

MASTER

Meetopstelling voor zuurstofbindingskurven voor bloed- en hemoglobine-oplossingen

Lubrecht, A.A.

Award date:
1982

[Link to publication](#)

Disclaimer

This document contains a student thesis (bachelor's or master's), as authored by a student at Eindhoven University of Technology. Student theses are made available in the TU/e repository upon obtaining the required degree. The grade received is not published on the document as presented in the repository. The required complexity or quality of research of student theses may vary by program, and the required minimum study period may vary in duration.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain

Faculteit der Geneeskunde
Afdeling Fysiologie
Kath. Universiteit Nijmegen

Technische Hogeschool Eindhoven
Vakgroep Analyse Fysische Meet-
methoden

MEETOPSTELLING VOOR ZUURSTOF-
BINDINGSKURVEN VOOR BLOED- EN
HEMOGLOBINE-OPLOSSINGEN

Verslag van het afstudeerwerk, verricht op de
afdeling Fysiologie van de Katholieke Univer-
siteit Nijmegen.

Afstudeerhoogleraar: Prof. Dr. J.A. Poulis
Coördinator: Dr. Ir. H.J. van Ouwkerk
Begeleiding: Drs. L.J.C. Hoofd

Op deze plaats wil ik iedereen bedanken die, op zijn
of haar specifieke gebied, een bijdrage leverde tot
de totstandkoming van dit afstudeerwerk.

Nijmegen, september 1982

Ton Lubrecht

INHOUDSOPGAVE	BLZ
SAMENVATTING.....	3
1. INLEIDING.....	4
2. ZUURSTOFBINDINGSKURVE.....	5
2.1 Hemoglobine.....	5
2.2 De verschillende modellen.....	7
2.2.1 Het Adair model.....	8
2.2.2 Het M.W.C. model.....	9
2.2.3 Het Hill model.....	10
2.2.4 Een uitgebreid M.W.C. model.....	11
3. MEETPRINCIPE.....	15
3.1 Meting van de partiële zuurstofdruk.....	15
3.2 Het principe van de saturatiemeting.....	16
3.3 Saturatiemeting nader bekeken.....	18
4. MEETMETHODE.....	23
4.1 De meetcel.....	23
4.2 De wiggen.....	25
4.3 De PO ₂ -meting.....	26
4.4 Het optische systeem.....	27
4.5 Optimaliseren van het optische systeem.....	28
4.6 Elektronische gedeelte van de saturatiemeting	30
4.7 Optimaliseren van de saturatiemeting.....	32
4.8 Het meten met bloed.....	33
5. METINGEN.....	34
5.1 Metingen met hemoglobine.....	34
5.2 Bij de grafieken.....	35
5.3 Metingen met bloed.....	40
6. DISKUSSIE.....	44
7. VOORTZETTING VAN HET ONDERZOEK.....	45
LITERATUUR.....	46
APPENDIX KOMPUTERPROGRAMMA	

SAMENVATTING

Ter bepaling van zuurstofbindingskurven van bloed- en hemoglobine-oplossingen is de bestaande opstelling (Moonen 1981) veranderd en uitgebreid.

In een meetcel wordt de bloed- of hemoglobine-oplossing geoxigeneerd en tijdens dit proces wordt tegelijkertijd de PO_2 en de Saturatie gemeten.

Het optische systeem werd veranderd en de lichtopbrengst werd vergroot.

De bijbehorende elektronika werd in zijn geheel vernieuwd. De wiggen die de fibers bevatten zijn gewijzigd.

Voor de dataverwerking en de aanpassing van de parameters van het theoretische model aan de kromme werd gebruik gemaakt van een PDP 11 komputer.

De opstelling levert goede resultaten voor hemoglobine-oplossingen en redelijke resultaten voor bloedsuspensies.

1 INLEIDING

Hemoglobine (Hb) is een eiwit dat reversibel zuurstof kan binden. Het komt voor in de rode bloed cellen (afgekort tot RBC) en vervult een belangrijke taak bij het zuurstoftransport van de longen naar de diverse weefsels.

De zuurstofbindingskurve, of saturatiekurve, van een hemoglobine bevattende oplossing, geeft grafisch het verband tussen de partiële zuurstofdruk (PO_2) in de oplossing en de verzadigingsgraad van het hemoglobine (Y).

Deze verzadigingsgraad, of saturatie, van het hemoglobine is gedefiniëerd als de verhouding tussen het aantal molekulen zuurstof dat gebonden is en het aantal dat maximaal gebonden kan worden (bindingscapaciteit).

Het doel van dit afstudeerwerk is het operationeel maken van een opstelling gebouwd door Jan Moonen [Moonen 1981], om saturatiekurven te meten met als kenmerken:

- 1) kleine monsters ($\ll 1$ ml) in vitro
- 2) stilstaande bloed- of hemoglobinelagen
- 3) korte meettijd (< 30 min)
- 4) bruikbaar voor bloed- en Hb-oplossingen met fysiologische concentraties
- 5) PO_2 en Y op dezelfde plaats en tegelijkertijd meten

In de genoemde proefopstelling was aan de eisen 4 en 5 niet voldaan.

-Er kon slechts met (20x) verdunde Hb-oplossingen gemeten worden en niet met bloed

-In de proefopstelling werd gebruik gemaakt van twee Lock-In-Amplifiers met een integratietijd van 3-10 sec. Deze versterkers bevonden zich in het Y meetgedeelte van de opstelling zodat van gelijktijdige meting van PO_2 en Y geen sprake kon zijn (zichtbaar door hysteresis).

Om aan de eisen 4 en 5 te voldoen is het optische systeem en de bijbehorende elektronika vervangen.

In de Fysiologie is het gebruikelijk de druk met P aan te geven. In dit verslag is deze notatie aangehouden.

2 ZUURSTOFBINDINGSKURVE

2.1 HEMOGLOBINE

Het menselijk bloed bestaat voor 40 volumeprocent uit rode bloed cellen. Het hoofdbestanddeel van de celinhoud is het hemoglobine dat chemisch zuurstof kan binden.

In normaal bloed zitten $5 \cdot 10^6$ RBC per mm^3 , en het bevat bij een PO_2 van 10 kPa 9 mmol O_2 per liter waarvan slechts 0.11 mmol O_2 fysisch opgelost is.

Het hemoglobinemolekuul bestaat uit vier subunits, twee α en twee β ketens (Perutz 1968), het is dus een tetrameer, elke subunit bevat een heemgroep waarin het ijzer reversibel zuurstof kan binden fig 2.1 .

De hemoglobineconcentratie [Hb] zal in het vervolg aangegeven worden in mol/m^3 monomeer = concentratie Fe = bindingscapaciteit .

De [Hb] van de rode cel inhoud is ongeveer $20 \text{ mol}/\text{m}^3$.

De reactie van Hb met O_2 gaat gepaard met een verandering van het absorptiespektrum, waardoor de saturatiebepaling door middel van lichtabsorptie mogelijk is in een bepaalde golflengteband. In het gekozen golflengtebereik is de absorptieverandering lineair.

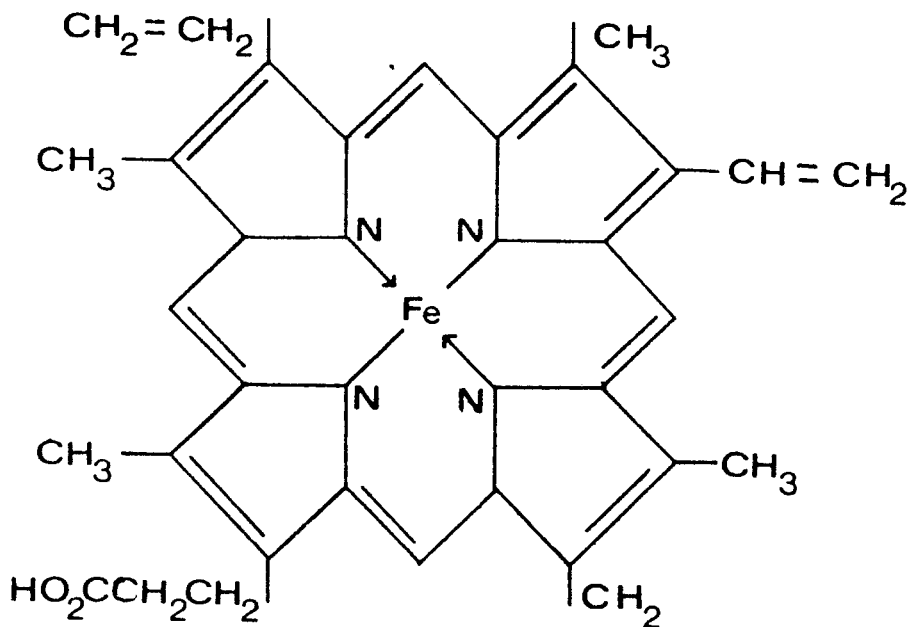


fig 2.1 Structuurformule van een heemgroep

De zuurstofbinding van het Hb-molekuul is afhankelijk van zeer veel factoren fig 2.2 waarvan de belangrijkste zijn:

- 1) pH
- 2) PCO_2
- 3) Ionenconcentraties zoals organische fosfaten (2,3 DPG)
- 4) Temperatuur

Voorbeelden zie fig 2.2

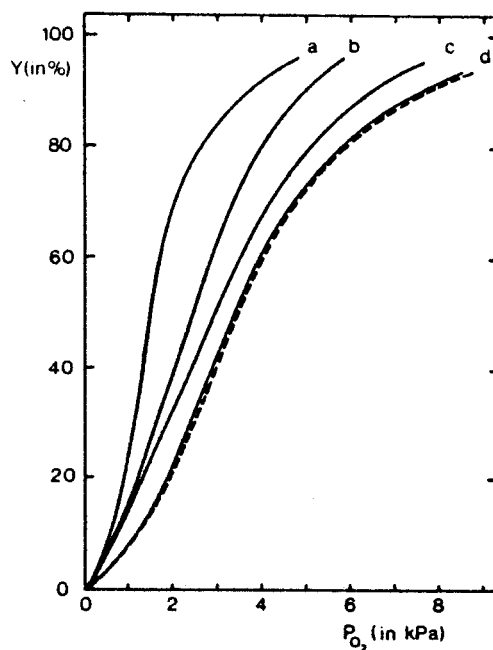


fig 2.2 Saturatiekurven van menselijk hemoglobine bij 37°C
stippellijn : vol bloed

- kurve a) 'schone' hemoglobineoplossing ('stripped' Hb)
b) $PCO_2 = 5.3$ kPa
c) $[DPG] = 1.2$ mol DPG/mol Hb
d) combinatie van b & c (Brenna et.al.1972)

2.2 DE VERSCHILLENDE MODELLEN

Om de S-vorm van de saturatiekurve van hemoglobine (tetrameer fig 2.3 kurve 1) te kunnen verklaren, is het noodzakelijk aan te nemen dat er wisselwerkingen bestaan tussen de vier heemgroepen van een molekuul.

Zou deze wisselwerking niet bestaan, dan zou de saturatiekurve een hyperbolisch verloop hebben, zoals voorkomt bij het eiwit myoglobine (monomeer fig 2.3 kurve 2), dat O_2 op dezelfde manier bindt. Myoglobine lijkt qua structuur op een enkele β -keten van hemoglobine, en komt voor in spierweefsel.

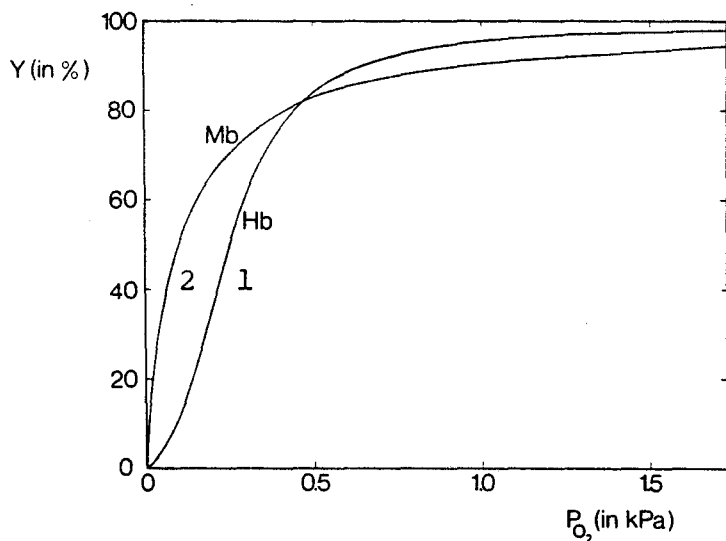
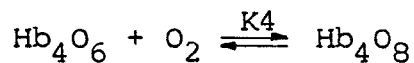
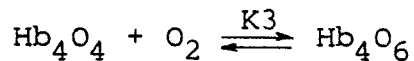
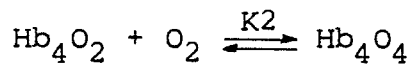
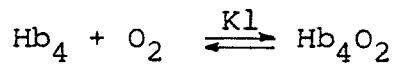


fig 2.3 Saturatiekurven van Hemoglobine (1) en Myoglobine (2) bij 25°C (Breepoel 1978)

2.2.1 HET ADAIR MODEL

De door Adair (Adair 1925) geopperde hypothese houdt in dat het hemoglobinemolekuul (tetrameer) stapsgewijs wordt geoxigeneerd resp. gedeoxigeneerd, en dat elke reaktiestap zijn eigen specifieke bindingssterkte heeft.



2.2.1

Waarbij het tetrameer hemoglobinemolekuul met Hb_4 aangegeven wordt en K_1 t/m K_4 de intrinsieke reaktiekonstanten (per bindingsplaats) zijn van de vier reaktietrappen.

Dan volgt voor de saturatie Y (Imai 1973) 2.2.2a

$$Y = \frac{K_1 \cdot P + 3K_1 \cdot K_2 \cdot P^2 + 3K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot P^3 + K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot P^4}{1 + 4K_1 \cdot P + 6 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot P^2 + 4K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot P^3 + K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot P^4}$$

2.2.2a

met $P = \text{PO}_2$ (fig 2.3 kurve 1)

Wanneer $K_1 = K_2 = K_3 = K_4 = K$ (geen interactie myoglobine) is 2.2.2a te vereenvoudigen tot:

$$Y = \frac{K \cdot P}{1 + K \cdot P} \quad 2.2.2b \quad (\text{fig 2.3 kurve 2})$$

2.2.2 HET M.W.C. MODEL

In het M.W.C. model (Niesel 1961, Monod et.al. 1965) wordt aangenomen dat de reaktiekonstanten K1 t/m K4 gelijk zijn, echter dat hemoglobine in twee verschillende toestanden kan voorkomen.

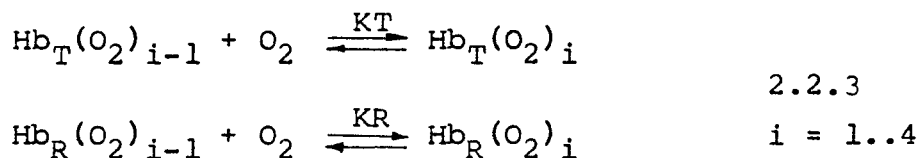
Deze twee toestanden zijn de 'Tense' toestand en de 'Relaxed' toestand aangegeven met Hb_T en Hb_R.

Röntgenonderzoek heeft inderdaad twee verschillende toestanden van het hemoglobinemolekuul aangetoond.

Voor de deoxi-situatie geldt het volgende evenwicht:



Voor de verschillende oxygenatietrappen gelden de volgende evenwichten:



Met de substituties: $\alpha = K_R \cdot \text{PO}_2$
 en : $C = K_T/K_R$

Volgt dan voor de saturatie Y de formule 2.2.4

$$Y = \frac{L \cdot C \cdot \alpha \cdot (1 + C \cdot \alpha)^3 + \alpha \cdot (1 + \alpha)^3}{L \cdot (1 + C \cdot \alpha)^4 + (1 + \alpha)^4} \quad 2.2.4$$

2.2.3 HET HILL MODEL

Een manier om de wisselwerkingen tussen de heemgroepen van van een hemoglobinemolekuul zichtbaar te maken is de Hill-plot (Hill 1910).

In deze grafiek wordt de $\log(Y/1-Y)$ uitgezet tegen de $\log(PO_2)$.

Over een belangrijk deel van de curve ($0.1 < Y < 0.9$) kan de kromme goed benaderd worden met een rechte lijn (fig 2.4).

Deze voldoet aan vergelijking 2.2.5

$$\log(Y/1-Y) = n_{\text{hill}} \cdot \log(PO_2/P50) \quad 2.2.5$$

Waarbij n_{hill} = Hill-konstante
 $P50 = PO_2$ bij $Y = 0.5$

Wanneer er geen wisselwerking optreedt is de Hill-parameter gelijk aan 1 (myoglobine).

Wanneer er wel een wisselwerking bestaat is bij positieve interactie $n_{\text{hill}} > 1$, bij negatieve interactie $n_{\text{hill}} < 1$.

Om de saturatiecurve te beschrijven zijn slechts twee parameters nodig. Wanneer men de zo gedefiniëerde Saturatiecurve uitzet en vergelijkt met de metingen, blijken de afwijkingen vooral op te treden bij lage waarden van de saturatie en in mindere mate bij hoge waarden.

