

HET IJZERMETABOLISME VAN DE ZEELT TINCA TINCA LINNAEUS EEN VERGELIJKEND ONDERZOEK

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

WOENSDAG 12 DECEMBER 1973 TE 16.15 UUR PRECIES

DOOR

JOHANNES PETRUS VAN DIJK

GEBOREN TE 's-GRAVENHAGE IN 1939

1973

BRONDER-OFFSET B.V. — ROTTERDAM

PROMOTOR: PROF. DR. B. LEIJNSE
COREFERENTEN: DR. H.G. VAN EIJK
DR. G.H. ZEILMAKER

INHOUD

pag.

	pag.
HOOFDSTUK V	
DE BESTUDERING VAN HET IJZERMETABOLISME VAN DE ZEELT DOOR MERKINGEN VAN HET PLASMAIJZER OF VAN HET IN DE ERYTHROCYTEN AANWEZIGE IJZER MET $^{59}\text{Fe(III)}$	
Inleiding	58
§ 1. De kinetiek van het intracardiaal toegediend - aan plasma gebonden - $^{59}\text{Fe(III)}$	59
§ 2. De bestudering van de erythrocytenafbraak door middel van intracardiale toediening van erythrocyten die gemerkt zijn met $^{59}\text{Fe(III)}$.	72
HOOFDSTUK VI	
DE BESTUDERING VAN DE IJZEREXCRETIE EN VAN ENKELE ASPECTEN VAN DE IJZEROPNAME	
Inleiding	79
§ 1. De ijzeruitscheiding in de urine	82
§ 2. De ijzeruitscheiding in de feces	94
§ 3. De ijzeruitscheiding via lichaamsmembranen	96
§ 4. Het bepalen van de drinkratio in verband met het berekenen van het orale ijzeraanbod	99
§ 5. De ijzeropname door de kieuw	101
HOOFDSTUK VII	
DISCUSSIE	110
SAMENVATTING	129
SUMMARY	133
LITERATUURLIJST	137
NASCHRIFT	141

HOOFDSTUK I

PROBLEEMSTELLING EN LITERATUURBESPREKING

Reeds in 1937 stelden McCance en Widdowson (1937) dat de zeer beperkte ijzerafgifte een karakteristiek aspect van de ijzerhuishouding van de mens is. Het sindsdien verrichte onderzoek heeft dit vele malen bevestigd. Het inzicht dat het vermogen om ijzer uit te scheiden in kwantitatieve zin zeer beperkt is, heeft ertoe geleid dat de studie van de regulatiemechanismen zich voornamelijk heeft gericht op het ijzeropnamesysteem. Verschillende regulatiemechanismen voor de ijzerabsorptie zijn geponeerd. Het bekendste mechanisme is de regulatie door middel van het in de darmmucosacellen aanwezige (apo)ferritine (mucosa blok-theorie, Granick, 1946).

De ijzerhuishouding bij de mens is bijzonder storingsgevoelig. Enerzijds blijkt dit uit het veelvuldig voorkomen van ijzergebreksanemieën, anderzijds uit het regionaal voorkomen van hemochromatosen. Op grond van de gemeten ijzerverliezen van de normale man en van de normale niet-zwangere vrouw, wordt de dagelijkse ijzerbehoefte van de normale man gesteld op 1 mg en die van de normale vrouw op 1,5 mg, dus op 18 en 27 μ mol respectievelijk. Uit de verschillende studies die zijn gepubliceerd over het dagelijks voedsel-ijzer aanbod (Hallberg et al., 1970), kan worden geconcludeerd dat - althans in de westeuropese landen - in principe ruimschoots aan de gestelde eisen wordt voldaan. Gemiddeld wordt evenwel slechts 5% van het met het voedsel aangeboden ijzer door het lichaam geabsorbeerd. Op grond van deze geringe absorptie, kan worden gesteld, dat in vele gevallen de voeding - wat het ijzer betreft - marginaal tot submarginaal is.

Het is bekend dat in geval van ijzerdepletie de absorptie van het met het voedsel aangeboden ijzer toeneemt. Deze toename is evenwel niet dusdanig, dat bij een conditioneel submarginaal ijzerdieet, de dagelijkse ijzerbehoefte kan zeker worden gesteld, zodat de ijzerdepletie zonder gerichte ijzertherapie niet kan worden opgeheven.

Bij een continu verhoogd ijzeraanbod met het voedsel, treedt zowel in absolute als in relatieve zin verlaging van de absorptie op; deze verlaging is niet dusdanig, dat bij een continu verhoogd ijzeraanbod, het optreden van hemochromatose kan worden vermeden.

We moeten dan ook concluderen, dat de regulatie van de ijzerhuishouding via de ijzerabsorptie slechts binnen bepaalde grenzen van het ijzeraanbod optimaal verloopt.

Dit doet de vraag rijzen hoe het komt, dat de ijzerhuishouding zo gebrekking wordt gereguleerd. Een goede regulatie van de ijzerhuishouding is immers van fundamenteel belang voor het optimaal functioneren van het erythropoietisch systeem hetgeen op zijn beurt een belangrijke voorwaarde is voor een verzekerd zuurstoftransport naar de weefsels.

Het gestelde probleem kan als volgt worden benaderd. We gaan hierbij uit van de hypothese dat bij de homoiotherme dieren het zwaartepunt van de regulatie ligt op de stabilisering van de erythropoiese. Een van de voorwaarden hierbij is, dat aan de dagelijkse ijzerbehoefte van het erythropoietisch systeem wordt voldaan. Dit gebeurt enerzijds door hercirculatie van het bij afbraak van erythrocyten vrijkomende ijzer en anderzijds door een zo goed mogelijke compensatie van de optredende ijzerverliezen, zodat een bepaalde voorraad aan ijzer (ferritine, hemosiderine) gehandhaafd kan worden. We kunnen hierbij het ferritine- en het hemosiderineijzer beschouwen als een buffersysteem dat tijdens een langdurig submarginaal ijzeraanbod met het voedsel - waarbij de dagelijks optredende ijzerverliezen niet ten volle worden gecompenseerd door de relatieve toename van de ijzerabsorptie - de ijzerleverantie aan het erythropoietisch systeem nog enige tijd zekerstelt. Het primaat van de goed functionerende erythropoiese wordt ondersteund door het feit, dat factoren die de erythropoiese stimuleren, de ijzerabsorptie verhogen (Bothwell et al., 1958; Pirzio-Biroli et al., 1960). Bij een conditioneel marginaal tot submarginaal ijzeraanbod met het voedsel is minisering van het ijzerverlies een functioneel mechanisme en is de zeer beperkte mogelijkheid tot regulatie van de ijzerafgifte verklaarbaar. De reductie van het ijzerverlies moet dan gezien worden als een factor welke tot

de stabilisering van de erythropoiese bijdraagt. Bij een conditioneel marginaal tot submarginaal ijzeraanbod is eveneens verklaarbaar waarom de regulatiemechanismen zich praktisch beperken tot het niveau van de ijzeropname.

In tegenstelling tot de poikilotherme diersoorten zijn de homoiotherme diersoorten wat de intensiteit van hun metabolisme betreft verregaand onafhankelijk van de omgevingstemperatuur. De hoge lichaamstemperatuur hangt samen met een verhoogd basaal metabolisme. Dit verhoogd basaal metabolisme vereist meer calorieën per gewichtseenheid en een intensiever zuurstoftransport. Het intensievere zuurstoftransport wordt onder andere bewerkstelligd door een ten opzichte van de poikilotherme diersoorten verhoogde zuurstofcapaciteit van het bloed der homoiothermen. Sommige vissoorten uit ondiep water en de zeer actieve vissen bezitten een zuurstofcapaciteit welke in het bereik van de zuurstofcapaciteit der homoiothermen ligt (Prosser, 1966). Schematiserend kunnen we stellen, dat het hemoglobinegehalte per eenheid lichaamsgewicht voor homoiotherme diersoorten hoger is dan voor de poikilotherme soorten. Dit geldt ook voor de hoeveelheid ijzer per eenheid lichaamsgewicht, welke als hemoglobine-ijzer in dienst staat van het zuurstoftransport.

Eén van de factoren welke van invloed zijn op de intensiteit van het basale metabolisme is het lichaamsgewicht. Kleinere dieren hebben per eenheid lichaamsgewicht een hogere basaal-metabole snelheid dan grotere dieren. Burke (1966) stelt, dat vertebraten met een geringer gewicht een intensiever metabolisme kunnen handhaven dan vertebraten met een groter lichaamsgewicht doordat:

1. het bloedvolume per eenheid lichaamsgewicht bij kleine dieren groter is,
2. de zuurstofcapaciteit van het bloed per eenheid lichaamsgewicht bij kleine dieren groter is,
3. de zuurstofspanning waarbij 50% verzadiging van het bloed optreedt (P_{50}) bij kleinere vertebraten hoger is, zodat snelle diffusie van zuurstof naar de weefsels wordt bevorderd.

De bovengenoemde correlaties zijn geldig binnen de soort. De soorten kunnen zowel poikilotherm als homoiotherm zijn. Hoewel het niet is onderzocht, lijkt het waarschijnlijk, dat uit de onder 1 en 2 genoemde correlaties een negatieve correlatie tussen de hoeveelheid hemoglobine-ijzer per eenheid lichaamsgewicht en het lichaamsgewicht mag worden afgeleid.

Het zal op grond van het voorgaande duidelijk zijn, dat een stabiele ery-

thropoiese beschouwd moet worden als een belangrijke voorwaarde voor de handhaving van het hoge basale metabolisme der homoiotherme diersoorten. Op de grotere behoefte aan calorieën zijn we reeds ingegaan.

Dit roept de vraag op of er een vaste relatie bestaat tussen de calorische waarde en het ijzergehalte van het voedsel der herbifore, carnifore en omnifore homoiotherme vertebraten. Het is zeer waarschijnlijk, dat de verhouding van beide parameters in het voedsel der drie genoemde groepen sterk zal verschillen, zodat er bij een verzekerd calorieën aanbod toch - in één of meerdere van de genoemde voedingscategorieën - mogelijk van een marginaal tot submarginaal ijzeraanbod sprake kan zijn. Mocht dit zo zijn, dan laat zich vragen of dit heeft geleid tot specifieke regulatiemechanismen voor de handhaving van een stabiele erythropoiese of in ruimere zin voor de handhaving van de totale ijzerbalans.

De mens onderscheidt zich nu zodanig van de overige homoiotherme vertebraten, dat de samenstelling van zijn voedsel niet slechts seizoen bepaald is - zoals dit het geval is voor de meeste vertebraten - doch eveneens sterk cultureel wordt bepaald. Het resultaat hiervan is een grote variatie in de voedselsamenstelling. Vanuit een evolutionaire optiek bezien, zou men kunnen stellen, dat gezien de verbreidheid van anemieën en het regionaal voorkomen van hemochromatosen, *Homo sapiens* géén toereikende adaptieve mechanismen heeft kunnen ontwikkelen welke deze wijde scala van mogelijkheden in de ijzer/calorieën verhouding volledig kunnen opvangen. Zoals we hebben gezien, is de eigen aard van de regulatie van de ijzerhuishouding van de mens te begrijpen als we een conditioneel marginaal tot submarginaal ijzeraanbod veronderstellen. De uitdrukking "conditioneel marginaal" wil zeggen dat de toestand waarin zich de mens met betrekking tot het ijzeraanbod oorspronkelijk bevond als marginaal wordt gekenmerkt. In hoeverre deze conditie oorspronkelijk is, kunnen we op grond van de beschikbare gegevens niet aantonen.

De genoemde oecologische aspecten van de ijzerhuishouding zijn vrijwel niet onderzocht. Over de evolutionaire aspecten is ons niets bekend.

Om de eigen aard van de ijzerhuishouding van de mens en mogelijk in het algemeen van de op het land levende homoiotherme vertebraten beter af te grenzen, leek het ons relevant om de ijzerhuishouding van de vis te bestuderen. De belangrijkste reden is dat de vis wat zijn ijzervoorziening betreft mogelijk niet uitsluitend op zijn voedsel is aangewezen. Het is name-

lijk waarschijnlijk dat de vis in staat is het in het water opgeloste of colloïdaal verdeelde ijzer te absorberen. Gebeurt dit in voldoende mate dan is de vis wat het ijzer betreft in principe onafhankelijk van zijn voedsel. Het tegengaan van ijzerstapelingen moet dan als een kenmerkend probleem van de vis worden gekenschetst, zodat zich vanzelf de vraag stelt naar de regulatie van de ijzerhuishouding en wel in het bijzonder naar de regulatie via de ijzeruitscheiding. We zullen bij de bestudering van het ijzermetabolisme niet slechts ingaan op de zojuist genoemde aspecten, ook zal de rol van de diverse organen in het ijzermetabolisme worden onderzocht. Het zwaartepunt zal hier liggen op de bestudering van het erythropoietische systeem. Het is in dit verband van belang om te weten of ook bij de vis aan de erythropoiese een regulatiefunctie ten dienste van de zuurstofvoorziening moet worden toegekend. Anders gezegd, of verandering van het hemoglobinegehalte tot de controlemechanismen moet worden gerekend welke in geval van stress het zuurstoftransport naar de weefsels moeten waarborgen; waarbij we onder het begrip stress iedere verandering van een externe factor zullen verstaan waarop het organisme reageert met een fysiologische aanpassing. Immers, aanpassing door middel van een veranderde erythropoieseactiviteit zal ook voor de totale ijzerhuishouding implicaties hebben. Als het tegengaan van ijzerstapeling bij de vis inderdaad een probleem genoemd moet worden, dan zal aan de toegenomen ijzerbehoefte van het erythropoietisch systeem tijdens de aanpassingsfase gemakkelijk kunnen worden voldaan. De erythropoiese zal niet snel worden beperkt door een onvoldoende ijzeraanbod, zodat dan van een relatieve milieu-onafhankelijkheid sprake is. Als anderzijds de vis - wat het ijzer betreft - afhankelijk is van zijn voedsel dan is de mogelijkheid van een submarginaal ijzeraanbod - zeker tijdens de aanpassingsfase - niet uitgesloten. Bij een beperkte ijzervoorraad zou de erythropoiese milieuafhankelijk kunnen worden. We zullen op grond van deze overwegingen op de vraag of aan de erythropoiese in geval van stress een regulatiefunctie toekomt ingaan en wel aan de hand van een literatuuronderzoek.

Het metabolisme (zuurstofverbruik per tijds- en gewichtseenheid) wordt beïnvloed door een aantal factoren, zoals de temperatuur, de zuurstofconcentratie en de samenstelling van het voedsel. We zullen hier ingaan op de invloed van wijzigingen van de temperatuur en van het zuurstofgehalte van het milieu op de intensiteit van het metabolisme. Ook de invloed van de voedselsamenstelling zal kort worden toegelicht.

In tegenstelling tot de dieren met een constante lichaamstemperatuur zijn de poikilotherme dieren slechts in beperkte mate in staat hun lichaamstemperatuur op een bepaald niveau te handhaven. Dit betekent niet dat de snelheid der metabole processen zonder meer met de omgevingstemperatuur hoeft te fluctueren. Er kan, zoals dit bij vissen het geval is, regulatie van het metabolisme optreden, zodat het fysiologisch effect van de temperatuursverandering als het ware wordt gebufferd. Vele processen vertonen een vertraagde compensatie. De compensatie bereikt dan eerst na dagen of weken zijn grootste waarde. Een dergelijke compensatoire regulatie wordt acclimatie genoemd als er sprake is van aanpassing aan één gedefinieerde laboratoriumconditie en acclimatisatie als de aanpassing plaatsvindt in het natuurlijk milieu. Als voorbeeld van acclimatie noemen wij de compensatoire regulatie van het zuurstofverbruik van de vis bij veranderde omgevingstemperatuur. Zoals fig. 1,1 laat zien verloopt deze regulatie in de zin van een partiële compensatie.

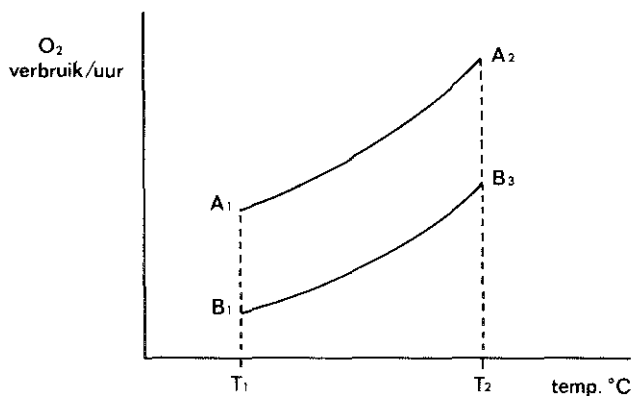


Fig. 1,1

Schema van Precht (1955); vereenvoudigd.

A₁ is het zuurstofverbruik bij een acclimatietemperatuur T₁. Verhoging van de temperatuur tot T₂ heeft een toename van het zuurstofverbruik tot het niveau A₂ ten gevolg. Door acclimatie bij een temperatuur T₂ wordt het zuurstofverbruik tot het niveau B₂ gereduceerd, zodat er sprake is van een partiële compensatie.

De temperatuursverhoging heeft nu enerzijds tot gevolg dat de vraag naar zuurstof is toegenomen, anderzijds is zowel het zuurstofbindingsvermogen van het hemoglobine als de oplosbaarheid van het zuurstof in het water ge-

reduceerd. Dit doet de vraag rijzen of bij de vis stimulering van de erythropoiese - waardoor een toename van het hemoglobinegehalte en dus van de zuurstofcapaciteit van het bloed wordt bewerkstelligd - als fysiologisch aanpassingsmechanisme werkzaam is.

Het onderzoek naar het verband tussen thermoacclimatie en de zuurstofcapaciteit verhogende hematologische parameters heeft weinig consistente resultaten opgeleverd (Spoor, 1951; Anthony, 1961a; Falkner en Houston, 1966; De Wilde en Houston, 1967). De algemene indruk is, dat wijziging van de zuurstofcapaciteit in het geval van thermoacclimatie van weinig betekenis is. De Wilde en Houston spreken op grond van hun studie van de regenboogforel (*Salmo gairdneri*) het vermoeden uit, dat bij acclimatie bij een temperatuur dicht bij het 'incipient lethal level', verhoging van de zuurstofcapaciteit van het bloed wél van fysiologische betekenis is.

De landvertebraten en de meeste vissen zijn in staat om hun zuurstofverbruik op peil te houden bij een dalende zuurstofconcentratie van het milieu, tot aan een kritische zuurstofconcentratie toe.

Acclimatie aan verlaagde zuurstofconcentraties in het water leidt tot een afname van zowel het standaardmetabolisme als van de kritische zuurstofconcentratie voor de handhaving van het standaardmetabolisme. Prosser (1957) vond bij acclimatie van de goudvis aan lage zuurstofconcentraties zowel een toename van het aantal erythrocyten als van het hemoglobinegehalte per volume eenheid van het bloed. Hij concludeerde, dat verhoging van de zuurstofcapaciteit onder andere de verschuiving van de kritische zuurstofconcentratie mogelijk maakt. De invloed van de experimentele omstandigheden op het bloedvolume werd door Prosser niet onderzocht. Cameron et al. (1970) onderzochten de invloed van experimenteel - door middel van fenyldiazine - geïnduceerde anemie op de hoogte van het standaardmetabolisme en op de tolerantiegrenzen bij verlaagde zuurstofconcentraties bij de Amerikaanse zeebrasem (*Lagodon rhomboides*). Hoewel in de experimentele groep het hemoglobinegehalte maximaal tot 10% van de normale waarde was gereduceerd, kon er geen relatie tussen het hemoglobinegehalte en de tolerantiegrens worden aangetoond. Wel was het mogelijk voor de anemische groep een geringe toename van het standaardmetabolisme waar te nemen. Dit kon verklaard worden door de compensatoir toegenomen snelheid van de hartslag. Cameron et al. stellen nu, dat - juist omdat compensatie door het verhogen van de hartslag een metabool kostbaar mechanisme is - de vis gebaat is bij een reserve circulatiecapaciteit in de vorm van hemoglobine. Een andere me-

thode om anemie te simuleren is het blokkeren van het hemoglobine door middel van koolmonoxyde. Anthony (1961b) onderzocht zo de invloed van koolmonoxyde op de overlevingsduur van de goudvis en kwam tot de algemene uitspraak dat de vissen als klasse beschouwd een gering gebruik maken van het voorhanden zijnde hemoglobine. Een recente studie van Holeton (1971) toont aan dat de bruine forel en de regenboog forel (*Salmo trutta* en *Salmo gairdneri*) veel gevoeliger zijn voor het verlies van functioneel hemoglobine onder invloed van koolmonoxyde dan b.v. de karper, de goudvis of de paling. Dit doet vermoeden - aldus de auteur - dat de meer actieve forellen hun hemoglobine eveneens voor het standaardmetabolisme gebruiken, dit in tegenstelling tot de andere soorten. Zanjani (1969) toonde aan, dat de blauwe gourami (*Trichogaster trichopterus*) na bloedafname reageert met een toename van de erythropoiese. Toediening van serum van anemische vissen aan niet anemische leidde tot een stimulatie van de erythropoiese in de laatste - niet anemische - groep, zodat onder anemische condities een erythropoiese stimulerende factor (ESF) wordt gevormd.

Op de eerder gestelde vraag of het erythropoietisch systeem van de vis een functie vervult bij de homeostase van de ademhaling onder condities van stress kan geen generaliserend antwoord worden gegeven. Er zijn - zoals we zagen - aanwijzingen dat het erythropoietisch systeem inderdaad een positieve rol in de homeostase vervult. De opvatting dat het hemoglobine-systeem beschouwd moet worden als een reserve circulatiecapaciteit zou dan impliceren, dat regulatie van de zuurstofvoorziening door middel van een toegenomen hemoglobinesynthese zinvoller wordt naarmate de reserve circulatiecapaciteit vollediger wordt benut. Samenvattend kan met enige reserve worden gesteld dat aan de onderzochte functie van het erythropoietisch systeem hoogstens in incidentele gevallen een rol van betekenis toekomt, zodat er in geval van stress (zuurstof of temperatuur) aan de ijzerhuishouding in de regel geen extra belasting wordt opgelegd.

De invloed van het voedsel op de intensiteit van het metabolisme is afhankelijk van de samenstelling van het voedsel. De gemiddelde calorieën-opbrengst per liter verbruikte zuurstof bedraagt voor koolhydraten en vetten respectievelijk 5,01 en 4,65 Kcal/ 10_2 . Eiwitten worden fysiologisch niet volledig geoxydeerd, zodat hier de calorieënopbrengst per liter zuurstof door middel van het experiment moet worden bepaald. Het voornaamste bestanddeel van het voedsel der herbivore diersoorten vormen de koolhydraten. In het voedsel der carnivoren is relatief meer vet aanwezig. Molnár et al. (1970)

onderzochten het gemiddelde hemoglobinegehalte per erythrocyt ($\text{Hb g\% / aantal erythrocyten} \times 10^6$) voor verschillende herbivore, carnivore en omnivore vissoorten. Voor de drie categorieën werden respectievelijk waarden gevonden van 4,4, 3,5 en 5,2. De verschillen waren significant, hoewel hun interpretatie - juist op grond van de calorische equivalent van de voedselbestanddelen - twijfel oproept. Zij stellen namelijk, dat de herbivore en omnivore vissoorten gezien de samenstelling van hun voedsel meer zuurstof zullen verbruiken. Dit hogere zuurstofverbruik vindt volgens de auteurs zijn uitdrukking in het toegenomen hemoglobinegehalte per erythrocyt. Wat de juiste interpretatie ook moge zijn, de resultaten wijzen op een verband tussen de voedselsamenstelling en de erythropoiese, temeer daar ook het hemoglobinegehalte van het bloed der carnivoren enerzijds en der omnivoren en herbivoren anderzijds in dezelfde richting verschilt. Over de mogelijke implicaties voor de erythropoiese en in ruimere zin voor de totale ijzerhuishouding kunnen we wegens het ontbreken van relevante gegevens geen uitspraak doen.

Wij zullen in ons onderzoek op de gestelde problemen van de thermoacclimatie en zuurstofacclimatie niet ingaan, temeer niet omdat er aanwijzingen zijn dat acclimatie in de regel geen extra belasting aan het erythropoietisch systeem oplegt.

De eisen die het erythropoietisch systeem stelt aan de handhaving van de ijzerbalans zullen wel aan de orde komen. Een belangrijke parameter in dit verband is het quotiënt van de dagelijkse ijzeropname en de dagelijkse ijzerbehoefte van het erythropoietisch systeem. Naarmate deze parameter kleiner is, zal de mobilisatie van het bij erythrocytenafbraak vrijkomende ijzer en van het ijzer in de voorraadpools groter dienen te zijn. De genoemde parameter is te beschouwen als een maat voor de relatieve milieu-onafhankelijkheid (wat de ijzerleverantie betreft) van het erythropoietisch systeem. Een op grond van deze parameter doorgevoerde vergelijking van de verschillende vertebrate diersoorten kan relevante informatie verschaffen over mogelijke adaptionele aspecten van de ijzerhuishouding.

Over de opname en afgifte van zware metalen door vissen is zeer weinig bekend. De meeste onderzoeken staan bovendien voornamelijk in het teken van de toxiciteit der zware metalen. Het onderzoek beperkt zich hoofdzakelijk tot zink (Nakatani, 1966; Eisler, 1973), cadmium (Eisler, 1971; Gardner et al., 1970), koper (Mount, 1968) en aluminium (Freeman et al., 1971). De toxiciteit van ijzerverbindingen is eveneens sporadisch onderzocht.

