurney, C.W., Goldwasser, E. et al. - *Recent Progr. Hormone Res.* 16 (1960) 219.
- Zanjani, E.D., Contrera, J.F., Cooper, G.W. et al. - *Science* 156 (1967a) 1367.

- Zanjani, E.D., Contrera, J.F., Gordon, A.S. et al. - Proc.Soc.
Exp.Biol.Med. 125 (1967b) 505.
- Zanjani, E.D., Schooley, J.C. and Gordon, A.S. - Life Sci. 7 (1968a)
505.
- Zanjani, E.D., Gordon, A.S., Wong, K.K. et al. - Life Sci. 7 (1968b)
1233.

CURRICULUM VITAE AUCTORIS

Gerard Wagemaker werd in 1948 geboren te Den Haag. Na het behalen van het h.b.s.-B-diploma (Chr.Lyceum Overvoorde, Den Haag) studeerde hij geneeskunde aan de toenmalige Medische Faculteit Rotterdam; het doctoraal examen werd in 1971 afgelegd. In de periode 1969-1973 was hij verbonden aan de afdeling Chemische Pathologie (Prof. dr. B. Leijnse), achtereenvolgens als keuzepraktikant (Dr. H. G. van Eijk), student-assistent, en wetenschappelijk medewerker. Op deze afdeling werd het in dit proefschrift beschreven onderzoek uitgevoerd, deels in samenwerking met de afdeling Interne Geneeskunde I (Dr. L. D. F. Lameijer). Sinds 1974 is hij werkzaam op het Radiobiologisch Instituut TNO, Rijswijk (directeur: Prof. dr. D. W. van Bekkum) als wetenschappelijk medewerker van de afdeling Radiobiologie van de Erasmus Universiteit, Rotterdam. Hij verricht onderzoek over de regulatie van de bloedcelvorming.