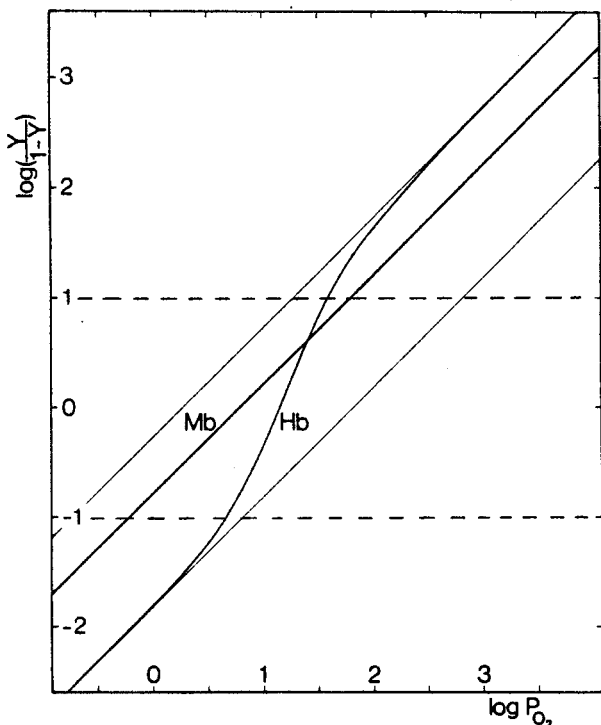


fig 2.4 Hill-plot van de kurven uit fig 2.3 tussen de stippellijnen beschrijft de vgl 2.2.5 de kromme redelijk

2.2.4 EEN UITGEBREID M.W.C. MODEL

In het oorspronkelijke model (form. 2.2.4) komen de parameters L, KR, KT voor.

De aanpassing van deze parameters aan een aantal meetpunten met behulp van de kleinste kwadraten methode is echter in dit geval een uiterst gevoelige, instabiele procedure.

Wanneer de beginschatting slechts weinig afwijkt van de eindwaarde, divergeert de oplossing.

Wanneer men de parameters in formule 2.2.4 anders groepeert en wel:

$$K1 = KT$$

$$g = 1/\sqrt[4]{L}$$

$$KS = g \cdot KR$$

Met $KS \doteq 1/P50$ (Cordone et.al. 1981)

Dan gaat vgl 2.2.4 over in 2.2.6

$$1 - Y = \frac{(1 + K1 \cdot P)^3 + g \cdot (g + KS \cdot P)^3}{(1 + K1 \cdot P)^4 + (g + KS \cdot P)^4} \quad 2.2.6$$

Met behulp van deze vergelijking is het wel mogelijk om door middel van kleinste kwadraten tot een parameteraanpassing te komen.

De keuze om de meetpunten te beschrijven met het M.W.C model is gedaan om de volgende redenen:

- 1) Het Adair model is al eens geprobeerd (Leeden-Lensink 1978) en levert diverse problemen o.a. een slechte bepaalbaarheid op van a_3 ($=K1 K2 K3$) met verscheidene malen een negatieve waarde van a_3 . De theoretische achtergrond van het model gaat hiermee verloren.
- 2) Het Hill model bezit geen theoretische achtergrond en vertoont grote afwijkingen bij lage waarden van Y en in mindere mate bij hoge waarden van Y .

Een soortgelijk nadeel als bij het Adair model doet zich ook voor bij het M.W.C. model; de parameter g blijkt niet positief definitief te zijn.

Dit betekent dat de theoretische achtergrond van het model (evenwicht tussen twee toestanden) niet bruikbaar is.

Het model wordt dus alleen gebruikt voor een fenomenologische beschrijving van de saturatiecurve.

Het navolgende model, met een vierde parameter, is opgezet met het doel

- 1) g positief definitief te krijgen
- 2) een betere 'fit' aan de meetpunten te krijgen

De extra parameter β is in de partiële zuurstofdruk ondergebracht volgens vgl 2.2.7 zodat P' een voor verschuivingen (bv door pH) gekorrigeerde PO_2 voorstelt.

$$P' = P \cdot e^{-\beta \cdot Y} \quad 2.2.7$$

Men kan laten zien dat vgl 2.2.7 samenhangt met de experimenteel (Breepoel 1978) en theoretisch (Tanford 1961) gevonden relatie:

$$\frac{d \ln P_{50}}{d \text{pH}} = \text{konstant} \quad 2.2.8 \quad (\text{Breepoel 1978})$$

En met het feit dat H^+ -ionen (Bohr-mechanisme) en andere ionen vrijkomen wanneer O_2 gebonden wordt aan het hemoglobinemolekuul.

Met deze extra parameter blijkt aan de 2^e eis (betere 'fit') voldaan te zijn, helaas voldoet zij niet aan de 1^e eis; g wordt niet positief definitief.

Vanwege de betere aanpassing aan de meetpunten is het model toch aangehouden.

De testpunten voor de verschillende modellen zijn gekozen uit de standaarddissociatie-kurve van Severinghaus (Severinghaus 1966). Deze metingen zijn verricht aan vol bloed.

Voor de beste Adair-aanpassing zijn de resultaten gebruikt van Roughton & Severinghaus (Roughton & Severinghaus 1973).

De beste aanpassing aan de Severinghaus-kromme, verkregen met de kleinste kwadraten methode, levert als waarden voor de diverse parameters:

$$K1 = 0.052$$

$$KS = 0.343$$

$$g = -0.00252$$

$$\beta = 0.272$$

2.2.9 (zie fig 2.5)

Dit levert een $\bar{\sigma} = 0.27$ % sat. op en een $\Delta Y_{\max} = 0.49$ % sat., zie fig 2.6

Met deze parameters blijkt het uitgebreid M.W.C. model de testpunten net zo goed te benaderen als de door Severinghaus (Severinghaus 1979) gekreëerde functie 2.2.10

$$Y = ((23400 \cdot (PO_2)^3 + 150 \cdot PO_2)^{-1} + 1)^{-1} \quad 2.2.10$$

Met als waarden $\bar{\sigma} = 0.26$ % sat. en $\Delta Y_{\max} = 0.50$ % sat. (fig 2.6)

En het benadert deze punten beter dan de door Lutz (Lutz et.al. 1975) gekreëerde functie met als waarde $\bar{\sigma} = 0.70$ % sat. die bovendien twee diskontinuiteiten bevat.

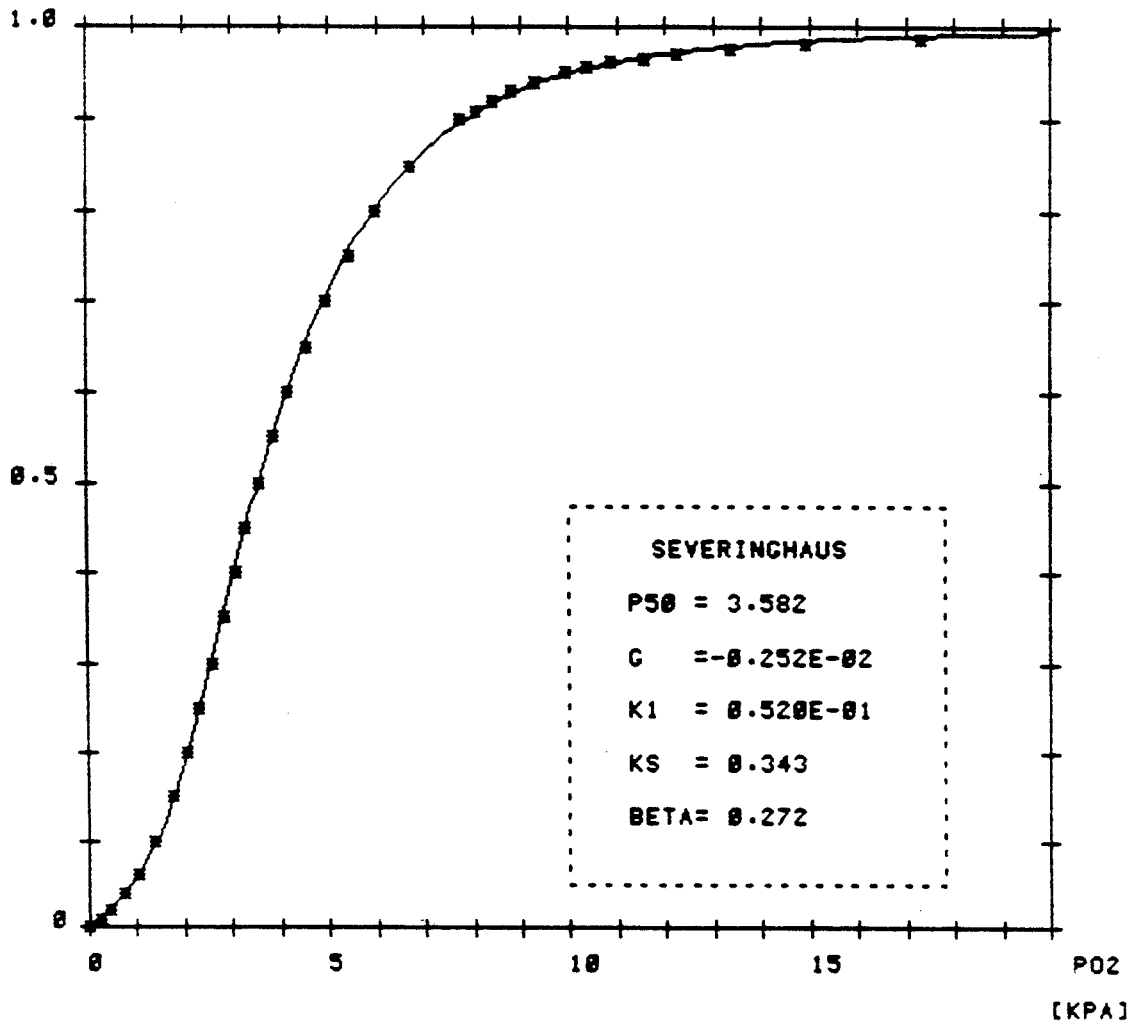


fig 2.5 Beste benadering van het uitgebreid M.W.C.-model aan de punten van de standaard dissociatie-kurve van Severinghaus

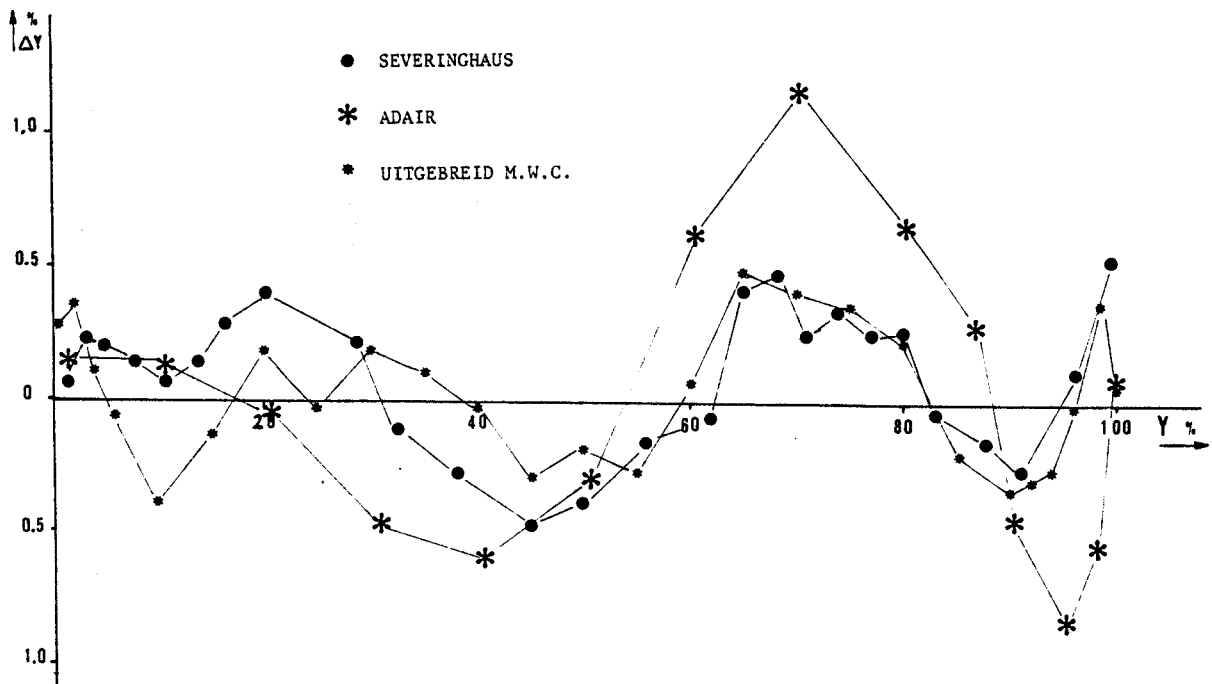


fig 2.6 Afwijkingen van de diverse modellen van de punten van de standaard dissociatie-kurve van Severinghaus.

3 MEETPRINCIPE

Onze doelstelling is het meten van twee grootheden in een stilstaande vloeistoflaag:

- de partiële zuurstofdruk PO_2
- de verzadigingsgraad Y van het hemoglobine

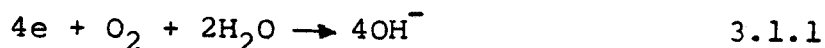
3.1 METING VAN DE PARTIËLE ZUURSTOFDRUK

De PO_2 wordt met behulp van micro PO_2 -elektroden gemeten, die werken volgens het principe van de Clark-elektrode (Kimmich 1969).

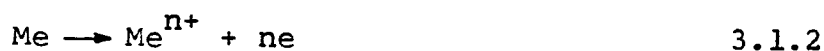
Een Clark-elektrode is een bipolaire elektrode, dit wil zeggen kathode en anode zijn gescheiden van de oplossing door middel van een gasdoorlatend membraan.

De ruimte tussen elektroden en membraan is gevuld met een bufferoplossing, zodat de elektrode steeds in hetzelfde milieu meet.

Tussen Kathode en Anode wordt een spanningsverschil aangelegd (-0.7 V), waardoor aan de kathode de aanwezige zuurstof gereduceerd wordt volgens vgl 3.1.1, deze kathode is vervaardigd uit platina,



terwijl aan de anode reactie 3.1.2 plaatsvindt,



waarbij Me een of ander metaal is waarvan de anode gemaakt is, in het algemeen is dat zilver. In ons geval bestond de anode uit monel, een koper-nikkel legering.

Door deze reductie van zuurstof ontstaat een zuurstofgradiënt naar het kathode-oppervlak. Het gevolg hiervan is een O_2 diffusie naar het kathode-oppervlak. Het teflon membraan (dikte 6 μm) beperkt de diffusiesnelheid.

Het aantal molekulen dat door het membraan diffundeert is recht evenredig met het partiële drukverschil over het membraan en dus recht evenredig met de PO_2 in de oplossing.

3.2 HET PRINCIPE VAN DE SATURATIEMETING

Het principe van de saturatiemeting berust op een verschillend absorptiespektrum van hemoglobine en oxihemoglobine, zie fig 3.1 .

Hierbij is enerzijds verondersteld dat in de gebruikte golflengteband de absorptie alleen afhangt van de reactie van hemoglobine met zuurstof, anderzijds dat de extinktie lineair variëert met de saturatie y .

De lichtintensiteit van de doorvallende stralenbundel wordt dan gegeven door de wet van Lambert-Beer:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\bar{\epsilon} \cdot c \cdot d} \quad 3.2.1$$

I = intensiteit na absorptie

I_0 = intensiteit voor absorptie

$\bar{\epsilon}$ = extinktiecoëfficiënt van de vloeistof (m^2/mol)

c = concentratie van de hemoglobineoplossing (mol/m^3)

d = laagdikte van de hemoglobineoplossing (m)

Voor twee verschillende stoffen (Hb_4 en Hb_4O_8) levert dit:

$$I = I_0 \cdot 10^{-(\epsilon + \Delta\epsilon \cdot Y) \cdot c \cdot d} \quad 3.2.2$$

ϵ = extinktiecoëfficiënt van Hb_4

$\Delta\epsilon$ = extinktiecoëfficiënt van Hb_4O_8 - extinktiecoëfficiënt van Hb_4

Omdat behalve Y ook c kan variëren wordt de intensiteit van het doorvallende licht in twee golflengtebanden gemeten; er ontstaan dan twee vergelijkingen met twee onbekenden, zodat het stelsel vergelijkingen oplosbaar is.