Schiemenz stelde in 1937 reeds dat de toxiciteit van ijzerverbindingen sterk afhangt van de zuurgraad van het milieu. Voor de zeelt gaf deze auteur een onderste lethale pH-grens van 5,4 aan als de ijzerconcentratie in het milieu laag is. Bij hogere ijzerconcentraties verschuift de lethale pH-grens naar de basische kant. Kwantitatieve uitspraken over de zuurgraad/ijzerconcentratie verhouding worden niet gedaan. Larsen en Olsen (1948) vonden dat er bij een pH van 6,2 - 7,0 en een ijzerconcentratie van 1,5 - 20 ppm, wat neerkomt op 80 - 1110 $\mu\text{mol/l}$, in de kweekvijvers een aanzienlijke sterfte van de forel optrad. Zij vermoedden dat de sterfte het gevolg was van ferrihydroxide-afzetting op de kieuwlamellen. De groene zonvis (*Lepomis cyanellus*) en de baars (*Micropterus salmoides*) tolereren ijzerconcentraties tot 1500 $\mu\text{mol/l}$ bij een pH variërend van 3,7 - 4,7 (Lewis et al., 1956). Deze experimenten duurden evenwel niet langer dan drie dagen. De algemene gedachte achter de genoemde waarnemingen is, dat het ionogene ijzer in veel mindere mate toxisch is dan het gesuspendeerde ferrihydroxide. De lethaliteit zou voornamelijk veroorzaakt worden door precipitatie van ferrihydroxide op de kieuw, waardoor de ademhalingsfunctie wordt verstoord. Machado Cruz (1966) sprak het vermoeden uit dat de toxiciteit van het ijzer niet uitsluitend bepaald hoeft te worden door de belemmering van de ademhalingsfunctie van de kieuw tengevolge van ferrihydroxide precipitatie, maar dat inwendige ijzerstapelingen mogelijk van invloed zijn op het goed functioneren van het cellulaire metabolisme. Goudvissen welke gedurende 24 uur in een milieu verbleven bestaande uit gedestilleerd water waaraan 25,6 - 51,2 $\mu\text{mol/l}$ Fe(III) als sulfaat was toegevoegd, vertoonden sterke ijzerstapelingen in de nier, in de lever en in de darmmucosacellen. Voorts was de kieuw vrijwel geheel met ijzer bezet, dit in overeenstemming met de gangbare theorie. Het ijzer werd door Machado Cruz met behulp van de Turnbull's blauwkleuring histochemisch aangetoond. Roeder et al. (1966) bestudeerden de invloed van dagelijkse Fe(II) sulfaat en Fe(III) nitraat toevoeging aan het milieu op de gewichtstoename en op de toename van het hematocriet. Als proefdieren gebruikten zij de zwaarddrager (*Xiphophorus helleri*) en het plaatje (*Xiphophorus maculatus*). Zij konden aantonen, dat het Fe(II) een stimulerende invloed heeft op de toename van zowel het lichaamsgewicht als op het hematocriet. Toevoeging van Fe(III) had geen invloed op beide parameters. Bij het bereiken van de seksuele rijpheid nam de werking van Fe(II) sterk af. De auteurs stelden, dat de opname van het Fe(II) waarschijnlijk plaats vindt door de kieuw en dat deze opname zeer snel verloopt, daar het

toegevoegde ijzer slechts korte tijd als Fe(II) voorhanden is. Hevesy et al. (1964) hebben onderzoek verricht naar de metabole aspecten van de ijzer-huishouding bij de zeelt (*Tinca tinca*) door middel van intravasculair of intramusculair toedienen van plasma-gebonden $^{59}\text{Fe(III)}$. In de verschillende hoofdstukken zal op de door Hevesy et al. gevonden resultaten worden teruggekomen. In andere publicaties uit dezelfde groep - waaronder zeer recente - wordt ingegaan op de invloed van bestraling op de erythropoiese van de zeelt (Lockner et al., 1972).

We zullen dit hoofdstuk besluiten met een programmatisch overzicht van het door ons verrichte onderzoek.

De primaire vraag die wij ons hebben gesteld is of de vis in staat is ijzer direct vanuit het water te absorberen. We hebben voor de bestudering van de ijzeropname een proefopstelling ontwikkeld welke in hoofdstuk III is beschreven. Het ijzer is in het experimentele milieu voornamelijk in colloïdaal-disperse vorm aanwezig.

In hoofdstuk IV zal op een globale manier op de gemeten ijzeropname worden ingegaan. Voorts zal worden beschreven wat er met het opgenomen radioactieve ijzer in het lichaam gebeurt. Aan de hand van het in dit hoofdstuk geïntroduceerde utilisatiebegrip zal worden onderzocht in hoeverre kwantitatieve uitspraken over het ijzermetabolisme mogelijk zijn. Het accent zal hierbij liggen op de kwantitatieve aspecten van de erythropoiese.

Een andere methode om een inzicht te krijgen in de interne ijzerkinetiek is het specifiek "labelen" van één ijzercompartiment, waarna de verdeling van het radioactieve ijzer over de verschillende organen of zo mogelijk over de verschillende ijzercompartimenten in de tijd kan worden gevolgd. Hoofdstuk V geeft de resultaten van dergelijke experimenten weer. Centraal staat bij deze experimenten de bepaling van de verdwijningscurve van het serum-ijzer. Op grond van de verdwijningscurve en de verkregen curven voor het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de verschillende organen worden voor de betreffende organen de utilisatiewaarden berekend. Ook op de utilisatie van het erythropoietische systeem zal worden ingegaan.

In hoofdstuk VI komt de ijzeruitscheiding aan de orde. Voorts zal in dit hoofdstuk nogmaals op de ijzerabsorptie worden teruggekomen. Wat de absorptie betreft, zal worden onderzocht of de drinkratio van de vis de in hoofdstuk IV gegeven ijzeropname kan verklaren. De rol van de kieuw in de ijzerabsorptie is met behulp van een perfusietechniek bestudeerd; de

verkregen resultaten zijn eveneens in hoofdstuk VI vermeld. De ijzeruitscheiding is bestudeerd onder condities van een submarginaal ijzeraanbod. De rol van de nier in de ijzeruitscheiding is ook onder condities van een overmatig ijzeraanbod bestudeerd.

In het laatste hoofdstuk zullen de verkregen resultaten in een wijder kader worden besproken. In deze bespreking zullen de resultaten die door ons zijn verkregen in een onderzoek naar de ijzerstatus van verschillende zoet- en zoutwatervissen worden opgenomen. Verscheidene - van de in hoofdstuk I vermelde - aspecten van de ijzerhuishouding komen nogmaals aan de orde.

Wij hebben voor onze experimenten een zoetwatervis gekozen, te weten de zeelt (*Tinca tinca*). De keuze is uitsluitend gebaseerd op praktische redenen. Zoetwatervissen zijn in tegenstelling tot zoutwatervissen - in niet speciaal op visonderzoek gerichte laboratoria - redelijk goed in quarantaine te houden. Voorts was reeds enig onderzoek naar het ijzermetabolisme van de zeelt verricht (Hevesy et al.), zodat een gedeeltelijke vergelijking van de resultaten mogelijk is. Voor een overzicht van de biologische gegevens van de zeelt wordt verwezen naar een artikel van Rosa (1958).

Tot slot zij nog opgemerkt, dat de relevante literatuur wat het ijzermetabolisme van het zoogdier betreft zeer goed in de proefschriften van Glaser (1970), Tavenier (1971) en van Van Kreel (1972) is vermeld.

HOOFDSTUK II

MATERIALEN EN METHODEN

§1. MATERIALEN

1. Chemicaliën.

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

2. Radioactief ijzer.

Voor de bereiding van de in hoofdstuk III beschreven proefopstelling is altijd gebruik gemaakt van $^{59}\text{Fe(III)}$ chloride van N.V. Philips-Duphar. De oplossing is niet dragervrij, ze bevat $0,2 - 0,4 \mu\text{mol } ^{56}\text{Fe}/100 \mu\text{C}$ als drager. Gezien de relatief geringe radiochemische concentratie van het genoemde preparaat was dit niet geschikt voor het merken van plasma, zonder een aanzienlijke volumetoename te veroorzaken. In experimenten waarbij een volumetoename zoveel mogelijk moest worden voorkomen, werd daarom gebruik gemaakt van $^{59}\text{Fe(III)}$ citraat geleverd door het Zentral Institut für Kernforschung, D.D.R. Dit dragervrije preparaat was leverbaar in een radiochemische concentratie van $200 \mu\text{C}/\text{ml}$.

3. Proefdieren.

De zeelten werden gevangen in de Maaslandse polderwateren (bij Vlaardingen) en verbleven alvorens ze naar het laboratorium werden overgebracht niet langer dan een week in de zich ter plaatse bevindende dompelreservoirs. Het gewicht van de in onze experimenten gebruikte zeelten lag in de regel tussen de 280 en 350 g, de lengte - waarbij de cau-

dale vin niet is meegerekend - bedroeg voor deze populatie 25 tot 28 cm. Op grond van de publicaties van Rosa (1958), Weatherley (1959) en Cerny (1968), kunnen we de leeftijd ruwweg op 5 tot 7 jaar schatten. De zeelten zijn niet volgroeid, doch wel geslachtsrijp.

§2. METHODEN

Biologische methoden

1. Het houden van de proefdieren in het laboratorium.

De proefdieren verbleven in 1000 liter reservoirs. De reservoirs werden continu doorstroomd met onthloord leidingwater. Vissen die bij aankomst in het laboratorium tekenen van protozoën-ziekten vertoonden, werden nadat bloed was afgenomen voor de isolatie van transferrine, opgeofferd. De resterende vissen werden behandeld met 'PS-tabletten' (Dohse - Aquaristik, Bonn, BRD).

2. Voedsel.

De proefdieren werden dagelijks één maal gevoed met het kunstmatig voedsel, zoals dat door ons volgens het voorschrift van Berg (1968) werd bereid. Dit voedsel bevat alle essentiële mineralen en vitaminen; het is gemaakt op gelatine basis. Eén maal per week werd gemalen runderlever aangeboden.

3. Verdoving van de proefdieren.

De zeelten werden verdoofd met MS 222 (Sandoz) bij een concentratie van 150 mg/l. Teneinde de door verdoving met MS 222 geïnduceerde stressfactoren zoveel mogelijk te minimaliseren werd de oplossing geneutraliseerd (Wedemeyer, 1970).

4. Bloedafname.

De bloedmonsters werden steeds door punctie van de dorsale aorta verkregen. Er werd een 5 ml spuit gebruikt; de naald was van het type steristar 40 mm x 0,8 mm. Als antistollingsmiddel werd heparine gebruikt.

5. Bloedvrij spoelen van de vis.

Een half uur voordat de proefdieren doorspoeld werden, werd intraperitoneaal 5000 i.e. heparine toegediend. Na verdoving werd vervolgens een polytheen canule door het hart aangebracht en wel zodanig dat de canule ter hoogte van de ventrale aorta gefixeerd kon worden. Nadat vervolgens ventrikel en atrium van elkaar waren gescheiden, werd met doorspoelen begonnen. De spoelvloeistof bestond uit Ringer - polyvinylpyrrolidone (PVP) waaraan heparine was toegevoegd. De spoelvloeistof werd vanuit een 60 cm boven het hart gelegen reservoir toegevoegd met een snelheid van ongeveer 150 ml/uur. Er werd met doorspoelen gestopt als de lever volledig blank was geworden. In de regel was hier een half uur voor nodig. Voor de samenstelling van de Ringerse oplossing wordt verwezen naar Chan et al. (1967). Aan 1 liter Ringer werd 20 g PVP toegevoegd om de colloïdosmotische druk te simuleren (Rankin et al., 1971).

6. Canuleren van de urineblaas en van de einddarm.

De proefdieren werden zodanig verdoofd, dat geen reactie op pijnprikkels meer optrad. Vervolgens werden ze overgebracht in perspex operatiekamers, gevuld met leidingwater. Zonodig kon dit water snel tegen MS 222 houdend water worden uitgewisseld. In de flank, ter hoogte van de urogenitale porus werd een 1 cm lange inkeping aangebracht, waarna de einddarm en de urineblaas voorzichtig konden worden vrijgeprepareerd. De door de urinaire porus of de door de anale porus aangebrachte canule werd met "catgut" (jenilene 00) inwendig gefixeerd. Nadat de wond met sulfodimidine was behandeld, werd, eveneens met jenilene 00, gehecht. De gehele operatie duurde ongeveer een half uur.

De urineblaas werd gecanuleerd met PP 160 polytheen slang. Voor de einddarm werd C.7^e P.V.C. slang gebruikt. Beide polytheen canules waren voorzien van een goed passend hard eindstukje, zodat bij het inwendig fixeren geen afbinding van de canule kon optreden.

7. Intracardiale toediening van een speurdosis.

De speurdosis werd steeds met een 1 ml spuit toegediend. De gebruikte naald was van het type Steristar 0,5 mm x 16 mm. Het volume van de speurdosis bedroeg max. 0,2 ml. De proefdieren waren zwak verdoofd, zodat de zeer langzaam toegediende dosis direct door het hart kon worden weggepompt. Als de hartpunctie niet direct optimaal was, zodat geen

bloed kon worden aangezogen, werd het proefdier uit het experiment genomen. Als na beëindiging van het experiment bleek, dat er om het hart een bloedstolsel aanwezig was, werden de verkregen resultaten niet verwerkt.

8. Kunstmatig zoetwater.

In verschillende experimenten was het van belang over een basismilieu te kunnen beschikken gekenmerkt door een zeer gering ijzergehalte. Het door ons gebruikte kunstmatig zoetwater dat aan deze eis voldoet, had de volgende samenstelling: NaCl 10,10 mmol/l, KCl 0,34 mmol/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 mmol/l, KH_2SO_4 1,17 mmol/l, NaHCO_3 2,50 mmol/l, CaCl_2 0,25 mmol/l.

De osmolaliteit bedroeg ± 25 mosm/kg. De pH was 7.

Chemische methoden

1. IJzerbepalingen.

a. In plasma.

Het was niet altijd mogelijk om voldoende plasma te verkrijgen om een macrobepalingstechniek te gebruiken. In dit geval werd het ijzergehalte en de totale bindingscapaciteit bepaald met een microbepalingstechniek.

Macro-bepalingstechniek.

Het ijzergehalte van het plasma en de totale bindingscapaciteit van het plasma werden respectievelijk bepaald volgens Trinder (1956) en Ramsay (1957). De reacties berusten op de vorming van het gekleurde ferro-bathophenantrolinedisulfonzuurcomplex. De extinctie wordt gemeten bij 535 nm.

Microbepalingstechniek.

Het verschil met de genoemde macrobepalingen is, dat de methode gebruik maakt van een Scalar spectrofotometer, welke het werken met zeer kleine monsters mogelijk maakt. In het kort komt de bepaling van het ijzergehalte in het plasma op het volgende neer: In 0,1 ml monster wordt met 0,05 ml, 1 molair $\text{HCl}(\text{H}^+)$ het ijzer van het eiwit losgemaakt, waarna dit ijzer met behulp van 0,005 ml, 2 molair Na_2SO_3 wordt gereduceerd. Nadat de eiwitten met behulp van 0,1 ml, 0,75 molair trichloorazijnzuur zijn geprecipiteerd, wordt aan 0,15 ml

van het verkregen supernatant 0,025 ml, 2,2 molair Na-acetaat toegevoegd teneinde de pH op 5 te brengen. De kleur wordt vervolgens ontwikkeld met 0,025 ml bathophenantrolinedisulfonzuur 0,42 mmolair. De extinctie wordt gemeten bij 535 nm.

Voor de bepaling van de totale ijzerbindingscapaciteit wordt 0,1 ml monster overladen met 0,2 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mmolair. Het niet gebonden ijzer wordt met 0,5 mmol MgCO_3 uitgeschud en door centrifugatie verwijderd. In 0,1 ml van het supernatant wordt op de boven beschreven wijze het ijzer bepaald.

b. In urine of in het kunstmatig zoetwater.

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

Voor de bepaling van het ijzergehalte in het kunstmatig zoetwater en in het in hoofdstuk III beschreven milieu was een concentratiestap noodzakelijk. Voor het kunstmatig zoetwater bedroeg de concentratiefactor 50 en voor het in hoofdstuk III beschreven milieu een factor 10. Concentratie geschiedde door indamping van het met HCl suprapur aanzuurde monster (pH 2).

c. In organen.

Nadat de proefdieren als hiervoor beschreven bloedvrij waren gespoeld, werden de organen verwijderd, gewogen en vervolgens in de destructiekolven 48 uur bij 80°C gedroogd. Nadat het drooggewicht was bepaald, werd nat gedestruueerd met 10 ml, 14 molair $\text{HNO}_3(\text{H}^+)$ en 1 ml, 12 molair $\text{HClO}_4(\text{H}^+)$. Als de destructie volledig was, werd de vloeistof kwantitatief vanuit de destructiekolven in 10 ml gecalibreerde buizen overgebracht, waarna de ijzerbepaling volgde. Hier toe werd aan 1 ml monster 1 ml, 1 molair $\text{HCl}(\text{H}^+)$ en 2 ml, 0,1 molair Na_2SO_3 toegevoegd, teneinde het ijzer te reduceren. Na 15 minuten werd de oplossing met behulp van 2 ml Na-acetaatbuffer, 4 molair op pH 5,0 gebracht, waarna met 1 ml bathophenantrolinedisulfonzuur 0,42 mmolair de kleur ontwikkeld werd. Na 15 minuten werd de extinctie bij 535 nm gemeten. De beschreven destructiemethode was voor de destructie van botweefsel niet geschikt. Daarom werd het botweefsel alvorens aan de genoemde destructie te onderwerpen, gedurende 48 uur bij 600°C verast.

d. In de heminefractie van een orgaan.

In principe komt de bepalingsmethode er op neer, dat het ijzergehalte wordt berekend op grond van het gemeten heminegehalte. Een noodzakelijke voorwaarde is dus, dat het hemine kwantitatief kan worden geïsoleerd.

Voor de hemineisolatie hebben we gebruik gemaakt van de door Gresham et al. (1971) beschreven methode om hemosiderine, ferritine, transferrine en haem te scheiden. De methode komt in het kort hierop neer, dat na homogenisatie van het orgaan in fysiologisch zout, de hemosiderinefractie door centrifugatie bij 1000 g verkregen kan worden. In het supernatant kan het ferritine met behulp van een verzadigde oplossing van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ worden neergeslagen en na centrifugatie geïsoleerd worden. Door nu het resterende supernatant met een Drabkinse oplossing te mengen, de pH naar 2 te brengen en vervolgens de zo behandelde oplossing met ethylmethylketon uit te schudden kan het hemineijzer (organische laag) van het transferrineijzer (waterlaag) gescheiden worden. In plaats van ethylmethylketon hebben wij gebruik gemaakt van ethylacetaat als extractiemiddel. De hemine in de ethylacetaatlaag kon worden bepaald door de extinctie bij 380 nm te meten. Op grond van het gemeten heminegehalte werd het ijzergehalte in de heminefractie berekend.

We hebben de betrouwbaarheid van de bepalingsmethode gecontroleerd door verschillende recovery experimenten. De recovery van aan een nierhomogenaat toegevoegde hoeveelheden hemine in de vorm van gedoseerde erythrocytensuspensies waarvan de heminegehaltenes 10 tot 50 procent van het geschatte heminegehalte van het orgaan bedroegen lag tussen de 95 en 106%.

e. In de heminefractie van de erythrocyten.

Ook hier berust de ijzerbepaling op het meten van het heminegehalte, waarna op grond van het gemeten gehalte de ijzerconcentratie berekend kan worden. Wij hebben voor de bepaling van het hemine gebruik gemaakt van de door Thunell (1963) beschreven methode. De zo bepaalde ijzergehalten kwamen binnen een nauwkeurigheid van 2% overeen met de resultaten van de ijzerbepaling in het destruaat van eenzelfde bloedmonster.

2. Transferrinebepaling.

Het transferrinegehalte van plasma, van urine en van kieuwhomogenaten werd bepaald volgens de kwantitatieve precipitatietechniek van Mancini (1965). Het antizeeltransferrine werd verkregen door immunisatie van cavia's met ver gezuiverd zeeltransferrine (Van Eijk et al., 1972). De transferrineisotatie geschiedde volgens de door Hershberger (1970) beschreven methode. Voor de bepaling van het transferrinegehalte in de urine was het nodig een concentratiestap in te voeren. Concentratie geschiedde door middel van vacuumdialyse.

3. Merken van plasma met $^{59}\text{Fe(III)}$.

Voor de exacte procedure verwijzen we naar hoofdstuk V. Hier zij slechts vermeld, dat het plasma gedurende 1 uur wordt geïncubeerd met het dragervrije $^{59}\text{Fe(III)}$ citraat preparaat. De dosis werd zo gekozen, dat het verzadigingspercentage van het transferrine geen grote verandering onderging.

De methode werd op zijn betrouwbaarheid onderzocht door het gemerkte plasma op cellulose-acetaat te elektroforeren waarna verdeling van de radioactiviteit over de cellulose acetaat strip werd bepaald. Na een incubatietijd van 1 uur was ongeveer 94% van de opgebrachte dosis aanwezig in één discrete radioactiviteitspiek. Langere incubatietijden leidden niet tot verbetering. Bij een incubatietijd van 10 minuten daarentegen was slechts 60% van de dosis in de overeenkomstige piek aanwezig.

4. Celfractionering.

We hebben de methode gevolgd welke de Duve (1969) heeft beschreven voor de verdeling van leverhomogenaat. Gehomogeniseerd werd in een Potter-Elvehjem homogenisator; als centrifuge gebruikten wij de Sorvall $\text{RC}_2\text{-B}$.

5. Ultrafiltratie.

De gebruikte ultrafiltratieopzet werd ontwikkeld door Tavenier (1971). De techniek komt er op neer dat de te onderzoeken oplossing onder invloed van een aangelegd vacuüm door een Visking 8/32 dialyseslang wordt ultragefiltreerd.

6. Apparatuur.

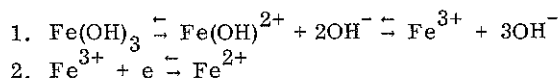
Voor de meting van de radioactiviteit werd gebruik gemaakt van een Philips γ -teller, type PW 4280/01-4237-4003. Als spectrofotometer gebruikten wij een Zeiss, type PMQ II. De osmolaliteit werd bepaald met een "Advanced Osmometer Model" type 31 LAS.

HOOFDSTUK III

ONTWIKKELING VAN DE PROEFOPSTELLING

§1. THEORETISCHE OVERWEGINGEN

In neutraal tot alkalisch oppervlaktewater worden ijzerconcentraties gemeten, variërend van onderdelen van een micromol tot honderden micromolen per liter. De vraag doet zich voor in welke vorm dit ijzer aanwezig is. Allereerst zullen wij ingaan op de mogelijkheden die anorganische ijzerverbindingen opleveren. Gezien het oplosbaarheidsprodukt van Fe(OH)_2 , 2×10^{-15} bij 25°C , lijkt het op het eerste gezicht mogelijk dat het opgeloste ijzer in de vorm van Fe(II) -ionen aanwezig is. Gezien het oplosbaarheidsprodukt van Fe(OH)_3 , 4×10^{-38} bij 25°C , lijkt een rol van Fe(III) -ionen zeer onwaarschijnlijk. Een zorgvuldige beschouwing is echter op zijn plaats. Door Cooper is reeds in 1937 een beschrijving uitgewerkt waarbij de redox potentiaal van het ferro-ferrisysteem een rol speelt. Cooper, wiens werk in het teken stond van de marine biologie, ging uit van de volgende evenwichtsvergelijkingen:



Verder werd door hem afgeleid, dat de redoxpotentiaal van het $\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+}$ systeem, gemeten t.o.v. een waterstofelektrode, wordt weergegeven door de volgende vergelijking:

$$E^h = 1,011 - 0,058 \log a \text{Fe}^{2+} - 0,174 \text{ pH.}$$

Bij grote verdunning mag men volgens Cooper de activiteitscoëfficiënt gelijkstellen aan 1. Op grond van de E^h /pH vergelijking kan men berekenen, dat analytisch aantoonbare Fe(II)-ionen concentraties eerst bij een E^h van 0,2 V mogelijk zijn. Voor het oplosbaarheidsprodukt $[\text{Fe}(\text{OH})^{2+}][\text{OH}^-]^2$ berekent Cooper de waarde $10^{-26,8}$. Voor het oplosbaarheidsprodukt $[\text{Fe}^{3+}][\text{OH}^-]^3$ wordt de waarde $10^{-38,6}$ berekend. Cooper houdt voorts nog rekening met het bestaan van het ferrite ion, volgens $\text{H}_3\text{FeO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{H}_2\text{FeO}_3^-$. Hiervoor wordt een oplosbaarheidsprodukt van $10^{-19,3}$ gesteld. Bij een pH = 7 kan volgens Cooper $10^{-10,9}$ $\mu\text{mol Fe}^{3+}$, $10^{-6,3}$ $\mu\text{mol Fe}(\text{OH})^{2+}(\text{Fe})$ en $10^{-6,3}$ $\mu\text{mol H}_2\text{FeO}_3^-(\text{Fe})$ per liter in oplossing zijn. Inderdaad blijkt dus, dat Fe(III)-ionen geen rol van betekenis spelen.

De redoxpotentiaal van het oppervlaktewater zal voornamelijk worden bepaald door de opgeloste O_2 , volgens de in principe reversibele vergelijking: $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightleftharpoons 4\text{OH}^-$.

Voor de redoxpotentiaal leidt Cooper hieruit de volgende vergelijking af

$$E^h = 1,234 - 0,058 \text{ pH} + 0,0145 \log p\text{O}_2$$

waarin de $p\text{O}_2$ de partiële zuurstofspanning in atmosferen voorstelt.

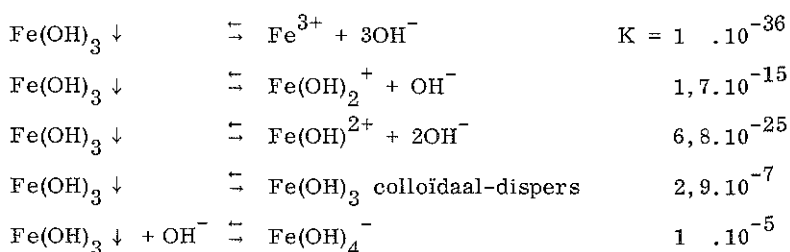
De weergegeven vergelijking is berekend op basis van een pKw waarde van 14,23. Dit is de pKw waarde bij 18°C; de vergelijking is daarom slechts bij deze temperatuur geldig. Bij een andere temperatuur dient een nieuwe vergelijking te worden afgeleid. Bij een pH = 7 en bij evenwicht met atmosferische lucht, zal de berekende potentiaal bij 0°C en bij 25°C respectievelijk 0,86 en 0,80 V bedragen. De beste waarde voor een in natuurlijk water gemeten redoxpotentiaal is volgens Hutchinsonson (1957) 0,52 V. Een mogelijke verklaring voor deze afwijking van de theoretische waarde is, dat met een platina elektrode geen reversibele, doch irreversibele zuurstofpotentialen worden gemeten.

In oppervlaktewater worden E^h waarden gemeten van 0,4 V - 0,5 V, gecorrigeerd naar een pH = 7. De in het algemeen geringe afwijking van de 0,52 V waarde kan worden verklaard door de aanwezigheid van reducerend anorganisch of organisch materiaal.

Op grond van deze hoge E^h waarden, moet op grond van Cooper's vergelijking dus geconcludeerd worden, dat de relatief hoge ijzerconcentraties in oppervlaktewater, niet kunnen worden verklaard door de aanwezigheid van Fe(II)-ionen.

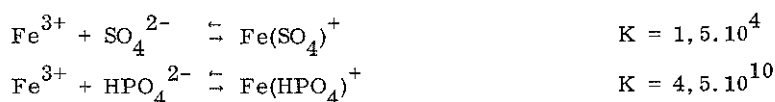
Meer recent onderzoek over de oplosbaarheid van ferrihydroxide stamt van Gayer en Woontner (1956) en Feitknecht (1959). Zowel Gayer en Woontner als Feitknecht vonden in het pH bereik 6-11 een redelijk constante ijzerconcentratie van respectievelijk $2,9 \cdot 10^{-7}$ en $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Gayer en Woontner postuleerden voor dit pH bereik het volgende evenwicht: $\text{FeOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Fe(OH)}_3$. De gemiddelde oplosbaarheid van het Fe(OH)_3 zou zoals vermeld $2,9 \cdot 10^{-7}$ mol/l bedragen. Aanvankelijk werd vermoed, dat het Fe(OH)_3 moleculair-dispers in oplossing was, doch latere experimenten (Lengweiler et al., 1961) wezen uit dat het ijzer in colloïdaal-disperse vorm aanwezig was.

