

# ENKELE ASPECTEN VAN DE IJZERSTOFWISSELING MET BETREKKING TOT DE HERSENEN

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. C.J. VAN DER WEIJDEN  
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.  
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN  
OP 27 JUNI 1973, DES NAMIDDAGS TE 3.30 UUR

DOOR

BERTUS GERRIT BLIJENBERG

GEBOREN TE HILVERSUM

1973

BRONDER-OFFSET B.V. – ROTTERDAM

PROMOTOR: PROF. DR. B. LEIJNSE

COREFERENTEN: DR. H.G. VAN EIJK  
PROF. DR. J.B.J. SOONS

Dit proefschrift werd bewerkt

in de afdeling Chemische Pathologie van de Faculteit der Geneeskunde van de Erasmus Universiteit  
en in de afdeling Klinische Chemie van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam–Dijkzigt.

*Aan mijn ouders,  
Ineke,  
Pieter en Liesbeth*

## INHOUD

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING	9
HOOFDSTUK I LITERATUUROVERZICHT	12
Inleiding	12
IJzer in liquor cerebrospinalis	13
Transferrine in liquor cerebrospinalis	15
IJzer in hersenweefsel	15
HOOFDSTUK II MATERIALEN EN METHODEN	21
HOOFDSTUK III ONDERZOEK AAN HERSENWEEFSEL	31
Inleiding	31
Bestudering van de overgang van ijzer vanuit de bloedbaan naar de hersenen bij normale ratten	31
De inbouw in hersenweefsel van uit de bloedbaan afkomstig ijzer	38
Bestudering van de overgang van ijzer vanuit de bloedbaan naar de hersenen bij niet- normale ratten	44
HOOFDSTUK IV ONDERZOEK AAN LIQUOR CEREBROSPINALIS	46
Inleiding	46
De bepaling van het ijzergehalte en het transferrinegehalte van liquor cerebrospinalis van de mens	48

De bepaling van het ijzergehalte en het transferrinegehalte van liquor cerebrospinalis van het konijn	49
De electroforese van met $^{59}\text{Fe}$ opgeladen liquor cerebrospinalis	52
Onderzoekingen betreffende de overgang van ijzer vanuit de bloedbaan naar het liquorcompartiment en omgekeerd.	55
HOOFDSTUK V DISCUSSIE	64
SAMENVATTING	74
SUMMARY	77
LITERATUUR	80
NASCHRIFT	82
CURRICULUM VITAE	84



## INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

Morfologische en fysiologische onderzoeken van het centrale zenuwstelsel hebben reeds eeuwen de belangstelling van wetenschappelijke onderzoekers. Ook op dit gebied is er, vooral de laatste decennia, sprake van grote vooruitgang in onze kennis (1, 2, 3). De eerste onderzoeker die wees op het belang van de chemische analyse als hulpmiddel in dit gebied was Hensing in 1719. Hij beschreef tevens de aanwezigheid van fosfor in hersenweefsel. Nadat Vaughelin in 1811 de eerste kwantitatieve analyses van een aantal hersenbestanddelen gepubliceerd had, was het Couerbe in 1834 die de eerste vergelijkende analyses publiceerde. Hij vergeleek de fosforgehaltes van hersenen van verschillende diersoorten met elkaar en schreef als conclusie: ". . . . . cet élément est le principe excitant du système nerveux". Door Molenschot werd dit in gepopulariseerde vorm gevat: "Ohne Phosphor keine Gedanke". De meest grondige studie in de 19e eeuw was die van Thudichum (1884): "A treatise on the chemical constitution of the brain". Hierin worden al 140 hersenbestanddelen genoemd.

De biochemische processen in de hersenen onderscheiden zich in principe niet van de processen die zich in andere organen afspelen. Een indruk van de metabole activiteit van hersenweefsel krijgt men bij beschouwing van de waarneming dat in rusttoestand 20% van de voor het menselijke organisme benodigde hoeveelheid zuurstof door de hersenen wordt gebruikt. Meet men het respiratoir quotiënt van hersenweefsel dan blijkt dit bij de mens en vele dieren altijd ongeveer 1 te bedragen. Deze waarneming is begrijpelijk daar is aangetoond, dat onder normale omstandigheden uitsluitend glucose als substraat voor metabole activiteit van hersenweefsel dienst doet. Bij andere organen in het menselijk en dierlijk organisme kunnen ook andere stoffen als substraat dienen.

Gezien het feit dat een aantal enzymen die betrokken zijn bij de celademhaling ijzerafhankelijk zijn, doordat het ijzer een onderdeel vormt van de moleculen van de prosthatische groepen, is het duidelijk dat het ijzermeta-

bolisme een belangrijk onderdeel vormt van het hersenmetabolisme.

Voor iedere stof die de hersenen binnentreedt moet rekening worden gehouden met het bestaan van de bloed- hersen-barrière. Hoe universeel deze barrière is wordt duidelijk uit het feit dat ook de toegang van glucose aan beperking onderhevig is. De hersenen zijn niet in staat glucose op te slaan in de vorm van glycogeen. Zij zijn voor hun metabole activiteiten afhankelijk van een continue toevoer. In dit licht bezien is het opmerkelijk dat er geen vrije stofuitwisseling is tussen bloed en hersenweefsel met betrekking tot het glucose. Het was Ehrlich in 1885 die het fenomeen van de bloed-hersen-barrière voor het eerst waarnam. In eerste instantie werd er door hem en later ook door andere onderzoekers mee bedoeld weer te geven dat sommige stoffen de hersenen niet binnentreden vanuit de bloedbaan. Dit was in tegenstelling met de gang van zaken bij andere organen. Maar langzamerhand is men er ook mee gaan bedoelen het feit, dat vele stoffen de hersenen wel binnen kunnen treden, maar dat dit veel langzamer geschiedt dan in andere organen het geval is. Het is een communis opinio dat de term barrière niet in eerste instantie in anatomische zin opgevat moet worden. Herlin (4) en ook Dobbing (5) zien dan ook in de term barrière, meer het geheel van verschijnselen, dat het binnendringen in het centraal zenuwstelsel van een bepaalde stof voorkomt, vertraagt of soms vergemakkelijkt. Hiervan noemen zij: dialyse, ultrafiltratie, osmose, Donnan-evenwicht, elektrische lading, vetoplosbaarheid, speciale weefselaffiniteit en metabole activiteit van de hersenen.

Bij een beschouwing over de bloed-hersen-barrière behoort eveneens een bespreking van de barrière die er bestaat tussen de compartimenten bloed en liquor cerebrospinalis. Men stuit hier op dezelfde reeks speculatieve verklaringen als welke reeds beschreven zijn bij de bloed-hersen-barrière. Deze opsomming van mogelijkheden maakt het beeld van de bloed-hersen-barrière niet bepaald duidelijker. Dhopeswarkar en Bawa (6) schrijven dan ook in een recent artikel: "Most textbooks of neuroanatomy treat the concept of blood-brain-barrier as being too complicated for discussion".

De rol die ijzer in de hersenen speelt is, voor zover wij weten, geen andere dan de rol die dit element elders in het lichaam vervult. Dit valt af te leiden uit het feit, dat men ijzer ook in de hersenen aantreft als bouwsteen van de verbindingen die bekend zijn als onderdelen van de celademhaling of de erythropoëse. Dat de concentratie in een hersenhomogenaat vergelijkbaar is met de concentraties in andere organen moge blijke uit de volgende tabel.



Het betreft hier resultaten die in ons laboratorium verkregen zijn bij de rat, het proefdier dat bij ons onderzoek ook gebruikt is.

TABEL

De ijzerconcentratie in diverse organen van de rat weergegeven in  $\mu\text{mol/g}$  drooggewicht.

<u>Orgaan</u>	<u>Fe - concentratie</u>	<u>Standaarddeviatie</u>
Lever	7,7	2,0
Milt	34,6	12,6
Hart	5,4	1,1
Nier	7,5	0,6
Hersenen	2,8	1,1
Spier	2,5	1,1
Bot	0,1	0,1

Met betrekking tot de stofwisseling van het ijzer zelf in de hersenen zijn geen gegevens bekend. Aangaande de overgang van ijzer vanuit de bloedbaan naar de hersenen zijn eveneens geen gegevens in de literatuur bekend. Het is dan ook het doel van dit proefschrift enig inzicht te verkrijgen in de plaats van het element ijzer in de driehoek bloed-hersenen-liquor cerebrospinalis. Daartoe zijn de volgende onderzoeken verricht:

- a. onderzoeken die gericht zijn op de overgang van ijzer van de bloedbaan naar de hersenen en
- b. onderzoeken die gericht zijn op de overgang van ijzer van de bloedbaan naar het liquorcompartiment en omgekeerd.

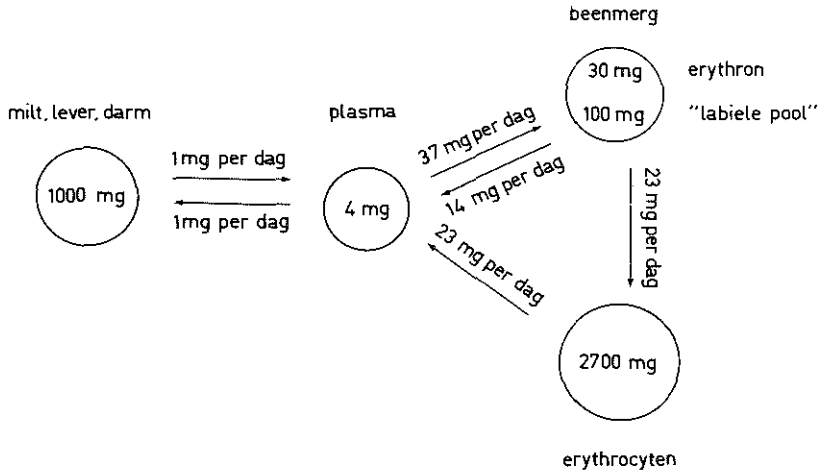
Gaarne danken wij op deze plaats Drs. M.M.J. C. Bobeck-Rutsaert, afd. Interne Geneeskunde I, voor het beschikbaar stellen van de gegevens vermeld in de tabel.

# HOOFDSTUK I

## LITERATUUROVERZICHT

### INLEIDING

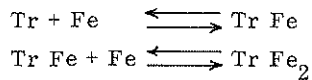
Voor een literatuuroverzicht betreffende de diverse facetten van de ijzerstofwisseling zij verwezen naar de proefschriften van Glaser (7), Tavernier (8) en van Kreel (9). Voor een globaal inzicht betreffende onze huidige kennis van de ijzerstofwisseling is het schema van Pollycove zeer illustratief (10). Hierin is zowel de kinetiek als de "anatomie" van ijzer weergegeven. (fig I-1).



FIGUUR I - 1

Verdeling en kinetiek van ijzer volgens Pollycove.

Centraal in dit schema staat, zoals te zien is, het plasma-ijzer. Hiermee wordt bedoeld het ijzer dat aan het ijzertransporterend eiwit, transferrine, gebonden is. De binding van ijzer aan transferrine geschiedt in twee stappen, naar men aanneemt:



Glaser beschrijft in zijn proefschrift uitvoerig een onderzoek betreffende de beide evenwichten. M.b.v. de resultaten verkregen uit dialyse-experimenten en uit optische metingen kon hij de evenwichtsconstanten die deze evenwichten beheersen, berekenen. Deze bleken te liggen in de orde van grootte van  $10^6$  voor  $K_1$  en  $10^5$  voor  $K_2$ . Hierbij dient wel benadrukt te worden dat Glaser het evenwicht tussen ijzer en transferrine bestudeerde onder zeer bepaalde in vitro omstandigheden. Op basis van de door Glaser genoemde evenwichtsconstanten moet het bestaan van een aanmerkelijke hoeveelheid niet aan transferrine gebonden tweewaardig ijzer onder ogen gezien worden.

Glaser noemt zelfs de concentratie  $2,5 \mu\text{mol}/\text{l}$ . De betekenis van "vrij" ijzer onder in vivo omstandigheden voor het ijzertransport wordt door Tavenier in zijn proefschrift onderzocht. Uit zijn in vivo dialyse-experimenten met konijnen bleek dat slechts ongeveer 1% van het totale ijzer in plasma niet aan transferrine gebonden is, maar aan albumine.

De aanwezigheid in plasma van niet aan transferrine gebonden ijzer, misschien mag men zeggen vrij voorkomend ijzer, maken de bestudering in dit opzicht van de vloeistof die de hersenen omspoelt, de liquor cerebrospinalis interessant omdat deze een veel lager transferrinegehalte heeft.

Allereerst zal in het navolgende worden weergegeven hetgeen in de literatuur op het gebied van ijzer en transferrine in liquor cerebrospinalis bekend is. Vervolgens zal ingegaan worden op de publicaties waarin onderzoeken vermeld zijn betreffende het voorkomen van ijzer in hersenweefsel.

## IJZER IN LIQUOR CEREBROSPINALIS

Evenals dit bij de hersenen het geval is zijn er aangaande de liquor cerebrospinalis vele getallen gepubliceerd betreffende de ijzerconcentratie in genoemde vloeistof. Eén van de oudste waarnemingen is die van Mestrezat uit 1912 die het ijzergehalte van liquor opgaf als  $200 \mu\text{g}$  per 100 ml in de vorm

van  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (11). Kjellin geeft een goed overzicht van een aantal publicaties over het ijzergehalte van liquor cerebrospinalis (12). Men ziet daarin zeer uiteenlopende waarden geciteerd. De Marro spant met zijn waarden wel de kroon: 11,4 - 32,2 mg per 100 ml. Verschillende auteurs in de veertiger en vijftiger jaren geven getallen op die ruwweg liggen tussen 20 en 50  $\mu\text{g}/100$  ml. De meest recente publicatie wat deze concentratie betreft is die van Plum en Fog uit 1959. Zij komen tot 39-55  $\mu\text{g}/100$  ml (13). Van recente datum (1968) zijn de waarden van Asenjo et al: 0.4-5  $\mu\text{mol}/\text{l}$  (71).

Een duidelijke andere mening heeft Kjellin. Hij komt door gebruikmaking van een colorimetrische bepalingstechniek tot een ijzerconcentratie in liquor van 1 - 2  $\mu\text{g}/100$  ml (0,2 - 0,4  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ). Volgens Kjellin is dit ijzer aan transferrine gebonden. Hij leidt dit af uit het feit dat hij verhoogde ijzergehaltes gevonden heeft bij patiënten met een verhoogd eiwitgehalte in liquor. Bovendien zou het ijzer niet ge-ultrafiltreerd worden.

In het licht gezien van de bovengenoemde getallen lijkt het weinig zinvol een oordeel uit te spreken over de ijzerconcentraties die gevonden zijn bij pathologische gevallen. In de eerder genoemde publicatie van Kjellin wordt ook hiervan een overzicht gegeven. Zowel verhoogde als verlaagde ijzerconcentraties worden opgegeven bij de door diverse auteurs onderzochte ziektebeelden. Evenals bij de hersenen is beschreven vindt men hier tegenstrijdige meningen. Kjellin heeft zelf ook een onderzoek gewijd aan het ijzergehalte in liquor cerebrospinalis bij enige neurologische aandoeningen (14). Hij deelt zijn patiëntenmateriaal ruwweg in drie categorieën in:

1. Patiënten met een hoog eiwitgehalte van de liquor cerebrospinalis. Deze groep omvat een aantal uiteenlopende ziektebeelden. Kjellin mat in het merendeel van de gevallen een verhoogd ijzergehalte.
2. Patiënten met recente hersenbloedingen. Binnen een maand na de bloeding vond Kjellin in zeven van de twaalf onderzochte gevallen geen verhoging van het "loosely bound" ijzer. Deze verhoging werd wel gevonden op een later tijdstip (tot drie maanden na de bloeding).
3. Patiënten waarbij geen verhoging van het eiwitgehalte in de liquor gevonden werd. Ook deze groep is zeer heterogeen. In sommige gevallen vond hij een verhoogde ijzerconcentratie in de liquor. Dit was b.v. het geval bij één op de twee patiënten met de ziekte van Parkinson.

## TRANSFERRINE IN LIQUOR CEREBROSPINALIS

Transferrine neemt onder de liquoreiwitten een bijzondere plaats in (15). Bijzonder in die zin dat de concentratie ervan in liquor cerebrospinalis in vergelijking met het totale eiwitgehalte hoger is dan in plasma t. w. 6,7% tegen 4,5% (16, 17). Frick en Scheid-Seydel verklaren dit verschil op basis van het feit dat een deel van het transferrine cerebrogeen van oorsprong zou zijn (18, 19). Werkend met gemerkt transferrine ( $^{131}\text{J}$ ) dat zij in de bloedbaan ingebracht hadden vonden zij dat de specifieke activiteit in liquor op de door hen onderzochte tijdstippen lager was dan in plasma. Zij bepaalden de specifieke activiteit 4-6 dagen na de introductie van het gemerkte transferrine. Dit was in tegenstelling tot wat zij bij albumine en  $\gamma$ -globuline gevonden hadden. Bij deze eiwitten waren de specifieke activiteiten gelijk na 70 resp. 100 uur (20, 21). Voor transferrine hebben zij berekend dat ongeveer 25% ter plaatse in het centrale zenuwstelsel gesynthetiseerd wordt.

In ander opzicht neemt transferrine trouwens ook een bijzondere plaats in. Electroforetisch gezien kent men in liquor twee transferrinecomponenten: één met  $\beta_1$ -beweeglijkheid en één met  $\beta_2$ -beweeglijkheid (22, 23). Het verschil tussen de componenten bleek te berusten op het al of niet gebonden zijn van sialzuur: Pette en Strupp (23) toonden aan dat de  $\beta_1$ -vorm overging in de  $\beta_2$ -vorm na behandeling van de liquor met neuraminidase. Er zouden volgens Parker en Bearn (24, 25) per molecuul transferrine 4 sialzuurmoleculen afgesplitst worden. De  $\beta_2$ -vorm zou transferrine zonder sialzuur zijn.

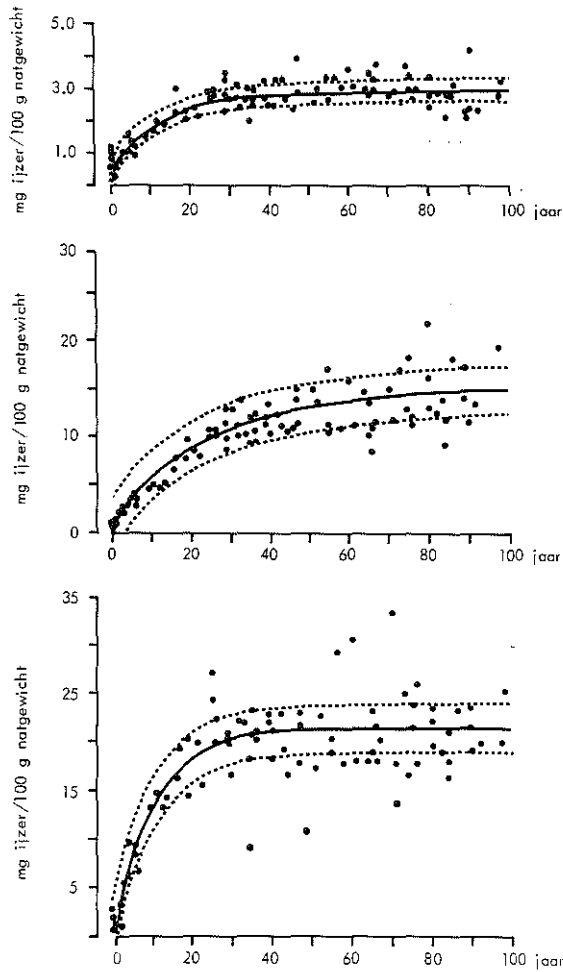
## IJZER IN HERSENWEEFSEL

Onze huidige kennis betreffende het voorkomen van ijzer in hersenweefsel stoelt gedeeltelijk op het werk van Spatz uit 1922 (26). Neuropathologisch gezien kan men ijzer in de volgende vormen indelen (27, 28, 29, 30):

1. fysiologisch ijzer
2. hemolytisch ijzer
3. ijzer bij paralytische aandoeningen
4. ijzerstapeling bij hemochromatose
5. ijzer bij degeneratieve aandoeningen van het centraal zenuwstelsel.