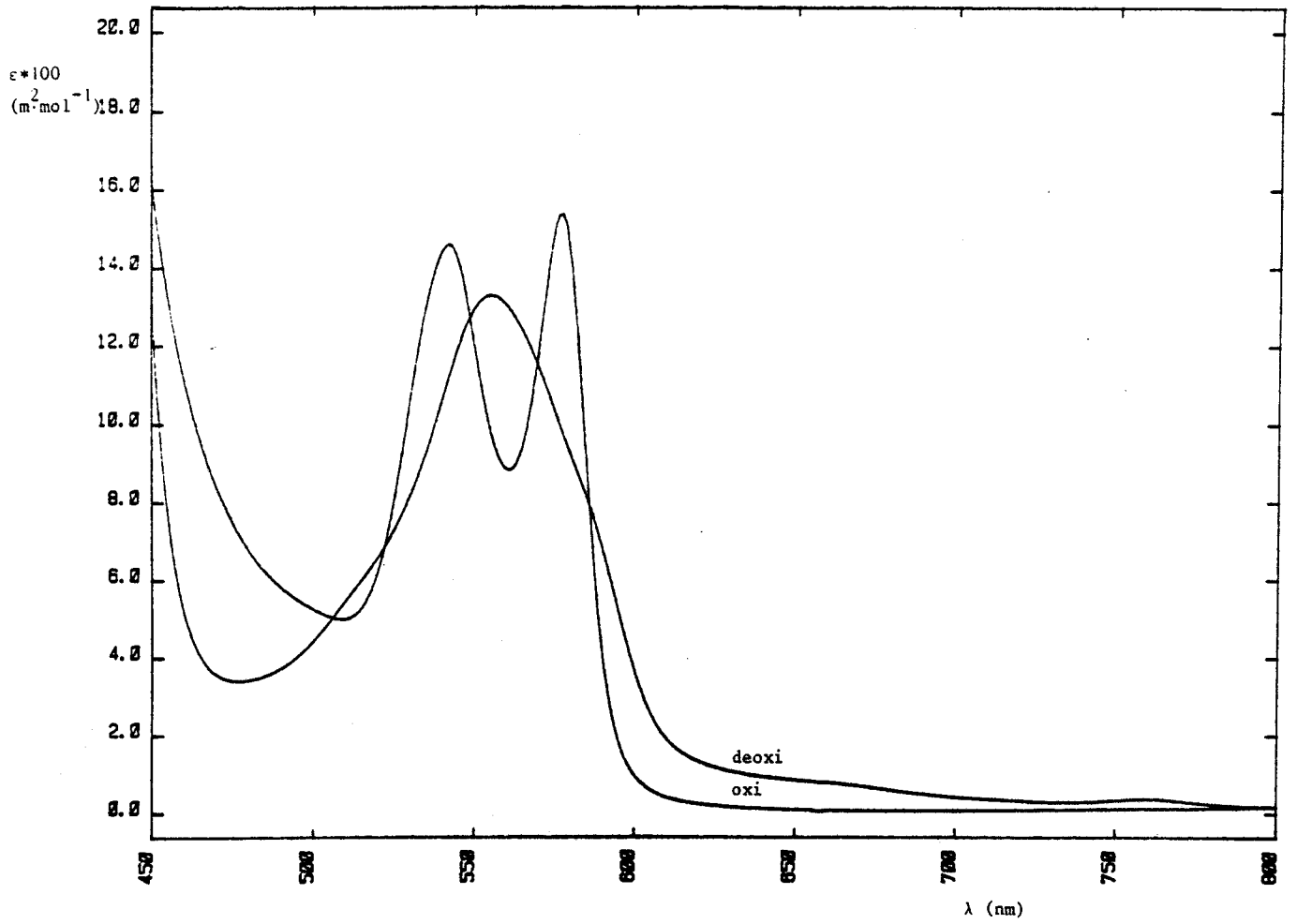


fig 3.1 Extinktie als funktie van de golflengte van oxi- en deoxy-hemoglobine (Zwart et.al. 1981)

3.3 SATURATIEMETING NADER BEKEKEN

Tijdens het afstudeerwerk bleek het noodzakelijk om vgl 3.2.2 meer in detail te beschouwen.

De straling, die door de hemoglobine laag dringt, wordt met behulp van een foto elektrische cel (photovoltaic) omgezet in een elektrische stroom I_v , waarvan de grootte gegeven wordt door vgl 3.3.1 .

$$I_v = \int_0^{\infty} I_0(\lambda) \cdot f(\lambda) \cdot 10^{-\{\epsilon(\lambda) + \Delta\epsilon(\lambda)\} \cdot c \cdot d} \cdot g(\lambda) \cdot d\lambda \quad 3.3.1$$

I_v = totale stroom van de photovoltaic

λ = golflengte

$I_0(\lambda)$ = spektrum van de gebruikte lichtbron

$f(\lambda)$ = karakteristiek van het interferentiefilter

$\epsilon(\lambda)$ = extinktie van hemoglobine

$\Delta\epsilon(\lambda)$ = verschil extinktie

$g(\lambda)$ = gevoeligheid van de photovoltaic

Uit de specificaties van de fotocel blijkt dat $g(\lambda)$ konstant is over het golflengtegebied $400 \text{ nm} < \lambda < 700 \text{ nm}$.

Voor alle zekerheid zijn de spektra van fig 3.2 & 3.3 met eenzelfde fotocel opgemeten.

De functies $\xi(\lambda)$ en $\Delta\xi(\lambda)$ zijn bekend (Zwart et.al. 1981) zie fig 3.1, en de functies $I_0(\lambda) \cdot f(\lambda)$ zijn opgemeten, zie fig 3.2 & 3.3 .

Hierbij dient nog vermeld te worden dat de twee gebruikte golflengtebanden twee lijnen uit het (kwik) spektrum van de gebruikte lamp bevatten (546 nm en 577 nm).

De grote breedte van de lijnen is het gevolg van het feit dat de gebruikte lamp een hoge druk Hg-Xe lamp is (lijnverbreding).

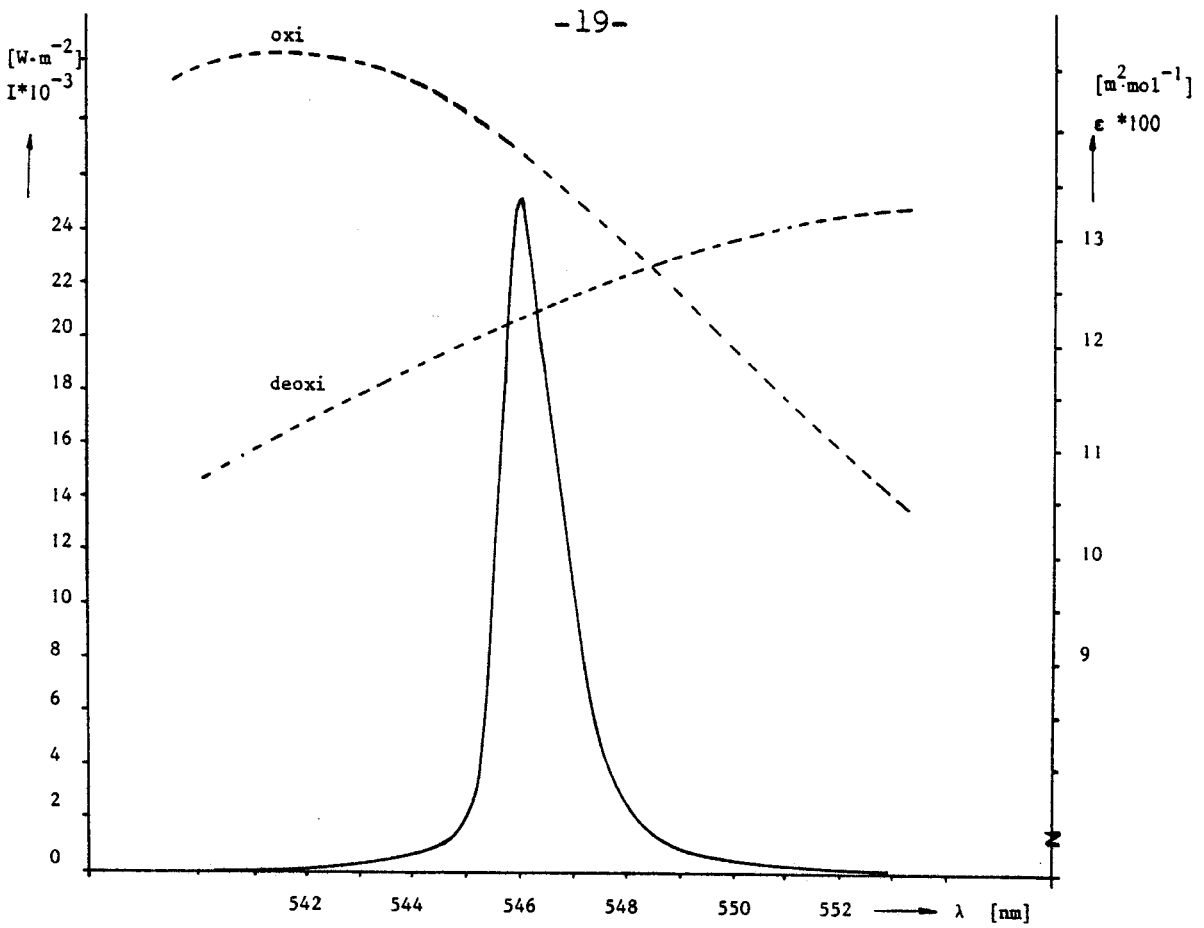


fig 3.2 Emissiespektrum van lamp + filter ($I_0(\lambda) \cdot f_1(\lambda)$)
 Absorptiespektrum van deoxi- en oxihemoglobine ($\epsilon(\lambda)$)

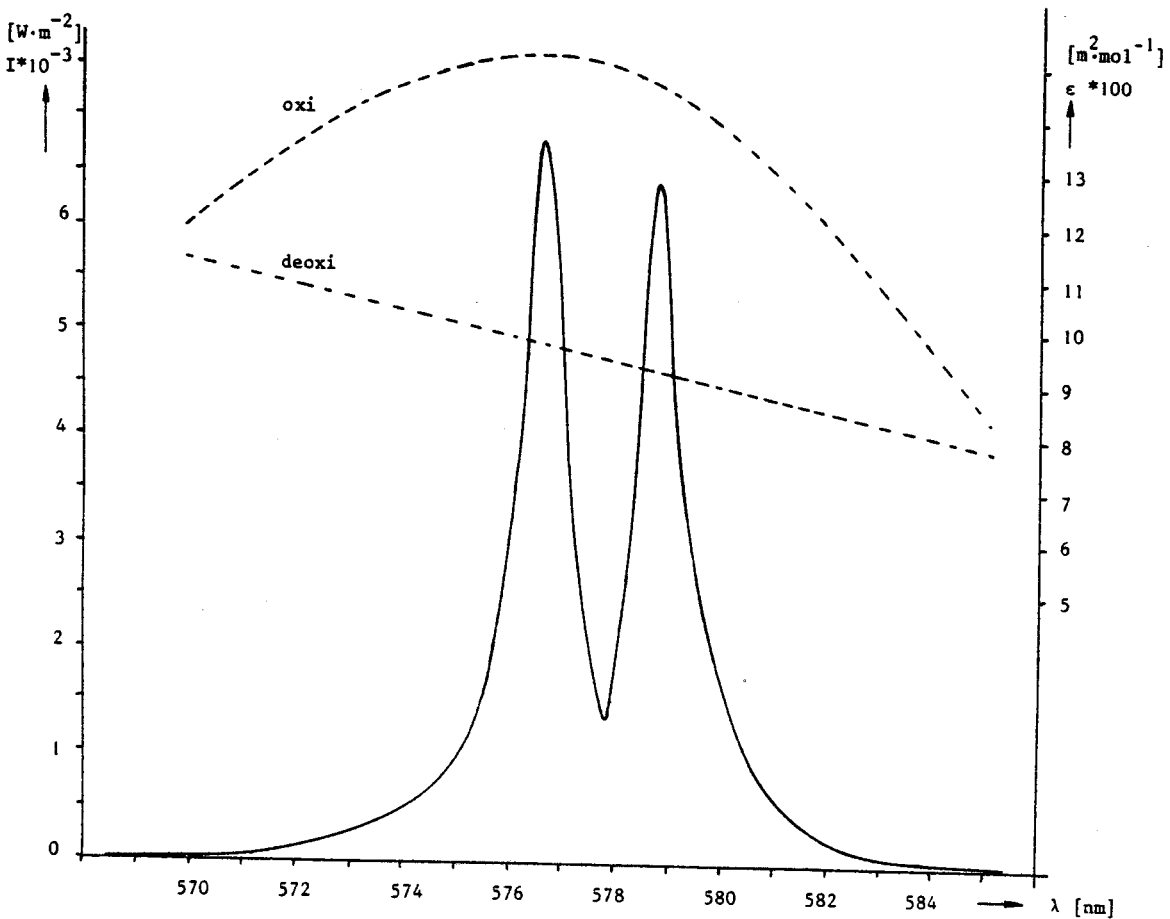


fig 3.3 Emissiespektrum van lamp + filter ($I_0(\lambda) \cdot f_2(\lambda)$)
 Absorptiespektrum van deoxi- en oxihemoglobine ($\epsilon(\lambda)$)

Gebruikt men formule 3.3.1 voor de beide interferentiefilters ($f_1(\lambda)$ en $f_2(\lambda)$), en voor twee gevallen, te weten met I_1 en I_2 , en zonder preparaat ($c=0$) I_{10} en I_{20} , dan krijgen we de volgende vier vergelijkingen:

$$I_1 \doteq \int_{538}^{554} I_0(\lambda) \cdot f_1(\lambda) \cdot 10^{-\{\epsilon(\lambda) + \Delta\epsilon(\lambda) \cdot Y\} \cdot c \cdot d} \cdot d\lambda$$

$$I_{10} \doteq \int_{538}^{554} I_0(\lambda) \cdot f_1(\lambda) \cdot d\lambda$$

3.3.2

$$I_2 \doteq \int_{570}^{585} I_0(\lambda) \cdot f_2(\lambda) \cdot 10^{-\{\epsilon(\lambda) + \Delta\epsilon(\lambda) \cdot Y\} \cdot c \cdot d} \cdot d\lambda$$

$$I_{20} \doteq \int_{570}^{585} I_0(\lambda) \cdot f_2(\lambda) \cdot d\lambda$$

Wanneer we nu de grootheid K als volgt definiëren:

$$K = \frac{\log(I_2/I_{20})}{\log(I_1/I_{10})} \quad 3.3.3$$

Dan kunnen we met behulp van fig 3.1, 3.2 en 3.3 en met vgl 3.3.2 en 3.3.3, K berekenen als functie van de saturatie Y , zie fig 3.4 en 3.5

Wanneer de beide golflengtebanden erg nauw zijn zie vgl 3.3.4

$$I_0(\lambda) \cdot f_1(\lambda) = C_1 \cdot \delta(\lambda - 546) \quad 3.3.4$$

$$I_0(\lambda) \cdot f_2(\lambda) = C_2 \cdot \delta(\lambda - 577)$$

Dan vereenvoudigt $K(Y)$ tot vgl 3.3.5

$$K(Y) = \frac{\epsilon(577) + \Delta\epsilon(577) \cdot Y}{\epsilon(546) + \Delta\epsilon(546) \cdot Y} \quad 3.3.5$$

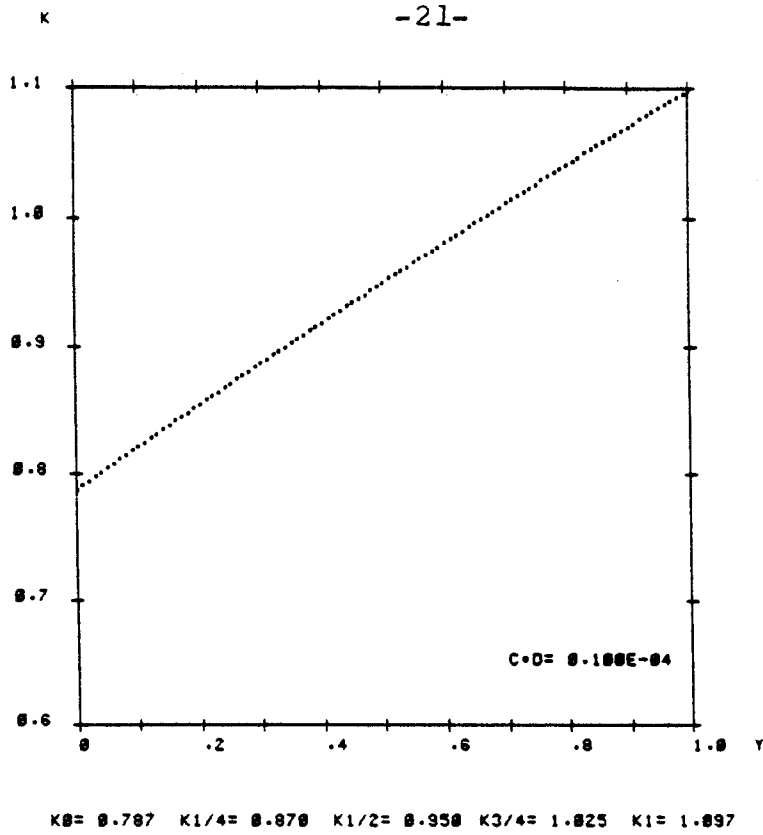


fig 3.4 IJkkurve van K tegen Y voor $c \cdot d = 10^{-5} \text{ mol/m}^3$
 $K_0 = K(Y=0)$ etc.

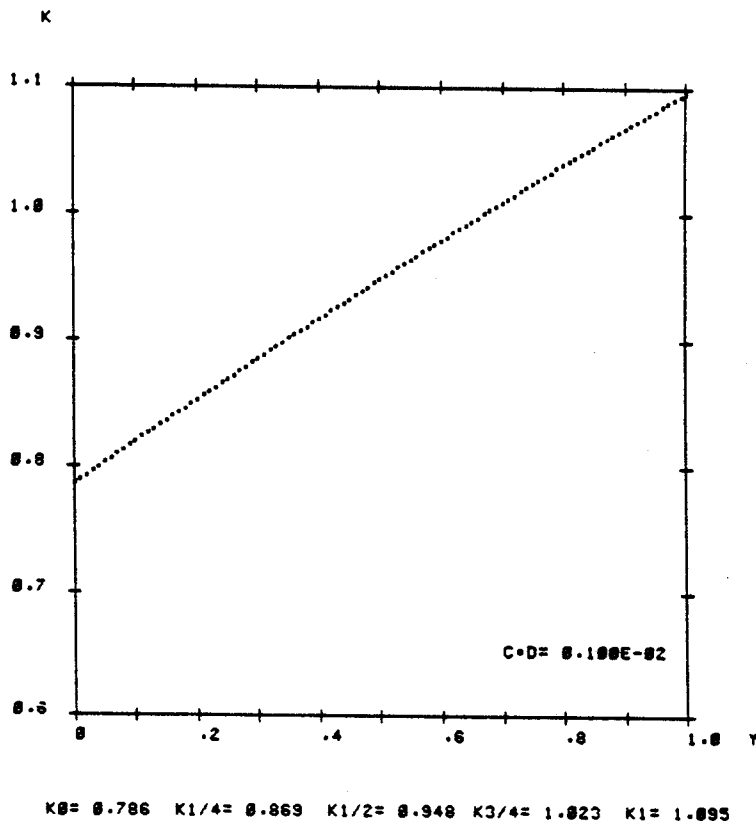


fig 3.5 IJkkurve van K tegen Y voor $c \cdot d = 10^{-3} \text{ mol/m}^2$

De waarden van ξ en $\Delta\xi$ (Zwart et al 1981) in 3.3.5 ingevuld levert:

$$K(Y) = \frac{9.61 + 5.60 \cdot Y}{12.23 + 1.58 \cdot Y} \quad 3.3.6$$

Inderdaad blijkt dat de fig 3.4 en 3.5 goed aan de vgl 3.3.6 voldoen. Voor grotere waarden van $c \cdot d$ blijkt de kromme echter niet meer te voldoen aan vgl 3.3.6 .