In hun overzichtsartikel, handelend over de chemie van ijzer in natuurlijk water, geven Stumm en Lee (1960) de volgende vergelijkingen, die de oplosbaarheid van ferrihydroxide zouden beheersen:



Een met amorf ferrihydroxide verzadigde oplossing, zal bij een pH = 7 10^{-15} mol/l Fe^{3+} , $6 \cdot 10^{-11}$ mol/l Fe(OH)^{2+} , $2,8 \cdot 10^{-8}$ mol/l Fe(OH)_2^+ , 10^{-12} mol/l Fe(OH)_4^- en $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l Fe(OH)_3 colloïdaal-dispers kunnen bevatten. In het totaal komt dit neer op $3,2 \cdot 10^{-7}$ mol Fe(III)/l. In de regel kan de in het oppervlaktewater voorkomende hoeveelheid ijzer hiermee niet verklaard worden. De vraag moet worden gesteld of complexvorming en polymerisatie van hydroxoferriionen voor deze discrepantie verantwoordelijk kunnen worden gesteld.

Met betrekking tot de complexvorming, zijn de volgende reacties mogelijk van belang:



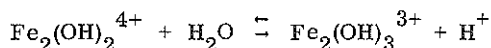
Voor het uitspreken van een oordeel over de vraag in hoeverre de ijzerconcentraties in natuurlijk oppervlaktewater verklaard kunnen worden met behulp

van deze vergelijkingen, is het nodig de SO_4^{2-} en de HPO_4^{2-} concentraties te kennen. Op dit vraagstuk zal nog nader worden teruggekomen.

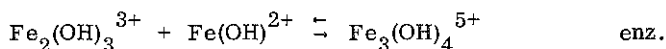
Polymerisatie kan optreden volgens de vergelijking:



Gezien de geringe concentratie van het $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ ion bij $\text{pH} = 7$, kan deze polymerisatie niet tot een aanmerkelijke verhoging van de ijzerconcentratie leiden. Het dimeer kan gehydrolyseerd worden volgens



waarna het zo ontstane driewaardige ion in een polymerisatiereactie kan opgaan:



Dit kan uiteindelijk leiden tot de vorming van onoplosbare ijzerprecipitaten. De positief geladen ferrihydroxocomplexen komen vooral voor in zwakzure tot neutrale oplossingen. In natuurlijk water kunnen deze complexen - mogelijk gestabiliseerd door organisch materiaal - colloïdaal-dispers bestaan. In hoeverre dit een werkelijke bijdrage levert aan het in oppervlaktewater aanwezige ijzer, kan door gemis aan kwantitatieve gegevens niet worden beoordeeld.

Bij de voorgaande beschouwingen moet worden opgemerkt, dat de waarden der vermelde evenwichtsconstanten in de regel slechts benaderingen zijn. Ondanks deze onzekerheid lijkt het toch gerechtvaardigd om te concluderen, dat de in natuurlijk oppervlaktewater gemeten ijzerconcentraties niet kunnen worden verklaard door het bestaan van ijzerverbindingen van anorganische aard.

Reeds lang is bekend, dat hoge ijzerconcentraties vaak voorkomen in sterk door organisch materiaal gekleurde wateren (Aschan, 1906). Een der eerste onderzoeken naar de aard van de waargenomen ijzerstabilisatie stamt van Ohle (1935). Recent onderzoek werd verricht door o.a. Shapiro (1964, 1966). Extractie van de "gele organische zuren" uit verschillende oppervlaktewateren leidde tot preparaten met een uiteenlopende ijzerbindingscapaciteit van 6-15 $\mu\text{mol Fe/mg}$ zuur bij $\text{pH} = 7$. Door middel van gelfiltratie

kon Shapiro (1966) aantonen, dat de verkregen extractiepreparaten steeds uit dezelfde vier componenten bestonden. De hoogmoleculaire componenten toonden het grootste peptisatievermogen. Het verschil in ijzerbindend vermogen van de extractiepreparaten kon Shapiro nu verklaren uit deze wisselende samenstelling.

Of aan deze processen in natuurlijk water een belangrijke rol toekomt bij de realisatie van de gemeten ijzerconcentraties, staat nog niet vast. Daar de organische aspecten van de ijzerchemie niet van direct belang zijn voor de ontwikkeling van onze proefopstelling, volstaan wij met een verwijzing naar de voor dit aspect relevante literatuur (Hutchinson, 1957; Johnston, 1964; Duursma et al., 1966).

Samenvattend kan worden gesteld, dat in een waterig milieu waarin de opgeloste zuurstof in evenwicht is met de zuurstof in de atmosferische lucht en waarin geen reducerende stoffen aanwezig zijn, het ijzer bij $\text{pH} = 7$ slechts als Fe(III) kan bestaan. Een geaereerd systeem dat met ferrihydroxide verzadigd is, kan op grond van de gegeven vergelijkingen ongeveer $3,2 \cdot 10^{-7}$ mol $\text{Fe(III)}/\text{l}$ - voornamelijk in colloïdaal-disperse vorm - bevatten.

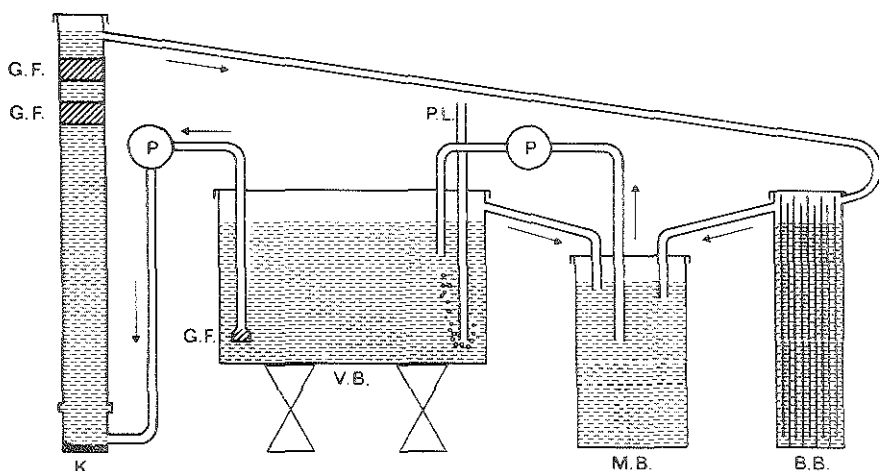
§ 2. BESCHRIJVING VAN DE PROEFOPSTELLING

Teneinde de ijzeropname met behulp van het isotoop $^{59}\text{Fe(III)}$ kwantitatief te kunnen bestuderen, dienen we te beschikken over een milieu, waarin zowel de ijzerconcentratie als de specifieke activiteit van dit ijzer voor langere duur constant blijft. Het constant zijn van genoemde factoren stelt ons namelijk in staat uit de opgenomen hoeveelheid actief ijzer direct de hoeveelheid reëel opgenomen ijzer te deduceren.

De inleiding tot dit hoofdstuk handelde over aspecten van de ijzerchemie in waterig milieu. Naar voren is gekomen, dat als de fractie opgelost ijzer in evenwicht is met een fractie ferrihydroxide als neerslag, de concentratie van het oplosbare ijzer ongeveer $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l kan bedragen. Hierbij is nog niet inbegrepen het ijzer dat eventueel ten gevolge van polymerisatie en complexvorming in oplossing is. Zoals naar voren is gebracht, kunnen over laatstgenoemde ijzerfracties weinig of geen kwantitatieve uitspraken worden gedaan.

Door ons nu van bovengenoemd evenwicht te verzekeren, is een milieu met een constante ijzerconcentratie te realiseren. De ontwikkelde proef-

opstelling is dus gebaseerd op het verkrijgen en handhaven van het evenwicht tussen opgelost ijzer en ijzer aanwezig als ferrihydroxideneerslag. In principe bestaat de opstelling (fig. III, 1) uit een gesloten circulatesysteem, waarbinnen kunstmatig zoetwater continu langs een ferrihydroxideneerslag wordt gepompt. Voor de samenstelling van het kunstmatig zoetwater wordt verwezen naar hoofdstuk II. Deze opzet brengt met zich mee, dat er voorzieningen moeten worden getroffen om eventueel losgeraakt ferrihydroxideneerslag uit de circulatie te nemen.



Figuur III, 1.

Schematische weergave van de kolomopstelling.

V.B. : Visbak inhoud 40 cm x 25 cm x 25 cm.

M.B. : Monsterbak inhoud 30 cm x 20 cm x 30 cm.

B.B. : Bezinkingsbak inhoud 12 cm x 12 cm x 35 cm.

K. : Kolom met ferrihydroxideneerslag.

P. : Eheim circulatiepomp, magnetisch aandrijfmecanisme geplastificeerd.

G.F. : Glaswolfilter

P.L. : Persluchttoevoer.

Het water wordt vanuit de bak (V.B.) waarin zich de vis gedurende de experimentele periode bevindt, via een kolom (K.) dat het ferrihydroxideneerslag bevat, gepompt naar een bezinkingsbak (B.B.). Vanuit deze bezinkingsbak stroomt het water ten gevolge van het drukverschil in de monsterbak. Vanuit de laatste bak wordt het water voorts in de visbak teruggepompt. Een overloop van de visbak naar de monsterbak zorgt er voor, dat

de hoeveelheid water in de visbak bij het nemen van watermonsters niet verandert. Glaswolfilters boven in de kolom voorkomen, dat losgeraakt grof ferrihydroxide in de circulatie komt. Eventueel ontsnapte deeltjes neerslag worden in de bezinkingsbak weggevangen. De snelheden waarmee het water van de visbak via de kolom en de bezinkingsbak naar de monsterbak en van de monsterbak naar de visbak wordt gepompt, bedragen respectievelijk 30 (25-40) en 100 ml/min. De temperatuur bedraagt 22 (21-23)⁰C. De visbak wordt met behulp van perslucht geaereerd.

Teneinde de diverse problemen betreffende het werken met de beschreven opstelling duidelijk te maken, volgt hier een beschrijving van de voorbereiding van een experiment.

Op de bodem van de kolom brengen we een bepaalde hoeveelheid ferrihydroxideneerslag. De hoeveelheid wordt berekend aan de hand van de gewenste hoeveelheid radioactiviteit in het water. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het feit, dat de specifieke activiteit van het ferrihydroxideneerslag in de loop van de tijd gelijk wordt aan de specifieke activiteit van het ijzer in het water, zoals uit het volgende zal blijken.

Bij een te realiseren activiteit A_w dpm/5 ml in het water zal in de 40 l die de opstelling bevat $40 \times 200 \times A_w$ dpm aanwezig moeten zijn. Wordt er nu in het totaal A_t dpm toegevoegd, dan zal bij evenwicht ($A_t - A_w \times 40 \times 200$) dpm in het ferrihydroxideneerslag zijn gebonden. Daar de specifieke activiteiten van het ijzer in het neerslag en van het ijzer in het water - in geval van evenwicht - aan elkaar gelijk zijn, zal nu gelden:

$$\frac{A_w \times 200}{[Fe]} = \frac{(A_t - A_w \times 40 \times 200)}{X}$$

$$X = [Fe] \times \frac{(A_t - A_w \times 40 \times 200)}{A_w \times 200}$$

waarin $[Fe]$ de concentratie in $\mu\text{mol/l}$ van het ijzer in het water voorstelt en X het aantal micromolen ijzer is, dat het ferrihydroxideneerslag dient te bevatten.

Zoals uit onze proeven bleek, variëren de ijzerconcentraties $[Fe]$ van experiment tot experiment, doch zij blijven gedurende een bepaald experiment constant. De marge waarbinnen de ijzerconcentraties van experiment tot experiment variëren bleek 0,10 - 0,26 $\mu\text{mol/l}$ te zijn. Voor de berekening van

X wordt de ijzerconcentratie $[\text{Fe}]$ steeds op $0,18 \text{ } \mu\text{mol/l}$ gesteld. In concreto: Staat ons bijvoorbeeld ongeveer $200 \text{ } \mu\text{C } ^{59}\text{FeCl}_3$ ter beschikking, dan wordt allereerst de activiteit nauwkeurig gemeten. Stel deze activiteit bedraagt $4 \cdot 10^8 \text{ dpm}$. Willen wij een activiteit van 2350 dpm/5 ml in het water realiseren, dan zal er een hoeveelheid ferrihydroxide aan de kolom moeten worden toegevoegd van:

$$X = 0,18 \times \frac{(4 \cdot 10^8 - 2350 \times 40 \times 200)}{2350 \times 200} = 146 \text{ } \mu\text{mol Fe(OH)}_3$$

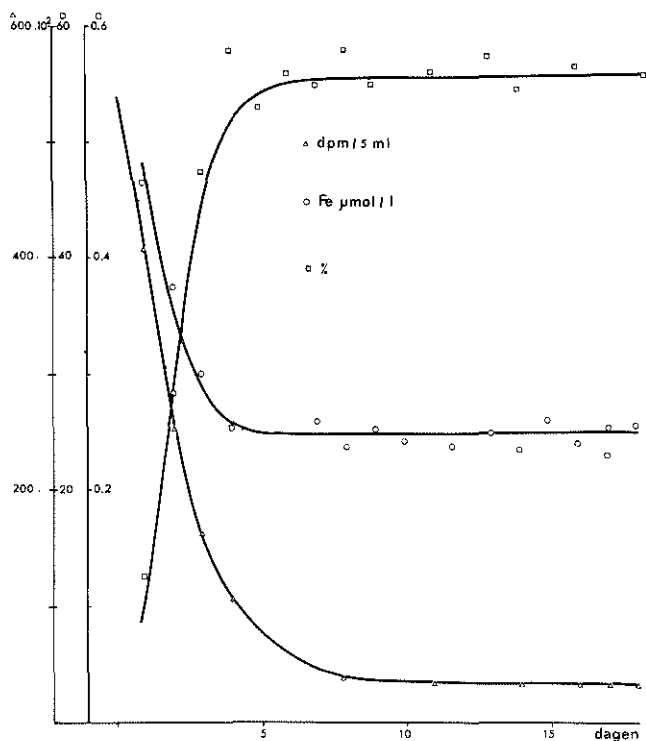
Bij de berekening wordt de hoeveelheid $^{56}\text{Fe(III)}$ in de speurdosis verwaarloosd (kleiner dan $0,5\%$). De berekende hoeveelheid van $146 \text{ } \mu\text{mol}$ ferrihydroxide wordt verkregen door uit een oplossing, die in 10 ml $146 \text{ } \mu\text{mol}$ FeCl_3 bevat, het ijzerhydroxide met behulp van $1 \text{ molair NaOH(OH}^-)$ neer te slaan. De pH mag niet hoger zijn dan 9 tot 10 , omdat bij hogere pH het ijzer in de vorm van het Fe(OH)_4^- ion tamelijk goed oplosbaar is. Het neerslag wordt kwantitatief naar de kolom overgebracht. Vervolgens wordt het kunstmatig zoetwater aan de opstelling toegevoegd.

§ 3. ENKELE GEGEVENS BETREFFENDE HET FUNCTIONEREN VAN DE PROEFOPSTELLING

Teneinde inzicht te krijgen in het functioneren van de opstelling zullen we de volgende parameters in de tijd vervolgen: de ijzerconcentratie, de radioactiviteit van het water en de ultrafiltreerbaarheid van het opgeloste ijzer. De ultrafiltreerbaarheid van het ijzer werd gekozen als een gemakkelijk meetbare parameter voor de deeltjesgrootte. De gebruikte technieken zijn in hoofdstuk II beschreven.

Het verloop der parameters in de tijd zullen we beschouwen aan de hand van de kolomopstelling waarvan de bereiding eerder werd beschreven (Fig. III, 2).

Zoals blijkt wordt ongeveer na 10 dagen een constant radioactiviteitsniveau gerealiseerd. Dit niveau (3240 dpm/5 ml) is niet gelijk aan het gewenste activiteitsniveau (2450 dpm/5 ml). Op de 10e dag heeft de ijzerconcentratie een vrijwel constante waarde van $0,24 \text{ } \mu\text{mol/l}$ bereikt. Daar de gestelde specifieke activiteit $((2450 \times 200) : 0,18 = 27,2 \cdot 10^5 \text{ dpm/} \mu\text{mol Fe})$ praktisch gelijk is aan de gerealiseerde specifieke activiteit $((3240 \times 200) :$



Figuur III, 2.

Verloop van de ultrafiltreerbaarheid van het ^{59}Fe , van het radioactiviteitsniveau en van de ijzerconcentratie in het milieu in de tijd.

- Ultrafiltreerbaarheid (%).
- △ Radioactiviteitsniveau (dpm/5 ml).
- Ijzerconcentratie ($\mu\text{mol/l}$).

$0,25 = 26,0 \cdot 10^5$ dpm/ $\mu\text{mol Fe}$), kan de afwijking van het gewenste radioactiviteitsniveau geheel worden verklaard door het feit dat de ontstane ijzerconcentratie hoger is dan bij de berekening werd aangenomen.

Op de 20e dag is een monster van het kolomneerslag genomen. De specifieke activiteit van dit monster bedroeg $26,7 \cdot 10^5$ dpm/ $\mu\text{mol Fe}$.

Op grond van de genoemde parameterwaarden kan dus worden geconcludeerd, dat zich in de loop van ruim een week een evenwicht instelt tussen het ijzer in het water en het ijzer in het ferrihydroxideneerslag. Aan de gestelde voorwaarde van een constante ijzerconcentratie en een constante specifieke activiteit is dan voldaan. Ook de ultrafiltreerbaarheid bereikt een constant niveau ($55 \pm 3\%$). Hieruit kan geconcludeerd worden, dat een groot gedeelte colloïdaal-dispers in oplossing is. Verder blijkt uit het feit dat de specifieke activiteit in alle fracties gelijk is, dat tussen de verschillende fracties een goede uitwisseling bestaat, hetgeen voor onze proefopzet een vereiste is.

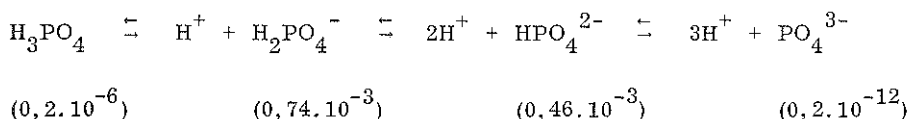
§ 4. SLOTOPMERKINGEN

De in onze kolomopstelling gerealiseerde ijzerconcentraties zijn lager dan de volgens Lee en Stumm (1960) mogelijke ijzerconcentraties. Zij stellen immers, dat bij neutrale pH 0,32 $\mu\text{mol/l}$ aan ijzer oplosbaar is in een met ferrihydroxide verzadigde oplossing. De gemiddelde constante ijzerconcentratie in onze kolomexperimenten bedraagt 0,18 $\mu\text{mol/l}$. Zoals uit § 1 blijkt zal het grootste gedeelte van het opgeloste ijzer in onze proefopzet moeten bestaan uit ferrihydroxide, dat grotendeels ultrafiltreerbaar is.

Een ander part kan bestaan uit Fe(III)-fosfaat complexen volgens:



Daar het kunstmatig zoetwater bereid is op basis van $1,2 \cdot 10^{-3}$ mol/l H_2PO_4^- , zal zich het volgende evenwicht instellen:



Nemen we voor het oplosbaarheidsprodukt van ferrihydroxide de waarde $1 \cdot 10^{-36}$, dan kan een Fe(III)-fosfaat concentratie worden berekend van $0,21 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{mol/l}$. De waarde $1 \cdot 10^{-36}$ geldt evenwel slechts voor een vers ferrihydroxidepreparaat. Voor een minder vers neerslag zal het oplosbaarheidsprodukt in de buurt van de $1 \cdot 10^{-38}$ liggen, waardoor de Fe(III)-fosfaat bijdrage tot $0,21 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol/l}$ wordt gereduceerd. Het zal duidelijk zijn, dat aan het ijzer-fosfaatcomplex geen rol van betekenis kan worden toegekend.

Dit blijkt ook uit de resultaten van een herhalingsexperiment, waar - na het bereiken van de evenwichtsfase - zowel in het kunstmatig zoetwater als in het ultrafiltraat van dit water de ijzer-fosfaat verhouding werd bepaald. De resultaten zijn in tabel III, 1 weergegeven.

De reductie van de ijzer-fosfaatverhouding in het ultrafiltraat kan geheel worden verklaard door de afgenomen ijzerconcentratie in het ultrafiltraat.

Tabel III, 1.

De ijzerconcentratie, de fosfaatconcentratie, de ijzer/fosfaatverhouding en de specifieke activiteit van het ijzer gemeten in de oorspronkelijke oplossing en in het ultrafiltraat van deze oplossing na het bereiken van de evenwichtssituatie.

	[Fe] $\mu\text{mol/l}$	[P] $\mu\text{mol/l}$	[Fe]/[P]	spec. activiteit Fe(dpm/ μmol)
zoetwater	0,25	$1,1 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$25,3 \cdot 10^5$
ultrafiltraat	0,14	$0,9 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$24,7 \cdot 10^5$

HOOFDSTUK IV

OPNAME EN UTILISATIE DOOR DE ZEELT VAN HET IN HET WATER OPGELOSTE IJZER

INLEIDING

Voor de bestudering van de opname en de utilisatie van het opgeloste ijzer door de zeelt, is gebruik gemaakt van de in hoofdstuk III beschreven proefopstelling. Zoals in dit hoofdstuk wordt uiteengezet, zijn de ijzerconcentratie en de specifieke activiteit van het in het experimentele milieu opgeloste ijzer in ieder experiment constante factoren. De ijzerconcentratie is niet zodanig te beïnvloeden, dat ze als een experimentele variabele kan worden ingevoerd. Op dit punt werd in hoofdstuk III eveneens uitvoerig ingegaan. Slechts de tijd gedurende welke de zeelt in de opstelling verblijft, kan worden gevarieerd. We hebben de volgende expositietijden gekozen: 1, 3, 6 en 10 dagen. De experimenten met een meerdaagse expositieduur zijn uitgevoerd over een periode van twee jaar (1971 en 1972). De experimenten met een ééndaagse expositieduur zijn uitgevoerd in 1972.

Tabel IV,1 geeft de verdeling van de experimenten over de verschillende maanden weer.

Oorspronkelijk was het de bedoeling de experimenten zo op te zetten, dat ook een mogelijke seizoensafhankelijke ijzeropname kon worden bestudeerd. De lange duur en de grote bewerkelijkheid van de experimenten maakten deze opzet evenwel praktisch onuitvoerbaar.

Zoals uit tabel IV,1 blijkt, zijn de - in verblijfsduur verschillende - experimenten gelijkmatig over de maanden mei t/m oktober verdeeld. Slechts de ééndaagse experimenten maken hierop een uitzondering. Als er een seizoens-

Tabel IV,1.

De verdeling van de naar de duur van het experiment geklassificeerde experimenten over de verschillende maanden van het jaar.

Dag(en)	1		3		6		10	
Sexe	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Maand:								
mei			1		1		1	1
juni			1	2	2	2		
juli			2	1	1	1	1	1
augustus					1	1	1	1
september	2	1		1	1	1	1	1
oktober		1	1			1	1	2

invloed op de ijzeropname bestaat, zal deze proefopzet leiden tot een toename van de variantie binnen de drie groepen met meerdaagse expositieduur. De invloed op de variantie tussen deze drie groepen zal van minder belang zijn. Daar er geen verschillen in de resultaten tussen vergelijkbare - in 1970 en 1971 uitgevoerde - experimenten kunnen worden aangetoond, worden ze in het vervolg onder één noemer geplaatst.

De zeelten die voor deze experimenten werden gebruikt, verbleven vooraf niet langer dan 3 weken in het laboratorium. Voordat de op het oog gezonde vissen in het kunstmatig zoetwater van de kolomopstelling werden overgebracht, maakten ze een acclimatieperiode van 10 dagen in het kunstmatig zoetwatermilieu door. Dit gebeurde om de eventueel - onder invloed van de milieuverandering - opgetreden wijziging van de drinkratio van de vis, voor de aanvang van het experiment te stabiliseren. Voor de invloed van veranderingen van de osmolaliteit op de drinkratio wordt verwezen naar hoofdstuk VI. De experimenten werden zo gepland, dat na beeindiging van de acclimatieperiode het radioactiviteitspeil en de ijzerconcentratie van het proefmilieu constant waren geworden, zodat overbrenging van de vissen vanuit het acclimatiemilieu naar het proefmilieu onmiddellijk kon plaatsvinden. De chemische samenstelling van het acclimatiemilieu was identiek aan die van het water in de proefopstelling. De temperatuur en de osmolaliteit bedroegen respectievelijk 23°C en 25 mosmol/kg.

Gedurende de experimentele periode werden het radioactiviteitspeil, de ultrafiltreerbaarheid van het ijzer en de pH van het water gevolgd. In de regel werd de ijzerconcentratie in het milieu na beeindiging van de proef-

periode bepaald. In enkele experimenten gebeurde dit eveneens aan het begin van de proef.

Na beëindiging van de proef werden de diverse organen en weefsels van de vis bloedvrij gespoeld en vervolgens op radioactiviteit en ijzergehalte onderzocht. Aan de laatstgenoemde metingen ging een bepaling van het nat en droog gewicht vooraf. Van het genomen bloedmonster werden in de regel 1 ml totaal bloed en 1 ml gewassen erythrocyten op radioactiviteit en ijzergehalte onderzocht. Ook het ijzergehalte van het plasma, de totale bindingscapaciteit van het plasma en de radioactiviteit van het plasma-ijzer zijn steeds gemeten. Van de nier, de kopnier en de gewassen erythrocyten is steeds een bekend gedeelte apart gehouden voor de meting van de radioactiviteit en het hemegehalte in de heme fractie. Op grond van deze metingen kon de specifieke activiteit van het heme-ijzer worden berekend.

Het is praktisch niet uitvoerbaar om het totale spierweefsel, het totale skeletweefsel en de totale hoeveelheid bloed aan een ijzerbepaling te onderwerpen. In genoemde gevallen moest dus worden volstaan met het nemen van een monster. Voor de omrekening naar de totale hoeveelheid ijzer respectievelijk radioactiviteit welke in genoemde weefsels aanwezig is, wordt verwezen naar hoofdstuk II. Voor een gedetailleerde beschrijving van de in dit hoofdstuk gebruikte meettechnieken zij eveneens naar hoofdstuk II verwezen.

We zullen dit hoofdstuk indelen in drie paragrafen, waarvan de eerste paragraaf zal handelen over de ijzeropname van de vis uit het milieu; de tweede paragraaf geeft een globale beschrijving van het ijzermetabolisme op orgaanniveau. In de laatste paragraaf zullen we proberen het ijzermetabolisme op orgaanniveau kwantitatief te benaderen. We zullen hierbij ingaan op twee verschillende rekenmethoden en hun mogelijke toepassing.