De categorieën 2 t/m 5 vat men wel samen onder de term pathologisch ijzer. Dit

Opvallend is de toeneming van de hoeveelheid ijzer in diverse hersenonderdelen met het toenemen van de leeftijd. Dit is zowel voor de mens als voor een aantal zoogdieren beschreven. Bij de mens eindigt dit proces op ongeveer dertigjarige leeftijd (43). Ook hier dienen de namen van Guizzetti en Spatz genoemd te worden. Hun histochemische onderzoekingen werden bevestigd door de chemische analyses van Hallgren en Sourander (42) en van Sundermann en Kempf (30). In figuur I-2 is het een en ander voor een aantal hersendelen weergegeven:



FIGUUR I - 2

Weergave van het verband tussen het niet aan heem gebonden ijzer en de leeftijd in enkele hersendelen bij de mens. Boven: prefrontale cortex, midden: putamen, onder: globus pallidus.

Chemisch gezien kan men de ijzerverbindingen die aanwezig zijn in hersenweefsel in twee groepen verdelen:

1<sup>o</sup>. Verbindingen waarbij ijzer in een heemgroep voorkomt.

2<sup>o</sup>. Verbindingen waarin ijzer anderszins gebonden is.

Het heemijzer vormt waarschijnlijk slechts een zeer klein gedeelte van het totale ijzer. Dit is wel begrijpelijk gezien het feit dat dit ijzer slechts voorkomt in de enzymsystemen die ijzerafhankelijk zijn (cytochromen b. v.) terwijl hemoglobine onder normale omstandigheden niet buiten het vaatstelsel aanwezig is.

Volgens Diezel is de grootste hoeveelheid van het fysiologisch ijzer aanwezig als ferritine-ijzer. Deze mening, die gebaseerd is op de isolatie van ferritine uit hersenen wordt gesteund door waarnemingen waarbij met histochemische technieken gehalten van niet aan heem gebonden ijzer in de hersenen onderzocht zijn. Fiehring en Sundermann ondersteunen deze opvatting (31). Zij isoleerden ferritine uit diverse hersendelen en vonden een treffende overeenkomst met het chemisch bepaalde ijzer in deze delen. Het een en ander is weergegeven in tabel I-3.

TABEL I-3

Vergelijking tussen het gehalte aan ferritine-ijzer en het totale ijzer in diverse hersendelen.

Weergegeven is het aantal  $\mu\text{g}$  per g natgewicht.

<u>Deel</u>	<u>Ferritine-ijzer</u>	<u>Totaal-ijzer</u>
Pallidum	130	140
Putamen	120	110
Nucleus caudatus	100	80
Nucleus ruber	50	50
Cortex cerebelli	20	50
Thalamus	20	70

Er is op dit moment nog weinig bekend over de neuropathologie van het ijzer. Verhoogde ijzergehaltes zijn waargenomen als gevolg van hemolyse, bij hemochromatose, bij enkele paralytische en degeneratieve aandoeningen. Bij een hersenbloeding wordt het hemoglobine opgenomen door de gliacellen waarin na enkele dagen het ijzer afkomstig uit hemoglobine teruggevonden wordt in hemosiderine.

Deze gegevens zijn afkomstig van Strassmann, die het verschijnsel bij muizen onderzocht heeft die hij een hersentrauma bezorgd had en bij mensen waarbij hij gebruik maakte van klinische gegevens (44).

Hemochromatose is beschreven in combinatie met verhoogde ijzergehaltenes in diverse hersendelen (45). Neumann (46) beschrijft echter een geval van hemochromatose waarbij hij geen verhoogde ijzergehaltenes heeft waargenomen. Sheldon (47) maakt de zaak nog onoverzichtelijker door een hem bekend geval zowel histochemisch als kwantitatief chemisch te onderzoeken. Histochemisch vond hij wel verhoogde ijzergehaltenes, kwantitatief chemisch niet in diverse hersendelen.

Hiernaast zijn bij een aantal neurologische aandoeningen ijzeranalyses gedaan in verschillende hersendelen. Cumings (48) beschrijft bij drie patiënten met de ziekte van Wilson afwijkingen in de ijzergehaltenes in diverse hersendelen. De afwijkingen betroffen in de door hem beschreven gevallen verhogingen terwijl Löwenthal (49) naast verhoogde gehaltenes ook verlaagde gehaltenes in sommige hersendelen publiceert.

Een weinig overzichtelijk beeld geeft de ziekte van Hallervorden-Spatz (48). Zet men de waarden van drie auteurs in een tabel dan krijgt men het volgende (tabel 1-4):

TABEL I-4

Het ijzergehalte bij de ziekte van Hallervorden-Spatz gevonden door verschillende auteurs.

Weergave in mg/100 mg drooggewicht.

<u>Deel</u>	<u>Löwenthal (1958)</u>	<u>Környey (1964)</u>	<u>Rozdilshy (1967)</u>	<u>Normaal</u>
Witte stof cerebellum	66,0	24,9	41,7	18,73
Cortex cerebelli	9,0		45,7	27,85
Basale ganglia	41,8	83,2	83,8	41,34
Globus pallidus		278		64,8
Substantia nigra	11,0	155		57,9

Onderzocht zijn verder nog de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Huntington, dementia paralytica en schizofrenie (28). In alle gevallen worden door de diverse auteurs getallen gepubliceerd die op zich weinig aanknopingspunten geven met de ziekteverschijnselen.



## HOOFDSTUK II

### MATERIALEN EN METHODEN

#### MATERIALEN

##### 1. Chemicaliën.

De gebruikte chemicaliën waren in alle gevallen van pro analyse kwaliteit.

##### 2. Radio-actieve reagentia.

$^{59}\text{Fe}$ : Het bij de experimenten gebruikte  $^{59}\text{Fe}$  werd verkregen als  $^{59}\text{FeCl}_3$  van N. V. Philips Duphar. Het  $^{59}\text{Fe}$  bevatte 0,2 - 0,4  $\mu\text{mol}$   $^{56}\text{Fe}$ /100  $\mu\text{C}$  als drager.

$^{51}\text{Cr}$ : Het  $^{51}\text{Cr}$  werd in de vorm van  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  eveneens van N. V. Philips Duphar betrokken.

$^{14}\text{C}$ : Bij een aantal experimenten die in hoofdstuk IV zullen worden beschreven werd gebruik gemaakt van met  $^{14}\text{C}$  gemerkt monobroomazijnzuur,  $\text{BrCH}_2 - ^{14}\text{COOH}$ .

##### 3. Proefdieren.

De proefdieren, ratten en konijnen, werden betrokken van het Centraal Proefdierenbedrijf van de Medische Faculteit Rotterdam. Het betrof in alle gevallen volwassen dieren. De ratten behoorden tot de Wistarstam en de konijnen tot de stam der Nieuwzeelanders.

## METHODEN

### 1. Bloedvrij maken van hersenen. \*

Teneinde de bijdrage van ijzer afkomstig uit hemoglobine bij de ijzeranalyses van hersenweefsel te elimineren, werd besloten het circulatiestelsel van het proefdier te doorstromen met fysiologisch zout. Hiertoe werd, nadat het proefdier verdoofd was en nadat de borstkas geopend was in de aorta een naald gebracht waaraan een slang verbonden was die in verbinding stond met een reservoir gevuld met fysiologisch zout. De doorstroming werd beëindigd op het moment dat de lever een lichtbruine kleur had aangenomen. Op het doorstromen met fysiologisch zout werd een controle uitgevoerd die in hoofdstuk III nader besproken zal worden. De controle werd uitgevoerd door erythrocyten te merken met  $^{51}\text{Cr}$  zoals hieronder aangegeven zal worden.

### 2. Merken van ratten erythrocyten met $^{51}\text{Cr}$ .

Van een rat werd 4 ml bloed afgenomen dat gemengd werd met een glucose-citraat-oplossing in de verhouding 4 : 1. Hieraan werd 0,05 ml  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -oplossing toegevoegd. Dit is ongeveer  $15\ \mu\text{C}$ . Het mengsel werd 1 uur geïncubeerd bij  $37^\circ\text{C}$  waarna gecentrifugeerd werd en de plasmalaag vervangen werd door fysiologisch zout. Vervolgens werd voorzichtig gemengd. Per rat werd 1 ml gemerkte erythrocytensuspensie toegediend. Op de bloedgroep behoefde geen acht geslagen te worden.

### 3. Opladen van transferrine en serum met ijzer.

Beide technieken werden ontleend aan Tavenier (8). Voor details zij dan ook verwezen naar zijn proefschrift. De uitvoering was als volgt:

#### a. Transferrine.

Bij het opladen van transferrine werd gebruik gemaakt van een preparaat dat gezuiverd en Fe-vrij gemaakt was volgens Van Eijk (50). Dit werd opgelost in 0,05 molair fosfaatbuffer (pH=7,4). Hieraan werd zoveel  $\text{NaHCO}_3$  toegevoegd tot de  $\text{HCO}_3^-$ -concentratie 25 mmol/l bedroeg. Vervolgens werd het ijzerchloride toegevoegd. Dit ijzerchloride werd vooraf gereduceerd (10 minuten) met ascorbinezuur (per  $10\ \mu\text{C}\ ^{59}\text{Fe}$  8  $\mu\text{mol}$  ascorbinezuur). Het opladen nam een half uur

\* Gaarne danken wij op deze plaats Prof. Dr. H. G. J. M. Kuijpers, afd. Anatomie II, voor de steun die hij ons in deze verleende.

in beslag. De eindoplossing die verkregen werd bevatte 2 mg transferrine/ml en  $5 \mu\text{C}^{59}\text{Fe}/\text{ml}$ . Deze oplossing werd gebruikt bij de experimenten waarbij het transferrine in de bloedbaan gebracht werd. De oplossing die intracister-naal bij konijnen ingebracht werd was een verdunning met fysiologisch zout hiervan. Deze oplossing werd voor gebruik gesteriliseerd d. m. v. filtratie door een bacteriefilter.

#### b. Serum.

Voor het opladen van serum werd gebruik gemaakt van een methode die identiek is met de onder a beschrevene. Er behoeft geen natriumbicarbonaat te worden toegevoegd.

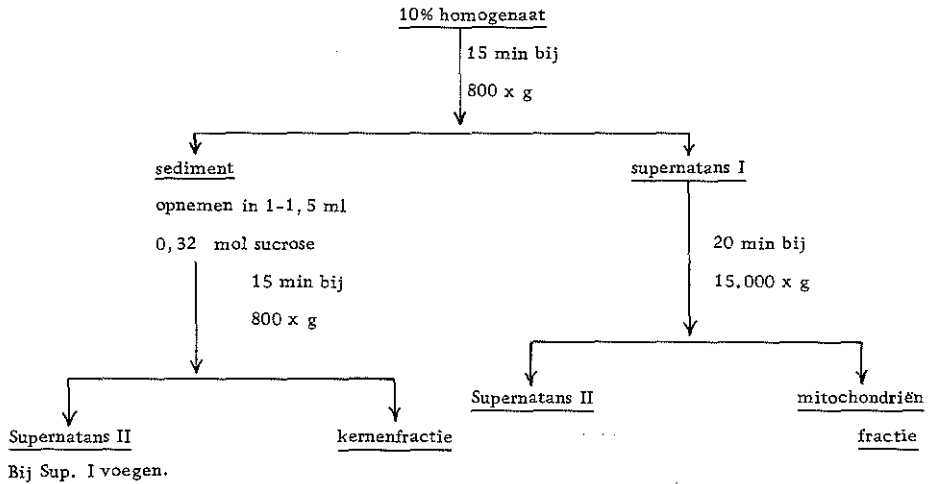
#### 4. Isolatie van ferritine.

Ferritine werd uit hersenweefsel geïsoleerd op een manier die beschreven is door Van Kreel (9). Voor details zij verwezen naar zijn proefschrift. In het kort komt de isolatie neer op het volgende:

Nadat aan het hersenmateriaal 3 à 4 maal het volume aan fysiologisch zout was toegevoegd werd gehomogeniseerd in een Braun-mixer. Het homogenaat werd vervolgens op  $80^{\circ}\text{C}$  gebracht in een paraffinebad en 5 minuten op deze temperatuur gehouden. Daarna werd 20 minuten gecentrifugeerd. De zo ontstane bovenstaande vloeistof werd gebruikt. Deze oplossing werd boven een laagje Sephadex G 25 gecentrifugeerd in een Beckman preparatieve ultracentrifuge L2 65B (rotor 30). De centrifugetijd bedroeg 14 uur bij 30.000 g. Tot slot werd het ferritine met 0,05 mol boraatbuffer pH=8,5 uit de Sephadex geëluëerd. De verkregen ferritinefractie werd geëlectroforeerd in 5% acrylamide m. b. v. Shandon-apparatuur. Als buffer werd gebruikt boraat-LiOH 0,05 molair pH=8,6. Nadat het monster 1 : 1 verdund was met sucrose 10% in water werd de oplossing op de gel gebracht. Hierna volgde concentratie van het monster bij een stroomsterkte van 0,5 mA per buisje waarna de stroomsterkte op 2,5 mA werd ingesteld en de eigenlijke electroforese plaats vond. De ijzerkleuring geschiedde m. b. v. 10% kalium Fe(II)cyanide-oplossing in methanol/ijszajn/water 30 : 7 : 63 (v/v).

#### 5. Celfractionering hersenweefsel.

Bij de celfractionering van de hersenen werd gebruik gemaakt van het onderstaand schema (51). De concentratie van de sucrose-oplossing die wij gebruikten bedroeg 0,32 molair (52). Nadat het hersenmateriaal m. b. v. een Potter-Elvehjem-homogenisator gehomogeniseerd was werd de fractionering voortgezet volgens:



Door uitvoering van een DNA-bepaling en een bepaling van cytochroom - c - oxydase werden de celfracties gecontroleerd.

Er werd gebruik gemaakt van een Sorvall-centrifuge.

#### 6. Anemisch maken en met ijzer overladen van ratten.

Bij de experimenten die uitgevoerd werden met anemische ratten werd d. m. v. fenyldiazine en d. m. v. flebotomie bereikt dat de proefdieren een anemie hadden. In beide gevallen werd om de 3 à 4 dagen een handeling verricht. In het geval van de toediening van fenyldiazine werd viermaal intraperitoneaal 10 mg fenyldiazine (in oplossing) toegediend. In het geval van het aftappen van bloed betrof dit achtereenvolgens het afnemen van 5,4,3 en 3 ml bloed. Beide manieren van anemisch maken hadden tot resultaat dat het hemoglobinegehalte van het bloed lag tussen 4 en 5 mmol/l(Fe) (normaal 10 mmol/l) en de hematocrietwaarde lag tussen 0,20 en 0,30 (normaal 0,45).

Het overladen met ijzer van ratten geschiedde d. m. v. toediening van ijzer in de vorm van ijzer (II) sulfaat en ijzerdextraan (Imferon). Ook dit gebeurde viermaal met tussenpozen van 3 à 4 dagen. Er werd iedere keer 10 mg ijzer gegeven. In het geval van ijzer (II) sulfaat gebeurde dit intraperitoneaal, in het geval van het ijzerdextraan intraveneus.

#### 7. Bepaling van ijzer in hersenweefsel.

Hersenweefsel werd gedeestruerd m. b. v. perchloorzuur. Het ijzer werd gekoppeld aan bathofenantrolinedisulfonylzuur, waarna het gekleurde complex

spectrofotometrisch gemeten werd bij 530 nm. Het voorschrift luidde als volgt: Aan weefsel (50 - 100 mg natgewicht) werd 1 ml  $\text{HClO}_4$  7 molair toegevoegd waarna gedestruëerd werd tot de vloeistof helder was. Hierna werd met gedestilleerd water aangevuld tot 10 ml. Aan 1 ml hiervan werd achtereenvolgens toegevoegd: 1 ml HCl (1 molair), 3 ml  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (0,1 molair), 2 ml natriumacetaat (4 molair). Er werd afgelezen bij 530 nm tegen de blanco. De standaardoplossing en de blanco werden op dezelfde manier behandeld.

De methode werd gecontroleerd aan de hand van de analyse van een aantal bloedmonsters. Van deze monsters werd het hemoglobinegehalte bepaald door gebruikmaking van de methode van Zijlstra en Van Kampen (53). Hierna werden deze monsters geanalyseerd op basis van het in hemoglobine aanwezige ijzer waarbij de boven omschreven destructiemethode werd toegepast. In tabel II-1 ziet men het resultaat van dit vergelijkende onderzoek weergegeven.

TABEL II-1

Vergelijking van de uitkomsten van de hemoglobine-analyses (mmol/l).

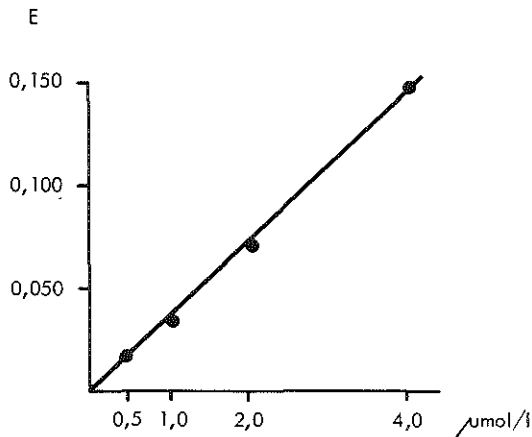
<u>Monster</u>	<u>"Fe-methode"</u>	<u>"cyaanmethode"</u>
1	5,2	4,9
2	6,5	6,9
3	7,3	7,1
4	7,7	7,7
5	8,5	8,6
6	8,9	8,9
7	9,5	9,4
8	9,9	9,8
9	10,4	10,0
10	11,1	11,2

Bovendien werd ijzer toegevoegd aan hersenweefsel en vervolgens het gehalte bepaald. Dit door toevoeging van ijzer aan porties van een hersenhomogenaat. De totale hoeveelheid toegevoegd ijzer lag in dezelfde orde van grootte als de in het homogenaat aanwezige hoeveelheid. Bij toepassing van de bovenomschreven techniek werd in zes experimenten teruggevonden: 106, 110, 97, 100, 113 en 90%. Gemiddeld kwam dit neer op 103%. Voor de variatiecoëfficiënt van de bepaling werd 5% gevonden.

## 8. Bepaling van ijzer in liquor cerebrospinalis.

De bepaling die door ons werd uitgewerkt is elders reeds uitvoerig beschreven zodat hier volstaan zal worden met de weergave van het voorschrift (54):

Onmiddellijk na afname van de liquor cerebrospinalis werd aan 1,0 ml monster toegevoegd: 0,1 ml 2 molair HCl ( $H^+$ ) en 0,1 ml 3 molair trichloorazijnzuur ( $H^+$ ). Nadat het mengsel 15 minuten in een bekersglas met kokend water gestaan had, werd, na afkoeling, gecentrifugeerd ten einde de neergeslagen eiwitten te verwijderen. Aan bovenstaande vloeistof werd toegevoegd: 0,1 ml 0,02 molair  $K_2S_2O_8$  ( $K_2S_2O_8$ ) en 0,2 ml 5 molair KCNS (KCNS). Hierna werd de vloeistof geëxtraheerd met 0,4 ml methylisobutylketon. De extincties werden gemeten bij 500 nm. Bij ons onderzoek werd gebruik gemaakt van een Zeiss PMQ II spectrofotometer met een uitrusting voor microbepalingen. Standaarden en blanco werden op dezelfde manier behandeld als het te onderzoeken monster. Dit resulteerde in de volgende ijkgrafiek (fig. II-1):



FIGUUR II - 1

De ijklijn behorende bij de bepaling van ijzer in liquor cerebrospinalis.

## 9. Bepaling van transferrine in liquor cerebrospinalis.

Ook deze bepaling is beschreven in de onder 8 genoemde publicatie.