In het interval ($10^{-5} \text{ mol/m}^2 < c \cdot d < 10^{-3} \text{ mol/m}^2$) waarin zich de metingen bevinden zijn de afwijkingen tussen vgl 3.3.2 en 3.3.6 kleiner dan 3%.

Dat de afwijking tussen 3.3.2 en 3.3.6 zo groot wordt voor grotere waarden van $c \cdot d$, kunnen we begrijpen door de voorwaarde vgl 3.3.5 te vergelijken met de fig 3.2 en 3.3 .

Een voorbeeld van de afwijkingen die optreden ziet u in fig 3.6 .

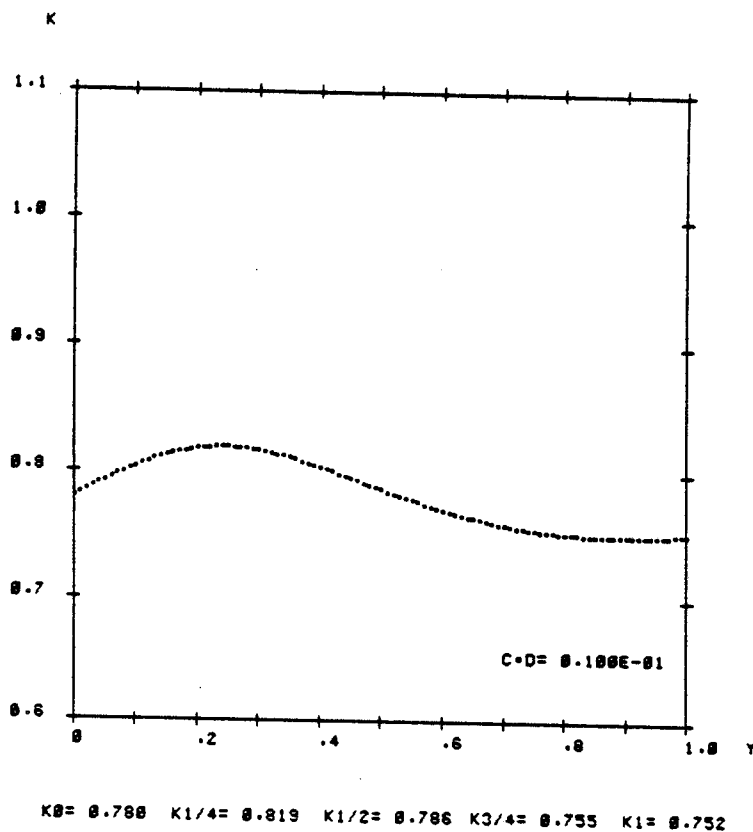


fig 3.6 IJkkurve van K tegen Y voor $c \cdot d = 10^{-2} \text{ mol/m}^2$

4 MEETMETHODE

4.1 DE MEETCEL

De in dit verslag beschreven meetcel is in principe ongewijzigd, alleen de maten zijn veranderd.

De meetcel is een rechthoekige ruimte van 12 mm lang, 0.5 mm breed en 0.1 - 0.2 mm dik, waarin zich het te onderzoeken monster bevindt.

Breedte en dikte van de meetcel worden bepaald door de voorzijde van de 4 wiggen (fig 4.1)

De wiggen type 1 bevatten elk een luchtkamer waarin zich een bepaald gasmengsel bevindt dat continu ververst wordt. De wiggen type 2 bevatten de fibers nodig voor de lichtgeleiding (saturatiemeting), en één bevat de elektroden (PO_2 -meting).

Naast elkaar liggen in het midden van de wig ongeveer 100 fibers met een diameter van 70 μm , tussen deze fibers liggen de drie elektroden, bestaande uit een 20 μm Pt draad en een glazen isolatiemantel (fig 4.2).

De fibers liggen slechts over een lengte van 7 mm om meting van randeffekten te voorkomen.

Over alle wiggen is een 6 μm teflon membraan gespannen, en tussen de wig met de elektroden en het membraan bevindt zich een dunne laag buffervloeistof, zodat de elektrode altijd in hetzelfde milieu meet.

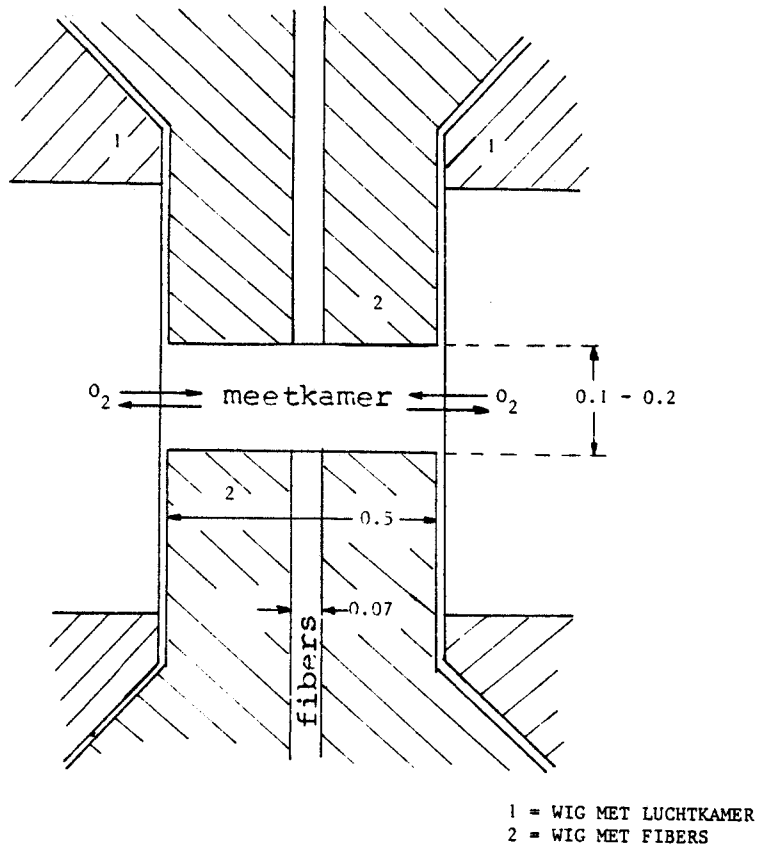


fig 4.1 Dwarsdoorsnede van de meetkamer met de vier wiggen

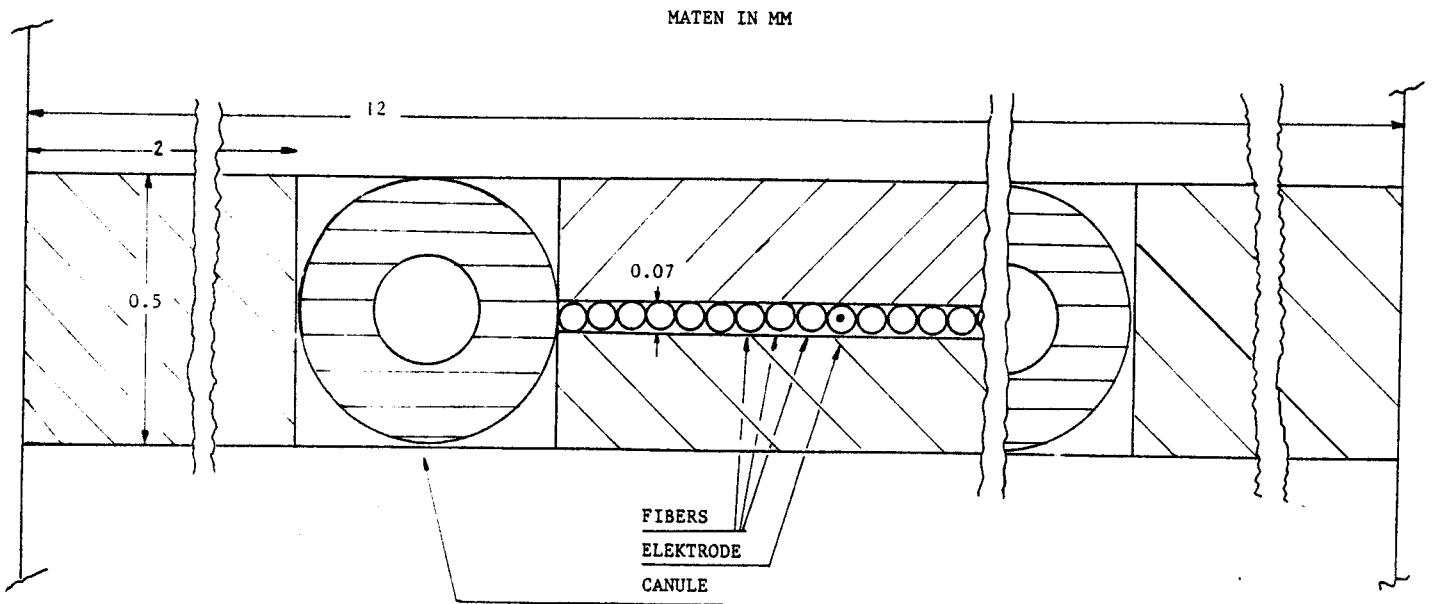


fig 4.2 Vooraanzicht van de wig met de elektroden

4.2 DE WIGGEN

De luchtwiggen zijn gemaakt van geänodiseerd aluminium, en zijn dezelfde gebleven, hoewel ze iets smaller zijn gemaakt.

Nieuw zijn echter de wiggen die de fibers bevatten, deze waren in de opstelling van Jan Moonen vervaardigd van Noryl, een zwarte kunststof.

Jan Moonen kampte met het probleem dat de helften waaruit de wiggen zijn opgebouwd gingen werken en dat de lijmverbinding tussen de helften (Araldit) losliet.

Hierdoor werd de glazen isolatie van de elektroden beschadigd en maakten de elektroden na enkele weken kortsluiting. Door de wiggen uit monel (Cu Ni legering) te maken, werden de invloeden van wateropname en geheugeneffekten van een kunststof geëlimineerd.

Door om de twee wighelften bovendien een RVS ring aan te brengen wordt voorkomen dat op de lijmverbinding tussen de twee wighelften een kracht wordt uitgeoefend.

De nieuwe kunsthars (Araldit f met AY 905 en DY 062) wordt nu alleen gebruikt als vulmiddel.

De voorzijde en de achterzijde van de wiggen type 2 is gepolijst om het lichtverlies bij in- en uittreden van de fibers te minimaliseren.

De wiggen zijn gedurende zes maanden intensief gebruikt en vertonen geen sporen van achteruitgang.

4.3 DE PO₂-METING

De elektrodestroom I_e , die ontstaat door de reductie van zuurstof aan de kathode (vgl 3.1.1), is van de orde grootte 10^{-9} ampère (1 nA).

Deze stroom wordt in een PO₂-versterker omgezet in een spanning van enkele volts, volgens het schema van fig 4.3 .

De hierin gebruikte operationele versterker A heeft de volgende eigenschappen:

- 1) een te verwaarlozen biasstroom ($\leq 10^{-14}$ ampère)
- 2) grote signaal-ruis verhouding (eigenruis ≤ 10 microvolt)

Na de compensatie voor de polarisatiespanning (700 mV) is het uitgangssignaal evenredig met I_e .

De versterker is gebouwd door Ir. J. de Koning . In deze schakeling zijn geen wijzigingen aangebracht.

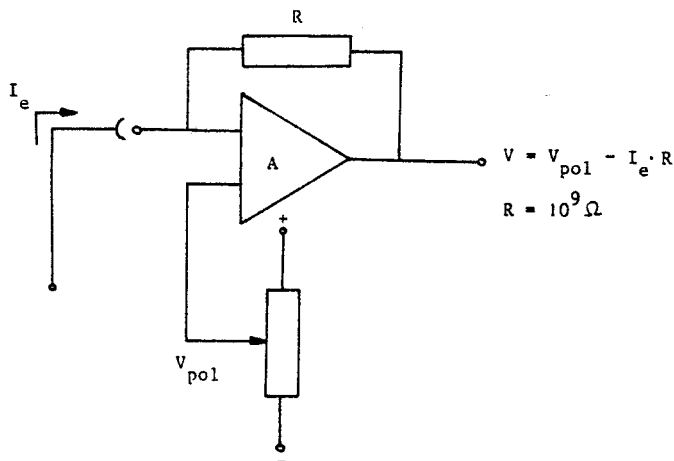


fig 4.3 Schema van de PO₂-versterker

4.4 HET OPTISCHE SYSTEEM

De zuurstofsaturatie van de hemoglobine-oplossing wordt bepaald aan de hand van absorptiemetingen, verricht in twee golflengtebanden. Deze beide banden omvatten twee lijnen van het kwik emissie-spektrum.

Andere lijnen en het continue spektrum worden tegengehouden door middel van twee interferentiefilters en met behulp van een chopper worden beide golflengtebanden om beurten doorgelaten (zie ook fig 4.5) .

Twee fotonvoltaics (fig 4.4) meten een vast gedeelte van de (referentie)lichtsterkte en vervolgens worden de beide stralenbundels op het monster gekoncentreerd (fig 4.5). Het licht dat door het monster valt wordt vervolgens door een derde fotonvoltaic opgevangen.

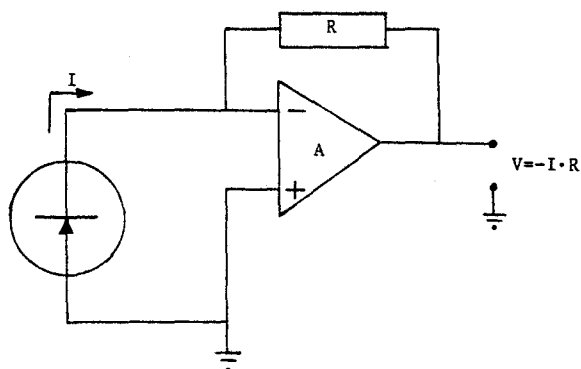


fig 4.4 Fotonvoltaic: fotocel met stroom-spanningsversterker voor optimale aanpassing

4.5 OPTIMALISEREN VAN HET OPTISCHE SYSTEEM

De opstelling afgebeeld in fig 4.5 verschilt op enkele punten van die welke door Jan Moonen (Moonen 1981) werd beschreven:

- 1) De totale lichtweg is teruggebracht van 1.2 m tot 0.3 m.
- 2) Glasplaatjes zijn vervangen door beamsplitters
- 3) De monochromator en het interferentiefilter zijn vervangen door twee nieuwe interferentiefilters.

De redenen hiervoor waren:

- a) De lichtopbrengst van het gehele systeem was te gering, met name die van de monochromator en het oude interferentiefilter.
- b) De bandbreedte van de monochromator (bepaald door o.a. de breedte van intree- en uittree-spleet 2-3 mm) was veel te groot; verder bleek de ingestelde golflengte te verlopen als gevolg van trillingen.
- c) Ook het oude interferentiefilter had een te grote bandbreedte; oude interferentiefilter: 50 nm op 10% van het maximum, nieuwe: 12 nm op 10% en 18 nm op 1% van het maximum, terwijl de transmissie van het nieuwe filter een factor vier hoger was.

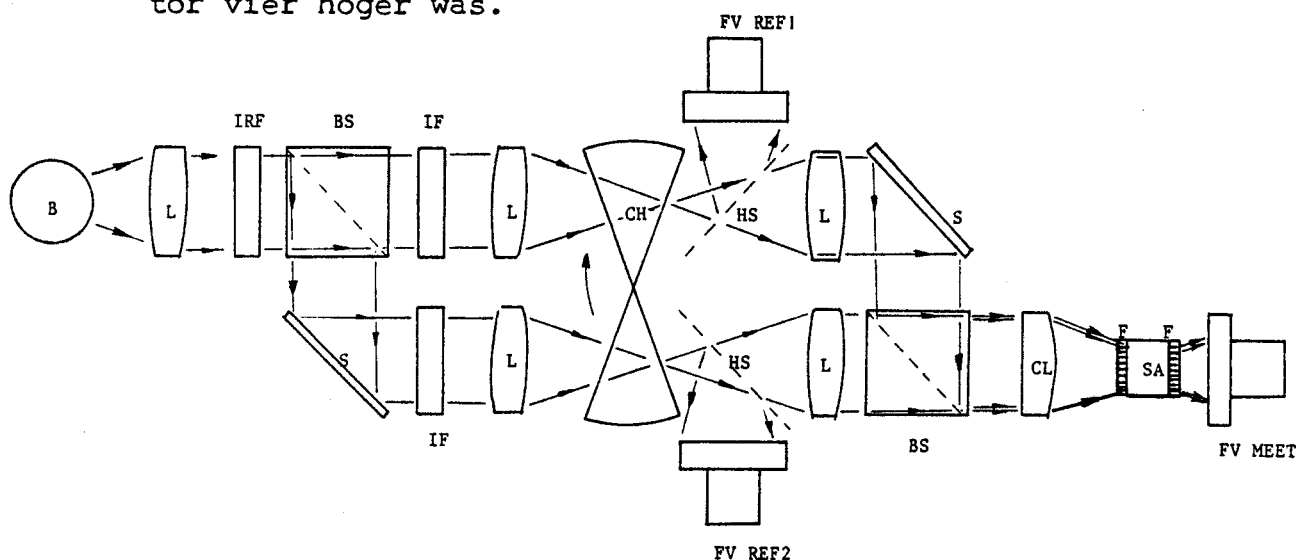


fig 4.5 Schema van het optische systeem

FV=FOTO-VOLTIAC	S =SPIEGEL
B =LICHTBRON	SA=SAMPLE
L =LENS	CL=CILINDER LENS
IRF=WARMTE-FILTER	F =FIBERS
BS=BEAM-SPLITTER	
IF=INTERFERENTIE-FILTER	
CH=CHOPPER	
HS=HALFDOORLATENDE SPIEGEL	

Met betrekking tot het licht dat op
gelijke lichtintensiteit valt.