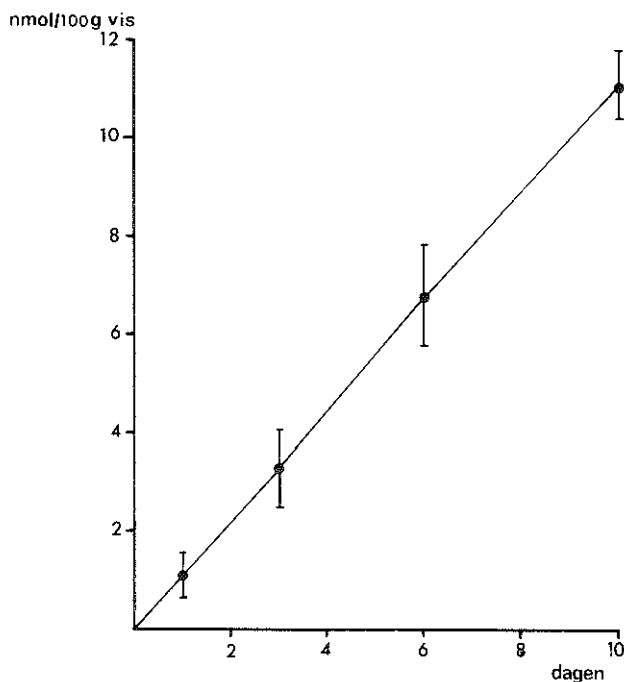
§ 1. DE IJZEROPNAME VANUIT HET WATER IN DE GEHELE VIS

De ijzeropname kan worden berekend op basis van de totale hoeveelheid radioactiviteit die in de vis wordt aangetroffen. Dit is mogelijk, omdat in principe in het milieu waaruit de ijzeropname plaatsvindt, aan de twee volgende voorwaarden is voldaan:

1. constantheid van de specifieke activiteit van het opgeloste ijzer gedurende de proefperiode,
2. gelijkheid van de specifieke activiteit van het ijzer in de diverse ijzer-verbindingen.

Bedraagt nu de opgenomen hoeveelheid radioactiviteit A dpm en is de specifieke activiteit van het opgeloste ijzer B dpm/ μ mol Fe, dan wordt een ijzeropname berekend van $\frac{A}{B} 10^3$ nmol Fe. De onderstaande figuur laat zien hoe de aldus berekende ijzeropname in de tijd toeneemt (fig. IV,1).

Volledigheidshalve wordt hier vermeld welke organen, weefsels en andere fracties aan de totale hoeveelheid radioactiviteit hun bijdrage leverden: bloed, kieuw, nier, milt, lever, gal, gonaden, darm, darminhoud, spier en skelet. Er werd aangenomen, dat 5% van de totale hoeveelheid radioactiviteit in de niet gemeten restfracties aanwezig is.



Figuur IV,1.

De op grond van de gemeten radioactiviteitsopname berekende ijzerabsorptie door de zeelten in nmol/100 g vis als functie van de tijd. Weergegeven is de gemiddelde waarde $\pm$ s.d.

De gemiddelde ijzeropname per 24 uur per 100 g lichaamsgewicht bedraagt voor de vrouwelijke zeelten (n=18) 1,18 nmol en voor de mannelijke zeelten (n=18) 1,05 nmol. Dit is geen significant verschil op basis van Student's t-test.

Het zal duidelijk zijn, dat deze methode ons slechts in staat stelt de netto ijzeropname te berekenen, aangezien het verlies van ijzer aan het milieu binnen deze opstelling niet kan worden gemeten. Toch zullen we informatie moeten hebben over de ijzeruitscheiding en met name over de invloed van dit uitgescheiden ijzer op de specifieke activiteit van het in het milieu opgeloste ijzer. Immers op basis van het constant blijven van de specifieke activiteit wordt de netto opname berekend. Bij de berekening van de netto ijzeropname is aangenomen, dat de ijzeruitscheiding een te verwaarlozen invloed heeft op de specifieke activiteit van het opgeloste ijzer. Evidentie dat deze aanname juist is, volgt enerzijds uit metingen van de specifieke activiteit aan het begin en na afloop van de proef. In de 5 zo uitgevoerde experimenten - waarvan 3 tiendaagse en 2 zesdaagse - konden binnen de nauwkeurigheid van de meettechnieken geen systematische verschillen in de specifieke activiteit worden aangetoond. Anderzijds zal aan de resultaten van dit hoofdstuk in combinatie met die van hoofdstuk VI verdere evidentie voor de juistheid van de aanname worden ontleend.

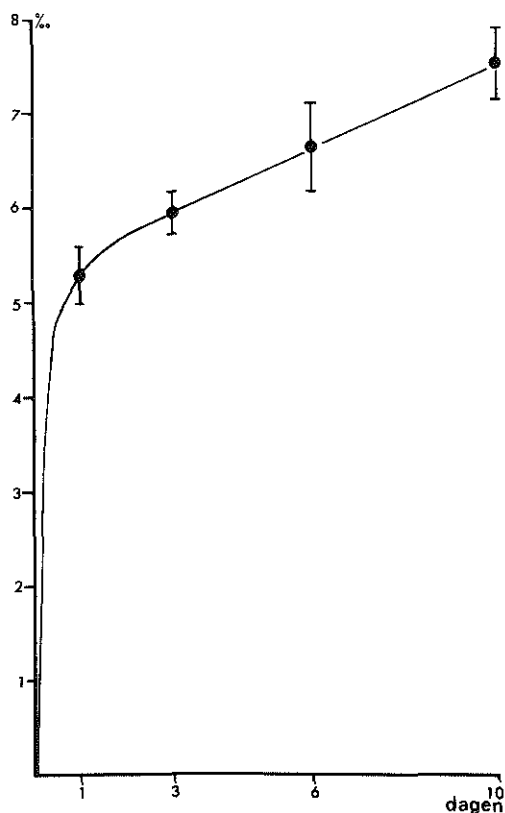
§ 2. GLOBALE WEERGAVE VAN DE VERKREGEN RESULTATEN OVER HET IJZERMETABOLISME OP ORGAANNIVEAU

Zoals in § 1 van dit hoofdstuk is beschreven, meten wij na het destrueren van de diverse organen zowel het ijzergehalte als de radioactiviteit van de organen. We kunnen dus de specifieke activiteit van het orgaan-ijzer berekenen.

De specifieke activiteiten van de overeenkomstige organen van verschillende proefdieren zijn, binnen een serie experimenten met gelijke expositieduur, niet direct vergelijkbaar. Dit komt, doordat de specifieke activiteit van het in het water opgeloste ijzer van experiment tot experiment verschilt. Vergelijkbare resultaten worden verkregen als voor ieder individueel experiment alle specifieke activiteiten worden uitgedrukt als percentage van de specifieke activiteit van het in het water opgeloste ijzer, dus als relatieve specifieke activiteiten. Voor de relatieve specifieke activiteiten van het plasmaijzer en van het orgaanijzer worden zo evenwel zeer uiteenlopende waarden verkregen. Deze zijn niet collectief op een lineaire schaal grafisch weer te geven.

Een modificatie van de beschreven procedure is de specifieke activiteit van het orgaanijzer uit te drukken in een percentage van de specifieke

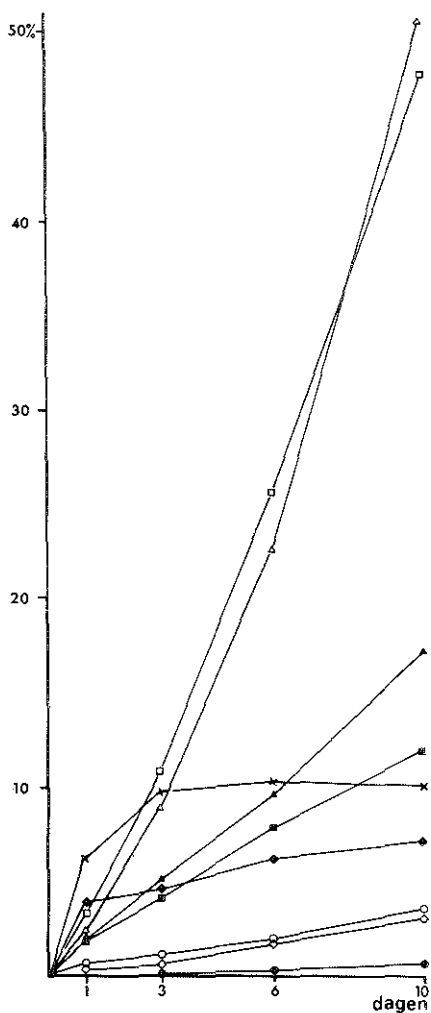
activiteit van het plasmaijzer. De specifieke activiteit van het plasmaijzer wordt weergegeven als een percentage van de specifieke activiteit van het opgeloste ijzer. De genoemde schaalproblemen doen zich hierbij niet meer voor. De op deze manier verkregen numerieke waarden voor de relatieve specifieke activiteit van het plasmaijzer respectievelijk van het orgaanijzer zijn als functie van de expositieduur in de figuren IV,2 en IV,3 grafisch weergegeven.



Figuur IV,2.

Het verloop van de relatieve specifieke activiteit van het plasmaijzer als functie van de tijd. De specifieke activiteit van het ijzer in het milieu is op 100% gesteld.

Figuur IV,3

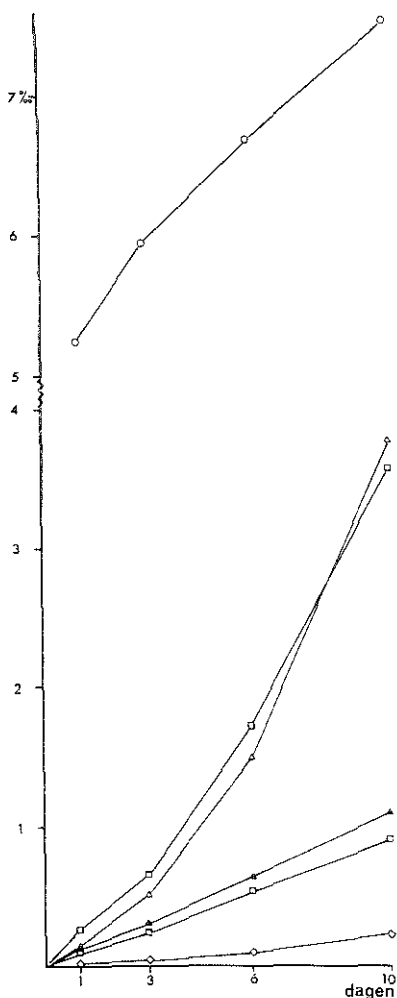


Figuur IV,3.

Het verloop van de relatieve specifieke activiteit van het orgaanijzer en van het ijzer in de heminefractie van enkele organen als functie van de tijd. De specifieke activiteit van het plasmaijzer is op 100% gesteld.

△ hemineijzer kopnier; □ hemineijzer nier; ▲ totaal ijzer kopnier; ■ totaal ijzer nier; ◇ hemineijzer erythrocyten; ○ totaal ijzer lever; ● totaal ijzer milt; × totaal ijzer darm; ◆ totaal ijzer kieuw.

Figuur IV,4



Figuur IV,4.

Het verloop van de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in de erythropoietische organen, in de perifere erythrocyten en in het plasma en van het ijzer in de heminefractie van erythropoietische organen. De specifieke activiteit van het ijzer in het milieu is op 100% gesteld.

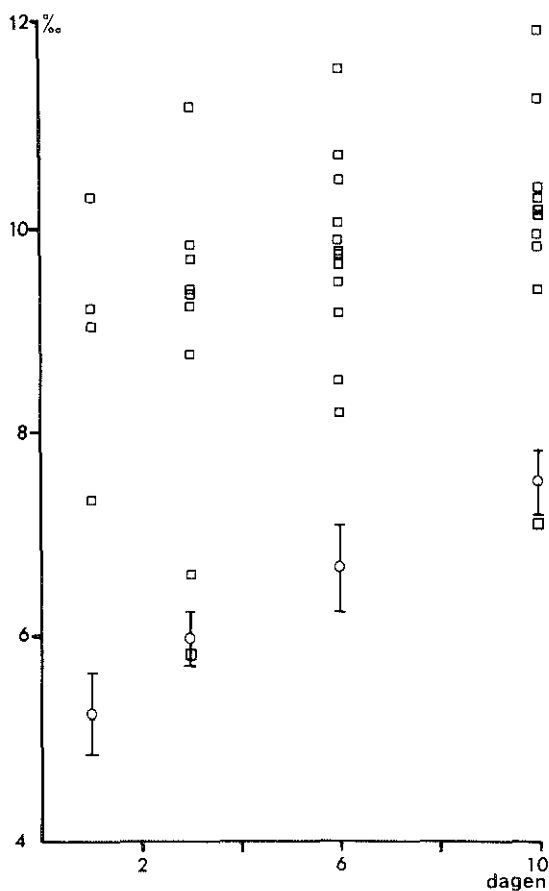
○ ijzer plasma; ▲ totaal ijzer kopnier; ■ totaal ijzer nier; ◇ totaal ijzer erythrocyten; △ hemineijzer kopnier; □ hemineijzer nier.

Tenzij anders vermeld, zal in het vervolg onder de relatieve specifieke activiteit van het orgaanijzer steeds de specifieke activiteit van het orgaanijzer als percentage van het plasmaijzer worden verstaan. De relatieve specifieke activiteit van het plasmaijzer is zonder uitzondering bedoeld als percentage van de specifieke activiteit van het opgeloste ijzer in het milieu.

De relatieve specifieke activiteit van het plasmaijzer blijkt na 3 dagen lineair met de tijd toe te nemen. Opvallend is, dat de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in de darmwand na 3 dagen slechts 10% bedraagt, wat dus neerkomt op ongeveer 1/10 van de relatieve activiteit van het ijzer in het plasma. Als we aannemen, dat de darmwand voor de ijzeropname vanuit het water verantwoordelijk is, dan moeten we concluderen dat het door de darmwand uit het water opgenomen ijzer niet of niet volledig - alvorens aan het plasma te worden doorgegeven - met het in de darmwand aanwezige depot ijzer wordt vermengd. Er moet met andere woorden op zijn minst het bestaan van twee ijzerpools in de darm worden aangenomen die zich wat het kinetisch gedrag van het ijzer betreft duidelijk van elkaar onderscheiden. De in § 3 van dit hoofdstuk beschreven lineaire ijzeropname met de tijd is zeer goed met het genoemde mechanisme in overeenstemming te brengen. Het is evenwel de vraag of de darm de enige plaats is waar het ijzer uit het water wordt opgenomen. Zo zouden bijvoorbeeld de kieuwen mogelijk een rol in de ijzerresorptie kunnen spelen. In hoofdstuk VI zal op de rol van de kieuw in de ijzerstofwisseling nader worden ingegaan.

Zoals reeds is vermeld, is in fig. IV, 3 het verloop van de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in de diverse organen tegen de tijd uitgezet. In de regel blijkt de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in de verschillende organen veel lager te zijn dan de op 100% gestelde specifieke activiteit van het plasmaijzer. Het transport van radioactief ijzer vanuit het plasma naar de organen blijkt dus na 10 dagen het transport van radioactief ijzer van de organen naar het plasma nog duidelijk te overtreffen. Op grond van de in § 3 berekende ijzeropname moet dit ook worden verwacht. Bij een totale ijzervoorraad van $42 \mu\text{mol Fe}/100 \text{ g vis}$ en bij een dagelijkse ijzeropname vanuit het water van $1,18 \text{ nmol Fe}/100 \text{ g vis}$ zou, onder aanname van een te verwaarlozen ijzerverlies, minimaal eerst na $42/1,18 \cdot 10^{-3} = 36 \cdot 10^3$ dagen de totale ijzervoorraad vervangen kunnen zijn.

In fig. IV, 5 zijn de numerieke waarden van de relatieve specifieke activiteit van ijzer in de gal in grafiek gebracht. De specifieke activiteit van het milieuijzer is hierop 100 procent gesteld in afwijking van de ge-



Figuur IV, 5.

De relatieve specifieke activiteit van het ijzer in het plasma en van het ijzer in de gal als functie van de tijd. Specifieke activiteit van het milieu-ijzer is 100%.

□ ijzer in het plasma; ○ ijzer in de gal.

bruikte procedure beschreven in het begin van deze paragraaf. Opvallend is, dat in het algemeen zeer hoge waarden voor de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in de gal worden gevonden. Op enkele uitzonderingen na geldt, dat de specifieke activiteit van het ijzer in de gal groter is dan de specifieke activiteit van het plasmaijs. Voorts geldt voor alle experimenten, dat de specifieke activiteit van het plasmaijs hoger is dan de specifieke activiteit van het ijzer in de lever. Er is slechts één aannemelijke

hypothese te formuleren om dit verschijnsel te verklaren. Het in de darmwand opgenomen milieuijzer wordt zonder noemenswaardige verlaging van de specifieke activiteit doorgegeven aan het plasma. Dit ijzer met zijn hoge specifieke activiteit wordt via het "poortadersysteem" naar de lever getransporteerd, waar het langs verschillende metabole wegen kan worden verwerkt. Eén van deze wegen is het galvormend systeem dat het ijzer zonder noemenswaardige verdunning via een ijzerpool secreteert.

§ 3. KWANTITATIEVE BENADERING VAN HET IJZERMETABOLISME OP ORGAANNIVEAU

In het volgende zal worden onderzocht in hoeverre de verkregen resultaten ook kwantitatieve uitspraken over het ijzermetabolisme mogelijk maken. In het bijzonder zal worden nagegaan of de toepassing van de begrippen utilisatie en vernieuwingssnelheid leidt tot betrouwbare kwantitatieve interpretaties van de experimentele gegevens.

a. Utilisatie

Het begrip utilisatie is op zichzelf weinig zeggend. Daarom zullen we in dit verband utilisatie definiëren als: de hoeveelheid ijzer die een orgaan per tijdseenheid uit het plasma opneemt. De grootte utilisatie zal worden uitgedrukt in $\mu\text{mol}/\text{dag}$. Onder condities van een "steady state" zal de ijzeropname uiteraard gelijk zijn aan de ijzerafgifte. We nemen aan, dat het door een orgaan opgenomen ijzer geheel afkomstig is uit het in het plasma aanwezig transferrine-ijzer. Het door een orgaan afgegeven ijzer zal enerzijds bestaan uit ijzer dat - hetzij extravasculair, hetzij intravasculair - direct aan transferrine wordt gebonden, anderzijds uit ijzer dat verwerkt is in de verschillende orgaanmetaboliëten. Onder orgaanmetaboliëten kunnen bijvoorbeeld worden verstaan het hemoglobineijzer, het ijzer in de galvloei-stof en dergelijke. De utilisatie kan worden berekend op basis van het verloop van de relatieve specifieke activiteit van het plasmaijzer en van het ijzer in het betreffende orgaan, gedurende een bepaalde tijdspanne. We zullen een formule voor de utilisatie afleiden en tevens enkele implicaties van de formule bespreken.

Stel de hoeveelheid radioactiviteit in een orgaan is q , dit is een tijdsafhankelijke. Stel de specifieke activiteit van het plasmaijzer is p , ook

deze grootheid is afhankelijk van de tijd. Voorts stelt u de hoeveelheid ijzer voor welke door een orgaan uit het plasma is opgenomen. Ook u is van de tijd afhankelijk.

Voor het verband tussen $p(t)$, $q(t)$ en $u(t)$ geldt nu:

$$\frac{dq(t)}{dt} = p(t) \frac{du(t)}{dt} \quad \text{of}$$

$$u(t) = \int \frac{1}{p(t)} dq(t)$$

Met deze formule kan uit het gemeten verloop van de specifieke activiteit en de gemeten toename van de radioactiviteit in een orgaan de utilisatie worden berekend. Voor de ijzeropname door het orgaan tussen de tijdstippen t_2 en t_1 geldt nu:

$$u(t) \Big|_{t_1}^{t_2} = \int_{t_1}^{t_2} \frac{1}{p(t)} dq(t)$$

zodat voor de utilisatie kan worden geschreven:

$$U = \frac{u(t) \Big|_{t_1}^{t_2}}{t_2 - t_1} = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \frac{1}{p(t)} dq(t)$$

Er werd reeds op gewezen, zie vorige paragraaf, dat in onze proefopzet het werken met relatieve specifieke activiteiten nuttig is. Vandaar dat wij genoemde formule hebben omgevormd door in plaats van $q(t)$ gebruik te maken van $o(t)$, het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in het orgaan. In de praktijk betekent dit de relatieve specifieke activiteit, dit maakt evenwel theoretisch geen verschil. Indien Fe org. het gemiddelde ijzergehalte in het orgaan aangeeft, geldt:

$$do(t) = \frac{1}{\text{Fe org.}} dq(t)$$

waaruit voor de ijzeropname tussen de tijdstippen t_2 en t_1 volgt

$$u(t) \Big|_{t_1}^{t_2} = \text{Fe org.} \int_{t_1}^{t_2} \frac{1}{p(t)} do(t)$$

Voor de utilisatie geldt nu:

$$U = \frac{u(t) \Big|_{t_1}^{t_2}}{t_2 - t_1} = \frac{Fe \text{ org.}}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \frac{1}{p(t)} do(t)$$

Uit het verloop van de specifieke activiteit van het plasmaiijzer en het orgaanijzer kan de utilisatie dus grafisch worden berekend.

De zo berekende utilisatie zal slechts dan betrouwbare informatie over de ijzeropname per dag leveren als mag worden aangenomen, dat gedurende de tijdspanne waarvoor de utilisatie is berekend, geen radioactiviteit door het orgaan is afgegeven. Op experimentele gronden kan vaak worden gesteld, dat $p(t) = k_1 t + k_2$, een lineaire afhankelijkheid van de tijd. De utilisatie is berekend in het traject waar $p(t)$ lineair met de tijd verandert (6e - 10e dag) en over een traject waar nog geen lineairiteit bestaat (1e - 3e dag).

Men kan zich afvragen hoe de specifieke activiteit van het ijzer in de organen als functie van de tijd behoort te verlopen bij genoemd lineair verband tussen $p(t)$ en de tijd.

$$do(t) = \frac{1}{Fe \text{ org.}} p(t) du(t)$$

$$\int_{t_1}^{t_2} do(t) = \frac{1}{Fe \text{ org.}} \int_{t_1}^{t_2} p(t) u'(t) dt$$

Als de utilisatie (U) constant is, dus onafhankelijk van de tijd, dan geldt:

$$u(t) = Ut \rightarrow u'(t) = U$$

$$\int_{t_1}^{t_2} do(t) = \frac{U}{Fe \text{ org.}} \int_{t_1}^{t_2} p(t) dt, \quad \text{dit gaat over in}$$

$$\int_{t_1}^{t_2} do(t) = \frac{U}{Fe \text{ org.}} \int_{t_1}^{t_2} (k_1 t + k_2) dt = \frac{U}{Fe \text{ org.}} \left(\frac{1}{2} k_1 t^2 + k_2 t + C \right)$$

De specifieke activiteit moet dus een tweede graads functie van de tijd zijn.

Als nu experimenteel een lineaire $o(t)$ functie wordt gevonden, dan kan dit

verklaard worden door aan te nemen, dat er in de periode waarover de utilisatie werd berekend, radioactief ijzer uit het orgaan verloren is gegaan. De rekenmethode geeft dan aanleiding tot onderschatting van de werkelijk opgenomen hoeveelheid ijzer per tijdseenheid, de gevonden utilisatie is te laag.

b. Vernieuwingssnelheid

We zullen hier het begrip vernieuwingssnelheid bespreken zoals dit door Zilversmit et al. werd gedefinieerd (1943). De vernieuwingssnelheid is de hoeveelheid van een stof die per tijdseenheid wordt vernieuwd. In dit verband is ook het begrip vernieuwingstijd van belang. De vernieuwingstijd definieert dezelfde auteur als de tijd nodig voor de vernieuwing van de totale hoeveelheid stof welke aanwezig is.

Terloops zij hier opgemerkt, dat dit niet de enig mogelijke definitie van de vernieuwingssnelheid is. Kleiber (1955), die de pool aan de basis van een theorie over vernieuwingssnelheden stelt, komt tot een andere definitie. Wel stemmen genoemde auteurs overeen wat de definitie van het begrip vernieuwingstijd betreft. Voor een uitgebreide bespreking over de theoretische aspecten die het begrip vernieuwingssnelheid opwerpt, wordt verwezen naar de publicatie van Leijnse (1964).

Zilversmit et al. gaven een eenvoudige rekenmethode om de vernieuwingssnelheid respectievelijk de vernieuwingstijd van een bepaalde stof in tracer experimenten te kunnen bepalen. Deze methode is gebaseerd op het verloop van de specifieke activiteit van de directe voorloper van de te onderzoeken verbinding en op het verloop van de specifieke activiteit van de te onderzoeken verbinding zelf.

Het zal duidelijk zijn, dat reeds hier, tegen de toepassing van de rekenmethode volgens Zilversmit voor het berekenen van vernieuwingssnelheden van het ijzer op orgaanniveau, ernstige bezwaren zijn aan te voeren. De experimentele gegevens stellen ons immers slechts in staat een parallel te trekken tussen respectievelijk de directe voorloper en het plasmaijszenerzijds en tussen de te onderzoeken stof en het totale orgaanijzer anderzijds. (In het meest gunstige geval kunnen we nog tussen het totale orgaanijzer en het ijzer in de heminefractie van het orgaan differentiëren.)

Wil men voorts de rekenwijze mogen toepassen, dan moet aan de volgende drie voorwaarden zijn voldaan:

1. "Steady state": de totale hoeveelheid van de verbinding, aanwezig op de plaats in het lichaam waarvoor men de vernieuwingssnelheid van die stof wil berekenen, moet constant zijn in het tijdsverloop waarover de berekening gemaakt wordt.
2. "Constant rate of appearance and disappearance": de snelheden van synthese en afbraak moeten gedurende de tijd constant zijn.
3. "Random appearance and disappearance": er wordt tijdens de vernieuwing geen onderscheid gemaakt tussen reeds enige tijd aanwezige moleculen en pas gevormde moleculen.

Wat de geldigheid van de twee eerste voorwaarden betreft dienen we te bedenken, dat de gebruikte zeelten weliswaar volwassen doch niet volgroeid zijn. Onder natuurlijke omstandigheden zullen de anabole processen de katabole processen overheersen. Tijdens de experimentele periode worden de vissen niet gevoed, hetgeen van negatieve invloed zal zijn op de anabole processen. Wat de derde voorwaarde betreft, wijst het onderzoek van Van Kreel (1972) naar de metabole aspecten van het ferritine erop, dat de anciënniteit van het ferritine molecuul wel degelijk van invloed is. "Random appearance and disappearance" kan dus niet zonder meer worden verondersteld, zodat men de rekenmethode in dit geval slechts zou kunnen toepassen op de "klasse" der evenoude moleculen.

Het aantal premissen, dat bij de toepassing van het utilisatiebegrip dient te worden aangenomen, is beduidend geringer dan bij de toepassing van het begrip vernieuwingssnelheid. We zullen daarom het ijzermetabolisme op orgaanniveau slechts met behulp van het begrip utilisatie proberen te kwantificeren.