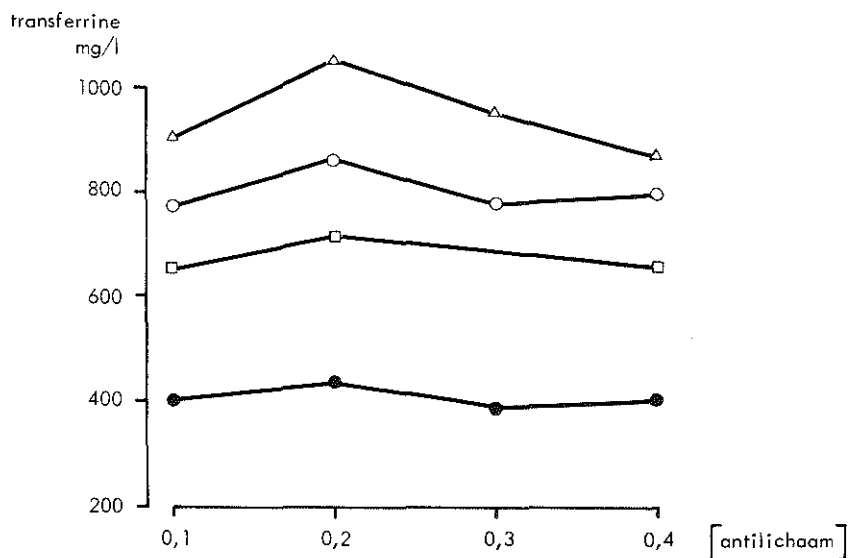
Het voorschrift luidt als volgt:

Eén ml liquor cerebrospinalis werd bij een temperatuur van  $40^{\circ}C$  10-20 keer geconcentreerd door lucht over het monster te blazen. De concentratiefactor werd berekend uit metingen van de gewichten voor en na het concentreren. De

bepaling van het transferrinegehalte geschiedde immunochemisch door gebruikmaking van de kwantitatieve precipitatietechniek van Mancini (55). Voor het onderzoek van menselijke liquor werd gebruik gemaakt van immunodiffusieplaten (Partigen) die betrokken werden van de firma Behringwerke AG (Marburg/Lahn). De uitkomsten werden vergeleken met een standaard die betrokken werd van de firma Kabi en gezuiverd volgens Van Eijk (50).

Voor de bepaling van het transferrinegehalte van konijnenliquor werd in principe dezelfde methode toegepast. Hier moesten alleen de immunodiffusieplaten zelf gemaakt worden alsmede het antiserum tegen konijntransferrine. De karakterisering van het konijntransferrine alsmede de isolatie van het antilichaam tegen dit transferrine zijn uitvoerig beschreven door Van Eijk (56).

Voor de bereiding van immunodiffusieplaten werd gebruik gemaakt van een voorschrift van Kalff (57). Voor gebruik van de platen werd eerst de optimale verhouding antigeen - antilichaam bepaald. Vier verschillende liquormonsters die op de bovenomschreven manier geconcentreerd waren, werden geanalyseerd m. b. v. immunodiffusieplaten waarbij de concentratie van het antiserum gevarieerd werd. De verdunning in de agaroplossing bedroeg resp. 0,1; 0,2; 0,3 en 0,4 ml antiserum per 100 ml agaroplossing. Na verloop van drie dagen werden de precipitatieringen gemeten en vergeleken met de standaarden 100, 400 en 1000 mg/l. De antigeen - antilichaamrelatie is weergegeven in figuur II-2.



FIGUUR II - 2

Bepaling van de optimale antilichaamtiter voor de meting van het transferrinegehalte van konijnenliquor. A, B, C en D zijn 4 verschillende liquormonsters.

Er werd op grond van figuur II-2 gekozen voor een antilichaamtiter van 0,2 ml/100 ml agaroplossing.

#### 10. Beschrijving gemerkt transferrine.

Bij enkele experimenten bestond behoefte aan gemerkt konijnentransferrine. In eerste instantie werd getracht deze stof te maken door in vivo synthese van transferrine waarbij gebruik gemaakt werd van  $^{75}\text{Se}$ -methionine. Het bezwaar van deze techniek was gelegen in de lage specifieke activiteit van het gemerkte transferrine. Daarom werd besloten het merkteken in vitro aan te brengen m. b. v. monobroomazijnzuur:  $\text{BrCH}_2 - ^{14}\text{COOH}$ . De koppeling van monobroomazijnzuur aan transferrine geschiedde volgens een methode die beschreven is door Line (58). Het monobroomazijnzuur had een specifieke activiteit van 8 mC/mol  $^{14}\text{C}$ . Er werd in totaal 200  $\mu\text{C}$  gebruikt voor 100 mg transferrine. Uitgaande van het voorschrift werden 10 van de 17 histidineresten in het transferrinemolecuul geacyleerd. De ontstane modificatie van transferrine werd op tweeërlei wijze gecontroleerd:

- a. op ijzerbindend vermogen door toepassing van de Ramsay-techniek (59). Er bleek uit deze analyse dat het ijzerbindend vermogen niet was veranderd.
- b. op elektroforetisch gedrag. Hiermee werd beoogd de plaats van het radioactieve merkteken te controleren. Er werden twee elektroferogrammen gemaakt. Eén werd gebruikt ter kleuring van de transferrinefractie (Ponceau S) en de ander werd gebruikt ter analyse van de radio-activiteit d. m. v. autoradiografie. Hiertoe werd het elektroferogram gedurende twee weken op een film gelegd (Ilford röntgenfilm) waarna, na ontwikkeling en fixering van de film, een zwart bandje op de film zichtbaar was. Het bleek dat dit bandje zich bevond op de plaats van het transferrine.

#### 11. Liquordrainage.\*

Het is op verschillende manieren mogelijk om liquor cerebrosppinalis te verkrijgen. Men kan zich daarbij twee doelen stellen:

- 1e. het verkrijgen van inzicht in de samenstelling van de liquor door uitvoering van een eenmalige punctie en
- 2e. het verkrijgen van inzicht op verschillende tijdstippen door de liquor op de een of andere manier te draineren.

\* Gaarne betuigen wij op deze plaats onze erkentelijkheid jegens Prof. Dr. S. A. de Lange en zijn medewerker G. J. Holtzer, arts, voor hun medewerking in deze, alsmede jegens Drs. J. P. van Dijk.



Wij stelden ons in dit onderzoek het onder 2 genoemde ten doel. De gedachten gingen hierbij uit naar een drainagesysteem zoals dit ontwikkeld is door Spitz-Holter voor behandeling van hydrocefalen. Een uitvoerige beschrijving hiervan is te vinden in de dissertatie van De Lange (60). In het kort komt dit systeem hierop neer dat een kleppensysteem de verbinding vormt tussen een drain die gelegd wordt in één van de zijventrikels van de te opereren patiënt en een afvoer naar de bloedbaan. Wordt de liquordruk in de ventrikel te hoog voor de tegen-druk van de kleppen dan wordt er liquor afgevoerd naar de bloedbaan.

Naar analogie hiervan werd een systeem ontwikkeld dat afgestemd was op de anatomische afmetingen van een konijn. Het laatste stuk in het Holter-systeem, de afvoer naar de bloedbaan, ontbrak echter. Hiervoor in de plaats kwam een slangetje waaraan een buisje verbonden was dat in de hals van het proefdier bevestigd werd. Bij de operatie, die onder diepe narcose werd uitgevoerd, werd gebruik gemaakt van een stereotactische atlas ten einde precies de plaats van de ventrikel te bepalen. Er werd een gaatje in het schedeldak geboord waar het kleppensysteem ingebracht en vastgeschroefd werd. Hierbij kon aan het verschijnen van de liquor geconstateerd worden of de drain goed geplaatst was of niet. Was dit niet het geval dan werd de hoogte van de drain veranderd, totdat het gewenste resultaat verkregen was. Hierna werd de huid weer dichtgenaaid en het afvoerslangetje bevestigd. Hoewel de operaties met grote zorgvuldigheid uitgevoerd werden lukte het niet om de geopereerde konijnen langer dan enkele dagen in leven te houden. Bovendien was intussen meestal de liquorafgifte gestopt. Het meest gunstige resultaat betrof een konijn dat de operatie 10 dagen overleefde. Hierbij werd gedurende de eerste 5 dagen liquor opgevangen waarvan in het begin zelfs 2-3 ml per dag.

Er werd dan ook besloten af te stappen van deze operatietechniek en deze te vervangen door een minder ingrijpende. Deze bestond hierin dat een plastic drain (inwendige diameter 1 mm) in één van de zijventrikels gelegd werd. Dit gebeurde met behulp van een voor dit doel geconstrueerde mal die tot in de ventrikel reikte. De drain werd hierna in het buisje van de mal geschoven waarna deze voorzichtig werd verwijderd. Tot slot werd het uiteinde van de drain verbonden met een reservoir dat in de huid vastgezet kon worden. Het betrof hier een reservoir zoals dat ontwikkeld is door Rickam. Het dopje dat dit reservoir afsluit is gemaakt van siliconrubber en kan vele malen geperforeerd worden. Op deze manier is het dus ook mogelijk om op een vrij gemakkelijke manier op verschillende tijdstippen liquor cerebrospinalis te verkrijgen. De resultaten echter die met deze operatietechniek verkregen werden, waren

evenzeer weinig bemoedigend. Weliswaar was de overlevingsduur van het konijn aanzienlijk verbeterd, maar de liquorafgifte stopte meestal vrij spoedig na de operatie.

Na deze teleurstellende resultaten werd besloten de oorspronkelijke proefopzet te herzien en over te gaan op suboccipitale punctie ter verkrijging van de liquor. Hiermee werd snel een grote mate van handigheid verkregen. Het nadeel was dat het aantal puncties beperkt moest worden. De uitvoering geschiedde als volgt: het konijn werd licht verdoofd waarna de nek kaal geschoren werd en de punctieplaats gedesinfecteerd. Hierna werd de kop naar voren getrokken waardoor de cisterna magna voor punctie toegankelijk werd. Deze plaats was door palpatie te vinden. Voor de punctie werd gebruik gemaakt van babylumbaalnaalden. Per punctie werd 0,5 - 1,0 ml liquor verkregen.

## HOOFDSTUK III

### ONDERZOEK AAN HERSENWEEFSEL

#### INLEIDING

In hoofdstuk I werden de in de literatuur beschreven gegevens betreffende het ijzergehalte van de hersenen besproken. Hoewel er nog geen communis opinio is omtrent de gevonden verschillen in ijzergehalte van diverse hersendelen, is men er wel van overtuigd dat er verschillen bestaan. In hoeverre het bestaan hiervan samenhangt met verschillen in stofwisselingsfunctie van de diverse hersendelen is een nog onopgeloste vraag.

Er van uitgaande dat ook het element ijzer in hersenweefsel in een dynamisch evenwicht verkeert, moet aangenomen worden dat ijzer voortdurend hersenweefsel binnentreedt en verlaat. Het is redelijk te veronderstellen dat het bloed, en in het bijzonder het transferrine, een rol speelt bij dit proces. In de literatuur zijn hierover echter geen gegevens beschikbaar.

In dit hoofdstuk zullen de resultaten besproken worden van de experimenten die uitgevoerd zijn ter bestudering van de overgang van ijzer uit het bloed naar de hersenen, zowel bij normale ratten als bij ratten die een anemie hadden respectievelijk overladen waren met ijzer. Tevens zal aandacht geschonken worden aan de verdeling van het radio-actieve ijzer over diverse onderdelen van de hersenen, alsmede aan de isolatie van ferritine uit hersenweefsel.

#### 1. BESTUDERING VAN DE OVERGANG VAN IJZER VANUIT DE BLOED- BAAN NAAR DE HERSENEN BIJ NORMALE RATTEN.

##### a. De controle op het bloedvrij maken van hersenen.

Bij het analyseren van weefsels op het gehalte aan ijzer moet aan één voorwaarde zijn voldaan: de te bestuderen weefsels moeten bloedvrij gemaakt zijn.

bloed opgezogen in een spuit. Het opofferen geschiedde door spoelen met fysiologisch zout zoals beschreven. De hersenen werden geïsoleerd waarna de radio-activiteit in de hersenen en in het bloed gemeten werd. De resultaten zijn weergegeven in tabel III-2.

TABEL III-2

Meting van de radio-activiteit in de hersenen en in het bloed op verschillende tijdstippen na toediening van  $^{59}\text{Fe Cl}_3$ .

Tijd	Radio-activiteit hersenen
	Radio-activiteit 1 ml bloed
1 uur	$3,2 \times 10^{-2}$
3 uur	$4,4 \times 10^{-2}$
8 uur	$5,8 \times 10^{-2}$
24 uur	$3,3 \times 10^{-2}$

Het leek ons van betekenis om na te gaan in hoeverre de vorm waarin het  $^{59}\text{Fe}$  in de bloedbaan wordt gebracht invloed heeft op de overgang van ijzer uit de bloedbaan naar de hersenen. Bij een volgend experiment werd daarom ascorbinezuur aan de injectievloeistof toegevoegd zodat  $^{59}\text{Fe(II)}$  werd ingebracht. De overige proefomstandigheden werden gelijk gehouden. De resultaten van dit experiment, dat in duplo werd uitgevoerd, zijn te vinden in tabel III-3.

TABEL III-3

Meting van de radio-activiteit in de hersenen en in het bloed op verschillende tijdstippen na toediening van  $^{59}\text{Fe Cl}_2$ .

Tijd	Radio-activiteit hersenen
	Radio-activiteit 1 ml bloed
8 uur	$6,7 \times 10^{-2}$
24 uur	$3,1 \times 10^{-2}$
48 uur	$1,8 \times 10^{-2}$

In een derde inleidend experiment werd  $^{59}\text{Fe}$  gekoppeld aan transferrine volgens de techniek van Tavenier die weergegeven is in hoofdstuk II. De hoeveelheid transferrine die ingebracht werd bedroeg 2 mg, hoeveelheid radio-activiteit ongeveer  $10\ \mu\text{C}$  per rat. De overige proefomstandigheden waren gelijk aan de bovenbeschrevene. De resultaten zijn weergegeven in tabel III-4.

TABEL III-4

Meting van de radio-activiteit in de hersenen en in het bloed op verschillende tijdstippen na toediening van  $^{59}\text{Fe}$  (III) - transferrine.

Tijd	Radio-activiteit hersenen
	Radio-activiteit 1 ml bloed
24 uur	$2,2 \times 10^{-2}$
48 uur	$2,6 \times 10^{-2}$
72 uur	$1,9 \times 10^{-2}$

De specifieke activiteit van het  $^{59}\text{Fe}$  bedraagt volgens de fabrikant meer dan 2 C per gram ijzer. Dit hebben wij gecontroleerd en juist bevonden (zie hoofdstuk II). Het betekent dat per rat slechts enkele microgrammen ijzer werden ingespoten, hetgeen een fractie is van de totale hoeveelheid die in het plasma van de rat aanwezig is. Zo was de hoeveelheid transferrine die ingebracht werd ongeveer 8% van de in het plasma aanwezige hoeveelheid. De resultaten van de experimenten leerden ons het volgende:

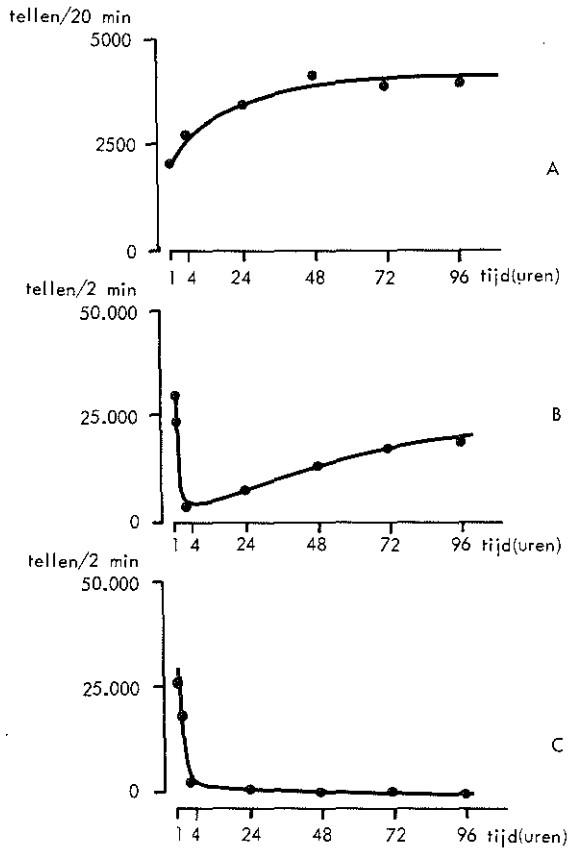
Een toegediende dosis van  $5\ \mu\text{C}$   $^{59}\text{Fe}$  resulteert in een meetbare radio-activiteit in de hersenen. De totale hoeveelheid radio-activiteit die de hersenen bereikt is echter uiterst gering. Deelt men de gemeten activiteiten van hersenen en bloed bij de proeven met  $^{59}\text{Fe}$  op dezelfde wijze op elkaar als dat gebeurd is bij de proeven met  $^{51}\text{Cr}$  (tabel III-1) dan komt men op getallen in de orde van grootte van  $10^{-2}$ . Bij  $^{59}\text{Fe}$  zijn de quotiënten dus een factor 100 groter. Dit lijkt erop te wijzen dat ijzer in staat is de bloedbaan te verlaten en het hersenweefsel binnen te dringen.

c. Definitieve experimenten.

Onze ervaring opgedaan bij de voorlopige experimenten leidde tot de volgende definitieve proefopstelling. Teneinde iedere twijfel omtrent het fysiologisch karakter van de te injecteren vloeistof weg te nemen besloten wij gebruik te ma-

ken van het met  $^{59}\text{Fe}$  opgeladen serum zoals dat door Tavenier beschreven is. De techniek van opladen is beschreven in hoofdstuk II. In totaal werd per rat 0,8 ml opgeladen serum ingespoten in de staartvene. Verder zagen wij geen aanleiding de in de voorlopige experimenten gebruikte techniek te wijzigen.

Uiteraard is het gewenst na te gaan hoe in verloop van tijd het  $^{59}\text{Fe}$  verdeeld raakt over het plasma- en het erythrocytencompartiment van bloed. Bij een volgend experiment werden dan ook metingen verricht zowel in hersenen als in bloed, plasma en tweemaal met fysiologisch zout gewassen erythrocyten. De ratten werden wederom opgeofferd door doorstroming met fysiologisch zout na  $\frac{1}{2}$ , 4, 24, 48, 72 en 96 uur. In figuur III-1 zijn de resultaten van dit experiment weergegeven.



FIGUUR III - 1

De verdeling van  $^{59}\text{Fe}$  over hersenen, bloed en plasma gemeten op verschillende tijdstippen.

In totaal werd per rat een hoeveelheid radio-activiteit ingespoten die overeenkwam met 5.092.000 tellen per 2 minuten. Dit betekent dat ongeveer 0,1% aanwezig is in de hersenen op de momenten waarop de hoogste concentratie  $^{59}\text{Fe}$  in hersenweefsel gemeten werd.

De meting van de radio-activiteit in de gewassen erythrocyten bevestigt de resultaten van de metingen die verricht zijn aan bloed en plasma. Na 24 uur zit vrijwel alle in het bloed gemeten radio-activiteit in de erythrocyten.

Datgene wat in figuur III-1 opvalt is dat het merendeel van de radio-activiteit die in de hersenen gemeten werd, er in de eerste 24 uur inkomt. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat deze overgang via het plasma plaats vindt, gezien de hoge radio-activiteit van het plasma in de eerste uren. De verklaring van de verdere toename van de  $^{59}\text{Fe}$ -activiteit in hersenen lijkt echter, op basis van opname van  $^{59}\text{Fe}$  uit het plasma, op het eerste gezicht onwaarschijnlijk. Immers na 24 uur neemt de  $^{59}\text{Fe}$ -activiteit in plasma voortdurend af, terwijl deze in hersenweefsel, zoals gezegd, nog stijgt. Deze schijnbare tegenspraak is op te lossen door de specifieke activiteiten van  $^{59}\text{Fe}$  in hersenen en plasma te berekenen en te vergelijken. De resultaten van deze berekeningen zijn weergegeven in tabel III-5.

TABEL III-5

Specifieke activiteit van de rattenhersenen (totaal) en het plasma (1 ml) weergegeven in tellen per mmol Fe. De teltijd bedroeg 20 minuten.