Dit licht dient hiervoor te worden
rechthoek van 0.07 x 7 mm.

Er zijn twee fundamentele problemen.

- 1) De ruimtehoek waarvoor het licht
accepteren is beperkt.
- 2) De afmetingen van de klemmen
ontlading van de klemmen.

De eerste lens in het systeem (de
bouw); hiermee wordt de lichtbundel
evenwijdige bundel gemaakt. Dit wordt
met een cilinderlens gedaan.

Om een zo hoog mogelijk rendement
verkrijgen, dient de afstand van de
kleind; de brandpuntsafstand moet
zijn. Dit heeft een aantal problemen.

- 1) De invalshoek wordt te klein
te van het licht.
- 2) De diameter van de lens moet
brandpuntsafstand.

Gekozen is voor een lens met een
licht invalt iets groter dan de
brandpuntsafstand.

Een in dit opzicht is het mogelijk
een ronde bundel zijn te maken met
een faktor 5-10 aan te nemen
worden.

Deze oplossing bleek niet mogelijk
vanwege de technische problemen die
hoekig (0.07 x 7 mm) zijn.

Met betrekking tot de afstand van de
lens tot de klemmen.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

De afstand van de lens tot de klemmen
moet klein zijn.

4.6 ELEKTRONISCH GEDEELTE VAN DE SATURATIEMETING

De hier beschreven elektronika is in zijn geheel afwijkend van die welke Jan Moonen (Moonen 1981) heeft beschreven. In fig 4.6 zien we hoe de twee referentiesignalen ($V_{ref 1}$ en $V_{ref 2}$) er uitzien die afwisselend door de chopper (CH fig 4.5) worden doorgelaten. De hoogte van deze signalen (gemeten met $FV_{ref 1}$ en 2 fig 4.5) geeft informatie over de lichtopbrengst van de lamp. Met deze signalen ($V_{ref 1}$ en 2) worden twee pulsgeneratoren gestuurd die de pulsen 1 en 2 afgeven en het bemonsteringstijdstip bepalen (fig 4.7). Tijdens deze korte puls volgen de Sample and Hold Amplifiers (S.H.A.), zowel het meetsignaal (V_{meet}) als het referentiesignaal (V_{ref}) en na de puls houden zij het vast tot de volgende puls. Zij stellen de Divider (\div) in de gelegenheid om het 'gelijkgerichte' meet- en referentiesignaal op elkaar te delen. Wij krijgen zo voor elke periode een signaal V_1 en V_2 die niet meer afhankelijk zijn van de lichtintensiteit van de lamp.

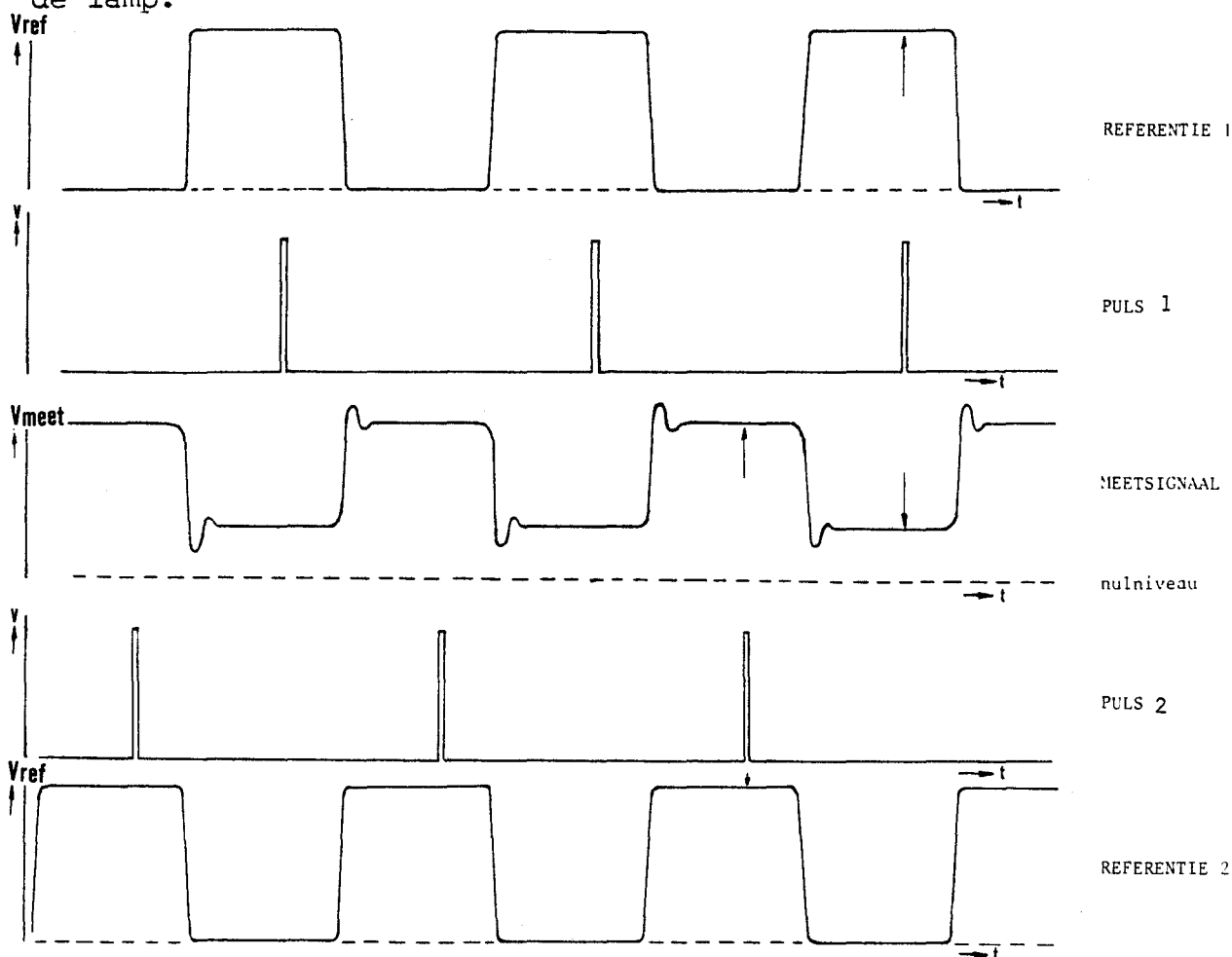


fig 4.6 Elektronische signalen

De filosofie die hieraan ten grondslag ligt is de volgende. Gebleken is dat de intensiteit van de lichtbron sterk varieert ($\pm 10\%$), waarschijnlijk ten gevolge van netspanningsfluctuaties.

Door nu het meetsignaal door het betreffende referentiesignaal te delen worden deze variaties grotendeels geëlimineerd. Zo ontstaan twee signalen (V_1 en V_2) die alleen van de extinktie van het hemoglobine monster afhangen. Om deze intensiteitsfluctuaties te bestrijden gebruikte Jan Moonen twee Lock In Amplifiers met een integratietijd van 3-10 sec. De variaties in de lichtopbrengst worden hierdoor redelijk effectief uitgemiddeld. Het gevolg is wel dat de twee elektronische signalen van Y een aantal seconden achterlopen bij het PO_2 -signaal (bij heen en terug meten hysteresis).

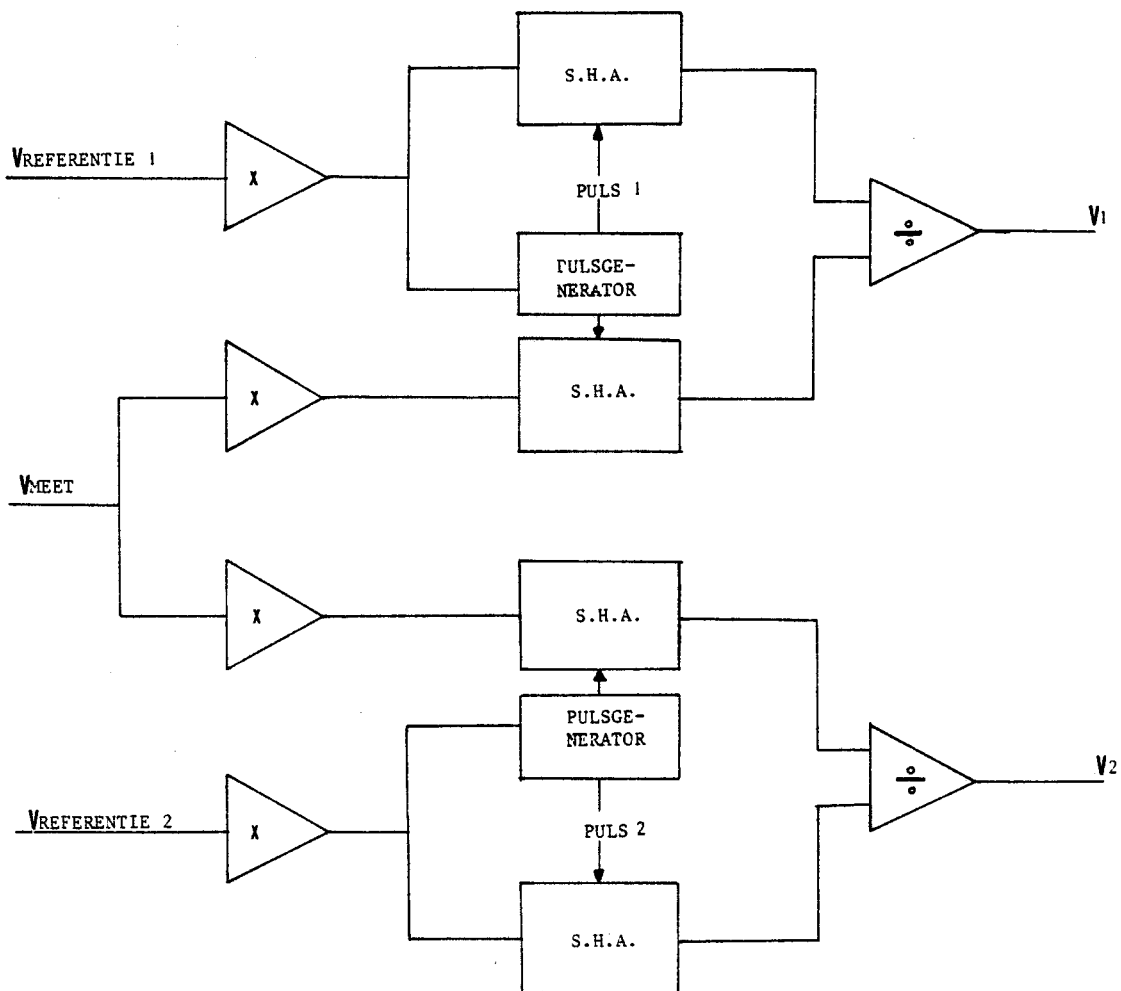


fig 4.7 Blokschema van de elektronische schakeling

4.7 OPTIMALISEREN VAN DE SATURATIEMETING

Om een optimale signaal-ruis-verhouding te verkrijgen is het noodzakelijk om de dikte van het hemoglobine monster zodanig te kiezen dat het intensiteitsverschil ΔI tussen deoxi- en oxihemoglobine maximaal is vgl 4.7.1 .

$$\Delta I = I_0 \cdot (10^{-\epsilon \cdot c \cdot d} - 10^{-(\epsilon + \Delta\epsilon) \cdot c \cdot d}) \quad 4.7.1$$

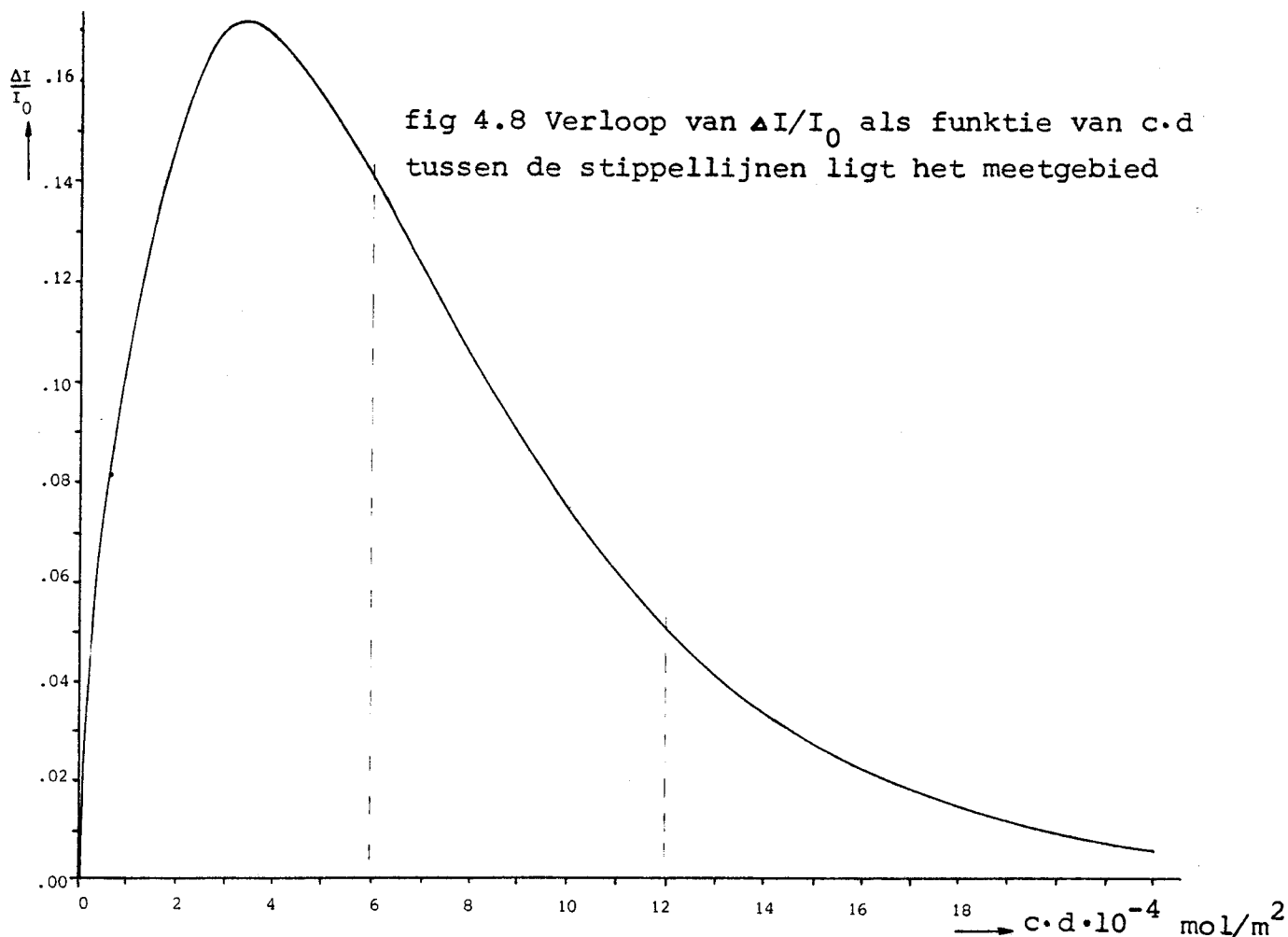
$$\frac{d\Delta I}{d(cd)} = 0 = I_0 \cdot \ln 10 \cdot (-\epsilon \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d} + (\epsilon + \Delta\epsilon) \cdot 10^{-(\epsilon + \Delta\epsilon) \cdot c \cdot d})$$

$$\frac{\epsilon}{\epsilon + \Delta\epsilon} = \frac{10^{-(\epsilon + \Delta\epsilon) \cdot c \cdot d}}{10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}} = 10^{-\Delta\epsilon \cdot c \cdot d} \quad 4.7.2$$

$$\begin{aligned} \text{met } \epsilon &= 1000 \text{ m}^2/\text{mol} \\ \Delta\epsilon &= 600 \text{ m}^2/\text{mol} \\ c &= 10 \text{ mol Fe/m}^3 \end{aligned}$$

Vergelijking 4.7.2 levert bij $d = 34 \mu\text{m}$ als maximum voor $\Delta I/I_0$ de waarde 0.171 op.

Voor het verdere verloop zie fig 4.8,



4.8 HET METEN MET BLOED

Ten opzichte van de metingen met hemoglobine heeft de saturatiemeting bij bloed twee extra moeilijkheden.

Beide moeilijkheden komen voort uit het inhomogene karakter van bloed: een suspensie van RBC in plasma.