Alvorens nader in te gaan op de utilisatie van het ijzer door de verschillende organen, zal eerst nog de verdeling van het ijzer over de organen van de zeelt - zoals deze in de hier beschreven experimenten werd gevonden - worden weergegeven (tabel IV, 2). Deze gegevens zijn immers noodzakelijk voor de berekening van de genoemde grootheid.

Tabel IV, 3 geeft de berekende utilisatiewaarden weer. De berekeningen zijn uitgevoerd voor twee perioden; 1e tot en met de 3e dag en 6e tot en met de 10e dag.

Voor de interpretatie van de verkregen waarden zullen we de diverse organen apart bespreken. Daar de berekende utilisatiewaarden voor de twee perioden niet essentieel verschillen, refereren we in het vervolg aan de over de 6e tot en met de 10e dag berekende waarden.

Tabel IV, 2.

Verdeling van het ijzer over de diverse organen en weefsels van de zeelt.
Het betreft hier gemiddelde waarden verkregen bij 36 proefdieren.

	gewicht (g)	ijzer-hoeveelheid (μmol)	ijzer-concentratie ($\mu\text{mol/g nat}$)
totale vis	290	120	0,42
bloed	11,4 *	38,8	3,5 **
plasma	7,8 *	0,07	0,015 **
nier	1,1	5,5	5,1
nierhemine		1,0	
kopnier	0,4	3,3	5,75
kopnierhemine		0,7	
milt	0,4	17,5	46,0
lever	3,2	35,3	11,2
darm	4,1	1,1	0,3
spier	135	8,8	0,07
skelet	120	2,4	0,02
rest	18	9,0	0,5

* Deze waarden zijn niet per gram maar per ml uitgedrukt.

** Niet op grambasis, maar op ml-basis berekend, uitgaande van een gemiddeld hematocriet van $0,32 \pm 0,03$ (l/l).

Tabel IV, 3.

De voor twee verschillende tijdsintervallen berekende utilisatie in $\mu\text{mol/dag}$. Voor de erythropoietische organen is de utilisatie niet slechts berekend voor het totale orgaan maar tevens voor de heminefractie afzonderlijk.

		Utilisatie ($\mu\text{mol Fe/dag}$)	
periode in dagen		1 t/m 3	6 t/m 10
nier	(Hemine Fe)	0,07	0,06
kopnier	(Hemine Fe)	0,06	0,05
nier	(totaal Fe)	0,09	0,07
kopnier	(totaal Fe)	0,07	0,06
lever	(totaal Fe)	0,19	0,17
milt	(totaal Fe)	0,02	0,02
spier	(totaal Fe)	0,04	0,04
skelet	(totaal Fe)	0,03	0,03

Nier en kopnier

De nier heeft bij de zeelt niet slechts een uitscheidingsfunctie, ze staat tevens in dienst van de hemopoiese. Topf (1953) en Haider (1968) konden aantonen, dat de nier en de kopnier de belangrijkste, zo niet de enige erythropoietische organen van de zeelt vormen. Hevesy et al. (1964) bepaalden de levensduur van de erythrocyten van de zeelt op ongeveer 150 dagen. Ze konden het bestaan van een aanzienlijk langer levende erythrocytenfractie niet volledig uitsluiten.

De gemiddelde hoeveelheid ijzer in het bloed van de zeelten-populatie in de hier beschreven ijzeropname experimenten bedroeg $39 \mu\text{mol}$. Gaan we uit van een levensduur van 150 dagen, dan zal er per dag $0,26 \mu\text{mol Fe}$ als hemoglobineijzer aan de circulatie moeten worden toegevoegd respectievelijk moeten worden onttrokken. De relatieve specifieke activiteit van het hemine-ijzer in de nier en in de kopnier vertonen een nagenoeg gelijke stijging in de loop van de tijd (fig. IV, 4). De erythropoietische activiteit van de nier zal dus niet essentieel van de erythropoietische activiteit van de kopnier verschillen.

Op grond van het aanwezige hemineijzer in de nier en in de kopnier berekenen wij voor de nier een Hb(Fe) productie van $0,16 \mu\text{mol}$ per dag en voor de kopnier een Hb(Fe) productie van $0,10 \mu\text{mol}$ per dag.

De uit empirische gegevens berekende ijzerutilisatie voor het heminecompartiment van de nier en de kopnier bedragen respectievelijk $0,06$ en $0,05 \mu\text{mol Fe}$ per dag. De berekening is uitgevoerd op basis van een in deze proefserie gevonden gemiddeld Fe(He) gehalte van $1,0 \pm 0,4 \mu\text{mol}$ voor de nier en $0,7 \pm 0,3 \mu\text{mol}$ voor de kopnier. De berekening van de utilisatie is geschied op grond van de eerder genoemde grafische methode, omdat er geen lineair verband bestond tussen de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in de heminefractie en de tijd. De rekenprocedure moet echter aanleiding geven tot een aanzienlijke onderschatting van de werkelijke utilisatiewaarden, daar er gedurende het tijdsverloop waarover de utilisatie wordt berekend een aanzienlijke hoeveelheid radioactiviteit aan de nieuw gevormde erythrocyten wordt afgestaan. Dit radioactiviteitsverlies is niet aan de hand van de stijging van de relatieve specifieke activiteit van het Fe(He) in de perifere erythrocyten te corrigeren.

Wel is het mogelijk voor het nier- en kopnier-heminecompartiment tesamen een correctie voor de ijzerleverantie naar het perifere erythrocyten-

compartiment in te voeren. We kunnen afleiden, dat voor de hoeveelheid ijzer die per tijdseenheid van het plasmacompartiment naar het heminecompartiment van nier en kopnier wordt vervoerd, geldt:

$$U = \frac{u(t) \Big|_{t_1}^{t_2}}{t_2 - t_1} = Fe_N \int_{t_1}^{t_2} \frac{x'(t)}{p(t)} dt + Fe_{kN} \int_{t_1}^{t_2} \frac{y'(t)}{p(t)} dt + Fe_E \int_{t_1}^{t_2} \frac{z'(t)}{p(t)} dt$$

Fe_N , Fe_{kN} en Fe_E stellen het ijzergehalte van het heminecompartiment van nier, kopnier en perifere erythrocyten voor. De functies $x(t)$, $y(t)$ en $z(t)$ geven het verloop van de relatieve specifieke activiteit van het hemineijzer in nier, kopnier en erythrocyten weer. De formule is gebaseerd op de aanname, dat er gedurende een experiment geen radioactief ijzer uit het erythrocytencompartiment verloren gaat. Daar de levensduur van de erythrocyten in vergelijking tot de duur van een experiment zeer lang is, mag worden aangenomen dat de aanname juist is.

Berekenen we over een periode van 4 dagen (6e - 10e dag) de ijzeropname, dan wordt een hoeveelheid gevonden van 1,18 μmol . Dit komt neer op een utilisatie van 0,30 $\mu\text{mol/dag}$. Het heminecompartiment van nier en kopnier tesamen neemt met andere woorden 0,30 μmol per dag aan ijzer uit het plasma op, zodat aan de ijzerbehoefte voor de erythrocytenproductie voldaan wordt (0,26 $\mu\text{mol/dag}$).

De ijzerutilisaties van de totale nier en de totale kopnier bedragen achtereenvolgens 0,07 en 0,06 $\mu\text{mol/dag}$. De waarden moeten uiteraard onderschat zijn. Na correctie voor het verlies van radioactiviteit aan de nieuw gevormde erythrocyten wordt een utilisatie voor nier en kopnier tesamen berekend van 0,39 $\mu\text{mol Fe/dag}$. Verdere correcties zijn door gemis aan experimentele gegevens niet mogelijk, zodat hier slechts over een benadering van de werkelijke utilisatie mag worden gesproken.

N.B. We kunnen de curven van de relatieve specifieke activiteit van het plasmaijzer en van de relatieve specifieke activiteit van respectievelijk het hemineijzer in nier en kopnier globaal naar het tijdstip 0 extrapoleren. De over de eerste 5 uur berekende utilisatie bedraagt dan voor de nier-heminefractie 0,2 en voor de kopnier-heminefractie 0,15 $\mu\text{mol/dag}$. Deze waarden zijn uiteraard slechts schattingen, omdat de extrapolatie van de curve die de relatieve specifieke activiteit van het plasmaijzer weergeeft, een

tamelijk willekeurige handeling is. Doch wel is duidelijk, dat het utilisatiebegrip juist in de beginfase van het experiment zijn meest betrouwbare toepasbaarheid heeft.

Erythrocyten

Het zal duidelijk zijn, dat op grond van de toename van de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in de hemine van de gewassen erythrocyten en de toename van de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in het plasma, de utilisatie van het ijzer in het erythrocyten-compartiment niet berekend kan worden. Wel kunnen we de ijzeropname per dag van het heminecompartiment van nier en kopnier tesamen berekenen. Hierop is in deze paragraaf reeds uitvoerig ingegaan. Deze bedraagt $0,3 \mu\text{mol Fe/dag}$. Onder aanname van een "steady state" zal dus een zelfde kwantum aan ijzer het nier- en kopnier-heminecompartiment moeten verlaten. Voor de erythrocytenvernieuwing is dagelijks $0,26 \mu\text{mol Fe}$ nodig, zodat in principe de ijzerbehoefte voor de erythropoiese gedekt is.

Milt

De verschillende functies die de vissenmilt vervult, kunnen we als volgt samenvatten:

1. hemopoiese
2. erythrocyten afbraak
3. erythrocyten depot
4. filtering van het plasma
5. afweer
6. bufferfunctie in de ijzerhuishouding.

Topf (1953) en Haider (1966, 1968) konden aantonen, dat de milt van de zeelt geen erythropoietische functie toekomt, zodat slechts de onder 2 en 6 genoemde functies in het kader van de ijzerstofwisseling relevant zijn. Zoals tabel IV, 2 toont, bevat de milt gemiddeld $17,5 \mu\text{mol}$ ijzer. Hiervan is $10 \mu\text{mol}$ hemineijzer en $7,5 \mu\text{mol}$ niet-hemineijzer. De gebruikte bepalingstechniek is in hoofdstuk III beschreven. Voor meer informatie wordt naar hoofdstuk VI verwezen. Het niet-hemineijzer is naar alle waarschijnlijkheid voornamelijk als hemosiderine aanwezig (Zwillenberg, 1964; Yu et al., 1971).

Histochemisch kon ook door ons met de Berlijnsblauwkleuring volgens Perl en met de totaal-ijzerkleuring volgens Macculum slechts het voor hemoderine typische clusterpatroon worden aangetoond.

De in figuur IV,3 afgebeelde toename van de relatieve specifieke activiteit in de tijd, heeft betrekking op het totale ijzer in de gespoelde milt. Daar de milt - vanwege zijn karakteristieke histologische structuur - niet bloedvrij te spoelen is, geeft deze toename van de relatieve specifieke activiteit nagenoeg geen informatie over de ijzerstofwisseling op orgaaniveau.

In 4 tiendaagse experimenten is niet slechts de relatieve specifieke activiteit van het totaal ijzer bepaald, maar tevens de relatieve specifieke activiteit van het niet-hemineijzer. Slechts de relatieve specifieke activiteit van het hemineijzer was te berekenen. Deze bedroeg gemiddeld 0,26%. De hoeveelheid radioactiviteit in de niet-heminefractie was gering. We moeten dan ook aannemen, dat de ijzer-inbouw vanuit het plasma in de niet-heminefractie van de milt zeer klein is. Dit is te verklaren door aan te nemen, dat de ijzerstofwisseling van de niet-heminefractie voornamelijk wordt gekarakteriseerd door opslag van het ijzer dat vrijkomt bij de erythrocytenafbraak (functie 2) en door mobilisatie van het zo verkregen ijzer, onder andere ten behoeve van de erythropoïese.

Op grond van deze overwegingen kan dan ook aan de berekende waarden van de utilisatie van het ijzer in de milt geen waarde worden gehecht.

Lever

De in § 3 van dit hoofdstuk weergegeven tabel (IV,3) laat zien, dat de lever bij de zeelt het orgaan is dat in absolute zin het meeste ijzer bevat. De milt volgt op de tweede plaats. Wordt het ijzergehalte per gewichtseenheid uitgedrukt, dan zijn de verhoudingen omgekeerd.

Over de vorm(en) waarin dit ijzer in de vissenlever is opgeslagen en over de metabole aspecten van dit opgeslagen ijzer is nagenoeg niets bekend.

De voor de lever berekende ijzerutilisatie bedraagt 0,17 μ mol/dag. Het is evenwel sterk te betwijfelen of we in het geval van de lever de utilisatie mogen berekenen op grond van de relatieve specifieke activiteit van het ijzer in het plasma, afkomstig uit het arteriële bloed. Zoals in § 3 werd uiteengezet, kan de hoge relatieve specifieke activiteit van het ijzer in de gal-

vloeistof slechts worden verklaard, als we voor de lever een directe clearance-functie voor het "poortaderlijke" bloed poneren. We mogen aannemen, dat in de vissenlever dit veneuze bloed, afkomstig uit onder andere de darm, de gonaden en de zwemblaas, alvorens door de hepatocyten te worden geklaard, in de lever-sinussoïden wordt gemengd met arteriëel bloed, zodat de berekeningen zich op de specifieke activiteit van het ijzer in deze meng-pool zouden moeten baseren. Daarenboven zal de samenstelling van het plasma in de sinussoïden van plaats tot plaats sterk verschillen.

Voorts kan het verlies aan radioactief ijzer, dat optreedt gedurende de periode waarover de utilisatie wordt berekend, niet worden gemeten, zodat ook om deze reden de gevonden utilisatiewaarde moet worden gewantouwd.

HOOFDSTUK V

DE BESTUDERING VAN HET IJZERMETABOLISME VAN DE ZEELT DOOR MERKINGEN VAN HET PLASMAIJZER OF VAN HET IN DE ERYTHROCYTEN AANWEZIGE IJZER MET $^{59}\text{Fe(III)}$

INLEIDING

De oorspronkelijk door Huff et al. (1950, 1951) gepubliceerde metingen van de ijzerkinetiek bij de mens leverden het grondschema voor onze kennis omtrent het kinetisch gedrag van het erythron. De experimentele gegevens werden verkregen door het meten van het radioactiviteitsverloop in het plasma en de erythrocyten van bloedmonsters, die successievelijk werden afgenomen en door het volgen van het radioactiviteitsniveau van de verschillende organen door middel van lichaamsscanning. Centraal in de door Huff et al. gepresenteerde rekenmethode voor de erythrocytenproductie staat de turnover van het plasmaijzer (PIT), waaronder verstaan wordt het dagelijkse transport van ijzer door het plasma. De PIT kan worden berekend uit het plasmaijzer en de verdwijningscurve van het radioactieve ijzer uit het plasma na intraveneuze toediening van plasma, dat geïncubeerd werd met een speurdosis $^{59}\text{Fe(III)}$. Oorspronkelijk namen Huff et al. aan, dat de verdwijningscurve monoëxponentieel was. Deze aanname is niet juist gebleken (Sharney et al., 1963). Na een aanvankelijke clearance van 80-90% neemt de daling van het radioactiviteitspeil in het plasma sterk af tengevolge van een optredende reflux van reeds geklaard radioactief ijzer naar het plasma. Op grond van latere inzichten zijn er verschillende rekenmethoden gepubliceerd, waarvan Pollycove's (1963) multicompartimentele model van de ijzerkinetiek bij de mens, de meeste bekendheid geniet. We zullen hier niet verder op ingaan.

In hoofdstuk I werd reeds verwezen naar de door Hevesy et al. (1964) uitgevoerde experimenten met de zeelt als proefdier. Ook zij dienden plasma dat van tevoren geïncubeerd werd met $^{59}\text{Fe(III)}$ intraveneus toe en volgden het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in diverse compartimenten. Het beperkt aantal waarnemingen en de onvolledigheid in de weergave van hun resultaten sluit een enigszins zinvolle vergelijking met de gegevens van de ijzerkinetiek bij de mens uit.

In dit hoofdstuk zullen analoge experimenten met de zeelt als proefdier worden beschreven. De experimenten hebben niet tot doel de gepubliceerde modellen op hun bruikbaarheid te toetsen, doch zijn slechts opgezet om eventuele verschilpunten tussen de resultaten verkregen bij de mens enerzijds en bij de zeelt anderzijds aan het licht te brengen. Het in hoofdstuk IV geïntroduceerde utilisatiebegrip zal op zijn bruikbaarheid worden onderzocht. Voorts zullen enige experimenten worden beschreven, waarbij de speurdosis ^{59}Fe niet aan plasma gebonden is, doch aanwezig is in de erythrocyten van de zeelt. De bedoeling van deze laatste experimenten is de in hoofdstuk IV gepostuleerde erythrocyten afbrekende functie van de milt te onderzoeken.

§ 1. DE KINETIEK VAN HET INTRACARDIAAL TOEGEDIENDE - AAN PLASMA GEBONDEN - $^{59}\text{Fe(III)}$

De hoeveelheid zeeltenplasma welke intracardiaal werd toegediend, bedroeg 0,2 ml. Het plasma was van tevoren met $2\ \mu\text{C } ^{59}\text{Fe(III)citraat}$ per 0,2 ml plasma gemerkt. De specifieke activiteit van de batch bedroeg $3400\ \mu\text{C}/\mu\text{mol Fe}$ bij een radiochemische concentratie van $200\ \mu\text{C}/\text{ml}$. Het ijzergehalte en de totale ijzerbindingscapaciteit van het opgeladen plasma bedroegen respectievelijk 0,016 en 0,049 $\mu\text{mol}/\text{ml}$, zodat na toediening van $2\ \mu\text{C } ^{59}\text{Fe(III)citraat}$ (0,01 ml) aan 0,2 ml plasma het ijzergehalte werd verhoogd tot 0,018 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. De gebruikte zeelten hadden een gewicht van 350-400 gram. Dit komt neer op een geschat bloedvolume van 13-15 ml, zodat noch het intravasculaire volume, noch het ijzergehalte in het plasma door de toevoeging van 0,2 ml plasma werden belast. Voor en na de toediening van de speurdosis radioactiviteit verbleven de zeelten in stromend onthloord leidingwater van 19°C . De duur van de experimenten bedroeg maximaal 10 dagen.

In de volgende grafieken representeert elk meetpunt het meetresul-

taat van één proefdier. De verschillende organen waarin de radioactiviteit en het ijzergehalte werden bepaald zijn: nier, kopnier, lever, gal, milt, kieuw, darm, spier en skelet. Zowel de gewassen erythrocyten als het plasma werden op radioactiviteit en ijzergehalte onderzocht. Van de nier, de kopnier en de erythrocyten is eveneens de radioactiviteit van het hemine-ijzer gemeten. Voordat de diverse organen uit de vis werden verwijderd, is de vis doorspoeld met fysiologisch zout (Cortland). Voor de verschillende technieken wordt verwezen naar hoofdstuk II.

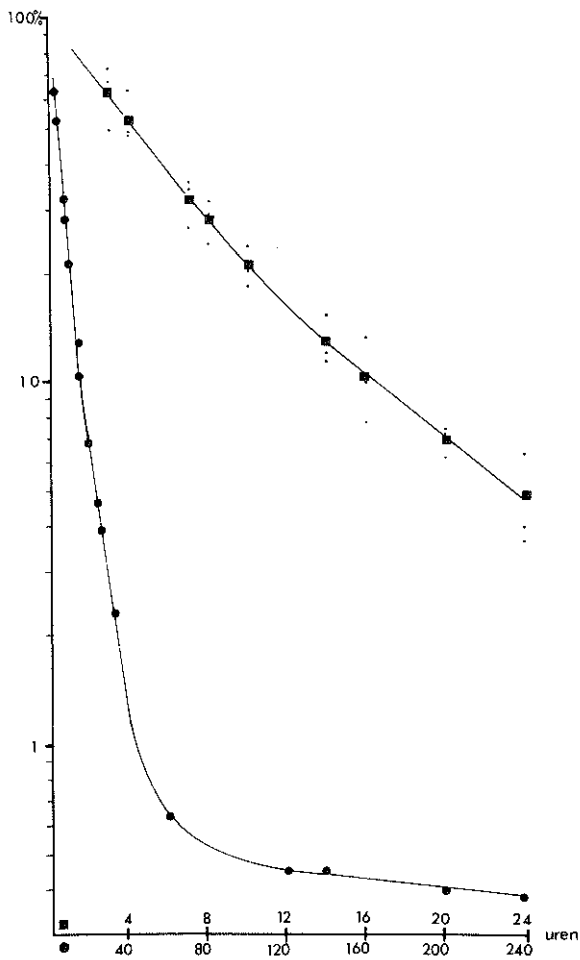
Figuur V,1 geeft het verloop weer van de specifieke activiteit van het plasmaijzer als functie van de tijd. De geëxtrapoleerde waarde op tijdstip $t=0$ is hier op 100% gesteld.

Na een aanvankelijk exponentiële afname treedt na ongeveer 10 uur een daling in deze afname op. De resulterende verdwijningscurve verloopt vervolgens over een periode van 20 uur wederom exponentieel. Ongeveer 60 uur na de aanvang van het experiment treedt een tweede, doch veel grotere reductie in de afname van de specifieke activiteit van het plasmaijzer op. De multiexponentiëleiteit van de verdwijningscurve wijst op het bestaan van meerdere refluxprocessen. De op grond van de verdwijningscurve bepaalde halfwaardetijd van het ijzer in het plasma bedraagt 4,4 uur. Deze waarde is in goede overeenstemming met de door Hevesy et al. gevonden halfwaardetijd van ongeveer 4 uur

Welke rol spelen de verschillende weefsels en organen in de clearance van het radioactieve ijzer uit het plasma? Deze vraag zal aan de hand van de in figuur V,2 en V,3 weergegeven resultaten worden beantwoord.

Figuur V,2 geeft het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de nier, kopnier, milt en erythrocyten weer. Figuur V,3 vat de resultaten verkregen voor de lever, darm, kieuw en het spier- en skeletweefsel samen. In beide figuren is voorts - voor zover de schaal van de afbeeldingen dit toelaat - het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in het plasma opgenomen.

Na respectievelijk 40 en 50 uur is de specifieke activiteit van het plasma-ijzer lager geworden dan de specifieke activiteit van het ijzer in de nier en in de kopnier. Voor de verklaring van dit verschijnsel wordt verwezen naar de bespreking van de erythropoïese, eveneens in dit hoofdstuk. Gelet op het ijzergehalte in nier, kopnier en erythrocyten komt de hoeveelheid radioactiviteit, welke na 50 uur in de genoemde compartimenten aanwezig is, neer

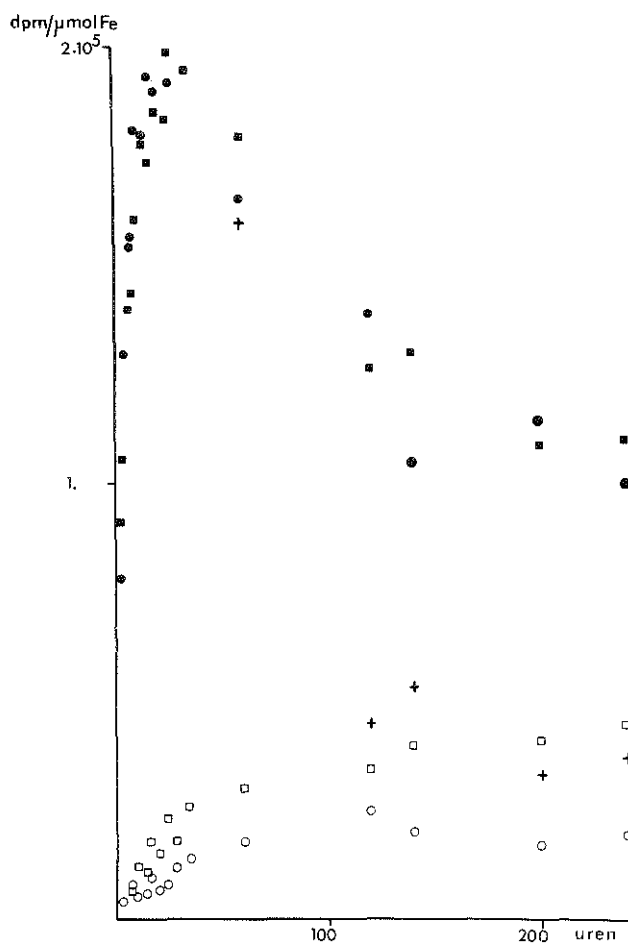


Figuur V, 1.

Verdwijningscurve van het plasmaijzer.

De op grond van het geschatte plasmavolume, de gemeten ijzerconcentratie van het plasma en de toegediende radioactiviteitsdosis berekende specifieke activiteit van het plasmaijzer op tijdstip $t=0$, is op 100% gesteld. Voor ieder tijdstip is de aangegeven waarde een gemiddelde verkregen bij drie proefdieren.

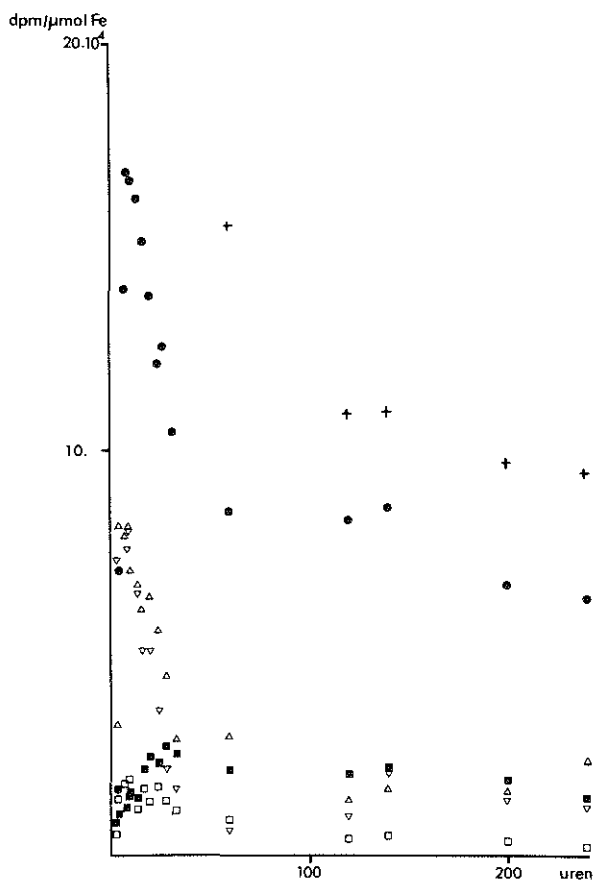
- heeft betrekking op de tijdschaal 0 tot 24 uur
- heeft betrekking op de tijdschaal 0 tot 240 uur.



Figuur V,2.

Verloop van de specifieke activiteit van het ijzer als functie van de tijd, na intracardiale toediening van de speurdosis plasmagebonden $^{59}\text{Fe}(\text{III})$. Elk symbool staat voor de gemiddelde waarde verkregen bij drie proefdieren.

- + ijzer in het plasma
- ijzer in de nier
- ijzer in de kopnier
- ijzer in de erythrocyten
- ijzer in de milt



Figuur V,3.

Verloop van de specifieke activiteit van het ijzer als functie van de tijd na intracardiale toediening van de speurdosis. Elk symbool staat voor de gemiddelde waarde verkregen bij drie proefdieren.