<u>Tijd</u>	<u>Hersenen</u>	<u>Plasma</u>
$\frac{1}{2}$ uur	2,0	7440
1 uur	2,0	5520
4 uur	2,5	820
24 uur	3,1	65
48 uur	3,7	49
72 uur	3,3	29
96 uur	3,3	24

In de tabel ziet men dat, ondanks het feit dat de specifieke activiteit in het plasma snel afneemt, deze ook op de laatste tijdstippen nog hoger is dan die van de hersenen. Hieruit valt te concluderen dat ook op de tijdstippen 24, 48, 72 en 96 uur het radio-actief ijzer de hersenen bereikt. Herhaling van dit experiment in triplo leverde hetzelfde resultaat op. Bovendien werd het experiment verlengd tot 2 respectievelijk 4 weken. Dit werd gedaan ten einde na te gaan in hoeverre de specifieke activiteiten van het hersen- en het plasmacompartiment nog veranderingen zouden ondergaan. Deelt men de waarde van de specifieke activiteit van het hersencompartiment op die van het plasmacompartiment dan levert deze deling het getal acht op. Bij de experimenten die na 2 weken werden beëindigd werd gevonden 6 en 9. Na 4 weken respectievelijk 2 en 2. Geleidelijk aan ziet men dus dat de waarden van de specifieke activiteiten dichter bij elkaar komen te liggen.

Voor de berekening werd gebruik gemaakt van het feit dat het ijzergehalte van de hersenen  $2,8 \mu\text{mol/g}$  drooggewicht bedraagt hetgeen het gemiddelde is van 14 waarnemingen. Bovendien werd gebruik gemaakt van het feit dat het plasma-ijzergehalte  $34 \mu\text{mol/l}$  bedraagt. Dit laatste getal is het gemiddelde van 47 waarnemingen.\*

## 2. DE INBOUW IN HERSENWEEFSEL VAN UIT DE BLOEDBAAN AFKOMSTIG IJZER.

### a. Verdeling van ijzer over diverse hersendelen.

Bij een volgende serie experimenten werd de verdeling van de radio-activiteit over diverse hersendelen bestudeerd. In eerste instantie werden de hersenen verdeeld in 1e. de grijze stof, 2e. de witte stof en 3e. de kleine hersenen. In tabel III-6 zijn de resultaten weergegeven.

\* Wij danken Dr. N. C. Verhoef, afd. Chemische Pathologie, voor het beschikbaarstellen van deze waarde.



TABEL III-6

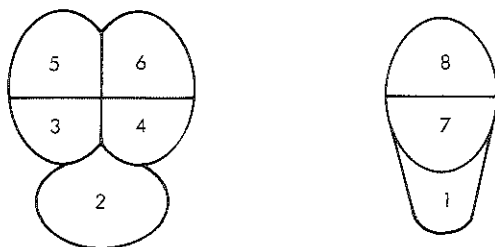
Radio-activiteit van de kleine hersenen, de grijze en de witte stof van de grote hersenen bij de rat weergegeven in tellen per 500 mg drooggewicht. De teltijd bedroeg 20 minuten.

<u>Tijd</u>	<u>Kleine hersenen</u>	<u>Grijze stof</u>	<u>Witte stof</u>
1 uur	1288	3270	2152
4 uur	2430	5100	3710
24 uur	2912	4280	3680
48 uur	2398	6090	4620
72 uur	1996	4640	3590
96 uur	1780	4110	3510

Uit de tabel volgt:

- 1e. Het activiteitsverloop in de bestudeerde hersendelen toont hetzelfde beeld als het verloop in de intacte hersenen (zie fig. III-1).
- 2e. In de diverse delen vallen duidelijk activiteitsverschillen te constateren.

Het had in onze ogen zin, vooral gezien de tegenstrijdige gegevens in de literatuur over verschillen in ijzergehalte, dit fenomeen nader te onderzoeken. De grijze en witte hersenfracties werden hiertoe onderverdeeld, de grijze fractie in vier stukken en de witte in twee zoals te zien is in figuur III-2. Bovendien werden de kleine hersenen en het verlengde merg geanalyseerd.



FIGUUR III - 2

De verdeling van de hersenen in 8 ongeveer gelijke delen.

Bovenaanzicht

Grijze stof +  
kleine hersenen

Onderaanzicht

Witte stof +  
verlengde merg

De stukjes hersenweefsel waren dusdanig van grootte (ongeveer 50 mg droge stof) dat een betrouwbare analyse van het ijzergehalte verwacht mocht worden. Van de beschreven hersendelen werd de radio-activiteit gemeten alsmede het ijzergehalte waarna de specifieke activiteit berekend werd. De resultaten zijn weergegeven in tabel III-7.

TABEL III-7

Specifieke activiteit van 8 hersendelen van de rat weergegeven in tellen per  $\mu\text{mol Fe}$  per g drooggewicht. De teltijd bedroeg 20 minuten.

<u>Tijd</u>	<u>Fractie</u>							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 uur	1640	1580	980	910	1230	1720	1010	860
4 uur	2340	2710	2040	1640	1720	2140	1350	1300
24 uur	2200	3170	1510	1520	1670	1630	1710	1680
48 uur	1710	3120	1940	1600	1580	1870	1490	1190
72 uur	2130	2440	1410	1220	1180	1420	1530	1210
96 uur	1960	2470	1380	1510	1500	1500	840	1470

De eerste indruk bij bestudering van tabel III-7 is dat de waarden voor de specifieke activiteiten in de diverse hersendelen dicht bij elkaar liggen na 4 dagen. Er zijn twee uitzonderingen (2 en 7). De waarde 840 bij monster 7 is een uitschieter gezien de waarden op de andere tijdstippen.

b. Verdeling over subcellulaire fracties.

Vervolgens onderzochten wij de verdeling van het uit de bloedbaan in de hersenen doorgedrongen  $^{59}\text{Fe}$  over de subcellulaire fracties van hersenweefsel. Voor het verkrijgen van deze fracties maakten wij gebruik van de techniek die in hoofdstuk II is beschreven. In tabel III-8 zijn de percentages weergegeven van de diverse fracties in vergelijking met de radio-activiteit die in de intacte hersenen gemeten werd.

TABEL III-8

Activiteitsverdeling als percentage van het totaal over de kernenfractie, de mitochondriënfractie en de supernatant

<u>A</u>			
<u>Tijd</u>	<u>Kernen</u>	<u>Mitochondriën</u>	<u>Supernatant</u>
$\frac{1}{2}$ uur	38	13	26
1 uur	52	20	32
4 uur	48	26	29
24 uur	43	29	21
48 uur	49	29	29
72 uur	44	24	28
96 uur	50	25	23
<u>B</u>			
2 weken	68	19	13
	73	11	15
	75	10	15
4 weken	74	11	14
	73	12	15
	61	26	14

Met uitzondering van het eerste experiment komen bij optelling van de percentages de uitkomsten rond honderd procent te liggen. Opvallend is het hoge gehalte aan  $^{59}\text{Fe}$  van de kernenfractie. Het leek ons gewenst na te gaan of de genoemde verdeling over de subcellulaire fracties verandering zou ondergaan wanneer het experiment tot 4 weken verlengd werd. Vandaar dat wij bij een volgend experiment de tijd tussen de toediening van opgeladen serum en de opoffering van de proefdieren verlengden tot twee respectievelijk vier weken. Het resultaat verkregen bij dit experiment kwam overeen met het resultaat van het eerste experiment voor wat betreft de eerste 4 dagen. Een opvallend verschil toonde echter de volgende analysetijdstippen zoals eveneens in tabel III-8 is aangegeven.

Van de drie fracties werd tevens het ijzergehalte gemeten ten einde de specifieke activiteit te berekenen. De gemiddelde ijzergehaltes (4 waarnemin-

gen) zijn per totaal: kernenfractie 0,8  $\mu\text{mol}$ , mitochondriënfractie 0,1  $\mu\text{mol}$  en supernatant 0,15  $\mu\text{mol}$ . Dit betekent dat na 4 weken de mitochondriënfractie de hoogste specifieke activiteit heeft. De kernenfractie en de supernatant hebben een nagenoeg gelijke specifieke activiteit. Een verklaring voor de gevonden activiteitsverdeling kunnen wij op dit moment niet geven.

c. De inbouw in ferritine en andere verbindingen.

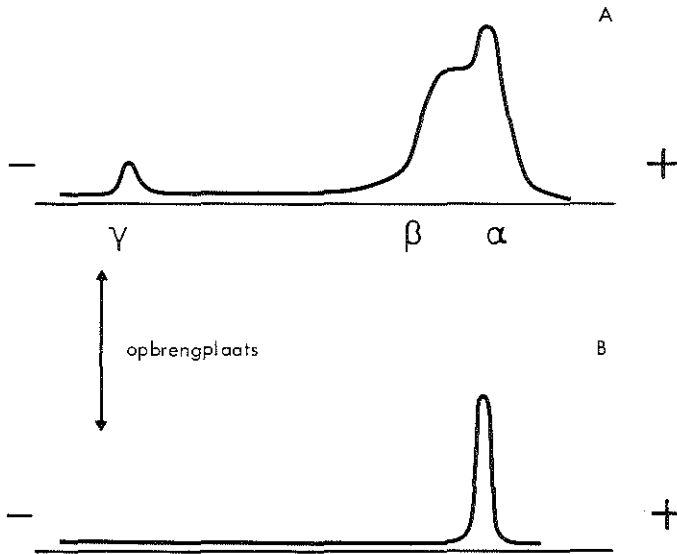
De tot nu toe beschreven experimenten hadden ons enig inzicht verschaft in de overgang van het element ijzer vanuit de bloedbaan naar de hersenen. Bovendien had ons onderzoek gegevens opgeleverd betreffende de verdeling van het ijzer over het hersenweefsel. De vraag rees nu of het mogelijk zou zijn inzicht te krijgen in de aard van de in de hersenen aanwezige ijzerverbindingen. Zoals uit hoofdstuk I blijkt is er dienaangaande in de literatuur weinig duidelijkheid. Er is eigenlijk maar één verbinding die enigszins beschreven is namelijk ferritine. Wij besloten daarom in ons onderzoek aandacht te schenken aan deze verbinding.

De isolatieprocedure voor ferritine zoals die op ons laboratorium door Van Kreel is uitgewerkt is beschreven in hoofdstuk II. Er zijn in de literatuur nauwelijks gegevens bekend omtrent het ferritinegehalte in de hersenen van diverse dieren. De rat is, bij ons weten, in deze een onbeschreven proefdier. Wij besloten in totaal tien rattenhersen te mengen en te analyseren. De voorbereidingen waren dezelfde als bij de voorgaande experimenten beschreven m. a. w. de dieren werden voordat de schedel gelicht werd, gespoeld met fysiologisch zout. Na het centrifugeren was boven de Sephadex-laag een uiterst dun vliesje te zien: het ferritine. Hieruit was reeds op te maken dat de totale hoeveelheid zeer gering was. Nadat het ferritine geëluëerd was werd het ijzergehalte van de ferritine-oplossing ( $F_3$ ) bepaald. Dit gebeurde tevens in de na centrifugatie achterblijvende vloeistof ( $F_2$ ) en het neerslag na homogenisatie ( $F_1$ ). De afzonderlijke fracties leverden respectievelijk op: 20% van het totale ijzer in  $F_1$ , 70% in  $F_2$  en 10% in  $F_3$ . De som van het ijzer aanwezig in de fracties  $F_1$ ,  $F_2$  en  $F_3$  is het totale ijzergehalte van het hersenweefsel. Per proefdier leverden deze analyses een totaal ijzergehalte van 0,8  $\mu\text{mol}$  op. Dit is in goede overeenstemming met het eerder genoemde getal van  $1,1 \pm 0,4$   $\mu\text{mol}$  hetgeen verkregen was door een directe analyse van het hersenweefsel.

Wanneer we een ruwe berekening uitvoeren om tot het ferritinegehalte in rattenhersen te komen dan komt deze 10% in  $F_3$  (= 0,08  $\mu\text{mol}$ ) overeen met

16  $\mu\text{g}$  ferritine. Hierbij is voor ferritine een molecuulmassa van 660.000 aangenomen en een ijzergehalte van 20%. De door ons gebruikte isolatietechniek van ferritine heeft een opbrengst van 68% zodat aangenomen mag worden dat aanwezig is in rattenhersenen 23  $\mu\text{g}$  ferritine. Dit komt neer op 12  $\mu\text{g}$  ferritine per gram hersenweefsel. Vergelijken we dit resultaat met leverweefsel dan krijgen we het volgende: per rattenlever vond Van Kreel in totaal 4  $\mu\text{mol}$  ferritine-ijzer. Stellen we het gewicht van een rattenlever op 8 g dan is de ferritineconcentratie in leverweefsel 100  $\mu\text{g}$  per gram, dus 8 x meer.

De ferritine-oplossing werd aan een electroforese onderworpen op poly-acrylamide op de wijze zoals beschreven is in hoofdstuk II. Tegelijk werd een oplossing van paardenmiltferritine als referentie meegenomen. Na kleuring op ijzer werden de gelen in een densitometer doorgemeten. Het resultaat hiervan is weergegeven in figuur III-3.



FIGUUR III - 3

Electroferogrammen van ferritinepreparaten.

- A. Ferritine uit paardenmilt
- B. Ferritine uit rattenhersenen

Het lijkt waarschijnlijk dat uit het hersenweefsel slechts één vorm van het ferritine geïsoleerd is. De electroforeseband ervan komt qua plaats overeen met de plaats van het  $\alpha$ -ferritine uit paardenmilt.

Een volgende stap in het onderzoek was de isolatie van ferritine nadat  $^{59}\text{Fe}$  in het proefdier geïntroduceerd was. De proefopzet was dezelfde als reeds

eerder beschreven. Nadat met  $^{59}\text{Fe}$  opgeladen serum in de bloedbaan bij 10 ratten gebracht was, werden de dieren na 3 dagen opgeofferd. Hierna volgde isolatie van ferritine zoals beschreven. Vervolgens werd de radio-activiteit gemeten in de eerder genoemde fracties  $F_1$ ,  $F_2$  en  $F_3$ . In fractie  $F_1$  bleek aanwezig te zijn 11% van de totale hoeveelheid radio-activiteit, in fractie  $F_2$  80% en in fractie  $F_3$  9%.

### 3. BESTUDERING VAN DE OVERGANG VAN IJZER VANUIT DE BLOED- BAAN NAAR DE HERSENEN BIJ NIET-NORMALE RATTEN.

Er werd hierbij een onderzoek verricht aan ratten die anemisch gemaakt waren en aan ratten die overladen waren met ijzer. Het verkrijgen van anemische ratten geschiedde d. m. v. fenyldiazine en d. m. v. flebotomie. Het overladen geschiedde met  $\text{Fe SO}_4$  en met een ijzerdextraanpreparaat. De details van de technieken waarmee de genoemde toestanden verkregen zijn, zijn vermeld in hoofdstuk II. Nadat de anemische toestand respectievelijk de overladen toestand bereikt was, werd op de gebruikelijke manier met  $^{59}\text{Fe}$  opgeladen serum intraveneus in de proefdieren geïnjecteerd, waarna na 3 dagen de ratten door spoelen met fysiologisch zout opgeofferd werden. Hierna werd de radio-activiteit gemeten in bloed (1 ml) en hersenen (totaal). In tabel III-9 zijn de resultaten van deze tellingen in hersenen en bloed weergegeven op dezelfde manier als dit gedaan is in de tabellen III-1 t/m III-4. Dit om een vergelijking tussen de verschillende categorieën mogelijk te maken.

Het quotiënt activiteit hersenen/activiteit 1 ml bloed is uiteraard een zeer ruwe maat. Dit bedenkende vallen toch een aantal punten op in tabel III-9:

1. De manier waarop ratten anemisch gemaakt worden, respectievelijk overladen worden lijkt niet van belang.
2. Bij anemische ratten is in tegenstelling tot overladen ratten een duidelijk verschil waarneembaar in de overgang van ijzer uit de bloedbaan naar de hersenen.
3. Vergelijkt men het genoemde quotiënt in de groep overladen ratten met het quotiënt uit de groep normale ratten (zie de tabellen III-2, III-3 en III-4) dan valt op dat deze quotiënten gelijk zijn.

Het leek ons zinvol het experiment te herhalen en tegelijkertijd normale ratten in het experiment te betrekken. Het resultaat was precies gelijk aan het eerstgedane. Het een en ander is weergegeven in tabel III-10.

TABEL III-9

Meting van de radio-activiteit van hersenen (totaal) en bloed (1 ml) bij anemische ratten en met ijzer overladen ratten.

	<u>Radio-activiteit hersenen</u> Radio-activiteit 1 ml bloed
1. Anemisch (fenyldiazine)	$4,4 \times 10^{-3}$
2. " "	$3,7 \times 10^{-3}$
1. " (flebotomie)	$5,8 \times 10^{-3}$
2. " "	$5,5 \times 10^{-3}$
1. Overladen ( $\text{Fe SO}_4$ )	$2,0 \times 10^{-2}$
1. " (Fe-dextraan)	$2,8 \times 10^{-2}$
2. " "	$2,1 \times 10^{-2}$

TABEL III-10

Meting van de radio-activiteit van hersenen (totaal) en bloed (1 ml) bij anemische ratten (fenyldiazine), met ijzer overladen ratten (Fe-dextraan) en normale ratten. Weergegeven is het quotiënt:  $\frac{\text{radio-activiteit hersenen}}{\text{radio-activiteit 1 ml bloed}}$ .

<u>Normaal</u>	<u>Anemisch</u>	<u>Overladen</u>
$1,7 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-2}$
$1,8 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$
$2,0 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$
$1,9 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$
$1,3 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-2}$

De conclusies 2 en 3 worden dus door tabel III-10 bevestigd.

## HOOFDSTUK IV

### ONDERZOEK AAN LIQUOR CEREBROSPINALIS

#### INLEIDING

Men heeft lange tijd gemeend dat liquor cerebrospinalis een ultrafiltraat van plasma was. Ten gunste van deze opvatting pleitten de uitkomsten van de chemische analyses die op de beide lichaamsvloeistoffen waren verricht. Hoogmoleculaire stoffen bleken in liquor cerebrospinalis nauwelijks aanwezig te zijn terwijl laagmoleculaire stoffen, globaal gesteld, gelijkelijk verdeeld waren over liquor en plasma. Uiteraard dient hierbij te worden aangemerkt dat, evenals dat bij interstitiële vloeistoffen en plasma het geval is, tussen liquor en plasma een Donnan-evenwicht moet worden verondersteld. Hoewel het hier niet de plaats is om diepgaand op de chemische analyses in te gaan, kan als resultaat van nauwkeurige metingen aan beide vloeistoffen wel vermeld worden dat er verschillen in samenstelling zijn. Deze verschillen betreffen zowel de hoogmoleculaire als de laagmoleculaire stoffen. Voor electrolyten krijgt men bij de mens hiervan een indruk bij bestudering van tabel IV-1 (61):

TABEL IV-1

De concentratie electrolyten in plasma, een plasma-ultrafiltraat en liquor uit de plexus chorioideus resp. cisterna magna weergegeven in mmol/kg H<sub>2</sub>O.

	Na	K	Cl	Ca	Mg
Plasma	163	4,40	132	2,62	1,35
Ultrafiltraat	151	3,30	136	1,83	0,95
Liquor plexus	158	3,28	138	1,67	1,47
Liquor cisterna	158	2,69	144	1,50	1,33



Het een en ander kon moeilijk in overeenstemming gebracht worden met de ultrafiltratietheorie. Men neemt dan ook nu aan dat liquor cerebrospinalis gesecerneerd wordt door de in de ventrikels liggende plexus chorioideus. Dit zijn uitstulpingen van de pia mater die een rijkvertakt haarvatennet bezitten. Men stelt zich voor dat in eerste instantie een plasmafiltiraat gevormd wordt dat door de epitheelcellen van de plexus chorioideus geabsorbeerd wordt en in gewijzigde vorm afgescheiden wordt in de ventrikels.