1) Verstrooiing

De lichtstralen worden verstrooid aan de rode bloed cellen, zodat de effectieve weglengte in het monster groter wordt dan de afstand tussen de wiggen.

Ook treed lichtverlies op, omdat het verstrooide licht de fibers niet bereikt.

2) Statistiek

Ten gevolge van de statistische spreiding van het aantal RBC dat een lichtstraal treft ontstaat ook informatieverlies:

wanneer een lichtstraal meer dan het gemiddelde aantal RBC treft zal hij wat lichtintensiteit betreft al snel niet meer meetellen.

wanneer de lichtstraal minder dan het gemiddelde aantal RBC treft zal de informatie die deze straal bevat gering zijn, terwijl de intensiteit groter is dan gemiddeld.

Tenslotte is het aantal RBC dat aanwezig is in het meetgebied onderhevig aan statistische fluktuaties en kan aanzienlijk veranderen ten gevolge van uitzakking van de RBC (bezinking).

Alle boven genoemde effecten veroorzaken een slechtere signaal-ruis verhouding bij de meting met bloed ten opzichte van een meting met een hemoglobineoplossing, die dezelfde concentratie hemoglobine bevat.

5 METINGEN

5.1 METINGEN MET HEMOGLOBINE

Het gebruikte hemoglobine is afkomstig van runderbloed dat minder dan drie dagen oud was, en op dezelfde dag waarop de meting gedaan is gehemoliseerd is.

Het runderbloed bevat heparine om de stolling tegen te gaan, echter geen antibioticum daar deze invloed op de ligging van de saturatiekurve heeft.

Het hemoglobine werd bereid door het runderbloed te hemoliseren met een fosfaatbuffer (pH = 7.4), en dit mengsel daarna op 10000 toeren per minuut af te draaien en alleen de bovenste vloeistof te gebruiken die vrij bleek te zijn van celwandfragmenten.

De gebruikte buffer bleek bij een $PCO_2 = 5$ kPa een pH van 7.2 te hebben.

Bij een ijkmeting voor alleen 0% en 100% verzadiging bleek de afwijking van de K-waarde kleiner dan 0.5% te zijn.

Voor de continue metingen bleek de afwijking echter groter ($\pm 10\%$); waarschijnlijk is dit te wijten aan een onnauwkeurige waterijking (vgl 3.3.2 I_{10} en I_{20}) die achteraf gedaan wordt. Bij deze ijking mag de stand van de wiggenhouder niet veranderd worden wat in de praktijk niet te garanderen is.

Bij de metingen bleken zich waterbruggen te vormen tussen de aansluitpunten van de elektroden ($R = 10^{10} \Omega$).

Deze zijn verholpen door over deze contacten droge N_2 te leiden.

5.2 BIJ DE GRAFIEKEN

De geregistreerde data werden met behulp van een PDP-komputer-systeem (PDP 11/34 en PDP 11/45) verwerkt.

Op de beide saturatiesignalen (V1 en V2) bevonden zich kleine storingen (specs) die, wanneer zij zich tijdens de bemonsteringspuls voordeden, de meting volslagen onbruikbaar maakten. Het aantal onbruikbare punten varieerde nogal, maar kwam als regel niet boven 4% van het totaal aantal punten. Daar deze punten meer dan $3 \cdot \bar{\sigma}$ buiten de kurve lagen zijn zij verwijderd.

Het programma rekent V1 en V2 om naar Y en Ie naar PO_2 en deze worden geplot als sat tegen PO_2 .

In de grafieken zijn een aantal gegevens geschreven:

- de datum en het nummer van de meting
- de P50 berekend met de beste aanpassing en
- vervolgens de parameters van de beste aanpassing zie par 2.2.4.

In de figuur is , naast de meetpunten, ook de beste aanpassing van het uitgebreide M.W.C.-model aan deze punten getekend.

Onder elke grafiek staan de kondities vermeld waaronder de meting is verricht.

In de figuur 5.2 is de meting van fig 5.1 nogmaals uitgezet waarbij echter elk punt een gemiddelde is van vier punten uit fig 5.1 .

Hoewel de kurve er een stuk mooier uitziet ($\bar{\sigma} = 0.8\%$ sat.) bevat zij toch minder informatie dan de oorspronkelijke figuur. Van alle metingen zijn op die manier gemiddelde kurven gemaakt, maar alleen fig 5.2 is in dit verslag opgenomen als voorbeeld.

Het hemoglobine is verdund met een fosfaatbuffer die een pH=7.2 had bij een $PCO_2=5$ kPa.

SAT

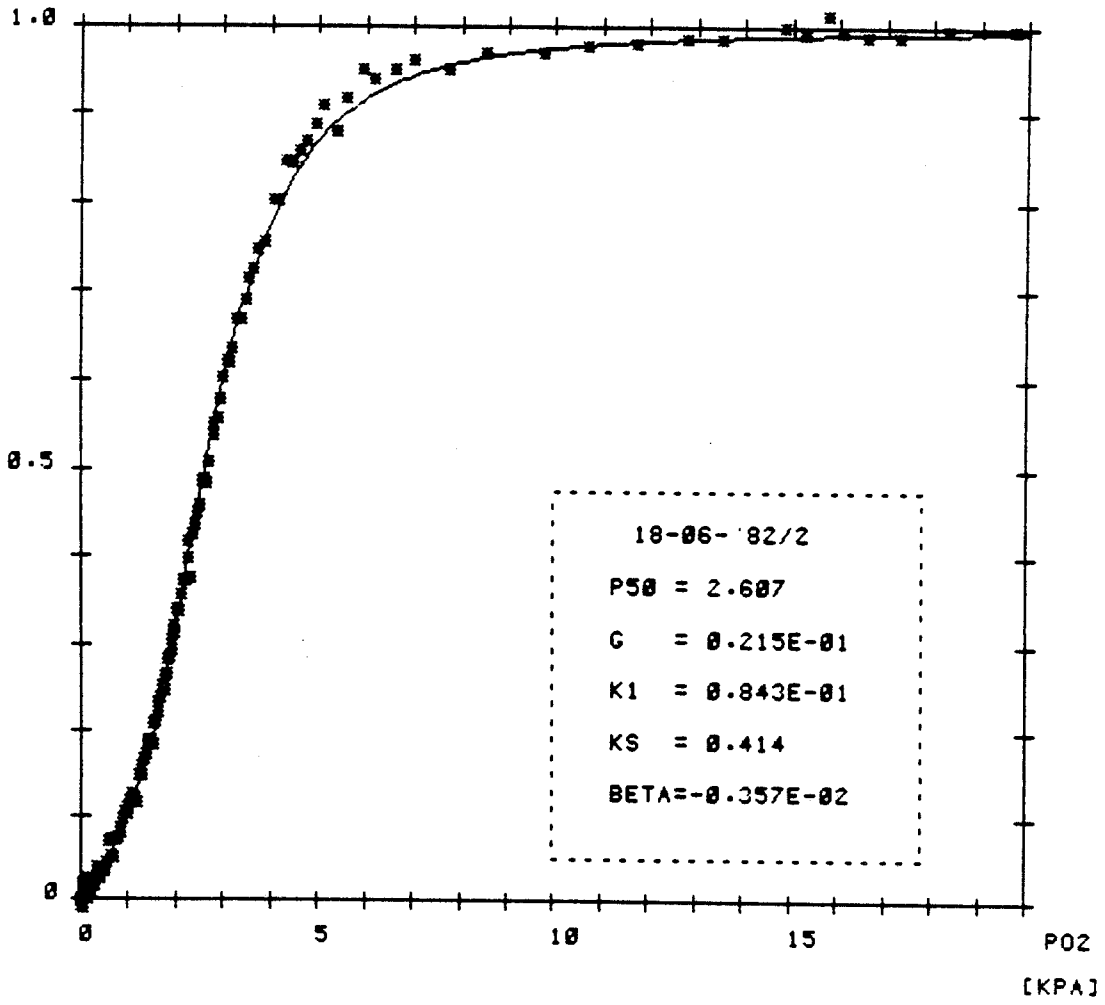


fig 5.1 [Hb] = 3.8 mol/m³ (drie dagen oud)
T = 25 °C
PCO₂ = 5.4 kPa

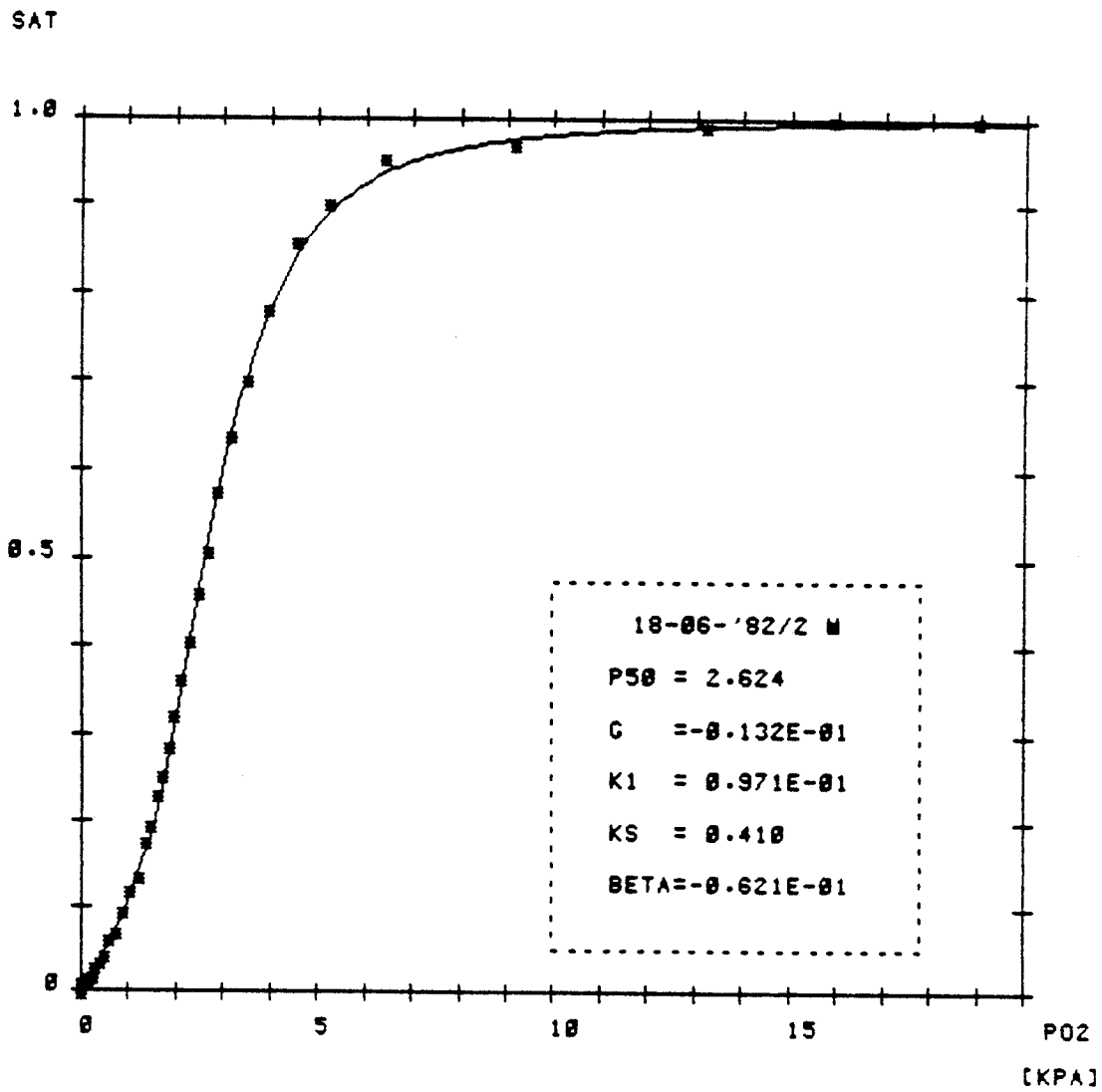


fig 5.2 $[Hb] = 3.8 \text{ mol/m}^3$ (drie dagen oud)
T = 25 °C
PCO₂ = 5.4 kPa

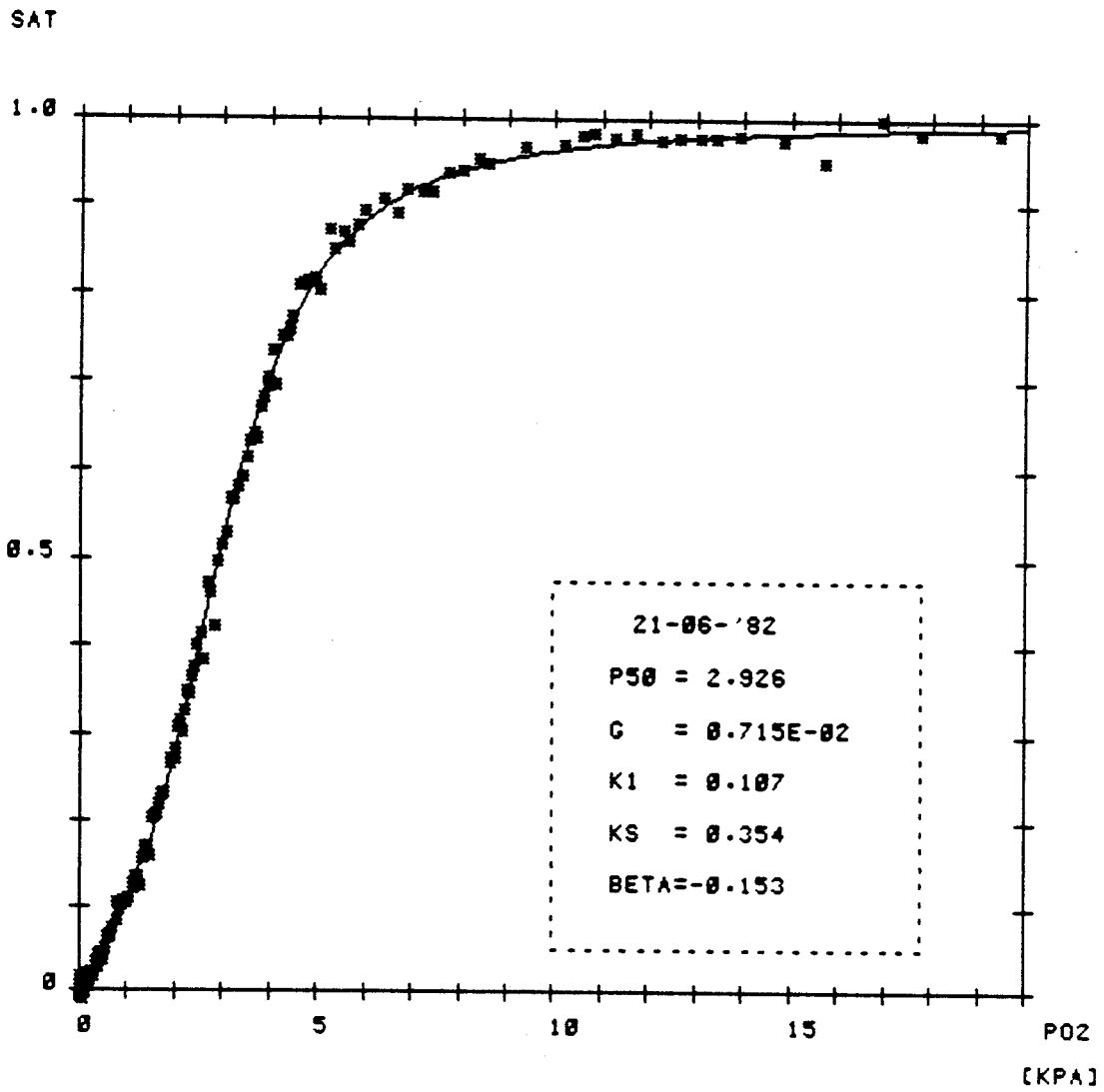


fig 5.3 [Hb] = 4.8 mol/m³ (vers)
T = 24 °C
PCO₂ = 5.4 kPa

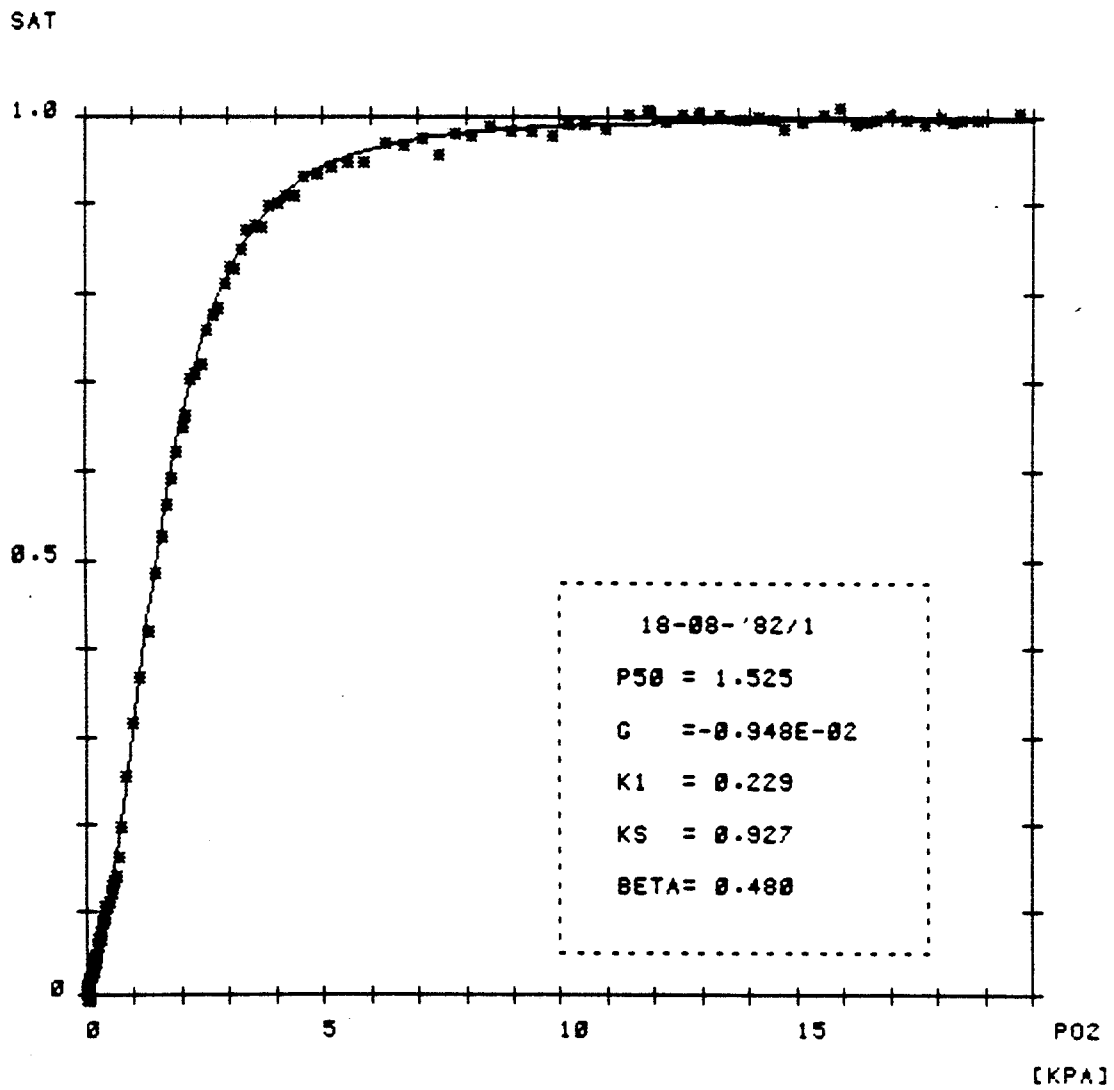


fig 5.4 $[Hb] = 6.6 \text{ mol/m}^3$ (twee dagen oud)
T = 24 °C
PCO₂ = 5.2 kPa

5.3 METINGEN MET BLOED

De verwerking van de data is identiek aan die van de metingen met hemoglobine.