- + ijzer in het plasma
- o ijzer in de kieuw
- ijzer in de lever
- ijzer in de darmwand
- Δ ijzer in het spierweefsel
- ▽ ijzer in het botweefsel

op ongeveer 55% van de ingebrachte dosis. Er is met andere woorden ongeveer 45% van de toegediende radioactiviteitsdosis na een tijdsverloop van 50 uur in niet erythropoietisch actieve organen en weefsels opgenomen. Na een verloop van 10 dagen bedraagt dit percentage nog slechts 25%.

Voor de specifieke activiteit van het ijzer in de niet erythropoietisch actieve organen geldt zonder uitzondering, dat ze over de gehele 10 daagse periode kleiner blijft dan de specifieke activiteit van het ijzer in het plasma. Dit werpt voor die organen welke hun ijzer direct uit het plasma betrekken enkele belangrijke vragen op. We zullen hier in het navolgende op ingaan.

Opmerkelijk is het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in het spierweefsel en skeletweefsel. Gelet op het ijzergehalte van beide weefsels, kan worden gesteld, dat gedurende de eerste 10 uur ongeveer 36% van de toegediende speurdosis radioactiviteit in het spier- en het skeletweefsel wordt opgenomen. In de loop van de eerste dag wordt vervolgens het grootste gedeelte van de oorspronkelijk geklaarde dosis weer in circulatie gebracht. Dit is in overeenstemming met de door Hevesy et al. gevonden resultaten. Zij vonden een maximale opname gedurende de eerste 10 uur van 40,3%. Ook Cheney et al. (1967) vinden bij de rat een snelle opname van radioactiviteit door het bot na intraveneuze toediening van $^{59}\text{Fe(III)}$ met een maximum van 40% na 5 uur. Zij konden aannemelijk maken, dat deze opname praktisch volledig kan worden toegeschreven aan ijzeropname door het erythroïde beenmerg. Het zal duidelijk zijn, dat deze verklaringsmogelijkheid bij de zeelt vervalst, omdat slechts aan de nier en kopnier een erythropoïetische functie kan worden toegekend (Topf, 1953; Haider, 1968). De radioactiviteitsopname welke Cheney et al. voor het spierweefsel vinden is veel geringer. Na 5 uur bevindt zich een maximum van 5% van de ingebrachte radioactiviteitsdosis in het spierweefsel. De genoemde auteurs konden aantonen, dat dit radioactieve ijzer - dat aanvankelijk aan extravasculair transferrine gebonden was - in de loop van 7 dagen voor 80% in het myoglobine en het ferritine van de spier wordt ingebouwd. Of - in het geval van de zeelt - zowel de reflux uit het spierweefsel naar het plasmacompartiment als de reflux uit het skeletweefsel naar het plasmacompartiment berust op het bestaan van een metabool actieve extravasculaire transferrine pool, lijkt twijfelachtig.

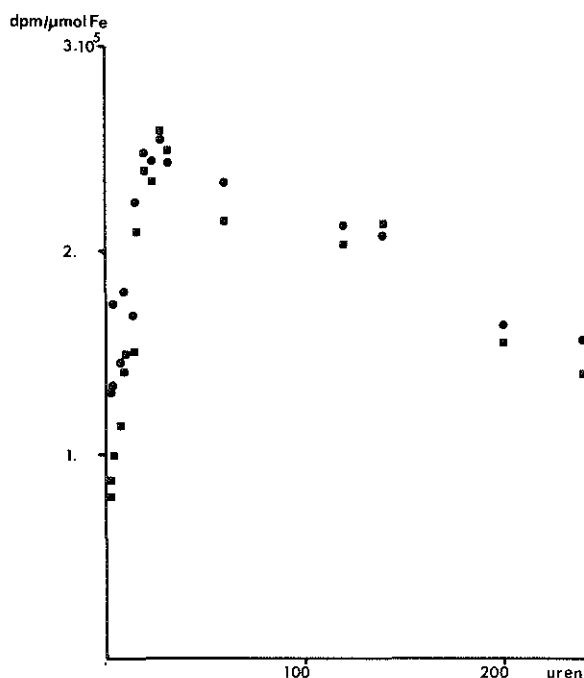
Voor de specifieke activiteit van het ijzer in de kieuw wordt eveneens een aanvankelijk zeer sterke toename gemeten. Na 10 uur zet een daling in de specifieke activiteitscurve in. Het in fig. V,2 weergegeven specifieke activiteitsverloop kan in principe worden verklaard door minimaal twee ijzercompartimenten in de kieuw aan te nemen die zich zowel in grootte als in turnover-waarde onderscheiden. Het eerste compartiment zou relatief klein moeten zijn en in evenwicht met het plasma-ijzer; voor het tweede relatief grote compartiment zou dan een langzame uitwisseling met het eerste compartiment moeten worden aangenomen. De rol van de kieuw in de ijzeropname en de ijzeruitscheiding komt in hoofdstuk VI ter sprake. Op de hier gestelde problematiek zal daarom in hoofdstuk VI nader worden ingegaan.

In vergelijking tot de situatie bij de kieuw, neemt de specifieke activiteit van het ijzer in de lever minder snel toe. Voorts ligt het maximum van de curve beduidend lager. Ook voor de lever kan de gevonden specifieke activiteitscurve in principe worden verklaard door minimaal twee compartimenten aan te nemen. De aanvankelijk snelle toename van de specifieke activiteit is dan toe te schrijven aan een compartiment dat in snelle uitwisseling is met het ijzer in het plasma. Het tijdstip waarop het maximum wordt bereikt, wordt voornamelijk bepaald door de snelheid van het equilibratieproces tussen het ijzer in het plasma en het geponeerde - eerste - ijzercompartiment. De hoogte van het maximum is afhankelijk van de grootte van dit compartiment. De in vergelijking tot de verdwijningscurve van het plasma-ijzer gereduceerde afname van de specifieke activiteitscurve van het ijzer in de lever kan een tweeledige oorzaak hebben:

1. Het eerste compartiment is niet in een dynamisch evenwicht met het plasma. De specifieke activiteit ijlt na.
2. Het geponeerde tweede ijzercompartiment neemt langzaam ijzer uit het eerste compartiment op. Een langzame turnover moet voor dit compartiment worden aangenomen.

In figuur V,4 is ook het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de gal opgenomen. Aanvankelijk is de specifieke activiteit van het ijzer in de gal hoger dan de specifieke activiteit van het ijzer in de lever. Ook hier kan als verklaring worden aangevoerd, dat de gal uit tenminste twee discrete compartimenten ijzer ontvangt: uit een ijzercompartiment met een hoge specifieke activiteit - mogelijk in evenwicht met het plasma-ijzer

in de leversinussen - en uit een langzaam ijzeruitwisselend compartiment met een lage specifieke activiteit. We zullen op de merkwaardige discrepantie tussen het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de gal en in de lever na intracardiale en orale toediening van $^{59}\text{Fe(III)}$, in hoofdstuk VII nader ingaan. Hier zij slechts opgemerkt, dat zowel de resultaten verkregen bij continue orale opname, als de resultaten verkregen bij intracardiale toediening binnen de geldende theorie over de bloedcirculatie in de lever kunnen worden verklaard.



Figuur V,4.

Verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de gal en van het ijzer in de lever als functie van de tijd na intracardiale toediening van de speurdosis. Iedere waarneming is een gemiddelde verkregen bij drie proefdieren.

- ijzer in de lever
- ijzer in de gal

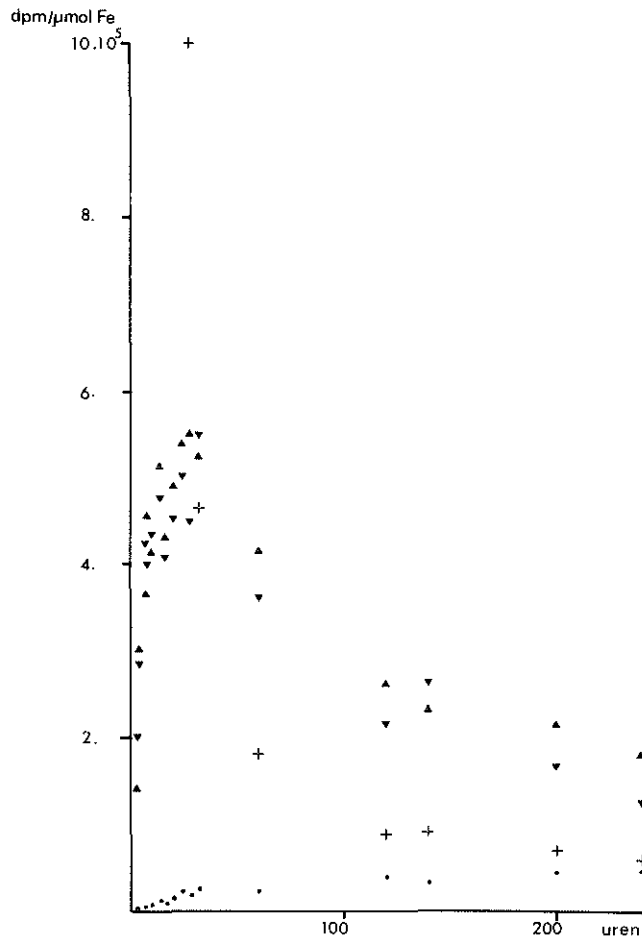
Fig. V,2 laat zien, dat de specifieke activiteit van het ijzer in de milt over de gehele proefperiode lager is dan de specifieke activiteit van het ijzer in de erythrocyten. In vergelijking tot de specifieke activiteit van het ijzer in de heminefractie van de erythrocyten is de specifieke activiteit van het ijzer in de milt verhoogd. We konden aantonen, dat praktisch alle radioactiviteit in de milt aanwezig is in de heminefractie.

De gevonden curve voor de specifieke activiteit van het ijzer in de milt doorloopt een maximum na ongeveer 100 uur. Hevesy et al. vonden dat de specifieke activiteitscurve van het hemineijzer in de milt de specifieke activiteitscurve van het ijzer in de heminefractie van de perifere erythrocyten, wat vorm betreft volgt. De specifieke activiteit van het hemineijzer in de milt was steeds een factor twee hoger dan die van het hemineijzer in de erythrocyten. In tegenstelling tot de door ons gevonden resultaten, doorloopt zowel de curve voor de heminefractie van de perifere erythrocyten, als de curve voor het hemineijzer in de milt een maximum. Dit maximum ligt volgens Hevesy et al. op de 4e tot 5e dag na intraveneuze toediening van de speurdosis.

In hoofdstuk IV werd reeds vermeld, dat ongeveer 60% van het in de milt aanwezige ijzer toe te schrijven is aan het ijzer in de heminefractie. Daar nu de specifieke activiteit van het hemineijzer in de milt hoger is dan de specifieke activiteit van het ijzer in de heminefractie van de perifere erythrocyten, moet geconcludeerd worden, dat de intralacunaire erythrocytenfractie de samenstelling van het perifere erythrocytenbestand - wat de verdeling van jonge en oude erythrocyten betreft - niet volgt. Een mogelijke verklaring is, dat van iedere hoeveelheid nieuw gevormde erythrocyten een deel - wellicht ondeugdelijke - uit de circulatie wordt genomen om in de milt te worden afgebroken. De waarneming van Hevesy et al. dat zowel de curve voor het hemineijzer in de erythrocyten als de curve voor het ijzer in de heminefractie van de milt een maximum doorloopt, is in overeenstemming met de gestelde verklaringsmogelijkheid.

Figuur V,5 geeft het verloop weer van de specifieke activiteit van het hemineijzer in de nier en in de kopnier. Voorts is het verloop van de specifieke activiteit van het hemineijzer in de erythrocyten en van het ijzer in het plasma in de figuur opgenomen.

De curven voor het hemineijzer in de nier en in de kopnier verlopen vrijwel identiek. Na ongeveer 30 uur is er sprake van een maximale specifieke



Figuur V, 5.

Verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de heminefractie van de nier, de kopnier en de perifere erythrocyten en van het plasmaijzer als functie van de tijd, na intracardiale toediening van de speurdosis. Iedere waarneming is een gemiddelde waarde verkregen bij drie proefdieren.

- + ijzer in het plasma
- ▲ ijzer in de heminefractie van de nier
- ▼ ijzer in de heminefractie van de kopnier
- ijzer in de heminefractie van de erythrocyten

activiteit in de heminefracties. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Hevesy et al. De verdwijningscurve van het plasmaijzer loopt nagenoeg exact door de top van beide specifieke activiteitscurven. In het kader van Zilvermit's (1943) theorie over vernieuwingssnelheden zou dit betekenen, dat we het plasmaijzer als directe voorloper van het hemineijzer mogen beschouwen, of dat er een mogelijk tussengeschakelde ijzerpool bestaat die in een zuiver dynamisch evenwicht verkeert met de plasmaijzerpool. Daar evenwel, door het erythropoietische systeem niet aan de voorwaarden voor de toepasbaarheid van de theorie der vernieuwingssnelheden wordt voldaan (hoofdstuk IV, 3b), kan deze conclusie niet zonder meer als juist worden aangenomen.

Zoals in hoofdstuk IV uitvoerig werd uiteengezet, kan het in genoemd hoofdstuk geïntroduceerde en gedefinieerde utilisatiebegrip worden toegepast op inhomogene systemen. Aan twee voorwaarden moet voldaan zijn:

1. Gedurende de periode waarover de utilisatie berekend wordt, mag geen radioactief ijzer uit het systeem verloren gaan.
2. Het systeem mag slechts uit één pool ijzer betrekken. Een transmittercompartiment tussen de genoemde ijzerpool en het systeem is slechts dan toegestaan als het ijzer in dit compartiment dezelfde specifieke activiteit heeft als het ijzer in het voorgeschakelde compartiment.

We beschouwen nu de totale hoeveelheid hemineijzer welke aanwezig is in de verzameling van cellen die de erythroïde rijpingsreeks van de nier respectievelijk van de kopnier omvat, als het inhomogene systeem waarvan de utilisatie wordt berekend. Slechts in de beginfase van de proefperiode zal dit systeem aan de eerste voorwaarde kunnen voldoen. Hoe lang deze beginfase duurt, kunnen alleen de berekeningsresultaten aantonen. Deze berekeningsresultaten geven slechts dan betrouwbare informatie over de utilisatie en over de lengte van de fase waarbinnen de utilisatieberekening geldig is, als ook aan de tweede voorwaarde wordt voldaan. We nemen voor de berekening van de utilisatie van het als boven gedefinieerde systeem aan, dat het plasmacompartiment het enige compartiment is waaruit het ijzer wordt betrokken en dat als er een transmittercompartiment bestaat het ijzer in dit compartiment aan de onder 2. gestelde voorwaarde voldoet. Evidentie, dat deze aanname juist is, kan, zoals boven reeds werd gesteld, slechts van indirecte aard zijn.

Zoals in hoofdstuk IV werd afgeleid, geldt voor de utilisatie de volgende formule:

$$U = \frac{u(t) \Big|_{t_1}^{t_2}}{t_2 - t_1}$$

waarin

$$u(t) \Big|_{t_1}^{t_2} = Fe_{org.} \int_{t_1}^{t_2} \frac{1}{p(t)} o'(t) dt.$$

Het gemiddelde ijzergehalte van het heminecompartiment in de nier en in de kopnier ($Fe_{org.}$) bedroeg respectievelijk $1,6 \pm 0,7$ en $1,2 \pm 0,4$ $\mu\text{mol Fe}$. De gemiddelde specifieke activiteit van het plasmaijzer op tijdstip t ($p(t)$) is uit figuur V,1 te berekenen. De absolute waarde van de naar tijdstip $t=0$ geëxtrapoleerde curve bedraagt $244 \cdot 10^5$ dpm/ $\mu\text{mol Fe}$. Deze waarde werd op 100% gesteld. $o(t)$ Stelt de gemiddelde specifieke activiteit van het ijzer in de heminefractie van de nier en de kopnier voor op tijdstip t (fig. V,5); $o'(t)$ is dan de grafisch bepaalde eerste afgeleide van deze curve op tijdstip t . De waarde van de integraal kan dus grafisch worden bepaald.

Tabel V,1 geeft de berekende utilisatiewaarden voor het als boven gedefinieerde erythropoietische systeem weer. De berekening is uitgevoerd voor verschillende tijdsintervallen.

Tabel V,1

De voor verschillende tijdsintervallen berekende ijzerutilisatie van het heminecompartiment in nier en kopnier in $\mu\text{mol Fe/dag}$.

tijdsinterval (uren)	utilisatie ($\mu\text{mol Fe/dag}$)		
	nier	kopnier	nier + kopnier
0- 2	0,16	0,14	0,30
2- 4	0,17	0,14	0,31
4- 6	0,15	0,12	0,27
6- 8	0,13	0,11	0,24
8-10	0,14	0,11	0,25
20-22	0,09	0,07	0,16

Ongeveer 5 uur na intracardiale toediening van de speurdosis $^{59}\text{Fe(III)}$ leidt de berekeningsmethode tot verlaagde waarden voor de utilisatie. De conclusie uit dit gegeven is, dat de beginfase - gekenmerkt door een te verwaarlozen verlies van radioactief ijzer uit het systeem - een duur heeft van ongeveer 5 uur. Het feit dat de berekende maximale waarde voor de utilisatie van het heminecompartiment van nier en kopnier samen (tabel V, 1, kolom 4) de behoefte aan ijzer voor de erythropoiese dekt, kan als - indirecte - evidentie voor de geldigheid der twee gestelde voorwaarden worden aangevoerd.

De in de loop van de tijd voortschrijdende reductie van de berekende utilisatiewaarden, zal waarschijnlijk veroorzaakt worden door het optredende verlies van radioactief ijzer tengevolge van de aanmaak van nieuwe erythrocyten. Als dit inderdaad de belangrijkste oorzaak voor de progressieve onderschatting van de utilisatiewaarden is, dan zou na correctie voor dit optredend verlies, voor het totale erythropoietische systeem van nier en kopnier tesamen - over willekeurig welk tijdsinterval dan ook - de maximale utilisatie moeten worden berekend. In hoofdstuk IV deel 3 is de correctieformule voor het erythropoietische systeem weergegeven. We kunnen inderdaad aantonen, dat na correctie, de voor het gehele erythropoietische systeem berekende utilisatiewaarden, gestabiliseerd zijn op het maximale niveau. Er wordt dan een gemiddelde utilisatie gevonden van $0,32 \mu\text{mol Fe/dag}$.

Samenvattend kan worden gesteld, dat de toepassing van het utilisatiebegrip op het erythropoietische systeem, zowel in de in hoofdstuk IV beschreven ijzeropname experimenten als in de hier beschreven experimenten tot consistente en fysiologisch te interpreteren waarden leidt.

In figuur V, 2 is het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de erythrocyten uit het perifere bloed weergegeven. Figuur V, 5 geeft voorts de specifieke activiteit van het hemineijzer in de perifere erythrocyten als functie van de tijd. De laatste curve blijkt over de gehele proefperiode lager te zijn dan de eerste curve. De reden hiervan is, dat het ijzer in de erythrocyten kan worden gesplitst in een pool bestaande uit hemoglobineijzer en in een inhomogene pool van "niet-hemoglobine" ijzer. Het ijzer in deze "niet-hemoglobine" pool is analytisch niet meetbaar, maar draagt wel bij tot de totale hoeveelheid radioactiviteit in de erythrocyten.

We kunnen op grond van het specifieke activiteitsverloop van het ijzer in de heminefractie van nier en kopnier en het specifieke activiteitsverloop van het ijzer in de heminefractie van de erythrocyten uit het perifere bloed

niet zonder meer de opgetreden hemoglobinesynthese berekenen. Dit zou slechts mogelijk zijn als we van een aantal zeer specifieke veronderstellingen over de ijzerkinetiek van het erythroïde systeem zouden uitgaan. Daar we voor géén van deze vermoedens uit de verkregen experimentele resultaten evidentie over hun al dan niet juist zijn kunnen ontleen, zullen we op de mogelijke modelsystemen niet ingaan.

Een bijkomende complicatie vormt het feit dat de erythrocyten van de vis het vermogen om hemoglobine te synthetiseren nog niet verloren hebben. De curve die het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de heminefractie der perifere erythrocyten weergeeft, is dus het resultaat van twee principieel verschillende processen.

Het vermogen van de erythrocyten om hemoglobine te synthetiseren kan in vitro worden bestudeerd (Hevesy et al., 1964). Toch is het proces niet zonder meer te kwantificeren omdat de specifieke activiteit van het ijzer in de "niet-hemoglobine" pool een onbekende grootte blijft. Onder aanname dat de specifieke activiteit van het precursorijzer gelijk is aan de specifieke activiteit van het ijzer in het plasma, wordt zowel door Hevesy et al. als door ons een dagelijkse hemoglobinesynthese gevonden van 0,05% per dag. Op grond van het ijzergehalte van de erythrocyten en de levensduur der erythrocyten kan men berekenen, dat de hemoglobineproductie van het erythropoietische nier-kopnier systeem ongeveer 0,7% per dag moet bedragen. De hemoglobinesynthese in het perifere bloed is dus waarschijnlijk ten opzichte van de centrale aanmaak te verwaarlozen. Dit zou in overeenstemming zijn met het reeds eerder besproken feit, dat na correctie voor het verlies van radioactiviteit uit het erythropoietisch systeem van nier en kopnier, utilisatiewaarden voor dit systeem worden berekend, welke de behoefte aan ijzer voor de erythropoïese volledig dekken.

§ 2. DE BESTUDERING VAN DE ERYTHROCYTENAFBRAAK DOOR MIDDEL VAN INTRACARDIALE TOEDIENING VAN ERYTHROCYTEN DIE GEMERKT ZIJN MET $^{59}\text{Fe(III)}$

Op grond van de in hoofdstuk IV beschreven resultaten werd voor de milt een erythrocytenafbrekende functie gepostuleerd. Ook de in 1 van dit hoofdstuk vermelde waarnemingen kunnen op een afbrekende functie van de milt wijzen. Teneinde op dit punt meer zekerheid te verkrijgen, zijn de in deze paragraaf te beschrijven experimenten uitgevoerd.

In principe kwamen de experimenten hierop neer, dat in vivo gemerkte erythrocyten aan de circulatie van een aantal vissen werden toegevoegd, waarna op gezette tijden een zo behandeld proefdier werd opgeofferd. Nadat de vis met fysiologisch zout was doorspoeld, werden de lever en de milt verwijderd. Van deze organen werd het ijzergehalte en het radioactiviteitsniveau zowel voor het gehele orgaan als voor de heminefractie afzonderlijk bepaald. De specifieke activiteit van het totale ijzer en van het ijzer in de heminefractie van de milt en de lever konden zodoende worden berekend. De specifieke activiteit van het niet-hemineijzer is steeds op indirecte wijze vastgesteld. In het plasma en in de heminefractie van de gewassen erythrocyten werd eveneens het ijzergehalte en de radioactiviteit bepaald, zodat ook voor het plasmaijzer en het hemineijzer de specifieke activiteit kon worden berekend.

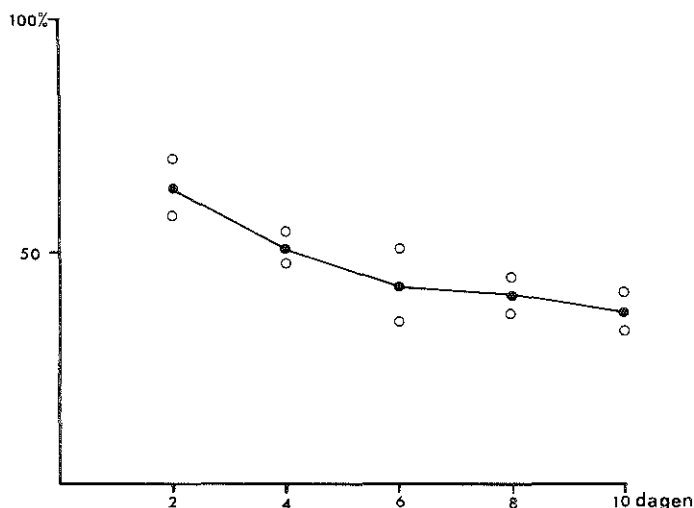
Agglutinatie van de toegediende erythrocyten werd voorkomen door selectie van de juiste ontvangers, via kruisproeven.

Het merken van de erythrocyten verliep als volgt: 50 μC $^{59}\text{Fe(III)}$ -citraat (0,2 ml) werd intramusculair aan een 300 gram wegende zeelt toegediend. Na 2 dagen werd 5 ml bloed afgenomen. De zorgvuldig gewassen erythrocyten werden in 5 ml Cortland's fysiologisch zout gesuspenderd. Na de 2 daagse inbouwperiode bleek ongeveer 35% van de toegediende radioactiviteitsdosis door erythrocyten te zijn opgenomen. Dit kwam neer op $32,1 \cdot 10^5$ dpm/ml gewassen erythrocyten. Voordat 0,2 ml van deze erythrocytensuspensie intracardiaal aan de op immunogene neutraliteit geselecteerde proefdieren werd toegediend, verbleven de erythrocyten gedurende 24 uur in de Cortlandse fysiologische zoutoplossing bij 4°C . Gebleken was, dat een langer verblijf aanleiding geeft tot hemolyse die progressief met de verblijfsduur toeneemt. De 24 uren periode had ten doel zo mogelijk irreversibele beschadigingen aan de erythrocyten te bewerkstelligen, teneinde het op gang komen van de afbraakprocessen te bevorderen. Hieraan ligt impliciet de gedachte ten grondslag, dat beschadigde erythrocyten eerder uit de circulatie worden genomen.

Zoals reeds eerder werd vermeld, kan het ijzer in de erythrocyten globaal worden verdeeld in ijzer dat in het hemoglobinemolecuul is ingebouwd en in ijzer dat niet als hemoglobineijzer voorhanden is. Op grond van de gebruikte isolatietechniek zullen we genoemde fracties aanduiden als hemineijzer en niet-hemineijzer. Sletten (1964) kon aantonen, dat het geen verschil maakt of de specifieke activiteit wordt bepaald in de geïsoleerde he-

moglobinefractie of in de verkregen heminefractie van de erythrocyten. De specifieke activiteit van het hemineijzer bedroeg $13,6 \cdot 10^5$ dpm/ μ mol Fe. De specifieke activiteit van het ijzer in de niet-heminefractie was veel hoger dan de specifieke activiteit van het ijzer in de heminefractie, doch kon niet exact worden bepaald omdat het ijzer in deze fractie te gering bleek om meetbaar te zijn. We kunnen dus stellen, dat 3/5 deel van de radioactiviteit in de erythrocyten zich in de heminefractie bevond en dat de rest - dus 2/5 gedeelte - in de niet-heminefractie was gelocaliseerd. Dit kwam voor 0,2 ml erythrocytensuspensie respectievelijk neer op $3,9 \cdot 10^5$ en $2,5 \cdot 10^5$ dpm. Op grond van de gevoeligheid van de bepalingstechniek zal het ijzergehalte in de niet-heminefractie minder bedragen dan 0,02 μ mol, zodat een minimale specifieke activiteit kan worden berekend van $1,2 \cdot 10^7$ dpm/ μ mol Fe.