Waarschijnlijk is de liquorproductie een continu proces. Er is geen terugkoppelingsmechanisme bekend dat dit proces reguleert. De geproduceerde liquor vloeit af naar de arachnoïdale ruimte. Hiervan gaat een gedeelte naar het ruggemergskanaal; het grootste deel gaat echter via de basale cisternen naar de cisterna chiasmatis waarna resorptie in de bloedbaan plaats vindt via de granulaties van Pacchioni.

Metingen aan diverse diersoorten resulteerden in productiesnelheden van 0,01 - 0,05 ml/min. Een volwassen mens kan  $\pm$  0,3 ml/min. produceren. Deze productiesnelheid is, vergeleken met de totale hoeveelheid (120 - 150 ml), lager dan bij de meeste zoogdieren het geval is.

Er zijn verschillende methodes om liquor cerebrospinalis te verkrijgen afhankelijk van de plaats waar de punctie in de liquor bevattende ruimte verricht wordt. Door de geringe stroomsnelheid bestaan verschillen in concentratie van een stof op diverse plaatsen. Het is daarom noodzakelijk bij opgave van chemisch onderzoek te vermelden hoe de liquor verkregen is. Hier- van geeft tabel IV-2 blijk (62):

TABEL IV-2

Totaal eiwitgehalte van op verschillend niveau gepunteeerde liquormonsters (mg/l).

<u>Auteur</u>	<u>Lumbaal</u>	<u>Suboccipitaal</u>	<u>Ventriculair</u>
Hoffmann (1956)	242	216	144
Hall (1958)	210 $\pm$ 73	183 $\pm$ 43	171 $\pm$ 99
Spina-Franca ((1961)	240 $\pm$ 63	170 $\pm$ 48	149 $\pm$ 50

Er is in deze inleiding bewust afgezien van een beschrijving van de bloed- liquor-barrière. Hiervoor zij verwezen naar de inleiding van dit proefschrift (63).

In hoofdstuk III is gewezen op een mogelijke functie van het bloed bij het handhaven van het dynamisch evenwicht van ijzer in de hersenen. Het is in deze redelijk te veronderstellen dat ook liquor cerebrospinalis een rol speelt bij het handhaven van dit evenwicht. Er zijn in de literatuur geen gegevens bekend die enige opheldering geven inzake dit probleem. In dit hoofdstuk zullen dan ook enige onderzoeken beschreven worden die gericht zijn op de overgang van ijzer vanuit de bloedbaan naar het liquorcompartiment en omgekeerd. Tevens zal nagegaan worden hoe ijzer, na intracisternale introductie, zich verdeelt over het bloed- en hersencompartiment. Begonnen wordt met een analyse van het ijzer- en transferrinegehalte van liquor cerebrospinalis.

#### 1. DE BEPALING VAN HET IJZERGEHALTE EN HET TRANSFERRINEGEHALTE VAN LIQUOR CEREBROSPINALIS VAN DE MENS.

Met behulp van de methode die in hoofdstuk II beschreven is werd het ijzergehalte in liquor cerebrospinalis bepaald. Het betrof in alle gevallen monsters die verkregen werden via een lumbaalpunctie. De hulpmiddelen voor de punctie werden zorgvuldig gereinigd en daarna op ijzer gecontroleerd. In geen van de geanalyseerde onderdelen kon ijzer aangetoond worden in een hoeveelheid die van invloed zou kunnen zijn op de gemeten ijzergehalten van liquor cerebrospinalis.

De liquormonsters waren afkomstig van personen die op de afdeling Neurologie van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam in het raam van een neurologisch onderzoek een lumbaalpunctie ondergingen. Wij gebruikten bij dit onderzoek liquormonsters van die onderzochte personen waarbij geen neurologische aandoeningen geconstateerd werden. De liquor cerebrospinalis zou dus als "afkomstig van een normaal persoon" beschreven kunnen worden. Met behulp van nader laboratoriumonderzoek werd dit criterium nog wat verscherpt. Op ieder monster werd de goudsol- en benzoësolreactie uitgevoerd benevens de bepaling van het eiwit- en het  $\gamma$  globulinegehalte (64). Direct na de lumbaalpunctie werd de ijzeranalyse verricht. Alleen heldere op water gelijkende liquor werd gebruikt. De transferrinebepaling, eveneens volgens de in hoofdstuk II beschreven methode verricht, werd daarna uitgevoerd. De resultaten van de genoemde bepalingen vindt men weergegeven in tabel IV-3:

TABEL IV-3

Experimentele gegevens van 23 normale liquormonsters.

	Fe	Transferrine	Eiwit	$\gamma$ -Globuline
	$\mu$ mol/l	mg/l	mg/l	mg/l
1	1,1	23	410	90
2	0,6	14	260	50
3	1,3	13	230	50
4	1,1	16	370	50
5	1,2	19	270	30
6	0,7	21	320	20
7	1,5	19	240	20
8	1,4	17	280	60
9	1,0	12	230	30
10	0,3	19	430	40
11	0,3	11	320	30
12	0,5	20	340	20
13	0,6	23	350	20
14	0,3	17	240	20
15	0,3	14	320	40
16	0,5		390	10
17	0,5		380	10
18	0,6		380	10
19	1,4		440	20
20	0,7		290	20
21	0,5		320	20
22	0,5		230	30
23	0,9		460	20

De gemiddelde waarde voor Fe is  $0,8 \mu\text{mol/l}$  (standaarddeviatie  $0,4 \mu\text{mol/l}$ ) en voor transferrine  $17 \text{ mg/l}$  ( $0,2 \mu\text{mol/l}$ ), standaarddeviatie  $4 \text{ mg/l}$

## 2. DE BEPALING VAN HET IJZERGEHALTE EN HET TRANSFERRINE-GEHALTE VAN LIQUOR CEREBROSPINALIS VAN HET KONIJN.

Bij konijnen werd zoals beschreven, een suboccipitale punctie uitge-

voerd ter verkrijging van liquor cerebrospinalis. Met behulp van dezelfde analysemethoden als genoemd in paragraaf 1 werden het ijzergehalte en het transferrinegehalte bepaald. De resultaten zijn te vinden in tabel IV-4.

TABEL IV-4

De resultaten van de bepalingen van Fe en transferrine in konijnenliquor. Van één monster werd òf het Fe-gehalte òf het transferrinegehalte bepaald.

Fe $\mu\text{mol/l}$	Transferrine monster kleurloos	Transferrine monster lichtrood	Transferrine monster rood
	mg/l	mg/l	mg/l
0,7	36	48	196
1,0	51	72	
0,5	48	49	
1,3	53	59	
0,7	68	57	
0,5	17	65	
0,4	32	61	
0,9	42		
0,8	38		
1,4	56		
1,4	33		
1,5	40		
1,9	41		
	69		
	50		
	66		
	46		
	56		
	50		

De gemiddelde waarde voor Fe is  $1,0 \mu\text{mol/l}$  (standaarddeviatie  $0,4 \mu\text{mol/l}$ ) en voor transferrine  $47 \text{ mg/l}$  ( $= 0,5 \mu\text{mol/l}$ ), standaarddeviatie  $13 \text{ mg/l}$ . Het gemiddelde van de lichtgecontamineerde monsters is  $58 \text{ mg/l}$ .

Een moeilijkheid die bij het punteren van konijnen ondervonden werd was de onmogelijkheid een traumatische punctie te corrigeren. Bij de mens heeft men door de aanzienlijk grotere hoeveelheid liquor cerebrospinalis de mogelijkheid om het eerste gedeelte dat opgevangen wordt niet voor analyse te gebruiken. Bij het konijn is dit uitgesloten in ons geval. Een traumatische punctie heeft tot gevolg dat de opgevangen liquor gecontamineerd is met plasma. In ons geval dus met transferrine uit plasma. Al werd ook bij de analyse van konijnttransferrine alleen gebruik gemaakt van op water gelijkende monsters, toch bestond de behoefte om de punctie te controleren. Dit werd op tweeërlei wijze gedaan: a) radiochemisch en b) morfologisch. Bij de radiochemische controle werd bij twee konijnen een half uur voordat de punctie verricht zou worden  $^{131}\text{I}$ -albumine intraveneus toegediend. Nadat de liquor-puncties uitgevoerd waren werd 1 ml bloed geprikt. In beide gevallen betrof het liquor die op het oog geschikt was voor de analyse van transferrine. De radio-activiteitsmetingen zijn vermeld in tabel IV-5.

TABEL IV-5

Meting radio-activiteit na inspuiting  $^{131}\text{I}$ -albumine. (tellen/ml/min).

<u>Konijn</u>	<u>Bloed (1 ml)</u>	<u>Liquor (1 ml)</u>
I	111940	0
II	105386	0

De morfologische controle werd bij een tweetal andere konijnen uitgevoerd. Het betrof hier het tellen van cellen in de liquor cerebrospinalis op de gebruikelijke wijze na kleuring. Beide monsters, die ook op het oog geschikt waren voor de analyse van transferrine, bevatten geen cellen. Uit de genoemde controles blijkt dat het gemeten transferrinegehalte werkelijk de concentratie van transferrine in liquor cerebrospinalis voorstelt. Deze conclusie wordt nog versterkt door het tweede deel van tabel IV-4. Hierin zijn de resultaten van enige duidelijk met bloed gecontamineerde monsters vermeld. Nochtans verschillen deze waarden weinig van het gemiddelde van de door ons goedgekeurde monsters.

### 3. DE ELECTROFORESE VAN MET $^{59}\text{Fe}$ OPGELADEN LIQUOR CEREBROSPINALIS .

Uit het bovenvermelde onderzoek blijkt duidelijk dat de hoeveelheden transferrine en ijzer in humane liquor cerebrospinalis zich niet tot elkaar verhouden zoals dat in plasma het geval is. IJzer is in liquor in overmaat aanwezig wanneer we alleen naar transferrine kijken. Afgezien van het feit dat deze vondst ons verraste leek het ons zinvol na te gaan of ijzer dan door andere liquoreiwitten gebonden zou worden. Wij besloten dit na te gaan aan de hand van een liquormonster dat ijzervrij gemaakt was door dialyse tegen EDTA (zie hoofdstuk II) en geconcentreerd was tot ca. 1/20 van zijn oorspronkelijke volume d. m. v. vacuumdialyse. Dit monster werd in twee delen gesplitst. Het ene monster werd gedeeltelijk verzadigd met  $^{59}\text{Fe}$  +  $^{56}\text{Fe}$ , het andere werd "oververzadigd". Uit de ijzeranalyse van de gemerkte ferrichloride-oplossing en de analyse van transferrine van het liquormonster bleek dat het eerste monster voor 45% verzadigd was en in het tweede monster de hoeveelheid ijzer een viervoud was van de hoeveelheid die transferrine zou kunnen binden. Vervolgens werden beide monsters aan electroforese op cellulose-acetaat onderworpen bij pH= 8,6. Dit gebeurde in dezelfde electroforesebak in triplo. Eén electroferogram werd gefixeerd en gekleurd ten einde de plaats van de eiwitfracties te kunnen lokaliseren. Van de beide andere, die alleen gedroogd waren, werd er één in stukjes van 2mm geknipt en één op een röntgenfilm gelegd gedurende een week (69). De activiteit van de stukjes werd gemeten in een  $\gamma$  - teller, het resultaat hiervan is te zien in tabel IV-6

Dit resultaat werd ondersteund door de beelden op de röntgenfilms. Met deze techniek waren, behalve een diffuse zwarting, duidelijk 4 bandjes aan te tonen bij het oververzadigde monster en 1 bij het onverzadigde. In figuur IV-1 is het resultaat van het een en ander weergegeven.

Op geleide van de filmstrook werd het electroferogram in stukjes geknipt waarna deze stukjes in een  $\gamma$  - teller gemeten werden. De nummering van de stukjes is eveneens in figuur IV-1 weergegeven. Het resultaat van de tellingen is te zien in tabel IV-7.

TABEL IV-6.

De verdeling van  $^{59}\text{Fe}$  over het liquorelectroferogram. Monster I = 45 % - verzadiging, monster II = oververzadiging. Weegegeven is het aantal tellen per 20 minuten. Blanco = 2500.

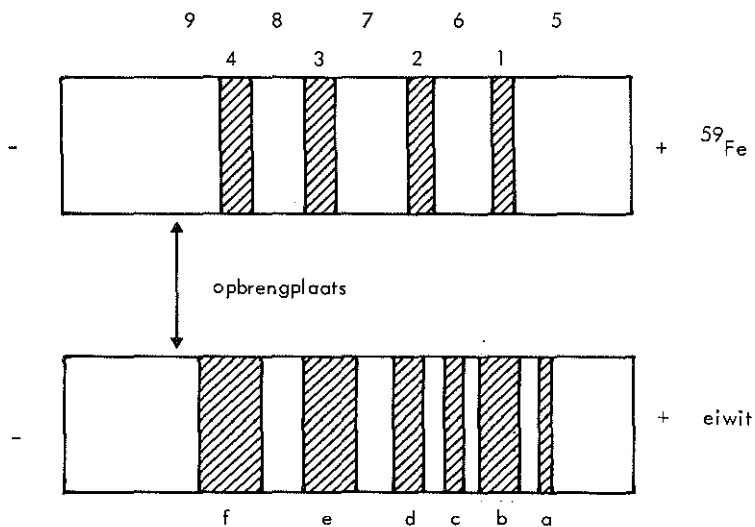
<u>Volgnr.</u>	<u>Monster I</u>	<u>Monster II</u>	<u>Volgnr.</u>	<u>Monster I</u>	<u>Monster II</u>
1	2468	2469	17	2537	4653
2	2467	2500	18	2552	4423
3	2387	2381	19	2426	4359
4	2532	2553	20	2521	4573
5	2786	3287	21	2519	4465
6	2893	6985	22	2495	3849
7	2594	10648	23	2403	4318
8	2503	8544	24	2475	3726
9	2525	6589	25	2470	3909
10	2391	6377	26	2524	3706
11	3327	8655	27	2444	3941
12	5965	9201	28	2621	3648
13	3723	5570	29	2492	3583
14	2570	5137	30	2663	3752
15	2568	5531	31	2476	4086
16	2655	5222	32	2507	4256

Opbrengplaat = 6-7

Transferrine = 12

Albumine = 20

Breedte strips = 2 mm



FIGUUR IV - 1

Het resultaat van de rontgenfoto van het liquorelectroferogram. Voor de betekenis van de cijfers zie tekst.

Gekleurd liquorelectroferogram:

- a = pre-albumine
- b = albumine
- c =  $\alpha_1$  - globuline
- d =  $\alpha_2$  - globuline
- e =  $\beta$  - globuline
- f =  $\gamma$  - globuline

TABEL IV-7.

De meting van enkele gedeelten van het electroferogram van liquor behandeld met  $^{59}\text{Fe}$ . Voor de betekenis van de nummers zie figuur IV-1.

<u>Nummer</u>	<u>Resultaat</u>
1	1075
2	1030
3	2626
4	1881
5	1831
6	1006
7	950
8	722
9	2000

Nummer 3 = transferrine

Blanco afgetrokken



Bandje 1 bleek overeen te komen met albumine, bandje 2 met een  $\alpha_2$  - globuline, bandje 3 met transferrine en bandje 4 met een  $\gamma$  - globuline. Verder bevond zich veel activiteit rond de plaats waar pre-albumine zit. Deze zwarting was echter te diffuus om te concluderen dat ook pre-albumine ijzer kan binden.

Nemen we aan dat het transferrine bij dit experiment volledig verzadigd is dan zou op grond van de activiteitsmetingen gezegd kunnen worden dat de hoeveelheid eiwitgebonden ijzer een factor 2-3 hoger is dan de hoeveelheid transferrine-ijzer. Deze berekening is gebaseerd op de  $^{59}\text{Fe}$ -analyse van de 4 genoemde bandjes, terwijl de diffuse zwarting buiten beschouwing is gelaten.

Als controle op bovengenoemde experimenten diende de elektroforese van een liquormonster dat niet ijzervrij gemaakt was. Hiervoor werd gebruik gemaakt van hetzelfde liquormonster. Het was echter alleen geconcentreerd tot ca. 1/20 van zijn oorspronkelijke volume. Na het concentreren werd het monster op dezelfde manier behandeld als het ijzervrije monster dat oververzadigd was met ijzer. Het mengsel werd een week bij  $4^{\circ}\text{C}$  bewaard waarna ge-elektroforeerd werd op cellulose-acetaat. Ook hierna werd, na droging, de strook in stukjes van 2 mm geknipt. Na telling van de stukjes in de teller bleek dat de eiwitfracties geen enkele radio-activiteit vertoonden. Er werd alleen activiteit gevonden op de opbrengplaats en ervoor. Deze uitkomsten suggereren dat het liquormonster reeds verzadigd was met ijzer, iets wat in overeenstemming is met de uitkomsten van de ijzer en transferrine-analyses.

#### 4. ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE OVERGANG VAN IJZER VAN- UIT DE BLOEDBAAN NAAR HET LIQUORCOMPARTIMENT EN OMGE- KEERD.

Uit het voorgaande blijkt dat ijzer aanwezig is in liquor cerebrospinalis. In deze stemmen onze gegevens dus overeen met die uit de literatuur. Wij vroegen ons af hoe het ijzer in de liquorbaan komt. Er zijn in onze ogen drie mogelijkheden:

- a. overgang vanuit de bloedbaan
- b. afgifte door het hersenweefsel
- c. een combinatie van a en b

Wij besloten dit bij het konijn te onderzoeken. Begonnen werd met het inbrengen van  $^{59}\text{Fe}$  in de bloedbaan. Dit gebeurde d. m. v. injectie van opgeladen serum, waarin dus het gemerkte ijzer aan transferrine gebonden wordt, in een oorvene. De techniek van het opladen van serum is dezelfde als die welke voor de expe-

rimenten met ratten (hoofdstuk III) gebruikt is. De beschrijving ervan is te vinden in hoofdstuk II; per konijn werd  $5 \mu\text{C}^{59}\text{Fe}$  in een volume van 1 ml serum ingebracht. Liquor cerebrospinalis werd gepuncteerd op de al eerder beschreven wijze. Dit gebeurde op drie verschillende tijdstippen: 6 uur, 5 dagen en 14 dagen na injectie van het gemerkte ijzer. In tabel IV-8a zijn de resultaten van dit experiment weergegeven.

TABEL IV-8a

Meting van de radio-activiteit in liquor en bloed na intraveneuze toediening van  $^{59}\text{Fe}$ . Weergegeven is het aantal tellen per 2 minuten per ml. De blanco bedroeg 350 tellen /2 minuten (reeds afgetrokken).

	<u>Konijn</u>	<u>Liquor</u>	<u>Bloed</u>
na 6 uur	I	0	2648
	II	105*	3116
	III	0	3860
	IV	0	3675
na 5 dagen	I	0	29456
	II	0	28882
na 14 dagen	I	0	
	II	0	

\*monster gecontamineerd met bloed.

Wanneer men de resultaten bekijkt dan ziet men, de eerste liquorpunctie bij konijn II waarbij contaminatie met bloed optrad uitgezonderd, dat in geen van de gevallen radio-activiteit in de liquor aangetoond kon worden. Het experiment werd daarom op uitgebreider schaal herhaald. Er werd meer  $^{59}\text{Fe}$  ingespoten ( $15 \mu\text{C}$  per konijn) en er werd eerder liquor gepuncteerd (na 6, 24 en 48 uur). De resultaten van deze experimenten zijn te vinden in tabel IV-8b. De resultaten van tabel IV-8b komen overeen met die van tabel IV-8a. Er werd geen radio-activiteit in de liquor gevonden. Dit zou twee oorzaken kunnen hebben.

TABEL IV-8b

Meting van de radio-activiteit in liquor en bloed na intraveneuze toediening van  $^{59}\text{Fe}$  ( $15 \mu\text{C}$  per konijn). Weergegeven is het aantal tellen per 2 minuten minus blanco. (bloed 1 ml, plasma 0,5 ml en liquor 0,3 ml).