De RBC werden gesuspendeerd in een Krebs-Ringer buffer die wat pH betreft dezelfde eigenschappen had als de voor hemoglobine gebruikte fosfaatbuffer.

Het grootste probleem met deze metingen was de hoge extinktie van de oplossingen.

Hierdoor ontstond een slechtere signaal-ruis-verhouding die in de figuren zichtbaar is als een grotere spreiding. Deze spreiding is het grootst voor Y_{21} omdat daar de extinktie het hoogst was.

In fig 5.5 is geen beste aanpassing getekend omdat deze niet berekend kon worden.

De spreiding in de meetpunten is dermate groot dat de aanpasmethode met de kleinste kwadraten niet werkte (geen convergentie).

Fig 5.6 vertoont een betere signaal-ruis-verhouding.

Dit is bereikt door de lichtwigen dichter bij elkaar te drukken zodat de dikte van het bloedmonster afneemt.

In fig 5.7 is weerom een gemiddelde van fig 5.6 gegeven. De afkorting Htc geeft het volumepercentage van RBC aan.

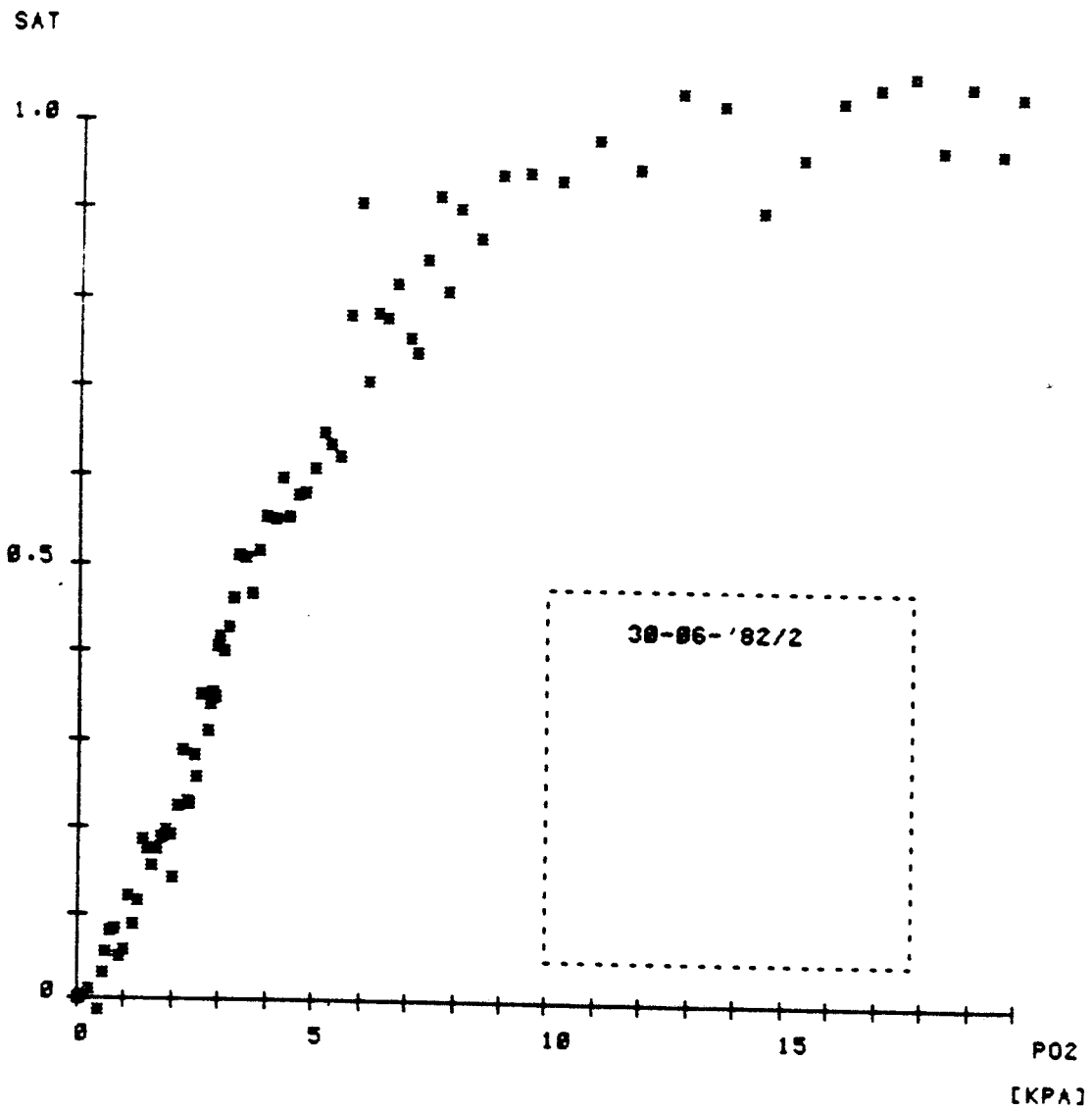


fig 5.5 Htc = 32% (twee dagen oud)
T = 28 °C
PCO₂ = 5.4 kPa

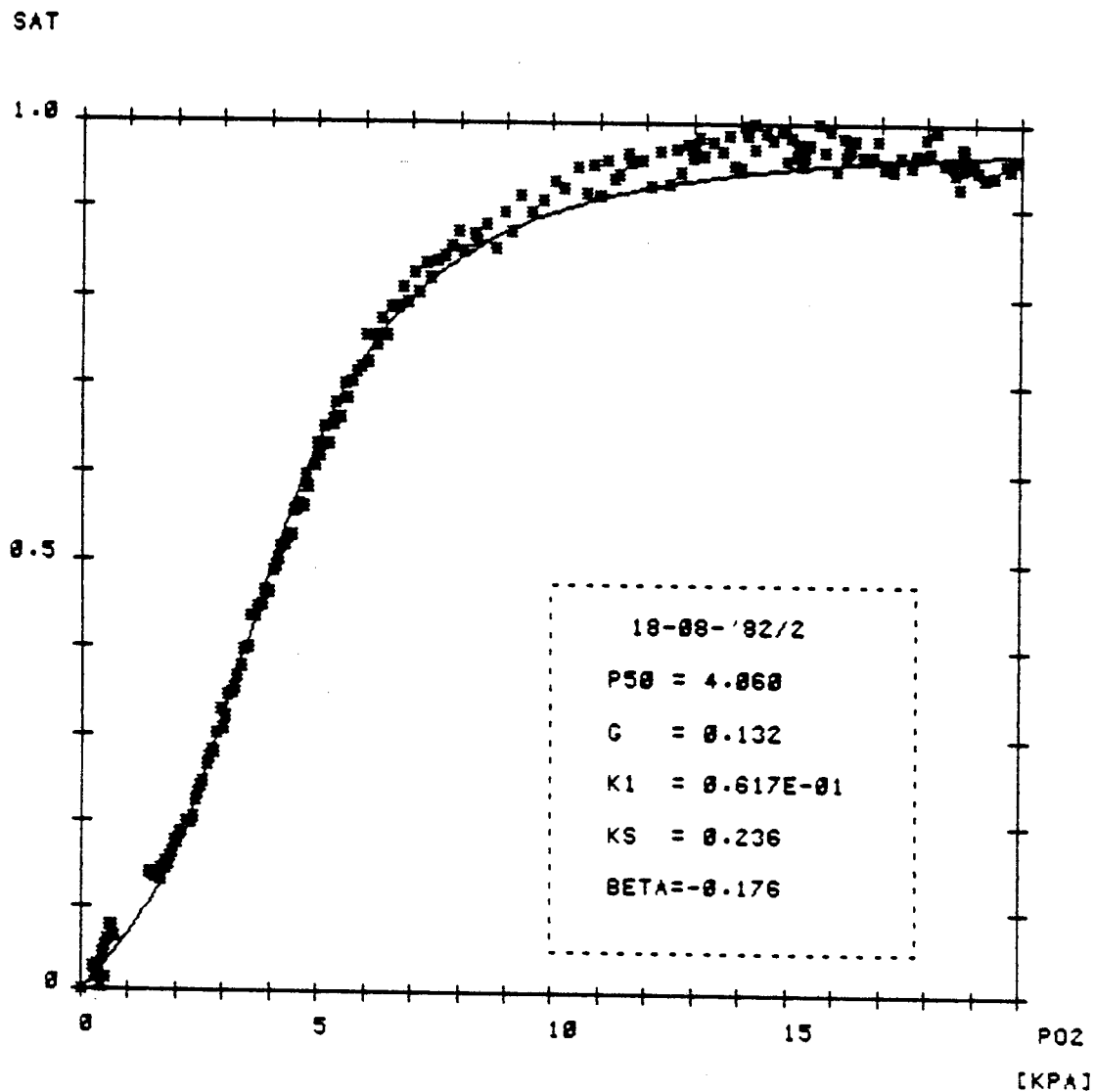


fig 5.6 Htc = 33% (twee dagen oud)
T = 24 °C
PCO₂ = 5.2 kPa

Het 'gat' in de curve werd veroorzaakt door een tijdelijk uitvallende elektronika, dit verklaart tevens de 'rafelige' rand

SAT

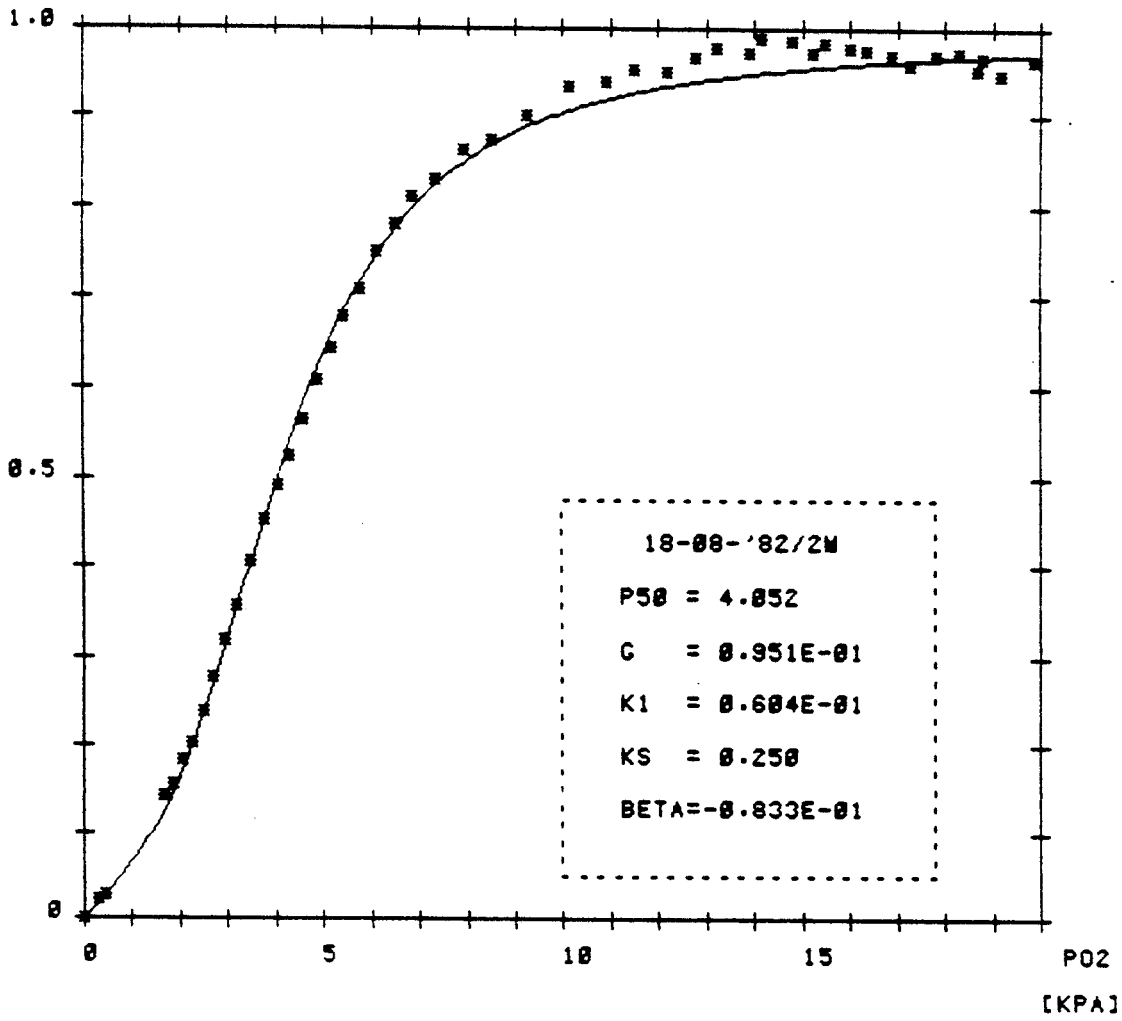


fig 5.7 Htc = 33% (twee dagen oud)
T = 24 °C
PCO₂ = 5.2 kPa

6 DISKUSSIE

Zoals uit de figuren 5.1 t/m 5.4 blijkt voldoet de opstelling aan alle eisen, gesteld in de inleiding, wat betreft hemoglobine-oplossingen. De tijd waarin de kurven gemeten werden bedroeg ongeveer 20 minuten, voornamelijk om een zo groot mogelijk aantal meetpunten te verkrijgen.

De gemiddelde spreiding van de meetpunten rond de kromme bedraagt minder dan 1% sat. en het verschil tussen de berekende K-waarden en de K-waarden verkregen bij de ijking bedraagt minder dan 0.5%. De nauwkeurigheid waarmee de saturatie bepaalt kan worden is dus goed te noemen.

Bij de ijking van de PO_2 -elektroden bleken wel steeds de nulstroom en de richtingscoëfficiënt van de ijklijnen te verschillen, echter de afwijkingen van de gasmengpomp (0.1 kPa) met de aangegeven waarden bleken goed te reproduceren. De nauwkeurigheid van de elektroden overtreft die van de gasmengpomp, en is ook goed te noemen.

Uit de figuren 5.5 t/m 5.7 blijkt dat dit verhaal niet opgaat voor bloed. De gemiddelde spreiding is veel groter (5-10 %sat.) en is vooral erg hoog bij hoge waarden van Y. Om de nauwkeurigheid van de bloedmetingen op te voeren zal de dikte van het bloedmonster nog verder teruggebracht moeten worden.

In principe is de opstelling goed bruikbaar voor bloedmetingen, echter het meten is tamelijk ingewikkeld en bewerkelijk.

Samenvattend kan gesteld worden dat de opstelling goed voldoet voor hemoglobine-oplossingen, en dat zij redelijk voldoet in het geval van bloed.

7 VOORTZETTING VAN HET ONDERZOEK

Met betrekking tot de gestelde eisen kan gezegd worden dat de opstelling aan alle eisen voldoet.

De opstelling kan een nog grotere nauwkeurigheid verkrijgen door de afstand tussen de lichtwiggen te verkleinen.

Dit zou onder andere gedaan kunnen worden door de wiggen met de luchtkamers iets smaller te maken ($\approx 10 \mu\text{m}$).

Verder kan de opstelling op een eenvoudige manier gethermostatiseerd worden zodat bij 37°C gemeten kan worden.