De proefdieren, 10 in het totaal, werden achtereenvolgens op de 2e, 4e, 6e, 8e en 10e dag paarsgewijs opgeofferd. Gedurende de experimentele periode verbleven de zeelten in onthloord leidingwater van 19°C.



Figuur V, 6.

Verloop van de specifieke activiteit van het totale ijzer in de perifere erythrocyten als functie van de tijd, na intracardiale toediening van gemerkte erythrocyten. De geschatte waarde van de specifieke activiteit van het ijzer in de perifere erythrocyten op tijdstip $t=0$, is op 100% gesteld. Het betreft steeds gemiddelden van twee waarnemingen (twee proefdieren).

Figuur V,6 geeft het verloop weer van de specifieke activiteit van het totale ijzer in de erythrocyten van het perifere bloed. De op basis van het geschatte bloedvolume en de ingebrachte hoeveelheid radioactiviteit berekende specifieke activiteit op tijdstip $t=0$ is in de weergave op 100% gesteld.

We zien, dat na een aanvankelijk snelle afname de curve afvlakt. Na 10 dagen is nog 40% van de oorspronkelijke hoeveelheid radioactiviteit in de erythrocyten aanwezig. Het zal duidelijk zijn, dat de gevonden curve in principe het resultaat kan zijn van drie gelijktijdig verlopende processen:

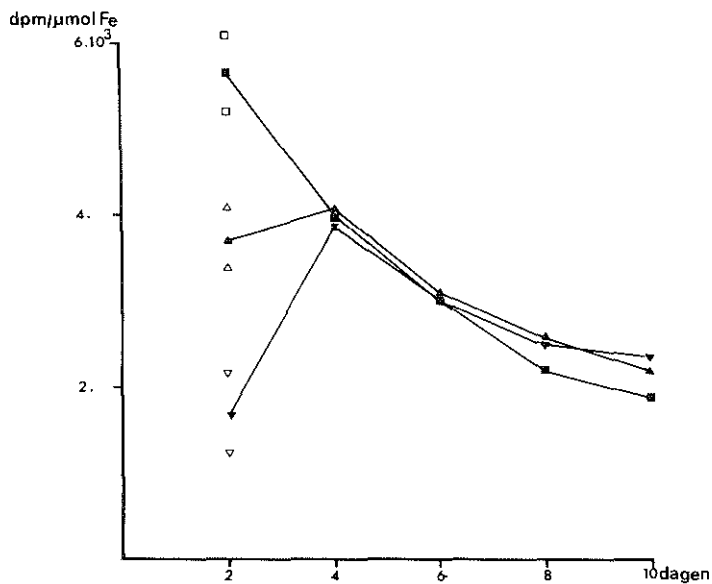
1. Uitwisseling van het ijzer in de niet-heminefractie van de erythrocyten met het plasmaijzer, gevolgd door clearance van dit (radioactieve) ijzer uit het plasma.
2. Afbraak van de ingebrachte erythrocyten.
3. Nieuwvorming van erythrocyten onder inbouw van het bij de eerste twee processen vrijkomende (radioactieve) ijzer.

Door ons - in vitro - uitgevoerde incubatie-experimenten hebben aangetoond, dat uitwisseling van het ijzer in de niet-heminefractie met het plasmaijzer te verwaarlozen is, zodat we dit proces als niet relevant moeten beschouwen. De snelle afname van de specifieke activiteit van het ijzer in de erythrocyten kan daarom slechts worden verklaard door een partieel uit de circulatie nemen van de ingebrachte erythrocyten. De afvlakking van de in fig. V,6 weergegeven curve kan onder anderen het gevolg zijn van de onder 3. genoemde nieuwvorming van erythrocyten.

Figuur V,7 geeft het verloop van de specifieke activiteit van het totale ijzer, van het hemineijzer en van het niet-hemineijzer in de milt weer. De curven voor het totale ijzer en het niet-hemineijzer doorlopen een maximum. De afname van de specifieke activiteit van het hemineijzer gaat gepaard met een toename van de specifieke activiteit van het ijzer in de niet-heminefractie. Dit wijst op een opname van het bij de afbraak van het hemoglobinemolecuul vrijgekomen ijzer door de niet-heminefractie.

In fig. V,8 is het verloop van de radioactiviteit in de genoemde fracties afgebeeld.

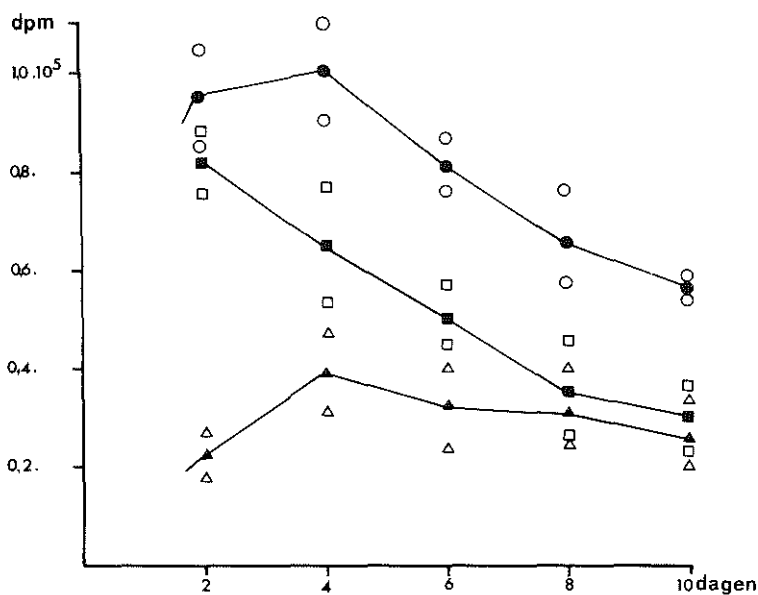
De toename van de radioactiviteit in de totale milt wordt gedurende de eerste twee dagen voornamelijk bepaald door de toename van de radioactiviteit in de heminefractie. Dit kan slechts betekenen, dat de radioactiviteit welke aanwezig is in de niet-heminefractie van de ingebrachte erythrocyten, in de bepaling van de totale radioactiviteit van de milt niet wordt betrokken. We



Figuur V,7.

Verloop van de specifieke activiteit van het totale ijzer in de milt, van het hemineijzer en van het niet-hemineijzer in de milt, na intracardiale toediening van gemerkte erythrocyten. Het betreft gemiddelden van twee waarnemingen.

- ▲ totale ijzer in de milt
- ijzer in de heminefractie van de milt
- ▼ ijzer in de niet-heminefractie van de milt



Figuur V,8.

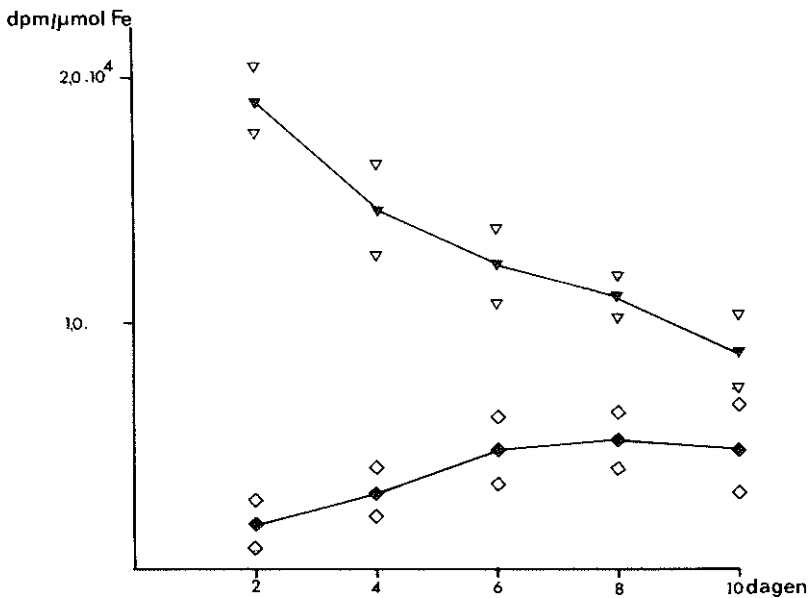
Verloop van de hoeveelheid radioactiviteit aanwezig in de totale milt, in de heminefractie en in de niet-heminefractie van de milt. Gemiddelden van twee waarnemingen. Gemerkte erythrocyten intracardiaal toegediend.

- radioactiviteit in de gehele milt
- radioactiviteit in de heminefractie van de milt
- ▲ radioactiviteit in de niet-heminefractie van de milt

moeten daarom aannemen, dat het ijzer in de niet-heminefractie van de erythrocyten bij afbraak van de erythrocyten zeer snel gemobiliseerd wordt.

Op grond van fig. V,6 kan worden gesteld, dat na 2 dagen ongeveer 35% van de ingebrachte radioactiviteitsdosis uit de erythrocyten is verdwenen. Dit komt neer op gemiddeld $2,2 \cdot 10^5$ dpm. In de totale milt is na 2 dagen gemiddeld een hoeveelheid radioactiviteit aanwezig van slechts $0,95 \cdot 10^5$ dpm. Deze discrepantie kan gedeeltelijk worden verklaard door de hypothese dat het niet-hemineijzer, dat bij afbraak vrijkomt, snel wordt gemobiliseerd en door het plasma wordt afgevoerd. Dit kan slechts een gedeeltelijke verklaring zijn omdat de niet-heminefractie slechts $2/5$ deel van de totale hoeveelheid radioactiviteit bevat, wat neerkomt op gemiddeld $0,9 \cdot 10^5$ dpm, zodat ongeveer $0,4 \cdot 10^5$ dpm op de totaal balans ontbreekt.

De gestelde hypothese wordt niet slechts direct ondersteund door de in figuur V,8 weergegeven resultaten, doch ook indirect door de in figuur V,9 weergegeven resultaten betreffende het verloop van de specifieke activiteit van het totale ijzer in de lever en van het ijzer in het plasma.



Figuur V,9.

De figuur geeft het verloop van de specifieke activiteit van het plasmaijzer en van het totale ijzer in de lever weer, na intracardiale toediening van gemerkte erythrocyten. Gemiddelden van twee waarnemingen.

- ▲ ijzer in het plasma
- ◆ totale ijzer in de lever

De afname van de specifieke activiteit van het ijzer in het plasma gaat gepaard met een toename van de specifieke activiteit van het ijzer in de lever. De curve voor de lever vertoont in tegenstelling tot de curve voor het totale ijzer in de milt, geen duidelijk maximum. Op géén der 5 tijdstippen bleek de specifieke activiteit van het ijzer in de heminefractie van de lever bepaalbaar te zijn, omdat de hoeveelheid radioactiviteit in de heminefractie te gering was om een betrouwbare meting toe te laten. Het lijkt daarom gerechtvaardigd, om niet het uit de erythrocyten vrijgekomen hemoglobineijzer, doch het plasmaijzer als de bron te beschouwen, waaruit de lever het ijzer betreft. De hoeveelheid door de lever opgenomen radioactiviteit heeft een dusdanige orde van grootte, dat deze hoeveelheid slechts verklaard kan worden door het radioactieve ijzer dat uit de niet-heminefractie van de erythrocyten bij afbraak vrijkomt.

Samenvattend kan nu worden gesteld, dat de milt zo niet het enige dan toch het belangrijkste orgaan is waar erythrocyten worden afgebroken. Het bij afbraak van erythrocyten vrijkomende hemoglobineijzer wordt in de milt verwerkt (niet-heminefractie in de milt); het uit de erythrocyten vrijkomende niet-hemineijzer wordt naar alle waarschijnlijkheid snel gemobiliseerd en door het plasma afgevoerd, waarna het in de lever wordt geklaard.

HOOFDSTUK VI

DE BESTUDERING VAN DE IJZEREXCRETIE EN VAN ENKELE ASPECTEN VAN DE IJZEROPNAME

INLEIDING

Over de ijzeruitscheiding bij de vissen is - voor zover ons uitgebreid literatuuronderzoek deze uitspraak toelaat - geen onderzoek verricht. We kunnen bij de vis in principe 4 wegen onderscheiden waarlangs ijzerverlies kan optreden:

1. via de urine
2. via de feces
3. via lichaamsmembranen welke in direct contact staan met het uitwendig milieu
4. via cel- en schubafschilfering e.d.

Het eerste proces is experimenteel gemakkelijk toegankelijk, dit in tegenstelling tot de drie overige processen. Door canulering van de urinaire papil kan de urine continu worden verzameld.

Wat de darminhoud betreft, deze zal bij een vastend proefdier voornamelijk zijn samengesteld uit water, gal, resten van de afgestoten darmmucosacellen en uit de daarbij vrijgekomen celinhoud. Het is praktisch niet mogelijk om de verschillende deelprocessen continu te vervolgen. De galblaas is wegens zijn ingekapselde ligging niet te canuleren; ook op de afstoting van de mucosacellen is in vivo experimenteel geen greep te krijgen. Daarom is getracht de ijzeruitscheiding via de darminhoud te bepalen door middel van canulering van de einddarm.

Problematischer nog is het onderzoek van de ijzeruitscheiding via

lichaamsmembranen. Als enige reële mogelijkheid biedt zich de meting van de radioactiviteitsuitscheiding aan na toediening van een speurdosis $^{59}\text{Fe(III)}$. Uitspraken over de opgetreden werkelijke ijzeruitscheiding zijn evenwel slechts mogelijk als alle compartimenten in de vis, wat het ^{59}Fe betreft, in een dynamisch evenwicht verkeren. Op grond van de specifieke activiteit van het gehele lichaamsijzer en de radioactiviteitsuitscheiding kan dan immers de werkelijke ijzeruitscheiding worden berekend. Dit is ook mogelijk als het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de pool van waaruit het ijzer wordt afgestaan, bekend is. Aan beide voorwaarden kan moeilijk worden voldaan. Een dynamisch evenwicht wordt slechts zeer langzaam bereikt, zodat de korte halveringstijd van het ^{59}Fe -isotoop beperkend is. De laatste voorwaarde vooronderstelt een diepgaande kennis van het uitscheidingsmechanisme zelf, welke niet aanwezig is. De plaats waar de uitscheiding plaatsvindt, kan globaal worden bepaald door het aanbrengen van goed afsluitende zakken waarin van tijd tot tijd de radioactiviteit wordt bepaald. Mashiko et al. (1964) bestudeerden zo de verschillende wegen waarlangs Ca wordt geabsorbeerd en wordt geëxcreteerd. Deze methode van onderzoek hebben wij niet toegepast.

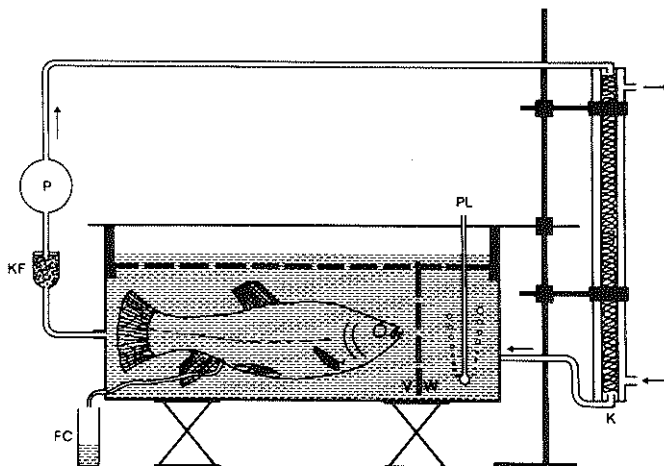
Het laatstgenoemde proces, ijzerverlies als gevolg van perifere afschilfering is experimenteel praktisch ontoegankelijk en waarschijnlijk kwantitatief van weinig belang.

We zullen, alvorens op de experimentele procedure in te gaan, de verschillende methoden welke zijn toegepast, toelichten. Voor een gedetailleerde beschrijving van de operatietechnieken, de technische gegevens van de gebruikte canulen en dergelijke wordt verwezen naar hoofdstuk II.

1. Urineverzameling.

De urinecatheter werd via de urinaire porus ingebracht, waarna de catheter, via een insnijding in de flank van de vis ter hoogte van de urinaire papil, werd gefixeerd. Drie dagen na hechting van de wond werd met de urinecollectie begonnen. Twee verschillende methoden werden toegepast. Deze zijn in figuur VI,1 schematisch weergegeven.

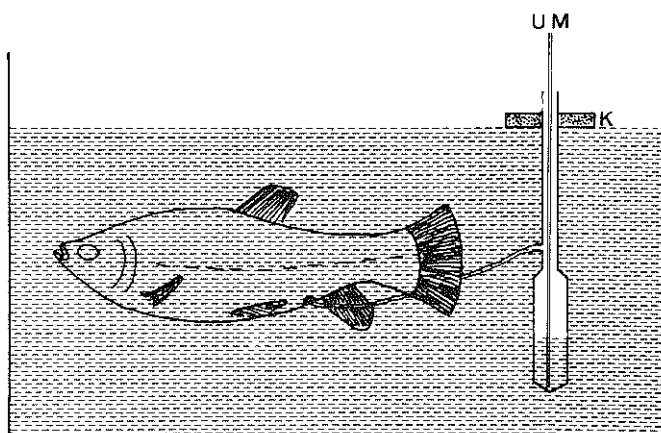
De verzameling met behulp van het drijvende reservoir had als voordeel, dat deze methode over langere duur (tot 7 dagen toe) kon worden angewend. De tweede methode waarbij de canule aan de wand van de experimenteerkamer was gefixeerd, maakte continue verzameling met een fractiecollector mogelijk, doch kon in de regel slechts voor korte tijd (tot 60 uur toe) worden gebruikt.



Figuur VI, 1_a.

Perspex kamer voor de urinecollectie. Voor de afmetingen wordt verwezen naar de tekst.

V.W.: verstelbare wand; P.L.: persluchttoevoer; F.C.: fractieverzamelaar; K.F.: koolfilter; P.: pomp (Eheim, geplastificeerd); K.: koelopzet.



Figuur VI, 1_b.

Urinecollectie met behulp van een drijvend reservoir. Het proefdier bevindt zich in een bak met een inhoud van 40 l. Het water wordt gekoeld en via een koolfilter gecirculeerd.

K.: drijver van kurk; U.M.: slang voor het nemen van urinemonsters.

2. Verzameling van de feces.

De canule werd door de anale porus aangebracht en via een doorsnijding van de flank, ter hoogte van de anale papil, inwendig gefixeerd. De darminhoud werd in een plastic zakje, dat extern aan de canule verbonden was, opgevangen en over perioden van 24 uur verzameld.

3. Het bepalen van de radioactiviteitsuitscheiding via de membranen.

Hier werd gebruik gemaakt van perspexkamers waarvan de lengten instelbaar waren. De afmetingen waren (17-30) cm x 5,5 cm x 10 cm en (30-40) cm x 6,5 cm x 12,5 cm (zie figuur VI, 1). In de kamers bevond zich respectievelijk 2,5 en 3,5 liter kunstmatig zoetwater met een osmolaliteit van 25 mosmol/kg. Het water werd via een koolstoffilter rondgepompt teneinde snelle vervuiling tegen te gaan. Het filter had geen invloed op de osmolaliteit. Proefondervindelijk bleek, dat de actieve kool een zeer goed adsorbens was voor het uitgescheiden radioactieve ijzer. Dit maakte meting van relatief geringe hoeveelheden uitgescheiden radioactiviteit mogelijk zonder voorafgaande concentratie van het kunstmatige zoetwater. Om selectieve metingen te verkrijgen, moesten uiteraard de alternatieve processen experimenteel worden geëlimineerd. Door canulering van de urinaire papil werd uitscheiding van urine in het milieu voorkomen. Verlies van radioactiviteit via de feces is een vertraagd proces. De duur van de experimenten was van dien aard, dat met dit radioactiviteitsverlies geen rekening hoefde te worden gehouden.

§ 1. DE IJZERUITSCHEIDING IN DE URINE

Om een eerste indruk te krijgen over de mate van ijzerexcretie in de urine, werd van 5 proefdieren met behulp van het beschreven drijvende reservoir over een tijd van 3 dagen urine verzameld. Overdag werd het reservoir elke twee uur geleegd. De gedurende de nacht geproduceerde urine werd in zijn geheel - dus ongefractioneerd - verzameld. De op het oog gezonde vissen waren voordat het experiment begon 14 dagen in het laboratorium. Ze verbleven zowel voor als tijdens het experiment in stromend ontchloord leidingwater van 19°C.

De gemiddelde urineproductie bedroeg $9,4 \pm 1,8$ ml/24uur/100 g vis, hetgeen voor een zoetwatervis als een normale waarde kan worden beschouwd (Cleveland et al., 1969). Het ijzergehalte van de opvolgende monsters werd

Tabel VI, 1.

Urineproductie en het gehalte aan ijzer, hemineijzer en transferrine
in de urine van de zeelt (5 proefdieren).

Zeelt No.	Urinehoeveelheid in 24 uur (ml)	Fe urine $\mu\text{mol/l}$	Hemineijzer urine $\mu\text{mol/l}$	Transf. urine $\mu\text{mol/l}$
1	33	1,3	0,021	$1,0 \cdot 10^{-2}$
2	26	0,9	0,018	$1,3 \cdot 10^{-2}$
3	38	1,6	0,010	$1,0 \cdot 10^{-2}$
4	42	1,1	0,020	$1,2 \cdot 10^{-2}$
5	28	1,5	0,035	$1,4 \cdot 10^{-2}$

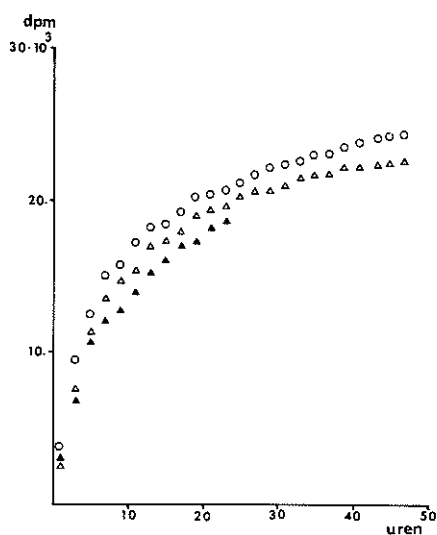
bepaald volgens de door Tavenier (1971) beschreven methode, zie hoofdstuk II. De urinemonsters werden vooraf 10 minuten op een Sorvall tafelfugetrifuge bij 3000 rpm afgedraaid teneinde het sediment te verwijderen. Over alle verkregen monsters werd een gemiddelde ijzerconcentratie berekend van $1,2 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$, zodat de gemiddelde ijzeruitscheiding $11,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/24 uur/100 g}$ vis bedroeg. Er konden geen systematische verschillen worden aangetoond tussen de overdag en 's nachts geproduceerde hoeveelheden urine. Ook de ijzerconcentraties ondergingen geen gerichte veranderingen.

We hebben ons de vraag gesteld in welke vorm dit ijzer in de urine aanwezig is. Hierbij werd in eerste instantie aan transferrineijzer en hemoglobineijzer gedacht. Het transferrinegehalte werd bepaald volgens de radiale immunodiffusietechniek op door ons gemaakte partigenplaten. Het anti-zeeltentransferrine werd verkregen door immunisatie van cavia's met sterk gezuiverde zeeltentransferrine (v. Eijk et al., 1972). Het hemoglobineijzer werd berekend op grond van het in de urine bepaalde heminegehalte. Voor beide bepalingstechnieken wordt naar hoofdstuk II verwezen. Voor de bepaling van het transferrinegehalte was het noodzakelijk de urine vooraf te concentreren. Van elk der 5 proefdieren werd de urine - welke na het bepalen van het ijzer in de opeenvolgende monsters resteerde - gemengd. In deze mengfracties werden het heminegehalte en het ijzergehalte bepaald. De urine die nu nog resteerde werd vervolgens 50 tot 100 maal geconcentreerd door middel van vacuumdialyse. In de 5 zo verkregen geconcentreerde mengfracties werd het transferrine gemeten. De verkregen resultaten zijn in tabel VI, 1 weergegeven.

Het is duidelijk, dat de gemeten ijzerconcentratie niet kan worden verklaard door het aanwezige hemineijzer. Voorts kan worden gesteld, dat het grootste gedeelte van het in de urine uitgescheiden ijzer niet aan transferrine is gebonden. Deze waarnemingen staan niet apart. Ook bij de mens bestaat er een grote discrepantie tussen het in de urine gemeten totale ijzer en de hoeveelheid ijzer die op grond van het transferrinegehalte kan worden verklaard (Wadsworth, 1969; Tavenier, 1971). Tavenier vond een gemiddelde ijzerconcentratie in 24 uur's urine van gezonde mensen van $0,32 \mu\text{mol/l}$, 15% hiervan bevond zich in het sediment. De transferrineconcentratie bedroeg gemiddeld $1,2 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/l}$.

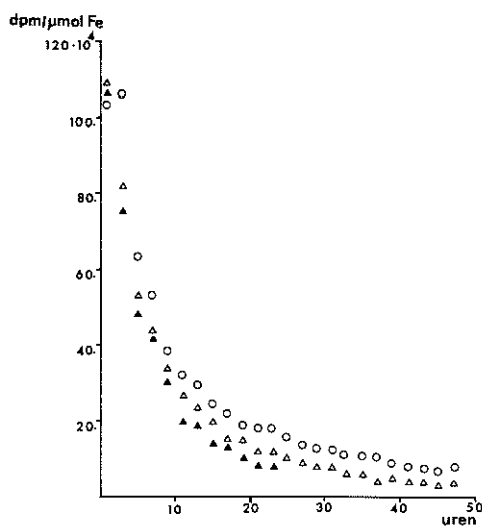
Mogelijk gaat het excretieproces in de nier gepaard met een directe loskoppeling van het ijzer van het transporterend transferrine molecuul. Een andere mogelijkheid is, dat er in de nier altijd al een van transferrine losgekoppelde ijzerpool aanwezig is, van waaruit ijzer kan worden uitgescheiden. In principe kan een oplossing van het zo gestelde probleem worden gevonden door na toediening van een speurdosis plasmagebonden $^{59}\text{Fe(III)}$ de specifieke activiteit van het plasmaijs, afgeleid uit figuur V,1, te vergelijken met de specifieke activiteit van het in de urine uitgescheiden ijzer. Aan 3 proefdieren (325, 350, 330 g), welke 3 dagen voor het inbrengen van de speurdosis, waren voorzien van een urinecatheter, werd volgens de in hoofdstuk V, § 1 beschreven procedure intracardiaal $2 \mu\text{C}$ plasmagebonden $^{59}\text{Fe(III)}$ toegediend. Gedurende het 48 uur durende experiment bevonden de zeelten zich in de eerder beschreven perspexkamers. De kamers waren gevuld met leidingwater, dat continu via het koolstoffilter werd rondgepompt. De temperatuur van het water werd op 19°C gehouden. De urine werd verzameld in 2 uur's fracties met een fractiecollector. In de urinefracties werd zowel het ijzer als de radioactiviteit bepaald. De specifieke activiteit van het uitgescheiden ijzer kon zodoende worden berekend. De verkregen resultaten zijn in de figuren VI,2,3 weergegeven. De eerste afbeelding geeft het cumulatieve verloop van de radioactiviteitsuitscheiding weer. In de tweede afbeelding is het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de urine weergegeven.