<u>Tijdstip</u>	<u>Konijn</u>	<u>Liquor</u>	<u>Bloed</u>	<u>Plasma</u>
na 6 uur	I	0	3229	2541
	II	0	13659	9149
	III	0	11111	11421
	IV	0	14070	9580
	V	0	16620	12927
	VI	0	12993	8763
na 24 uur	I		2454	609
	II		6294	464
	III	0	5065	362
	IV	0	7560	283
	V	0	6528	415
	VI	0	5367	368
na 48 uur	I	0	6747	101
	II	0	16316	278
	III	0	14080	0
	IV	0	17254	234
	V	0	13663	205
	VI	0	10355	191

- a. het ijzer komt niet vanuit de bloedbaan in de liquorbaan terecht.
- b. de penetratiesnelheid waarmee het ijzer vanuit de bloedbaan in de liquorbaan komt is dermate laag dat de aanwezige radio-activiteit te gering is om voor meting toegankelijk te zijn, althans in het hier beschreven experiment.

Het leek ons van belang teneinde een beter inzicht te verkrijgen ook de omgekeerde weg te bestuderen namelijk de overgang van  $^{59}\text{Fe}$  vanuit de liquorbaan naar de bloedbaan. In eerste instantie werd besloten  $10 \mu\text{C}$   $^{59}\text{Fe}$  in 1 ml te injecteren in de liquorbaan. Deze hoeveelheid radio-activiteit en daarmee

ook de hoeveelheid "carrier" ijzer was aan de hoge kant. Voor deze grote dosis diende gekozen te worden omdat in geval van overgang van het radio-actieve ijzer uit het liquorcompartiment naar de bloedbaan een grote verdunning optreedt. Bovendien zullen diverse organen het ijzer uit de bloedbaan wegvangen, zodat de spiegel snel zal dalen.

De ijzeroplossing (Fe was 2-waardig) werd bereid volgens een voorschrift dat in hoofdstuk II beschreven is. Eerst werd ongeveer 1 ml liquor cerebros spinalis opgevangen waarna de steriele radio-actieve oplossing (1 ml) door dezelfde lumbaalnaald teruggespoten werd. Vervolgens werd op verschillende tijdstippen bloed geprikt waarvan de radio-activiteit gemeten werd. In tabel IV-9 zijn de resultaten van deze metingen weergegeven.

TABEL IV-9

Meting van de radio-activiteit in bloed na intracisternale toediening van  $^{59}\text{Fe}$ . Weergegeven is het aantal tellen per 2 minuten per ml (blanco reeds afgetrokken).

<u>Tijdstip</u>	<u>Konijn</u>	<u>Resultaat</u>
na 1 uur	I	2296
	II	1118
	III	1312
	IV	1482
na 1 dag	I	2945
	II	1530
	III	1579
	IV	1960
na 5 dagen	I	5096
	II	2920
	III	2808
	IV	4782

Duidelijk is te zien dat de radio-activiteit in bloed stijgt. De laatste metingen werden gedaan op de 7e en de 11e dag van het experiment. Hierbij werd het

bloed gescheiden in erythrocyten en plasma. Na meting van beide delen bleek dat de radio-activiteit nagenoeg geheel in de erythrocyten zat. Op de 5e dag van het experiment werd nog eens liquor cerebrospinalis gepuncteerd. Ook hiervan werd de radio-activiteit gemeten. Deze bedroeg voor konijn I 210 tellen/2 min/ml en voor konijn II 840 tellen/2 min/ml. Bedenkt men dat 850.000 tellen/2 min in de liquor geïntroduceerd was, dan is duidelijk dat het ijzer snel de liquorbaan verlaat.

Het leek van betekenis na te gaan of ijzer gebonden aan transferrine eenzelfde hoge verdwijningssnelheid zou vertonen. In eerste instantie werd een hoeveelheid van 400 µg transferrine ingebracht. De hoeveelheid <sup>59</sup>Fe bedroeg 1 µC. Ook hier werd na de punctie 1 ml liquor cerebrospinalis opgevangen, waarna de gesteriliseerde transferrine-oplossing, eveneens 1 ml,

TABEL IV-10

Meting van de radio-activiteit in bloed na intracisternale en intraveneuze injectie van <sup>59</sup>Fe-transferrine. Weergegeven is het aantal tellen per 20 minuten per ml. Blanco = 1400 tellen per 20 minuten (reeds afgetrokken).

<u>Tijd</u>	<u>Konijn</u>	<u>Intracisternaal</u>	<u>Intraveneus</u>
na 1 uur	I	196	
	II	36	
	III		2698
	IV		1854
na 4 uur	I	642	
	II	329	
	III		1370
	IV		894
na 24 uur	I	227	
	II	187	
	III		180
	IV		152

door dezelfde naald teruggespoten werd. Bij twee andere konijnen werd dezelfde oplossing intraveneus ingebracht. Dit gaf ons de mogelijkheid het eventueel uit het liquor-compartiment komende ijzer in de bloedbaan te volgen en te vergelijken met het direct in de bloedbaan ingebrachte ijzer. In tabel IV-10 is het resultaat te zien van de metingen van het bloed dat op drie verschillende tijdstippen gepuncteerd werd.

Uit tabel IV-10 blijkt dat het ijzer snel uit het liquorcompartiment verdwijnt. Wanneer het ijzer in de bloedbaan is terechtgekomen wordt het kennelijk in eerste instantie opgenomen in de bloedvormende organen. De verdwijningscurve is namelijk vergelijkbaar met figuur III-1. Uit het feit dat de activiteit in de bloedbaan van de intracisternaal ingespoten konijnen na 24 uur verhoudingsgewijs veel hoger is dan na 4 uur bij vergelijking met de intraveneus ingespoten konijnen blijkt dat ook na 24 uur nog ijzer het liquorcompartiment verlaat. Daarom werd in een volgend experiment de tijdsduur verlengd. Bovendien werd de hoeveelheid opgeladen transferrine teruggebracht tot 100 µg. Dit werd gedaan om de fysiologische omstandigheden in het liquorcompartiment nog dichter te benaderen. De resultaten zijn weergegeven in tabel IV-11a.

TABEL IV-11a

Meting van de radio-activiteit in bloed en in liquor na intracisternale injectie van  $^{59}\text{Fe}$ -transferrine. Weergegeven is het aantal tellen per 20 minuten per ml minus blanco.

	<u>Tijd</u>	<u>Konijn I</u>	<u>Konijn II</u>
Bloed	na 1 dag	574	704
	na 3 dagen	1126	1324
	na 4 dagen	1178	1420
	na 5 dagen	1061	1217
	na 7 dagen	1218	1380
Liquor	na 7 dagen	161	300
	na 12 dagen	0	0

Ingespoten 556.000 tellingen per 20 minuten.

Het experiment werd herhaald waarbij eveneens het plasmacompartiment gevolgd werd (tabel IV-11b).

TABEL IV-11b

Meting van de radio-activiteit in bloed en liquor na intracisternale injectie van  $^{59}\text{Fe}$ -transferrine. Weergegeven is het aantal tellen per 20 minuten minus de blanco (bloed 1 ml, plasma 0,5 ml en liquor 0,3 ml).

<u>Tijd</u>	<u>Konijn</u>	<u>Bloed</u>	<u>Plasma</u>	<u>Liquor</u>
na 6 uur	I	278	219	
	II	524	422	
	III	524	431	
	IV	540	238	
na 24 uur	I	537	44	
	II	317	45	
	III	370	33	
	IV	235	17	
na 48 uur	I	756	78	0
	II	383	0	0
	III	595	0	0
	IV	473	0	0

Tabel IV-11 bevestigt de conclusie die uit tabel IV-10 getrokken werd. Kennelijk is na enkele dagen alle activiteit overgegaan naar de bloedbaan.

Wanneer men tabel IV-9 en tabel IV-11 met elkaar vergelijkt dan is duidelijk dat het nauwelijks verschil maakt in welke vorm het ijzer in de liquorbaan gebracht is, vrij of gebonden aan transferrine. In beide gevallen komt het ijzer al spoedig in de bloedbaan terecht. Ook leek het ons van belang te weten hoe transferrine zelf zich in deze gedraagt. Bij een volgend experiment brachten wij daarom met  $^{14}\text{C}$  gemerkt transferrine in de liquorbaan. De bijzonderheden omtrent deze stof zijn te vinden in hoofdstuk II. Er werd 400  $\mu\text{g}$  transferrine in een volume van 0,5 ml intracisternaal ingespoten. Het experiment werd in eerste instantie bij één konijn uitgevoerd. Ingespoten werd

600.00 tellen per 20 minuten. Er werd telkens 1 ml plasma, verdund met telvloeistof, gemeten. Na 24 uur bedroeg de radio-activiteit 290 tellen per 20 minuten, na 30 uur 620, na 48 uur 370 en na 72 uur 220. Tevens werd na 72 uur liquor gepuncteerd. De radio-activiteit hierin bedroeg 510 tellen per 20 minuten per ml. Hierna werd hetzelfde experiment bij vier konijnen gedaan. De resultaten zijn te vinden in tabel IV-12.

TABEL IV-12

Meting van de radio-activiteit in plasma en in liquor na intracisternale toediening van  $^{14}\text{C}$ -transferrine. Weergegeven is het aantal tellen per 20 minuten per ml minus de blanco. De getallen betreffende liquor staan tussen haakjes.

Tijd	Konijn				
	I	II	III	IV	
0 uur	90	0	50	30	
6 uur	460	680	660	870	
24 uur	650	620	500	870	
48 uur	†	350	360	520	
72 uur		290 (180)	270 (320)	400 (400)	
96 uur		200	†	280	
168 uur		300 (20)		90 (0)	

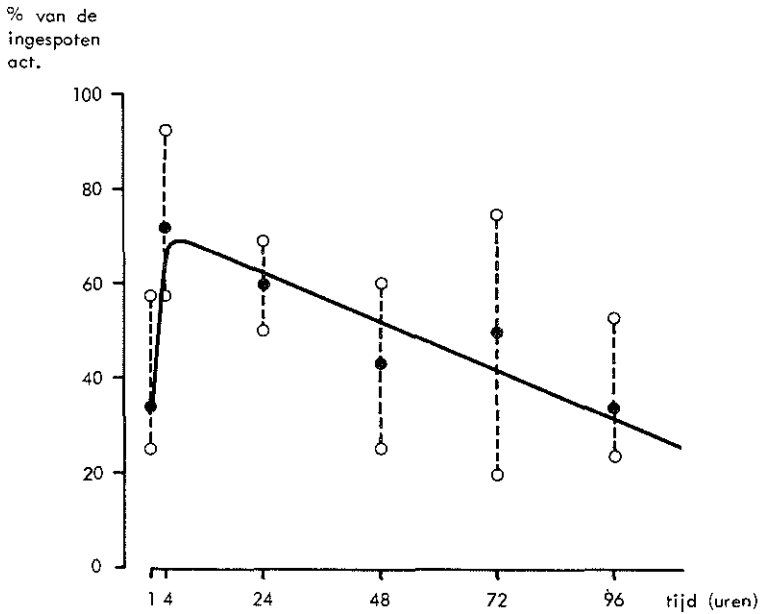
Hiernaast werd bij 2 konijnen dezelfde hoeveelheid gemerkt transferrine intraveneus ingespoten. Bij deze dieren werd eveneens op verschillende tijdstippen bloed geprikt. Na 4 uur bedroeg de gemeten radio-activiteit in 1 ml serum voor konijn I 1220 tellen per 20 minuten en voor konijn II 1140. Na 24 uur waren deze getallen respectievelijk 570 en 430. Na 6 dagen werd nog slechts 40 tellen boven de achtergrond gemeten (achtergrond = 740 tellen per 20 minuten).

Beziet men de resultaten vermeld in tabel IV-12 dan is duidelijk dat ook het transferrine in staat is om snel de liquorbaan te verlaten en over te gaan in de bloedbaan.

Tot slot stelden wij ons de vraag of het mogelijk was  $^{59}\text{Fe}$  in hersenweefsel aan te tonen nadat het intracisternaal ingebracht was. Wij besloten



dit bij een rat te onderzoeken. Er werd bij een aantal ratten 0,02 ml van een oplossing die  $^{59}\text{Fe}$  (11) bevatte geïnjecteerd. Na 1, 4, 24, 48, 72 en 96 uur werd bloed afgenomen. Vervolgens werden de dieren opgeofferd door spoelen met fysiologisch zout, waarna de hersenen geïsoleerd werden. Hierna werd de radio-activiteit gemeten van bloed, plasma en hersenen. De resultaten van de metingen zijn weergegeven in figuur IV-2 en in figuur V-3.



FIGUUR IV - 2  
Meting van de radio-activiteit in hersenweefsel na intracisternale injectie van  $^{59}\text{Fe}$ .

Herhaling van het experiment in duplo gaf een vergelijkbaar beeld: spreiding van het radio-actieve ijzer over het hele hersencompartiment en stijging van de radio-activiteit in het bloed.

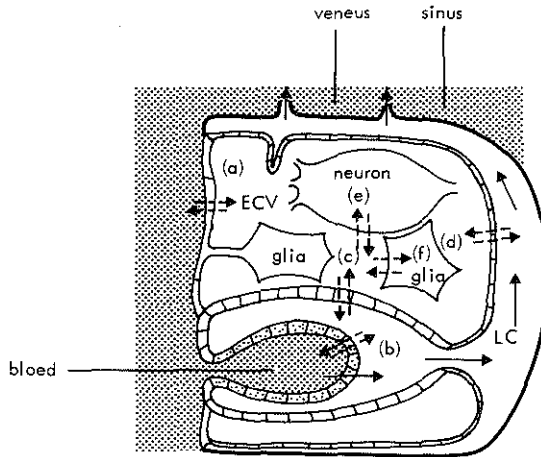
## HOOFDSTUK V

### DISCUSSIE

Een beschouwing over de overgang van stoffen uit de bloedbaan naar het hersenweefsel en omgekeerd brengt onvermijdelijk, naast een verhandeling over de bloed- hersenbarrière waarop reeds in de inleiding van dit proefschrift gewezen is, een bespreking over de extracellulaire ruimte van hersenweefsel met zich mede. De discussie betreffende het al of niet bestaan van een extracellulaire ruimte in hersenweefsel kwam op gang in de vijftiger jaren. Tot dan had men op grond van metingen van de natrium- en chlorideconcentraties van hersenweefsel aangenomen dat de extracellulaire ruimte 30-35% van het weefselvolume bedroeg. De eerste beelden echter die gemaakt werden met behulp van een electronenmicroscop, toonden ruimten die hooguit enkele procenten van het hersenvolume konden bedragen. Deze gegevens werden gesteund door de resultaten van metingen van de extracellulaire ruimte in hersenen waarbij gebruik gemaakt werd van stoffen als  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ ,  $^{14}\text{C}$ -sucrose en  $^{14}\text{C}$ -inuline ingebracht in de bloedbaan. Het resultaat hiervan was een ruimte van 2-6%. Beide uitkomsten strookten niet met de hoge natrium- en chloridegehalten. Men heeft gemeend dit dualisme op te kunnen lossen door aan te nemen, dat er speciale gliacellen bestonden die een hoog gehalte aan natrium en chloride hadden. Er bleven echter twijfels. Deze twijfels werden sterker toen electronenmicroscopisch onderzoek van recenter datum aantoonde dat de extracellulaire ruimte van conventionele omvang moest zijn (20-25%) (Van Harreveld). De eerder genoemde kleine extracellulaire ruimte zou een artefact zijn, het gevolg van onvoldoende voorzorgen bij het maken van preparaten van het hersenweefsel voor electronenmicroscopisch onderzoek. Door toepassing van bepaalde vriestechieken die uitgevoerd werden binnen 30 seconden nadat de bloedsomloop gestaakt was, werd een extracellulaire ruimte van ongeveer 20% gevonden. Werd de vriestijd verlengd tot 8 minuten dan werd als gevolg van een imbibitie van de gliacellen een

ruimte gevonden die qua grootte overeenkwam met vroegere bevindingen (70). Nieuwe berekeningen op grond van analyses van natrium en chloride waarbij in aanmerking genomen werd het bestaan van een Donnan-evenwicht tussen intra- en extracellulaire ruimte, leidden eveneens tot een extracellulaire ruimte van 20-25%.

Inmiddels had eveneens Davson een bijdrage geleverd ter oplossing van het probleem door te wijzen op de zogenaamde "sink action" van liquor cerebrospinalis (63). Hij bedoelde hiermee de verwijdering uit het liquorcompartiment van stoffen afkomstig uit de bloedbaan of uit de hersenen. De liquorbaan zou dus het karakter dragen van een lymfatisch systeem. Dit zou de verklaring zijn van het lage gehalte in liquor aan, via de bloedbaan ingebracht  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  en soortgelijke stoffen.



FIGUUR V-1

Schematische weergave van de vloeistofcompartimenten in het systeem bloed-hersenen-liquor.

Voor de betekenis van de pijlen en de letters zie tekst.

De achtergrond van de boven beschreven discussie was van fundamentele aard. De afwezigheid van een normale extracellulaire ruimte in de hersenen zou de verklaring van de bloed- hersenbarrière kunnen zijn. Het feit dat nu algemeen aanvaard wordt dat ook in hersenweefsel de extracellulaire ruimte 20% bedraagt, heeft echter aan deze eenvoudige verklaring van de bloed-hersenbarrière de grondslag ontnomen.

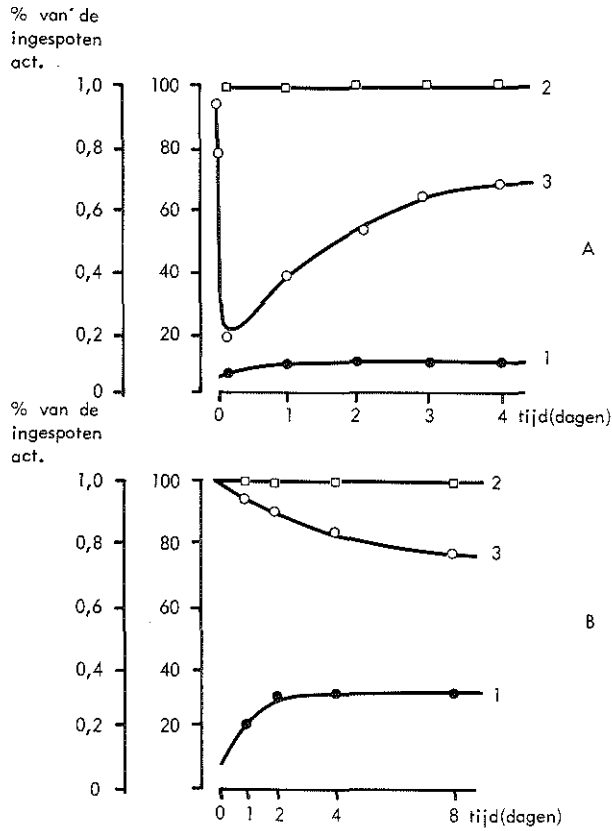
Stofuitwisseling in het systeem bloed- hersenen- liquor gebeurt op verschillende plaatsen. Figuur V-1 geeft hiervan in schematische vorm een goed overzicht. De ononderbroken pijlen geven de richting van een vloeistofstroom aan terwijl de onderbroken pijlen de overgang van water en opgeloste stoffen aangeven bij de verschillende compartimenten. Hierbij zijn zes mogelijkheden te onderscheiden:

- a. de overgang hersencapillairen- extracellulaire ruimte
- b. de overgang bloed- liquor aan de plexus chorioideus
- c. de overgang liquor-extracellulaire ruimte door het ependym
- d. de overgang door de pia mater
- e. de overgang door membraan van een neuron
- f. de overgang door membraan van een gliacel.

Ter inleiding van de discussie zullen in een kort overzicht de meest opvallende resultaten uit de hoofdstukken III en IV samengevat worden. Hierbij zal, waar nuttig, een parallel getrokken worden met de experimenten uitgevoerd met anorganisch fosfaat gemerkt met  $^{32}\text{P}$  (51, 68).

Overzicht.

1. IJzer in de vorm van  $^{59}\text{Fe}$  in de bloedbaan van ratten gebracht, is aantoonbaar in de hersenen (fig. V-2), niet in het liquorcompartment.