Volgens mij dient een eventuele voortzetting van het onderzoek zich vooral te richten op het ontwerpen van een nieuwe meetcel die, werkende volgens dezelfde principes, vooral eenvoudiger te maken dient te zijn, en eenvoudiger te assembleren.

Een dergelijke meetcel bestaat reeds (Hemoscan), maar dit apparaat kon de opgegeven nauwkeurigheden niet waar maken.

De cel bestaat uit een glasplaatje, waarop het te onderzoeken bloedmonster wordt gedruppeld en waaroverheen een gasdoorlatend membraan wordt gespannen.

De dikte van het monster is $70 \mu\text{m}$ en de richting waarin de diffusie van gas plaatsvindt is evenwijdig aan de invalrichting van het licht.

In het glasplaatje zou de elektrode kunnen worden ondergebracht. Op deze manier vervallen de fibers en wordt de lichtopbrengst van het hele systeem vergroot.

Afsluitend kan gesteld worden dat het systeem goed voldoet, echter dat het te bewerkelijk is om als standaardopstelling gebruikt te worden.

De grootste beperkingen liggen naar mijn mening in de gekompliceerde meetcel.

LITERATUUR

- Adair, G.S. (1925) The Hemoglobin System v .The Oxygen
Dissociation Curve of Hemoglobin. J. Biol. Chem. 63, 529-545
- Breepoel, P.M. (1978) Proton Binding Studies on Hemoglobins
of Cow and Eel and the Interaction with Organic Phos-
phates. Dissertatie, Kath. Universiteit Nijmegen.
- Brenna, O., M. Luzzana, M. Pace, M. Perrella, F. Rossi, L. Rossi-Ber-
nardi, F. J. W. Roughton (1972) The Interaction between He-
moglobin and its "Oxygenlinked" Ligands. In "Hemoglobin
and Red Cel Structure and Funktion". Ed. J. Brewer. Adv. Exp.
Med. Biol. 28, 19-40.
- Cordone, L., A. Cupane (1981) Effects of some Cosolvents on
the Functionl Properties of Hemoglobin: Kinetics of O₂-
Displacement by CO. Biopolimers 20, 2137-2142.
- Hill, A.V. (1910) The Possible Effects of Agregation of the
Molecules of Hemoglobin on its Dissociation Curve. J. Physiol.
40, 4-7
- Imai, K. (1973) Analyses of Oxygen Equilibria of Native and
Chemically Modified Human Adult Hemoglobins on the Basis
of Adair's Stepwise Oxygenation Theory and on the Allos-
teric Model of Monod, Wyman and Changeux. Biochemistry
vol 12 no 5, 798-807
- Kimmich, H.P., F. Kreuzer (1969) Cathter PO₂ Electrode with
Low Flow Dependency and Fast Response. Respir. Physiol.
3, 100-110.
- Leeden-lensink, M. van der (1978) Bepaling van de Adairkon-
stanten voor het Zuurstof-hemoglobine-Evenwicht. Afstu-
deerverslag, THE.
- Lutz, J., H.G. Schulze, H.F. Michael (1975) Calculation of O₂
Saturation and of the Oxihemoglobin Dissociation Curve
for Different Species Using a New Programmable Pocket
Calculator. Pflügers Arch. 359, 285-295.
- Monod, J., J. Wyman, J.P. Changeux (1965) On the Nature of
Allosteric Transitions: A Plausible Model. J. Mol. Biol.
12, 88-118.
- Moonen, J. (1981) Meetopstelling voor Zuurstofbindingskurven
voor Hemoglobineoplossingen. Afstudeerverslag, THE

- Niesel, W. (1961) Ein Beitrag zur Deutung des S-förmigen Verlaufes der Sauerstoffbindungskurve. Pflügers Arch. 274:1-16
- Perutz, M.F., H.M. Irhead, J.M. Cox, C.G. Goaman (1968) Three-dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxyhemoglobin at 2.8 Å Resolution: The Atomic Model. Nature 219 131-139
- Roughton, F.J.W., J.W. Severinghaus (1973) Accurate Determination of the O₂-dissociation Curve of Human Blood above 98.7% Saturation with Data on O₂-solubility in Unmodified Human Blood from 0 to 37 C. J.A.P. 35 no 6, 861-869.
- Severinghaus, J.W. (1966) Blood Gas Calculator. J.A.P. 21 no 3, 1108-1116.
- Severinghaus, J.W. (1979) Equations for Blood O₂-dissociation Computations. J.A.P. 461, 599-602.
- Tanford, C. (1961). Physical Chemistry of Macromolecules. Wiley & Sons, New York.
- Zwart, A., A. Buursma, E.J. van Kampen, B. Oeseburg, P.H. van der Ploeg, W.G. Zijlstra (1981) A Multi-Wavelength Spectrophotometric Method for the Simultaneous Determination of Five Hemoglobin Derivates. J. Clin. Chem. Biochem. 19, 457-463.

APPENDIX

KOMPUTERPROGRAMMA

EXT.FTN

Het programma EXT.FTN bepaalt de ijkkurven van K tegen Y met behulp van numerieke integratie.

De intensiteitskurven en de absorptiekurven zoals getekend in fig 3.2 en 3.3 zijn opgeslagen onder de naam EXT546.DAT en EXT577.DAT.

De ijklijn wordt berekend voor iedere op te geven waarde van $c \cdot d$.

MWC.FTN

Het programma MWC.FTN tekent de saturatiekromme en bepaalt met behulp van de kleinste kwadratenmethode de beste aanpassing van het uitgebreide M.W.C.-model (zie par 2.2.4) aan de meetpunten, aan de hand van de beginvoorwaarden van de vier parameters.

Het berekent eveneens de gemiddelde standaarddeviatie en tekent een Hill-plot (zie par 2.2.3).

Een listing van het programma is gegeven op de volgende bladzijden.

```
DIT PROGRAMMA BEPAALT DE WAARDEN VAN DE KONSTANTEN G,K1,KS,ALFA
VAN HET MWC-MODEL,WAARBIJ  $G=L**(-1/4)$ , $KS=KR*G$ , $KS=1/P50$ ,
WAARBIJ DATA{P,S} EN AANPASSING:  $MWC(P,S(P*EXP(-ALFA*S)))$ 
INCLUDE 'LB:[1,1]LN.DEF'
REAL NOE1,NHIL,NN,KT,KS,KKT,KKS,NOE
PARAMETER NMAX=500
DIMENSION PP(NMAX),SS(NMAX)
DIMENSION Q(4,4),QINV(4,4)
BYTE DA(20)
N=0
NSLAG=0
WRITE(LNTTO,*) 'DATUM? (OF CODE) '
READ(LNTTI,15) (DA(I),I=1,20)
FORMAT(20A1)
WRITE(LNTTO,*) 'BEGINSCHATTING VAN DE PARAMETERS '
WRITE(LNTTO,*) 'G=?>'
READ(LNTTI,100) G
WRITE(LNTTO,*) 'K1=?>'
READ(LNTTI,100) KT
WRITE(LNTTO,*) 'KS=?>'
READ(LNTTI,100) KS
WRITE(LNTTO,*) 'BETA=?>'
READ(LNTTI,100) AL
FORMAT(F20.8)
CALL DATASK(LNSY1,ISTA)
IF (ISTA.EQ.-1) STOP
IF (ISTA.NE.2) GOTO 10
DO 20 I=1,NMAX
READ(LNSY1,200,END=30) PP(I),SS(I)
FORMAT(X,F6.2,F9.4)
I=NMAX+1
NTEL=I-1
I=1
Q(1,1)=0
Q(1,2)=0
Q(1,3)=0
Q(1,4)=0
Q(2,2)=0
Q(2,3)=0
Q(2,4)=0
Q(3,3)=0
Q(3,4)=0
Q(4,4)=0
R1=0
R2=0
R3=0
R4=0
S=SS(I)/100
P=PP(I)*EXP(-AL*S)
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
DFDKT=(4*P*TEL*(1+KT*P)**3-3*P*NOE*(1+KT*P)**2)/NOE**2
DFDKS=(4*P*TEL*(G+KS*P)**3-3*P*NOE*G*(G+KS*P)**2)/NOE**2
DFDG=(4*TEL*(G+KS*P)**3-(4*G+KS*P)*NOE*(G+KS*P)**2)/NOE**2
TERM=P*S*(4*KT*(1+KT*P)**3+4*KS*(G+KS*P)**3)*TEL/NOE**2
DFDAL=P*S*((3*KT*P)**2+3*G*KS+(G+KS*P)**2)/NOE*TERM
V=1-TEL/NOE-S
Q(1,1)=Q(1,1)+DFDG**2
Q(1,2)=Q(1,2)+DFDG*DFDKT
Q(1,3)=Q(1,3)+DFDG*DFDKS
Q(1,4)=Q(1,4)+DFDG*DFDAL
Q(2,2)=Q(2,2)+DFDKT**2
Q(2,3)=Q(2,3)+DFDKT*DFDKS
Q(2,4)=Q(2,4)+DFDKT*DFDAL
```

```

Q(3,3)=Q(3,3)+DFDKS**2
Q(3,4)=Q(3,4)+DFDKS*DFDIAL
Q(4,4)=Q(4,4)+DFDIAL**2
R1=R1+DFDVG*V
R2=R2+DFDKT*V
R3=R3+DFDKS*V
R4=R4+DFDIAL*V
I=I+1
IF (I.LE.NTEL) GOTO 50
Q(3,2)=Q(2,3)
Q(3,1)=Q(1,3)
Q(2,1)=Q(1,2)
Q(4,1)=Q(1,4)
Q(4,2)=Q(2,4)
Q(4,3)=Q(3,4)
CALL INVMAT(4,Q,QINV,DET)
IF (DET.EQ.0) WRITE(LNTO,*) 'DET=0!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!'
G=G-(QINV(1,1)*R1+QINV(1,2)*R2+QINV(1,3)*R3+QINV(1,4)*R4)
KT=KT-(QINV(2,1)*R1+QINV(2,2)*R2+QINV(2,3)*R3+QINV(2,4)*R4)
KS=KS-(QINV(3,1)*R1+QINV(3,2)*R2+QINV(3,3)*R3+QINV(3,4)*R4)
AL=AL-(QINV(4,1)*R1+QINV(4,2)*R2+QINV(4,3)*R3+QINV(4,4)*R4)
WRITE(LNTO,300) G,KT,KS,AL
FORMAT(' G=',G13.4/' K1=',G13.4/' KS=',G13.4/' BETA=',G13.4//)
IF (N.GT.NSLAG) GOTO 60
N=N+1
GOTO 40
WRITE(LNTO,105)
FORMAT('$ TYPE AANTAL SLAGEN NOG TE MAKEN = >')
PEM=((1+G**4)/(KT**4+KS**4))**0.25
Z1=(KT+KS*G**3)/(1+G**4)
Z2=(KT**3+G*KS**3)/(1+G**4)
P50=(PEM*((1+PEM*Z1)/(1+PEM**3*Z2))**0.5)*EXP(+AL/2)
READ(LNTTI,500) NN
FORMAT(F10.0)
IF (NN.EQ.0) GOTO 70
N=0
NSLAG=NN
GOTO 40
WRITE(LNTO,*) 'EINDE VAN DE ITERATIEVE BENADERING!'
I=0
SOM=0
I=I+1
S=SS(I)/100
P=PP(I)*EXP(-AL*S)
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
S=1-TEL/NOE
P=PP(I)*EXP(-AL*S)
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
SOM=SOM+(SS(I)/100-1+TEL/NOE)**2
IF (I.LT.NTEL) GOTO 75
SOM=(SOM/(NTEL-4))**0.5
WRITE(LNTO,520) SOM
FORMAT(' SIGMA =',G13.4)
WRITE(LNTO,110)
FORMAT('$ TYPE S VOOR STOP)
READ(LNTTI,550) A
FORMAT(A1)
IF (A.EQ.'S') GOTO 95
TEKEN DE ASSEN
CALL INITI
CALL TWINDO(0,1023,0,1023)
CALL DWINDO(-2.5,22.5,-0.2,1.2)
CALL VAXIS(0,0,01,20,0,20,0,0,0,0,10,10,1.0)
CALL VAXIS(1,0,0,01,20,0,20,0,0,0,0,10,1.0)

```

```
CALL MOVEA(.0,-0.05)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'0',1)
CALL MOVEA(5.,-0.05)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'5',1)
CALL MOVEA(10.,-0.05)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'10',2)
CALL MOVEA(15.,-0.05)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'15',2)
CALL MOVEA(20.5,-0.05)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'P02',3)
CALL MOVEA(20.,-0.1)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'[KPAJ',5)
CALL MOVEA(-0.75,0.)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'0',1)
CALL MOVEA(-1.5,0.5)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'0.5',3)
CALL MOVEA(-1.5,1.0)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'1.0',3)
CALL MOVEA(-1.5,1.1)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'SAT',3)
CALL MOVEA(10.,0.05)
CALL DSHREL(320,0,14)
CALL DSHREL(0,310,14)
CALL DSHREL(-320,0,14)
CALL DSHREL(0,-310,14)
TEKEN DE PUNTEN IN HET PLAATJE
I=0
I=I+1
P=PP(I)
S=SS(I)/100
IF(P.GT.20) GOTO 82
CALL MOVEA(P,S)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DPLOT(5,1,IX,IY)
CALL TSEND
IF (I.LE.NTEL) GOTO 80
TEKEN DE BENADERDE KROMME
WRITE(LNTTO,*)'TEKEN DE BESTE AANPASSING Y/N >'
READ(LNTTI,550) A
IF(A.EQ.'N') GOTO 83
WRITE(LNTTO,*)'GEEF ANDERE DAN BEREKENDE PARAMETERS Y/N >'
READ(LNTTI,550) A
IF (A.EQ.'N') GOTO 84
WRITE(LNTTO,*)'GEEF G>'
READ(LNTTI,111) G
WRITE(LNTTO,*)'GEEF K1>'
READ(LNTTI,111) KT
WRITE(LNTTO,*)'GEEF KS>'
READ(LNTTI,111) KS
WRITE(LNTTO,*)'GEEF BETA>'
READ(LNTTI,111) AL
FORMAT(F13.6)
CONTINUE
PEM=((1+G**4)/(KT**4+KS**4))**0.25
Z1=(KT+KS*G**3)/(1+G**4)
Z2=(KT**3+G*KS**3)/(1+G**4)
```

```

CALL DRTEXT(IX,IY,'0',1)
CALL MOVEA(1.,-3.2)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'1',1)
CALL MOVEA(1.6,-3.2)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'LOG(P02)',8)
CALL MOVEA(-2.2,-3.)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'-3',2)
CALL MOVEA(-2.2,-2.)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'-2',2)
CALL MOVEA(-2.2,-1.)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'-1',2)
CALL MOVEA(-2.2,0.)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'0',1)
CALL MOVEA(-2.2,1.)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'1',1)
CALL MOVEA(-2.2,2.)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'2',1)
CALL MOVEA(-2.9,3.)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DRTEXT(IX,IY,'LOG(S/1-S)',10)
SCHRIJF DE GEGEVENS IN HET PLAATJE
F=P50*EXP(-AL/2)
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
S=1-TEL/NOE
F=P50*EXP(-AL*S)
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
NOE1=4*KT*(1+KT*P)**3+4*KS*(G+KS*P)**3
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
TEL1=3*KT*(1+KT*P)**2+3*KS*G*(G+KS*P)**2
NHIL=P*EXP(-AL*S)*(TEL*NOE1-NOE*TEL1)/(TEL*(NOE-TEL))
CALL MOVEA(-1.8,3.)
CALL DSHREL(250,0,14)
CALL DSHREL(0,-200,14)
CALL DSHREL(-250,0,14)
CALL DSHREL(0,200,14)
CALL MOVEA(-1.6,2.5)
CALL TSEND
WRITE(LNGRP,600) (DA(I),I=1,20)
CALL MOVEA(-1.6,2.1)
CALL TSEND
WRITE(LNGRP,650) F50
CALL MOVEA(-1.6,1.7)
CALL TSEND
WRITE(LNGRP,660) NHIL
FORMAT(1H+, 'N50 =',G10.4)
TEKEN DE PUNTEN IN HET PLAATJE
I=0
I=I+1
F=ALOG10(FF(I))
ST=SS(I)/(100-SS(I))
S=ALOG10(ST)
CALL MOVEA(F,S)
CALL SEELOC(IX,IY)
CALL DFPLOT(5,1,IX,IY)
CALL TSEND
IF (I.LT.NTEL) GOTO 210
TEKEN DE BENADERDE KROMME

```

60

10

P1=0.1
DOE TWEE ITERATIEVE SLAGEN OM S TE BENADEREN
P=P1
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
S=1-TEL/NOE
P=P1*EXP(-AL*S)
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
S=1-TEL/NOE
P=P1*EXP(-AL*S)
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
CALL MOVEA(ALOG10(P1),ALOG10(NOE/TEL-1))
Z=-1.0
Z=Z+0.01
P1=10.**Z
DOE TWEE ITERATIEVE SLAGEN OM S TE BENADEREN
P=P1
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
S=1-TEL/NOE
P=P1*EXP(-AL*S)
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
S=1-TEL/NOE
P=P1*EXP(-AL*S)
TEL=(1+KT*P)**3+G*(G+KS*P)**3
NOE=(1+KT*P)**4+(G+KS*P)**4
IF(TEL/NOE,LT,0.0005) GOTO 92
CALL DRAWA(ALOG10(P1),ALOG10(NOE/TEL-1))
CALL TSEND
IF (Z,LT,2) GOTO 215
CONTINUE
WRITE(LNTTO,115)
READ(LNTTI,550) A
IF (A,EQ,'J') CALL HDCOPY
CONTINUE
CALL GRUEXI
END