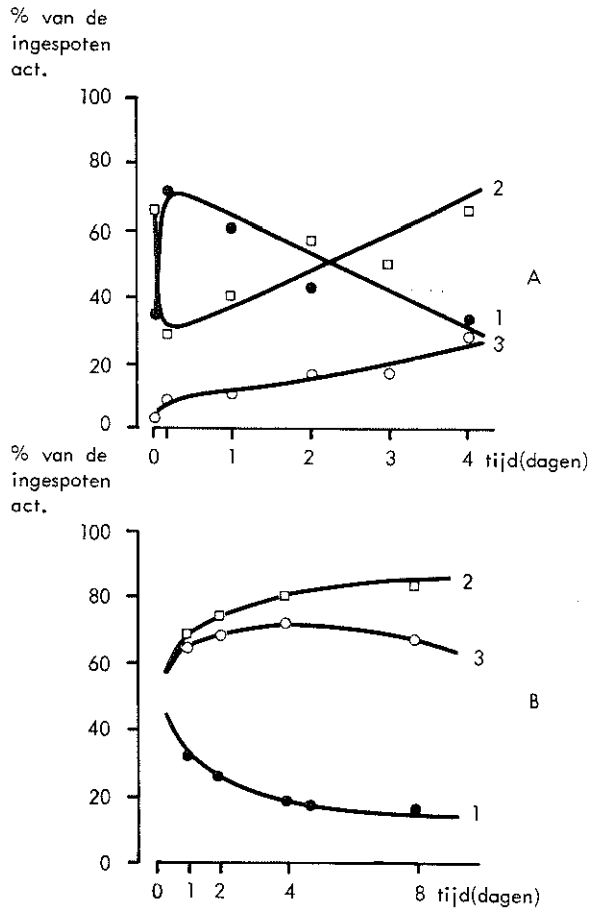
FIGUUR V - 2

De verdeling van ijzer ( $^{59}\text{Fe}$  = A) en anorganisch fosfaat ( $^{32}\text{P}$  = B) na intraveneuze (Fe) resp. intraperitoneale (P) introductie. Weergegeven is het percentage van de ingespoten dosis. Voor  $^{59}\text{Fe}$  golden de meettijden: 1/2, 1, 4, 24 uur enz. Curve 1 dient gelezen te worden op de linker absis, de curves 2 en 3 op de rechter.

- A. 1 - Hersenen  
 2 - Lichaam minus hersenen  
 3 - Bloed

- B. 1 - Hersenen  
 2 - Lichaam (minus hersenen) + excreta  
 3 - Lichaam minus hersenen

2. IJzer in het liquorcompartiment gebracht gaat snel over naar de bloedbaan (fig. V-3), evenals transferrine.



FIGUUR V - 3

De verdeling van ijzer ( $^{59}\text{Fe}$  = A) en anorganisch fosfaat ( $^{32}\text{P}$  = B) na intracisternale introductie. Weergegeven is het percentage van de ingespoten dosis.

A. 1 - Hersenen  
 2 - Lichaam minus hersenen  
 3 - Bloed

B. 1 - Hersenen  
 2 - Lichaam (minus hersenen) + excreta  
 3 - Lichaam minus hersenen

3. De gevonden Fe- en transferrineconcentraties in liquor cerebrospinalis zijn:

	mens	konijn
Fe	0,8 $\mu\text{mol/l}$	1,0 $\mu\text{mol/l}$
transferrine	17 mg/l=0,2 $\mu\text{mol/l}$	47 mg/l=0,5 $\mu\text{mol/l}$

4. De overgang van ijzer vanuit de bloedbaan naar de hersenen is te beïnvloeden door het aanbrengen van een anemie, niet door het overladen met ijzer:

	normaal	anemisch	overladen
<u>radio-activiteit hersenen</u>	$1,7 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-2}$
radio-activiteit 1 ml bloed			

In hoofdstuk I zijn een aantal onderzoeken beschreven betreffende het voorkomen van ijzer in hersenweefsel. Gezien het feit dat alle lichaamsstoffen aan een dynamisch evenwicht in het menselijk en dierlijk organisme deelnemen is het waarschijnlijk dat het element ijzer de bloedbaan moet kunnen verlaten en het hersenweefsel binnentreden en omgekeerd. Deze overgang zal, naar wij aannemen, plaats vinden binnen het raam van de mogelijkheden genoemd in figuur V-1. In hoofdstuk III toonden wij aan dat ijzer inderdaad in staat is de bloedbaan te verlaten en in het hersenweefsel binnen te dringen.

Zoals beschreven in de tabellen III-2 t/m III-4 en figuur III-1 doet de vorm waarin het ijzer aangeboden wordt weinig ter zake. Het is aannemelijk dat de overgang geschiedt vanuit het plasmacompartiment. Dit kon aan de hand van de specifieke activiteiten van het ijzer (tabel III-5) gevolgd worden. Onze onderzoeken dienaangaande strekten zich niet over een dusdanige tijd uit dat de specifieke activiteiten van het plasmacompartiment en het hersencompartiment gelijk werden. Ook na 4 weken was er nog een duidelijk verschil waarneembaar. Kennelijk wordt de in de hersenen aanwezige hoeveelheid ijzer maar zeer langzaam vernieuwd. Uit bovengenoemde onderzoeken is duidelijk geworden, dat ijzer in staat is de bloed- hersen-barrière te passeren, zij het in uiterst geringe mate. Waar het ijzer de bloedbaan verlaat is niet duidelijk. Studer (66) deed experimenten met konijnen die intraveneus een dosis ijzer (5 mg Fe/kg gedurende 14 dagen en 10 mg/kg gedurende 28 dagen) toegediend gekregen hadden. Hij kon met kleuringstechnieken geen extra ijzer aantonen in het hersenweefsel, dit in tegenstelling tot andere organen. Er was slechts één uitzondering de plexus chorioideus. Dit zou erop wijzen dat de overgang van ijzer vanuit de

bloedbaan via het liquorcompartiment zou geschieden.

Op het onderzoek vermeld in de tabellen III-2 t/m III-4 en figuur III-1 sluit dan ook aan het onderzoek vermeld in de tabellen IV-8 t/m IV-12. In tabel IV-8 werden weergegeven de metingen van de radio-activiteit van bloed, plasma en liquor cerebrospinalis op verschillende tijdstippen. Ondanks het feit dat de experimenten veelvoudig herhaald zijn kon nooit radio-activiteit in de liquor aangetoond worden. Dit zou twee oorzaken kunnen hebben : a) bij de overgang van bloed naar hersenen prevaleert de weg a (figuur V-1) of b) er vindt wel overgang van ijzer plaats bij de plexus chorioideus maar het wordt zo snel afgevoerd ("sink action") dat wij het in ons onderzoek niet konden aantonen. Hier pleit tegen dat de ingebrachte hoeveelheid radio-activiteit hoog was ( $\pm 200.000.000$  tellen/ 20 min). Stellen wij dat deze hoeveelheid in 100 ml plasma verdund werd dan is per ml plasma aanwezig 2.000.000 tellen per 20 minuten. Per minuut wordt bij het konijn 10,1  $\mu$ l liquor gevormd (65). Dit betekent in 24 uur ruim 10 milliliter. Toch is er in de liquor niets gemeten. Uiteraard beseffen wij dat de berekening zeer ruw is ook al gezien het feit dat een gedeelte van de radio-activiteit in de bloedvormende organen zal verdwijnen.

Dat ijzer snel uit het liquorcompartiment verdwijnt moge blijken uit de resultaten vermeld in de tabellen IV-9 t/m IV-12. Kort na de introductie is reeds radio-activiteit in het bloed aantoonbaar. De indruk bestaat dat ijzer en transferrine niet gelijktijdig uit het liquorcompartiment overgaan (tabel IV-11 en tabel IV-12). Een definitieve conclusie kan echter uit de beschreven experimenten niet getrokken worden.

Daarnaast echter wordt een gedeelte uit het liquorcompartiment opgenomen in het hersencompartiment zoals blijkt uit figuur IV-2. Dit resultaat komt overeen met het werk van Iwanowski en Olszewski (67) die ijzerpigmenten (hemoglobine en ijzerdextraan) in de subarachnoidale ruimte van honden brachten en een opname door het hersenweefsel constateerden. Bovendien is er een overeenkomst met het werk van Yamamoto (68) die direct in de hersenen van katten radio-actief ijzer bracht. Hij constateerde dat het ijzer zich voornamelijk ophoopte in de grensgebieden tussen de grijze en witte stof. Uitvoeriger werd door genoemde auteur de gang van fosfaat onderzocht na intraveneuze, cisternale en intracerebrale introductie van  $^{32}$ P. Hij kon de verspreiding onderverdelen in twee fasen namelijk een fysische waarin diffusie plaats vond en een biochemische waarin het fosfaat opgenomen werd in het hersenmetabolisme. Volgens Yamamoto diffundeert het anorganische fosfaat in het hersenweefsel vanuit de introductieplaats. Op 1 cm afstand van deze plaats vond hij een



maximum na 1 dag wanneer hij het percentage toegediend  $^{32}\text{P}$  per g weefsel uitzette tegen de tijd. Op 2 cm afstand was nauwelijks sprake van een maximum waar het anorganisch fosfaat betreft. Wel met betrekking tot het organisch fosfaat. Het maximum lag bij 12 dagen. Het ingebrachte fosfaat was dus opgenomen in het metabolisme van de hersenen (biochemische fase).

In ons laboratorium is de spreiding van anorganische fosfaat eveneens onderzocht (Ybema, persoonlijke mededeling). Na intracisternale introductie van anorganisch fosfaat gemerkt met  $^{32}\text{P}$  bij ratten bleek de specifieke activiteit in de grijze stof, de witte stof en de kleine hersenen snel te stijgen tot een maximum na ongeveer 60 minuten bereikt was. Hierna trad een geleidelijke daling in. Deze werd uitgesmeerd over dagen. Bakay voerde vergelijkbare experimenten bij konijnen uit. Hij vond een maximum na 35 minuten wanneer hij de specifieke activiteit van het fosfaat uitzette tegen de tijd. Een verklaring voor het verschil in diffusiesnelheid gemeten door Yamamoto enerzijds en Ybema en Bakay anderzijds is vooralsnog niet te geven.

Betreffende ijzer vonden wij een maximale radio-activiteit in het hersenweefsel ongeveer 4 uur na de introductie (intracisternaal) van het  $^{59}\text{Fe}$ . Wij nemen aan dat dit de diffusiefase betreft. Uit bovengenoemde onderzoekingen blijkt een actief metabolisme met betrekking tot ijzer. Dit betekent dat de in hersenweefsel voorkomende ijzerverbindingen ook afgebroken worden en afgevoerd worden naar de bloedbaan. Ook hier is de vraag naar de manier waarop dit transport zou plaats vinden interessant. Afbraak van hersencellen heeft tot gevolg dat de cellulaire bestanddelen in de extracellulaire ruimte terechtkomen. Deze ruimte staat in verbinding met de bloedbaan maar ook met het liquorcompartiment zoals blijkt uit figuur V-1. In dit licht gezien zijn de resultaten vermeld in de tabellen IV-3 en IV-4 opmerkelijk. Bij de mens is in de liquor meer ijzer aanwezig dan transferrine kan binden en bij het konijn is het transferrine ongeveer verzadigd. De waarde  $0,8 \mu\text{mol/l}$  voor de concentratie van ijzer in humane liquor cerebros spinalis is in overeenstemming met hetgeen Kofod hierover meedeelde (persoonlijke mededeling) en komt eveneens in de buurt van de waarde die Asenjo publiceerde. Het een en ander staat in schril contrast met de door Kjellin (12) gepubliceerde waarden ( $0,2 - 0,4 \mu\text{mol/l}$ ). Wij legden dit probleem door aan het Analytisch Chemisch Laboratorium van de Rijksuniversiteit te Utrecht. Agterdenbos, werkzaam aan dit laboratorium, kon onze bevindingen bevestigen.

Wij zijn op dit probleem in de discussie wat dieper ingegaan omdat de implicaties niet gering zijn. Bij een laag ijzergehalte zoals Kjellin vond, is

denkbaar dat het ijzer, misschien gebonden aan transferrine, afkomstig is uit de bloedbaan. Bij een hogere concentratie, zoals wij vonden, wordt deze gedachte onwaarschijnlijk, zeker gezien het feit dat wij geen radio-actief ijzer in het liquorcompartiment ter hoogte van de cisterna magna hebben kunnen aantonen. De gedachte dat het in het liquorcompartiment voorkomende ijzer afkomstig is uit hersenweefsel, dringt zich op. Het een en ander sluit zeker aan bij de ideeën die men over het liquorsysteem heeft ("sink action").

Er is op dit moment nog weinig bekend over de vormen waarin het ijzer voorkomt in hersenweefsel. Rafaelsen en Kofod (28) schrijven dat het heem gebonden ijzer slechts een kleine fractie van het totale ijzer in de hersenen bedraagt. Het was Diezel (27) die voor het eerst ferritine uit hersenweefsel isoleerde. Fiehring en Sundermann (31) en ook Hallgren en Sourander (42) noemen als mogelijke functie van ferritine het feit dat deze stof dient als opslagvorm ter dekking van de ijzerbehoefte van hersenweefsel. Zij stoelen deze opvatting, die redelijk lijkt, op de isolatie ervan. Zij hebben geen onderzoekingen gedaan die bewijzend zijn voor deze opvatting. Fiehring en Sundermann stellen dat, althans in menselijke hersenen, een aanzienlijk deel van het totale ijzer ferritine-ijzer is. Wij konden dit voor rattenhersenen niet bevestigen. Uit ons onderzoek bleek dat ferritine-ijzer slechts voor 10% bijdraagt aan het totale ijzer. Een indruk aangaande andere ijzerbestanddelen hebben wij niet. In de literatuur is hierover niets bekend. Wij konden radio-activiteit aantonen in de ferritinefractie na intraveneuze introductie van  $^{59}\text{Fe}$ . Dit zou erop kunnen wijzen dat ferritine ook in hersenweefsel een opslagfunctie heeft.

Opvallend is verder de verdeling in hersenweefsel over de subcellulaire fracties van intraveneus ingebracht  $^{59}\text{Fe}$ . De aanvankelijk hoge radio-activiteit in de mitochondriënfractie gaat geleidelijk over in de kernfractie evenals die van de supernatant. Ook na 4 weken blijkt hier nog geen evenwichtstoestand bereikt te zijn gezien het feit dat de specifieke activiteit voor de mitochondriënfractie het hoogst is.

De onderzoekingen die uitgevoerd zijn met ratten die in een pathologische toestand gebracht waren werpen een belangwekkend licht op de ijzerstofwisseling met betrekking tot de hersenen (tabel III-9 en tabel III-10). In geval van overlading met ijzer lijkt de overgang vanuit de bloedbaan niet beïnvloed te zijn. Kennelijk is het mechanisme dat wij bloed-hersen-barrière noemen dermate effectief dat van een overlading geen invloed uitgaat op de overgang van ijzer. In hoeverre de bloed-hersen-barrière in staat is om exorbitante hoeveelheden ijzer "tegen te houden" wordt duidelijk uit de onderzoekingen van Oberhauser

et al (72). Zij gaven 500 tot 2750 mg ijzer aan konijnen en schrijven:". . . . .  
it (total brain iron) was not found to be very different from normal; this  
suggested the existence of a blood-brain barrier to the iron dextran complex".  
In geval van een anemische toestand is duidelijk wel sprake van een verandering.  
Het lijkt hier zo dat de ijzerstofwisseling elders in het lichaam voorrang heeft  
boven het metabolisme in de hersenen. De overgang van ijzer wordt tenminste  
"op een laag pitje gezet".

## SAMENVATTING

Uit het literatuuronderzoek blijkt dat er op dit moment weinig bekend is met betrekking tot het ijzermetabolisme van de hersenen zowel bij de mens als bij dieren.

Het element ijzer komt in ieder geval voor in verbindingen waarvan heem een onderdeel vormt die, evenals elders in het lichaam, een rol spelen bij de celademhaling.

In dit proefschrift is een onderzoek beschreven naar een aantal aspecten van de stofwisseling van ijzer in de hersenen bij de rat en het konijn en voor zover mogelijk bij de mens. Terwijl bij de rat en het konijn het hersenweefsel, het bloed en de liquor cerebrospinalis bij het onderzoek konden worden betrokken, moest bij de mens volstaan worden met liquor cerebrospinalis.

Hoofdstuk I geeft een overzicht van de in de literatuur bekende gegevens betreffende het ijzer- en transferrinegehalte in liquor cerebrospinalis en het ijzergehalte van hersenweefsel bij de mens. Het gehalte aan ijzer in liquor, zoals door vele auteurs vermeld, blijkt zeer uiteen te lopen. Vergelijkt men het transferrinegehalte hiermee dan blijkt, op een uitzondering na, dat hogere waarden voor het ijzergehalte gevonden zijn dan in overeenstemming is met het transferrinegehalte.

Transferrine blijkt onder de liquoreiwitten een bijzondere plaats in te nemen. Bijzonder in die zin dat het gehalte in liquor in vergelijking met het totale eiwitgehalte hoger is dan in plasma. Bovendien blijken in liquor twee vormen van transferrine voor te komen. Men verklaart het een en ander door aan te nemen dat een gedeelte van het transferrine cerebrogeen van oorsprong is.

Aangaande het ijzer in hersenweefsel is nog weinig duidelijkheid. Men splitst de voorkomende ijzerverbindingen veelal in twee groepen: a) "fysiologisch" ijzer (cytochromen, ferritine) en b) "pathologisch" ijzer (hemoglobine,

hemosiderine). Er zijn vele uiteenlopende waarden betreffende het ijzergehalte gepubliceerd. Slechts over enkele punten bestaat een communis opinio: het ijzergehalte is verschillend op diverse plaatsen in de hersenen en het ijzergehalte neemt toe met de leeftijd. Het maximum zou omstreeks dertig jaar bereikt zijn. Betreffende het verband tussen de verhoogde en verlaagde ijzergehaltes, gevonden bij diverse neurologische aandoeningen, zijn weinig relevante gegevens bekend.

In Hoofdstuk II zijn de gebruikte methodieken en materialen beschreven. Het bleek nodig voor ons onderzoek een aantal nieuwe technieken uit te werken zoals het bepalen van ijzer in liquor cerebrospinalis bij mens en konijn. Het met  $^{59}\text{Fe}$  opladen van serum en het intraveneus inspuiten bij de rat gevolgd door opoffering door middel van verbloeding gevolgd door doorstroming met fysiologisch zout, een veel gebruikte proefopstelling, is uitvoerig beschreven.

Hoofdstuk III is gewijd aan de beschrijving van het onderzoek betreffende het hersenweefsel. Met de hierboven vermelde proefopstelling werd de overgang van ijzer vanuit de bloedbaan naar de hersenen bij intraveneuze introductie van verschillende vormen van ijzer bestudeerd. Het betrof: "anorganisch" (ijzer in tweewaardige respectievelijk driewaardige vorm) en "organisch" ijzer (ijzer gebonden aan transferrine of aan serum). Er blijkt geen verschil te bestaan met betrekking tot de onderzochte vorm. Uit het onderzoek blijkt verder dat het merendeel van de radio-activiteit die in de hersenen gemeten wordt, er in de eerste 24 uur in komt. Een plateau wordt echter pas bereikt na 2 tot 3 dagen. De specifieke activiteit van het plasma is op deze tijdstippen echter nog aanzienlijk hoger dan de specifieke activiteit van het hersencompartiment. Dit is zelfs nog het geval na 4 weken. Van de ingebrachte hoeveelheid  $^{59}\text{Fe}$  blijkt, op het moment dat het genoemde plateau bereikt is, slechts 0,1% in het hersenweefsel gepenetreerd te zijn.

Bij de bestudering van de verdeling van het  $^{59}\text{Fe}$  over diverse hersendelen blijkt het verloop hetzelfde beeld te vertonen als het verloop in het hersenweefsel als geheel. In de diverse onderdelen blijken duidelijk activiteitsverschillen te bestaan. Deze verschillen vallen echter weg wanneer wij de activiteiten omrekenen op specifieke activiteiten en zijn terug te voeren op de verschillen in ijzergehaltes.

Het onderzoek naar de verdeling van  $^{59}\text{Fe}$  over subcellulaire fracties leverde het gegeven op dat de activiteit in de kernfractie 50-60% bedroeg

terwijl de mitochondriënfractie en de supernatant een ongeveer gelijke radio-activiteit van 20% bezaten. De mitochondriën-fractie bleek de hoogste specifieke activiteit te bezitten.

Ten einde de literatuurgegevens betreffende het ferritine in hersenen na te gaan werd deze verbinding kwantitatief geïsoleerd. Omgerekend op ijzergehalte bleek ferritine voor 10% bij te dragen aan het totale ijzergehalte van hersenweefsel van de rat. Wij waren eveneens in staat aan te tonen, na toediening van met  $^{59}\text{Fe}$  opgeladen serum, dat de ferritinefractie metabool actief is doordat incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in ferritine optreedt.

Tot slot van het onderzoek aan hersenweefsel werd de overgang van ijzer vanuit de bloedbaan bij normale ratten vergeleken met die bij anemische dieren alsmede met die bij met ijzer overladen dieren. De overgang bij anemische ratten bleek duidelijk verminderd te zijn. Tussen de overige groepen daarentegen bestond geen verschil.

In hoofdstuk IV wordt het onderzoek aan liquor cerebrospinalis beschreven, te beginnen met de bepaling van ijzer en transferrine in liquor bij de mens en het konijn. Voor de mens is gevonden  $\text{Fe} = 0,8 \mu\text{mol/l}$  en transferrine =  $17 \text{ mg/l}$  (=  $0,2 \mu\text{mol/l}$ ) en voor het konijn  $\text{Fe} = 1,0 \mu\text{mol/l}$  en transferrine =  $47 \text{ mg/l}$  (=  $0,5 \mu\text{mol/l}$ ). De consequentie, een teveel aan ijzer met betrekking tot de bindingscapaciteit van transferrine, is voor humane liquor onderzocht. Het overschot aan ijzer blijkt aan andere eiwitten gebonden te kunnen worden bv. albumine,  $\alpha_2$ - en  $\gamma$ -globuline.

De vraag wordt gesteld of de overgang van het ijzer vanuit de bloedbaan naar de hersenen via het liquorcompartiment geschiedt. Dit is bij het konijn onderzocht d.m.v. toediening van  $^{59}\text{Fe}$  op dezelfde manier als dit bij ratten is geschied. In geen van de onderzochte gevallen kon  $^{59}\text{Fe}$  aangetoond worden in de liquor cerebrospinalis die gepuncteerd werd ter hoogte van de cisterna magna.

Introductie van  $^{59}\text{Fe}$ , zowel Fe (III)-chloride als Fe gebonden aan transferrine, in het liquorcompartiment, leidde tot een verschijning van  $^{59}\text{Fe}$  in het bloed. Reeds na enkele dagen bleek het gehalte aan  $^{59}\text{Fe}$  in de liquor tot nul te zijn teruggelopen. Een onderzoek met gemerkt transferrine ( $^{14}\text{C}$ ) dat in het liquorcompartiment gebracht was, leverde een vergelijkbaar resultaat op. Tot slot is het  $^{59}\text{Fe}$  gevolgd in het bloed en in de hersenen na intracisternale introductie ervan als Fe (III)-chloride. Het  $^{59}\text{Fe}$ -gehalte in bloed blijkt te stijgen. Na 4 dagen is 40%v van de toegediende dosis nog in de hersenen aanwezig terwijl in het bloed 30% gevonden is.

## SUMMARY

Even from recent literature little is known about the iron metabolism in brain. This statement applies to man and also to animals. The element iron is occurring in heme compounds which are very important in the respiratory chain.

In this thesis a description is given of the investigation on some aspects of the iron metabolism in brain of the rat and the rabbit and, where possible, in normal human subjects. In the rat and the rabbit brain tissue, blood and cerebrospinal fluid could be investigated and in man, for obvious reasons, only the spinal fluid.

Chapter I presents a survey of the literature on known data concerning the iron and transferrin content of spinal fluid and the iron content of brain tissue in man. Regarding the iron content in spinal fluid various values are found by different authors. If we compare the literature values for transferrin it is evident that the iron content is higher than can be calculated from the transferrin content at maximum saturation with iron. There is only one exception.

It is striking that cerebrospinal fluid has relatively a higher content of transferrin than the other plasma proteins with respect to these proteins in plasma. In addition, in spinal fluid transferrin is being found in two different forms: one with and one without sialic acid. These phenomena can be explained by assuming that transferrin is synthesized partly in the brain

It is convenient to divide the iron components in two groups: a) "physiological" iron (cytochromes, ferritin) and b) "pathological" iron (hemoglobin, hemosiderin). Many divergent values regarding the iron content have been published. Only a few facts are generally accepted: 1) there is a regional difference in brain in iron content and 2) the iron content increases with age

with a maximum at about 30 years. Very few data are available concerning the relationship between the high and low values which are found in a number of neurological diseases.

In chapter II a description is given of the methods and materials which have been used. For our work it was necessary to develop some new techniques like the determination of iron in spinal fluid of man and rabbit. The experimental technique which was used many times is extensively described. This consisted of the loading of serum with  $^{59}\text{Fe}$  and the intravenous injection in the rat followed by sacrifice by means of flushing with saline.

In chapter III we describe our studies on the determinations in brain tissue. A study was made of the transition of iron from the blood to the brain by means of intravenous introduction of  $^{59}\text{Fe}$ . Different forms of iron were studied namely "inorganic", Fe (II) and Fe (III), and "organic" iron, Fe bound to transferrin or serum. No differences in the results could be observed with respect to the iron components or iron valency state studied. From our studies it appears that the greater part of the radio activity given intravenously and measured in the brain, enters within 24 hours. However, a plateau is reached after two or three days. At this time the specific activity of plasma iron is considerably higher than the specific activity of the brain. This is also the case if we measure the specific activity in brain and blood 4 weeks after the injection of  $^{59}\text{Fe}$  in the blood. On the moment the plateau is reached, only 0,1% of the amount of  $^{59}\text{Fe}$  introduced has been penetrated in brain tissue,

With respect to the regional distribution of  $^{59}\text{Fe}$  in brain the same pattern can be seen as compared with total brain. It is apparent that distinct differences in activity exist in various parts. From the calculation of the specific activity it is clear that these differences are based on the differences in the iron content.

Determination of the distribution of  $^{59}\text{Fe}$  in subcellular parts resulted in an activity of 50 - 60% in the nuclei and about 20% in the mitochondria and about 20% in the supernatant, all with respect to the dose present in the brain. The highest specific activity was found in the mitochondria.

From the literature the occurrence of ferritin in brain is known. Therefore it was decided to confirm these data by isolating the ferritin. Calculated on iron content the contribution of ferritin to the total iron content of brain tissue of the rat is about 10%. We were also able to prove



that the ferritin fraction was metabolically active because of the fact that  $^{59}\text{Fe}$  from loaded serum was incorporated in the ferritin.

At the end of our studies on iron in brain tissue the transition of iron from blood to brain in normal rats was compared with these transitions in anemic animals and in animals overloaded with iron. The transition in anemic rats was considerably diminished. No difference was observed between the other groups.

In chapter IV a description is given of the investigations concerning the iron in cerebrospinal fluid. Initially the determination of iron and transferrin in man and rabbit is mentioned. For man we found a mean value of  $0,8 \mu\text{mol/l}$  for Fe and of  $17 \text{ mg/l}$  ( $= 0,2 \mu\text{mol/l}$ ) for transferrin and for the rabbit  $1,0 \mu\text{mol/l}$  for Fe and  $47 \text{ mg/l}$  ( $= 0,5 \mu\text{mol/l}$ ) for transferrin. As a consequence the surplus of iron with respect to the binding capacity of transferrin, has been investigated in human spinal fluid. It appeared that the surplus of iron could be bound to other proteins e.g. albumin,  $\alpha_2$ - and  $\gamma$ - globulin.

The question arises as to whether or not the transition of iron from blood to brain takes place via the spinal fluid compartment. This has been investigated in rabbits by means of injection of  $^{59}\text{Fe}$  in the same way as has been done in rats. No transition could be observed in all cases investigated. The spinal fluid was punctured from the cisterna magna.

Injection of  $^{59}\text{Fe}$ , Fe (III) chloride as well as Fe bound to transferrin, in the CSF compartment led to appearance of  $^{59}\text{Fe}$  in blood. Within a few days the  $^{59}\text{Fe}$  content was zero in the spinal fluid. Investigations with  $^{14}\text{C}$  labelled transferrin which was injected in the CSF compartment produced comparable results. Finally  $^{59}\text{Fe}$  has been followed in blood and brain after intracisternal introduction as Fe (III) chloride. The  $^{59}\text{Fe}$  content appeared to rise in blood. After four days 40% of the injected amount still proved to be in the brain. In blood 30% was found.

## LITERATUURLIJST

1. H. Mc ILWAIN and H. S. BACHELARD. *Biochemistry and the Central Nervous System*, Churchill Ltd. Edinburgh, (1971).
2. N. SEILER. *Der Stoffwechsl im Zentralnervensystem*, Georg Thieme, Stuttgart, (1966).
3. J. ARIËNS KAPPERS. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.* 98, 3569 (1954).
4. L. HERLIN. *Acta Physiol. Scand.* 37, Suppl. 127 (1956).
5. J. DOBBING. *Applied Neurochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 317 (1968).
6. G. A. DHOPESHWARKAR and S. R. BAWA. *J. Scient. Ind. Res.* 30, 22 (1971).
7. B. E. A. GLASER. *Dissertatie Medische Faculteit Rotterdam*, (1970).
8. P. TAVENIER. *Dissertatie Medische Faculteit Rotterdam*, (1971).
9. B. K. van KREEL. *Dissertatie Medische Faculteit Rotterdam*, (1972).
10. M. POLLYCOVE. *Iron Metabolisme*, Ciba Symposium, (1963).
11. W. MESTREZAT. *Le liquido céphalo-rachidien normal et pathologique*, Maloine, Paris, (1912).
12. K. G. KJELLIN. *J. Neurochem.* 13, 413 (1966).
13. C. M. PLUM and T. FOG. *Acta Psychiat. Scand.* Suppl. 128, 34, 29 (1959).
14. K. G. KJELLIN. *Acta Neurol. Scand.* 43, 299 (1967).
15. H. E. SCHULZE and J. F. HEREMANS. *Molecular Biology of Human Proteins*, vol I, Elsevier, Amsterdam, 732 (1967).
16. F. D. ROSENTHAL and J. F. SOOTHILL. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 25, 177 (1962).
17. E. FRICK. *Klin. Wochenschr.* 41, 75 (1963).
18. E. FRICK und L. SCHEID - SEYDEL. *Klin. Wochenschr.* 41, 589 (1963).
19. E. FRICK und L. SCHEID - SEYDEL. *Klin. Wochenschr.* 38, 1240 (1960).
20. E. FRICK und L. SCHEID - SEYDEL. *Klin. Wochenschr.* 36, 66 (1958).
21. E. FRICK und L. SCHEID - SEYDEL. *Klin. Wochenschr.* 36, 857 (1958).
22. J. CLAUSEN and T. MUNKNER. *Nature*, 189, 60 (1961).
23. D. PETTE und I. STUPP. *Klin. Wochenschr.* 38, 109 (1960).
24. W. C. PARKER and A. G. BEARN. *J. Exp. Med.* 115, 84 (1962).
25. W. C. PARKER, J. W. C. HAGSTROM and A. G. BEARN. *J. Exp. Med.* 118, 975 (1963).
26. H. SPATZ. *Z. Neurol.* 77, 261 (1922).
27. P. B. DIEZEL. *Biochemistry of the Developing Nervous System. Proc. First Intern. Neurochem. Symposium*, Oxford, 145, Academic Press, New York (1955).
28. O. J. RAFAELSEN and B. KOFOD. *Handbook of Neurochemistry*, vol I, Plenum Press, New York, 261 (1969).
29. R. L. FRIEDE. *Topographic Brain Chemistry*, Academic Press, New York (1966).
30. A. SUNDERMANN and G. KEMPF. *Ztschr. Alternforsch.* 15, 97 (1961).
31. H. FIEHRING and A. SUNDERMANN. *Ztschr. Inn. Med.* 14, 787 (1959).
32. W. VOLLAND und W. PRIBILLA. *Klin. Wochenschr.* 33, 145 (1955).
33. B. KOFOD. *Eur. J. Pharmacol.* 13, 40 (1970).
34. O. WUTH. *Zentr. Ges. Neurol. Psychiat.* 84, 474 (1923).
35. M. WOLLEMAN. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 1, 127 (1951).
36. H. BERTHA, A. MUSIL, W. HAAS und O. WAWRSCHINEK. *Monatsh. Chem.* 93, 536 (1962).

37. A. MUSIL, H. LECHNER, O. WAWRSCHINEK, W. BEYER, H. WIELINGER und H.H. TAGGER. *Montsh. Chem.* 95, 1013 (1964).
38. J.N. CUMINGS. *J. Clin. Path.* 21, 1 (1968).
39. R. C. HANIG and M.H. APRISON. *Anal. Biochem.* 21, 169 (1967).
40. W.W. HARRISON, M. G. NETSKY and M.D. BROWN. *Clin. Chim. Acta*, 21, 55 (1968).
41. E.T. BACKER. *Clin. Chim. Acta*, 24, 233 (1969).
42. B. HALLGREN and P. SOURANDER. *J. Neurochem.* 3, 41 (1958).
43. A. VÖIKL und G. ULE. *Zschr. Neurol.* 202, 331 (1972).
44. G. STRASSMANN. *Arch. Path.* 47, 205 (1949).
45. J. CAMMERMEYER. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 6, 111 (1947).
46. M.A. NEUMANN. A.M.A. *Arch. Neurol. Psych.* 76, 355 (1956).
47. J.H. SHELDON. *Quart. J. Med.* 21, 123 (1927).
48. J.N. CUMINGS, *Brain*, 71, 410 (1948).
49. A. LÖWENTHAL. *Acta Neurol. Psych. Belg.* 59, 1161, 1227 (1959).
50. H. G. van EIJK and B. LEIJNSE. *Biochim. Biophys. Acta*, 160, 126 (1968).
51. H.J. YBEMA. *Dissertatie Universiteit van Amsterdam*, (1961).
52. G. G. D. BLOKHUIS. *Dissertatie Universiteit van Leiden*, (1970).
53. W. G. ZIJLSTRA and E. J. van KAMPEN. *Clin. Chim. Acta*, 5, 719 (1960).
54. G. MANCINI, A. O. CARBONARA and J. F. HEREMANS. *Immunochemistry*, 2, 235 (1965).
55. B. G. BLIJENBERG, H. G. van EIJK and B. LEIJNSE. *Clin. Chim. Acta*, 31, 277 (1971).
56. H. G. van EIJK, J. P. van DIJK, W. L. van NOORT, B. LEIJNSE and C. H. MONTFOORT. *Scand. J. Haemat.* 9, 267 (1972).
57. M. W. KALFF, *Clin. Biochem.* 3, 91 (104). (1970).
58. W. F. LINE, D. GROHLICH and A. BEZKOROVAINY, *Biochemistry*, 6, 3393 (1967).
59. W. M. N. RAMSAY. *Clin. Chim. Acta*, 2, 221 (1957).
60. S. A. de LANGE. *Dissertatie Universiteit van Amsterdam*, (1965).
61. R. M. SCHMIDT, *Der Liquor cerebrospinalis*, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1968).
62. R. A. WELSUM. *Dissertatie Universiteit van Amsterdam*, (1970).
63. H. DAVSON. *Physiology of the Cerebrospinal Fluid*, Churchill Ltd. London, (1967).
64. N. W. PAPAIOPOULOS. *Clin. Chem.* 5, 569 (1959).
65. G. H. BOURNE. *The Structure and Function of Nervous Tissue*, vol IV, Academic Press, New York, 323 (1972).
66. F. STUDER. *Helvet. Med. Acta*, 15, 252 (1948).
67. L. IWANOWSKI, J. OLSZEWSKI. *J. Neuropath. Exp. Neur.* 19, 433 (1960).
68. T. YAMAMOTO. *J. Neuropath. Exp. Neur.* 18, 418 (1959).
69. C. van der HEUL, H. G. van EIJK, W. F. WILTINK and B. LEIJNSE. *Clin. Chim. Acta*, 38, 347 (1972).
70. A. van HARREVELD, *Brain Tissue Electrolytes*, Butterworths Inc. London, (1966).
71. A. ASENJO. *John Hopkins Med. J.* 122, 284 (1968).
72. E. OBERHAUSER, V. WEINSTEIN and A. ASENJO. *J. Neurosurg.* 32, 677 (1970).

## NASCHRIFT

Bij de voltooiing van dit proefschrift grijp ik gaarne de gelegenheid aan om een ieder die aan het tot stand komen ervan heeft meegewerkt mijn dank te betuigen.

Hooggeleerde Leijnse, hooggeachte promotor. U dank ik voor de prettige manier waarop U aan dit onderzoek leiding hebt gegeven. Uw interesse in het onderwerp en Uw kritiek tijdens de voortgang van het onderzoek hebben mij althit ten zeerste gestimuleerd. Ik ben U eveneens erkentelijk voor de gelegenheid die U mij gegeven hebt om, naast mijn werk op het Centraal Klinisch-Chemisch Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt, een dissertatie te bewerken.

Zeergeleerde van Eijk. U ben ik grote dank verschuldigd voor de vele waardevolle discussies die ik met U aangaande dit onderzoek mocht hebben en voor de medewerking die ik van U mocht ontvangen. Tevens dank ik U voor de nauwgezette wijze waarop U als coreferent het proefschrift hebt willen beoordelen.

Hooggeleerde Soons. U ben ik zeer erkentelijk voor het feit dat U zich als coreferent in dit onderzoek hebt willen verdiepen en vervolgens het manuscript van commentaar hebt willen voorzien.

Een aantal mensen zeg ik hartelijk dank voor hun bijdrage aan het experimenteel gedeelte van dit onderzoek. In de eerste plaats geldt deze dank Mevr. A. van Zijl-Arts en de Heer C. E. Raaymakers. Daarnaast heb ik zeer op prijs gesteld de medewerking van Mej. A. M. C. M. Pijnenburg en de Heren P. Bruinzeel en W. L. van Noort.

Bij een aantal dierexperimenten heb ik steun ontvangen van de Heer P. Backhuys waarvoor mijn dank.

Het typewerk van het manuscript werd op vlotte wijze verricht door Mej. E. C. M. Bakker waarvoor ik haar zeer erkentelijk ben.

Dank ben ik evenzeer verschuldigd aan de Audiovisuele Dienst voor het verzorgen van de figuren.

Tot slot, last but not least, dank ik mijn vrouw, voor het aanbrengen van de nodige correcties zowel materieel, in de vorm van het doorlezen van het manuscript, als geestelijk gedurende de voorbereiding ervan; bij dit laatste veelal op luidruchtige wijze gesteund door onze kinderen.

## CURRICULUM VITAE

In 1958 werd door mij in Hilversum het examen h. b. s. - B afgelegd.

In datzelfde jaar heb ik mij laten inschrijven aan de Rijks Universiteit te Utrecht met het doel scheikunde te gaan studeren.

Het candidaatsexamen in dit vak werd door mij afgelegd in januari 1962 en het doctoraal examen in maart 1965. Voor het laatst genoemde examen werd als hoofdrichting gekozen biochemie (Prof. Dr. L.L.M. van Deenen) en als bijvakken analytische chemie en pedagogiek en didactiek der scheikunde.

Nadat door mij van februari 1965 tot september 1966 de militaire dienstplicht vervuld was, waarbij ik o. a. gedurende 9 maanden werkzaam was op het Klinisch- Chemisch Laboratorium van het Militair Hospitaal "Dr. A. Matthijsen" te Utrecht (hoofd Drs. P. Prosé) trad ik in dienst als wetenschappelijk medewerker op de afdeling Chemische Pathologie van de Medische Faculteit Rotterdam.

Hier werd ik, werkzaam zijnde op het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium van het toenmalige Gemeenteziekenhuis Dijkzigt onder leiding van Prof. Dr. B. Leijnse opgeleid tot klinisch- chemicus.

Na voltooiing van deze opleiding in oktober 1968 werd het in dit proefschrift beschreven onderzoek verricht.