Na een tijdsverloop van 45 uur bedraagt de gemiddelde uitscheiding van radioactiviteit in de urine $23,5 \cdot 10^3$ dpm. Dit komt neer op 0,5% van de ingebrachte dosis. De biologische halfwaarde tijd van het in de nier uitgescheiden ijzer is ongeveer 4 uur. Voor de biologische halfwaarde tijd van het



Figuur VI,2.

De radioactiviteitsuitscheiding in de urine als functie van de tijd na intracardiale toediening van de plasmagebonden speurdosis $^{59}\text{Fe(III)}$. Cumulatief uitgezet. Drie proefdieren.



Figuur VI,3.

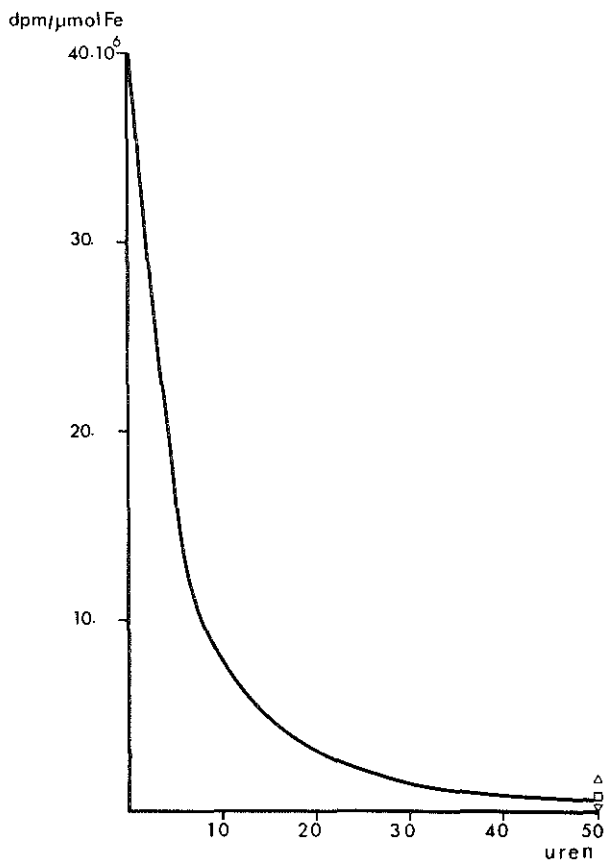
Specifieke activiteit van het ijzer in de urine als functie van de tijd. Speurdosis $^{59}\text{Fe(III)}$ intracardiaal toegediend. Drie proefdieren.

plasmaijzer werd - zoals in hoofdstuk V vermeld - een waarde gevonden van 4,3 uur.

De conclusie, dat er direct aan de ijzeruitscheiding voorafgaand een loskoppeling van het aan transferrine-gebonden ijzer plaatsvindt, is op grond van de gelijkheid der biologische halveringstijden alléén nog niet gewettigd. Het is namelijk niet uitgesloten, dat de uitscheiding in de urine van het transferrine-gebonden ijzer, het gemeten verloop van de radioactiviteit in de urine volledig verklaart. Als we aannemen, dat de in figuur VI,2 weergegeven cumulatieve curve, het directe gevolg is van het verlies aan transferrine-gebonden ijzer afkomstig uit het plasma, dan kunnen we berekenen, dat het gehalte aan transferrine-gebonden ijzer in de 2 uren urinefracties gemiddeld $0,08 \cdot 10^{-3}$ μmol bedraagt. Het gemeten transferrinegehalte is slechts $1,1 \cdot 10^{-5}$ μmol , zodat verlies van transferrine-gebonden ijzer geen voldoende verklaring kan zijn voor de experimentele resultaten.

We moeten dus concluderen, dat er voorafgaand aan de excretie van het ijzer, loskoppeling optreedt van het transferrine molecuul. De vraag die zich nu opdringt is of al het in de urine uitgescheiden ijzer direct - al dan niet aan transferrine gebonden - uit het plasma afkomstig is. Zou dit het geval zijn, dan moet de specifieke activiteit van het op een bepaald ogenblik uitgescheiden ijzer gelijk zijn aan de specifieke activiteit van het plasmaijzer op datzelfde ogenblik, aangenomen dat het excretieproces ten opzichte van het loskoppelingsproces niet al te sterk naijlt, en dat de invloed van het in de urine aanwezig hemoglobineijzer op de gemeten specifieke activiteit te verwaarlozen is. De - op grond van de in figuur V,1 weergegeven verdwijningscurve - berekende absolute verdwijningscurve van het plasmaijzer (figuur VI,4), zou dan binnen de nauwkeurigheid van de bepalingstechniek de in figuur VI,2 weergegeven curve voor het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de urine moeten overlappen. Dit is niet het geval.

Figuur VI,4 geeft de berekende absolute verdwijningscurve weer, voor een gemiddelde vis van 340 g met een plasmavolume van 10 ml en een plasmaijzerconcentratie van 15 $\mu\text{mol/l}$. Als we aannemen, dat de specifieke activiteit van het ijzer in de geponeerde ijzerpool nul is, dan kunnen we berekenen welke hoeveelheid ijzer geleverd wordt door de ijzerpool en voor welke bijdrage het loskoppelingsproces verantwoordelijk is. De in figuur VI,2 weergegeven cumulatieve curve is onder deze aanname het directe gevolg van het verlies aan - al dan niet transferrine gebonden - ijzer, afkomstig



Figuur VI, 4.

Berekend verloop van de specifieke activiteit van het plasmaijzer, na intracardiale toediening van $2 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe(III)}$, gebonden aan plasma. De bij de drie proefdieren verkregen eindwaarden zijn in de figuur opgenomen.

uit het plasma. Op grond van deze curve werd reeds eerder een totale ijzeruitscheiding in de 2 uren urinemonsters berekend van gemiddeld $0,08 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}$. Omdat een gemiddelde 2 uren urinefractie 2,5 ml bedraagt, komt dit neer op een ijzerconcentratie van $0,033 \mu\text{mol/l}$. Een transferrineconcentratie van $1,2 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/l}$ kan bij een 30% verzadiging slechts $0,7 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol}$ ijzer/l verklaren, zodat de resterende $2,6 \cdot 10^{-2} (= 3,3 \cdot 10^{-2} - 0,7 \cdot 10^{-2}) \mu\text{mol/l}$ kunnen worden toegeschreven aan het geponeerde loskoppelingsproces.

We kunnen nu op grond van bepalingen en berekeningen het ijzer in de urine als volgt indelen (tabel VI, 2):

Tabel VI,2.

Ijzer in de urine ingedeeld naar de aard van de verbinding en naar de herkomst. Aangenomen is, dat de specifieke activiteit van het depot-ijzer in de nier te verwaarlozen is. (Zie voor de berekening de tekst.)

ijzer	ijzerconcentratie ($\mu\text{mol/l}$)
1. sediment	0,08
2. hemoglobine	0,021
3. transferrine	0,007
4. van transferrine losgekoppeld	0,026
	0,134
totaal ijzer	1,2
5. uit de "ijzerpool" afkomstig	1,07

We moeten concluderen, dat het meeste ijzer in de urine afkomstig is uit de geponeerde ijzerpool.

Is er op microscopisch niveau enige aanwijzing te vinden voor het bestaan van een ijzerpool in relatie tot het excretieapparaat? Histologische preparaten welke gekleurd zijn met Berlijnsblauw volgens Perl en tegengekleurd met kernechtrood, tonen kleurbaar ijzer aan in de tubuli van de nier. Niet alle delen van het excretieapparaat reageren positief. De glomerulus, de nek van de glomerulus, het distale segment van de tubulus en de collectie tubulus reageren negatief op de Berlijnsblauw kleuring. In de cellen van het eerste en tweede proximale segment is wel ijzer aanwezig dat met Berlijnsblauw kan worden gekleurd. Ook in het lumen van het eerste en tweede proximale segment kan ijzer worden aangetoond. Dit laatste is ook mogelijk - zij het in mindere mate - in meer distaal gelegen regionen van de tubulus. Of het histochemisch aantoonbare ijzer identiek is met het ijzer in de geponeerde ijzerpool, kan op grond van de verkregen experimentele resultaten niet worden uitgemaakt.

Zoals reeds eerder vermeld, bevonden zich de zeelten gedurende de beschreven experimenten in stromend leidingwater. Het ijzergehalte van het leidingwater is laag en bedraagt niet meer dan $0,4 \mu\text{mol/l}$. Als we ons voorlopig baseren op een drinkratio van $1,7 \text{ ml}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$ (zie verderop in dit hoofdstuk), dan kunnen we een dagelijks oraal ijzeraanbod berekenen van $0,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol Fe}/100 \text{ g vis}$. Zelfs bij een 100% absorptie van het met het drinkwater aangeboden ijzer, zou het urinaire ijzerverlies niet worden gecompenseerd. De gemeten ijzeruitscheiding in de urine bedraagt immers

$11,4 \cdot 10^{-3} \pm 2,6 \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$. Daarbij komt, dat er niet slechts ijzerverlies via de urine optreedt, maar dat ook met de feces en mogelijk door de lichaamsmembranen ijzer kan worden uitgescheiden. We komen hier later op terug. Een en ander doet vermoeden, dat het urinaire ijzeruitscheidingsmechanisme niet goed regelbaar is, zodat de ijzeruitscheiding niet optimaal op de ijzerabsorptie wordt afgestemd. We mogen evenwel de mogelijkheid niet uitsluiten, dat aanpassing van het ijzeruitscheidingsmechanisme eerst na verloop van tijd wordt bereikt.

We hebben reeds eerder gesteld, dat de grootste bijdrage aan het in de urine uitgescheiden ijzer wordt geleverd door de geponeerde ijzerpool. Het is zeer wel mogelijk, dat er bij een langdurige negatieve balans van opgenomen en uitgescheiden ijzer, depletie van de geponeerde pool optreedt, zodat ook de bijdrage vanuit deze pool aan het in de urine uitgescheiden ijzer wordt gereduceerd. Anderzijds zou bij een langdurig overmatig ijzeraanbod de pool in omvang kunnen toenemen, met als gevolg een mogelijk verhoogde ijzerexcretie in de urine. Deze overwegingen leiden tot twee soorten experimenten. De concrete vraagstelling kunnen we als volgt formuleren:

1. Neemt de omvang van de ijzerpool bij langdurig submarginaal ijzeraanbod af en zo ja, is deze afname van invloed op de urinaire ijzeruitscheiding.
2. Leidt een langdurig overmatig aanbod tot een toename van de geponeerde ijzerpool en zo ja, gaat dan deze toename gepaard met een verhoging van de ijzeruitscheiding in de urine.

Voor de bestudering van de eerste vraagstelling hebben wij de volgende experimentele procedure gevolgd. Drie vissen, welke gedurende 10 dagen in een kunstmatig zoetwatermilieu verbleven met een osmolaliteit van 25 mosmol/kg , werden gedurende de eerste 8 dagen gevoed met het in hoofdstuk II beschreven artificiële voedingsmengsel, waaraan geen ijzer was toegevoegd. Op grond van het gemeten ijzergehalte van dit voedsel, kon worden berekend, dat per 100 g vis niet meer dan $1,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol Fe}$ werd aangeboden. De ijzerconcentratie in het kunstmatig zoetwater bedroeg $4 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/l}$, zodat de ijzeropname met het drinkwater kon worden verwaarloosd. Na 8 dagen werd volgens de beschreven procedure de urineblaas gecanuleerd; 2 dagen later werd in de perspexkamers - eveneens gevuld met kunstmatig zoetwater van gelijke osmolaliteit - met urinecollectie begonnen. De urine werd gedurende 30 uur opgevangen in fracties van 5 uur. Tabel VI, 3 geeft de resultaten weer.

Tabel VI,3.

Ijzeruitscheiding onder condities van een submarginaal ijzeraanbod.

	proefdier no.			totaal
	1	2	3	gemiddelde
gem. urineproductie (ml/100 g vis/24 uur)	$9,4 \pm 0,8$	$8,4 \pm 0,6$	$9,4 \pm 0,95$	$9,1 \pm 0,8$
gem. ijzerconcentratie ($\mu\text{mol/l}$)	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,2$
gem. ijzeruitscheiding ($\mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$)	$8,2 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-3}$	$7,6 \cdot 10^{-3} \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$	$7,3 \cdot 10^{-3} \pm 1,1 \cdot 10^{-3}$	$7,7 \cdot 10^{-3} \pm 1,75 \cdot 10^{-3}$

Urineproductie, ijzerconcentratie in de urine en de dagelijkse ijzeruitscheiding in de urine per 100 g vis, na een verblijf van 10 dagen in kunstmatig zoetwater met een ijzerconcentratie van $4 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/l}$. Drie proefdieren. Gemiddelde $\pm$ standaarddeviatie.

De gemiddelde ijzeruitscheiding is in vergelijking tot de eerder gevonden waarde van $11,4 \cdot 10^{-3} \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$ weliswaar afgenomen, op basis van de Student t-toets ($p = 0,05$) is deze afname niet significant.

Na afloop van het experiment werden de vissen bloedvrij gespoeld met fysiologisch zout. Van de milt en de nier werden coupes gemaakt welke met Berlijnsblauw op de aanwezigheid van ijzer werden onderzocht. De coupes werden vergeleken met de eerder verkregen serie en met een nieuwe serie verkregen uit pas gevangen zeelten. Deze laatste serie kon als een blanco worden beschouwd.

De hoeveelheid kleurbaar ijzer in de niertubuli blijkt onder condities van een langdurig submarginaal ijzeraanbod te zijn afgenomen. Slechts incidenteel kan nog ijzer in de cellen van de proximale tubuli en in het lumen van de tubuli worden aangetoond. Voor het kleurbare ijzer dat als "clusters" in het erythroïde weefsel voorhanden is, kon geen duidelijke afname worden waargenomen, dit in tegenstelling tot het kleurbare ijzer in de milt.

Voor de bestudering van de tweede vraagstelling, is gebruik gemaakt van de volgende proefopstelling. Drie zeelten - waarvan de urineblaas twee dagen voor de aanvang van het experiment was gecanuleerd - bevonden zich gedurende 48 uur in de urine collectiekamers welke werden doorstroomd met een oplossing bestaande uit kraanwater waaraan vanuit een reservoir continu Fe(III)citraat werd toegevoegd. De ijzerconcentratie in de kamers was constant en bedroeg $20 \mu\text{mol Fe(III)}/\text{l}$. De pH in het ferricitraat reservoir was op 7 gebracht zodat ook de pH van het experimentele medium neutraal was. De osmolaliteit van het met ferricitraat verrijkte water bedroeg $30 \text{ mosmol}/\text{kg}$. De drie zeelten waren van te voren gedurende 7 dagen geacclimeerd in een milieu bestaande uit kraanwater waaraan natriumcitraat tot aan een osmolaliteit van $30 \text{ mosmol}/\text{kg}$ was toegevoegd. De temperatuur van het acclimatiemilieu en van het experimentele milieu bedroeg 18°C . De urine werd in '5 uursfracties' verzameld.

Tabel VI,4 geeft de resultaten weer. De verzamelde urinefracties zijn zo gecombineerd, dat voor iedere vis 4 '10 uursfracties' en 1 '8 uursfractie' werden verkregen. In de tabel zijn deze respectievelijk genummerd van 1 t/m 5. De tabel geeft de gemiddelde waarden van de genoemde grootheden weer.

De - op grond van de volumina der 5 verkregen monsters - berekende urineproductie per 100 g vis per dag ondergaat gedurende het experiment geen gerichte verandering, dit in tegenstelling tot de ijzerconcentratie en de da-

Tabel VI,4.

Ijzeruitscheiding in de urine onder condities van een verhoogd ijzeraanbod.

rubriek no.	1	2	3	4	5	6
urineproductie (ml/100 g vis/24 uur)	6,5	7,8	6,4	6,9	8,2	6,3
s.d.	0,8	1,2	0,6	1,0	0,5	5,7-6,9
ijzerconcentratie (μ mol/l)	1,0	0,9	0,8	1,3	1,8	2,5
s.d.	0,05	0,1	0,2	0,2	0,25	2,1-2,9
ijzeruitscheiding (μ mol/100 g vis/24 uur)	$6,5 \cdot 10^{-3}$	$7,0 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-3}$	$9,0 \cdot 10^{-3}$	$14,8 \cdot 10^{-3}$	$15,8 \cdot 10^{-3}$
s.d.	$0,8 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$

Rubriek 1 t/m 5 geeft de gemiddelde waarden $\pm$ de standaarddeviaties (3 proefdieren) voor de urineproductie, de ijzerconcentratie en de dagelijkse urinaire ijzeruitscheiding weer bij een verblijf van 48 uur in een milieu bestaande uit stromend leidingwater continu verrijkt met 20 μ mol Fe(III)citraat/l. De rubrieken 1 t/m 4 representeren opeenvolgende '10 uren urinefracties'. De 5e rubriek representeert de laatst verkregen '8 uren urinefractie'.

Rubriek 6 geeft de gemiddelde waarden $\pm$ de spreidingsbreedte van de urineproductie, de ijzerconcentratie en de dagelijkse ijzeruitscheiding in de urine (2 proefdieren) bij een - aan de urinecollectie voorafgaand - verblijf van 7 dagen in leidingwater verrijkt met 20 μ mol Fe(III)citraat/l. De waarden hebben betrekking op de per vis verzamelde 24 uren urine.

gelijkse ijzeruitscheiding per 100 g vis. Voor het laatste monster (8 uren) geldt, dat zowel de ijzerconcentratie als de berekende ijzeruitscheiding significant van de voor de eerste 3 monsters berekende ijzerconcentratie en ijzeruitscheiding verschillen. Een verklaring hiervoor kan zijn, dat de gedurende de acclimatieperiode geïnduceerde depletie van de ijzerpool, pas in de loop van het experiment wordt te niet gedaan. De uiteindelijk toegenomen omvang van de geponeerde ijzerpool, zou dan de verhoogde ijzeruitscheiding per 100 g vis kunnen verklaren.

Het histologisch onderzoek (Berlijnsblauwkleuring volgens Perl) toonde aan dat de hoeveelheid kleurbaar ijzer in de niertubuli, onder de gegeven experimentele condities, duidelijk was verhoogd, dit in overeenstemming met de hypothese dat het histochemisch aantoonbare ijzer identiek is met de geponeerde ijzerpool.

Als de gedachte juist is, dat depletie van de ijzerpool leidt tot een aanvankelijke verlaging van de ijzerconcentratie van de urine en daardoor tot een verlaging van de dagelijkse ijzeruitscheiding, dan moet na een langdurig verblijf in het beschreven milieu een verhoogde ijzerconcentratie en een toegenomen ijzeruitscheiding worden verwacht.

Twee zeelten verbleven hiertoe gedurende 6 dagen in kraanwater dat met ferricitraat tot een ijzereconcentratie van $20 \mu\text{mol Fe(III)}$ was verrijkt. Twee dagen voordat met urinecollectie werd begonnen, werd de urineblaas gecanuleerd.

De verkregen resultaten zijn in tabel VI,4 vermeld en wel onder rubriek 6. Zowel de ijzerconcentratie als de dagelijkse ijzeruitscheiding zijn duidelijk verhoogd. Dit geldt eveneens voor de histochemisch met behulp van Berlijnsblauw aantoonbare ijzerfractie in de tubuli van de nier.

We kunnen uit deze experimenten concluderen, dat de ijzeruitscheiding in de urine afhangt van het ijzeraanbod. De resultaten, verkregen onder condities van een submarginaal ijzeraanbod zouden kunnen betekenen, dat de ijzeruitscheiding in de nier slechts tot een bepaald minimum toe regelbaar is; dit minimum zou dan ongeveer $6,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol Fe}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$ bedragen. Een verhoogd ijzeraanbod doet de ijzeruitscheiding in de urine toenemen. Of hier van een efficiënte regulatie sprake is, kan niet worden beoordeeld. Hiertoe zou de werkelijke ijzeropname onder condities van een verhoogd ijzeraanbod bekend moeten zijn. Baseren we ons wederom op een drinkratio van $1,7 \text{ ml}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$, dan bedraagt het orale ijzeraanbod in het met Fe(III) citraat verrijkte milieu $38 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$. De

maximale waarde welke wij hebben gemeten voor de ijzeruitscheiding onder deze condities bedraagt 16.10^{-3} . De mogelijkheid dat er een doeltreffende regulatie optreedt, lijkt zeker aanwezig.

§ 2. DE IJZERUITSCHEIDING VIA DE FECES

We zullen hier op de vraag ingaan of er afhankelijk van het ijzeraanbod regulatie van het fecale ijzerverlies kan optreden. Zoals in de inleiding van dit hoofdstuk is besproken, wordt de darminhoud verzameld door middel van canulering van de einddarm. Aan de proefdieren is steeds 4 dagen voor de aanvang van het experiment voedsel onthouden, zodat de darminhoud voornamelijk bestond uit water, resten van darmmucosacellen en gal. We hebben twee soorten experimenten uitgevoerd.

De eerste serie had betrekking op het fecale ijzerverlies onder condities van een submarginaal ijzeraanbod. De experimentele procedure was gelijk aan die welke werd gevolgd bij de bestudering van het urinaire ijzerverlies onder condities van een langdurig submarginaal ijzeraanbod (paragraaf 1).

De tweede serie experimenten had betrekking op het fecale ijzerverlies onder condities van een langdurig overmatig ijzeraanbod. Evenals bij de bestudering van het urinaire ijzerverlies onder deze condities verbleven de zeelten gedurende 6 dagen in kraanwater waaraan $20 \mu\text{mol/l Fe(III)}$ als citraat was toegevoegd. Dit milieu werd dagelijks ververscht. Na het aanbrennen van de einddarmcanule werden de zeelten overgebracht in een kunstmatig zoetwatermilieu van gelijke osmolaliteit en zuurgraad (30 mosmol/kg ; $\text{pH} = 7$). Twee dagen later werd met de verzameling van de darminhoud begonnen. Er werd gedurende 5 dagen verzameld in 24 uursfracties. In de 24 uursfracties werd zowel hemine als totaal ijzer bepaald. Tabel VI, 5 geeft de resultaten weer.

De gevonden waarden zijn niet significant verschillend. De relatief hoge waarden doen de vraag rijzen of mogelijk tengevolge van de operationele ingreep interne bloeding is opgetreden. De heminebepalingen die wij hebben verricht op de gecollecteerde 24 uursfracties, wijzen niet in deze richting. Maximaal 5% van het totale ijzer kan door de aanwezigheid van hemineijzer worden verklaard.

Dat mogelijk de gal in de regulatie van de ijzeruitscheiding een rol speelt, zou uit de volgende gegevens kunnen blijken. Na afloop van de collec-

tiefase werden de zeelten opgeofferd en met fysiologisch zout doorspoeld. De gal, de lever en de totale schoongespoelde darm werden vervolgens op ijzer onderzocht. Tabel VI,6 geeft de resultaten weer.

Tabel VI,5.

ijzeraanbod aantal monsters	submarginaal 14	overmatig 15
darminhoud (ml/100 g vis/24 uur)	$2,1 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,6$
ijzerconcentratie ($\mu\text{mol/l}$)	$6,8 \pm 1,7$	$11,4 \pm 2,9$
ijzeruitscheiding ($\mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$)	$14,3 \cdot 10^{-3} \pm 3,9 \cdot 10^{-3}$	$20,5 \cdot 10^{-3} \pm 4,7 \cdot 10^{-3}$

Ijzeruitscheiding via de feces. De proefdieren, 6 in het totaal, verbleven vooraf in een milieu gekenmerkt door een submarginaal en een overmatig ijzeraanbod. Voor de betekenis van deze rubrieken wordt verwezen naar de tekst. Gemiddelde waarden $\pm$ standaarddeviaties.

Tabel VI,6.

ijzeraanbod aantal proefdieren	submarginaal 3	overmatig 3
ijzergehalte gal ($\mu\text{mol/g nat gewicht}$)	$0,17 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,05$
hoeveelheid gal (ml)	$0,15 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,04$
ijzergehalte lever ($\mu\text{mol/g nat gewicht}$)	$7,4 \pm 2,1$	$8,2 \pm 2,5$
ijzergehalte darm ($\mu\text{mol/g nat gewicht}$)	$0,26 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,09$

Ijzergehalte in de gal, de lever en de darm en de hoeveelheid gal in de galblaas, gemeten bij de proefdieren die zijn gebruikt voor de bestudering van het fecale ijzerverlies onder submarginale en overmatige ijzercondities. Gemiddelde waarden $\pm$ standaarddeviaties.

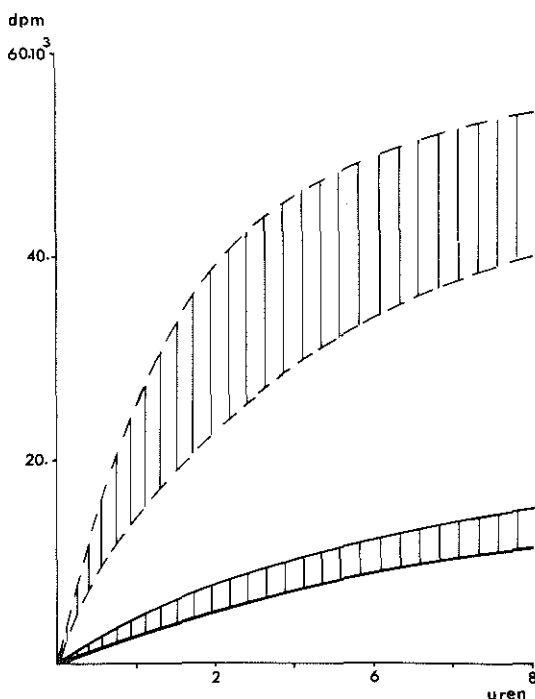
Slechts de waarden voor het ijzergehalte van de gal zijn op basis van de t-toets, $p < 0,05$, significant verschillend. Er zijn - voor zover ons bekend - voor vissen geen gegevens gepubliceerd over de hoeveelheid geproduceerde en in het darmlumen uitgescheiden galvloeistof, zodat over de kwantitatieve rol van de gal in de ijzeruitscheiding geen bindende uitspraak kan worden gedaan. Terloops zij hier opgemerkt, dat de ijzerconcentratie van de galvloeistof afhankelijk is van de totale ijzerstatus van de zeelt. Door ons uitgevoerde experimenten, waarbij zeelten werden overladen met intramusculair toegediende ijzerdoses (Fe(III)citraat), toonden aan, dat de ijzerconcentratie in de gal evenredig met de overladingsfactor toenam. In hoofdstuk VII wordt hierop teruggekomen.

§ 3. DE IJZERUITSCHEIDING VIA LICHAAMSMEMBRANEN

In de inleiding van dit hoofdstuk zijn we reeds ingegaan op de experimentele en theoretische moeilijkheden die het meten van de werkelijke ijzeruitscheiding via de lichaamsmembranen met zich meebrengt. We zullen ons beperken tot het volgen van het radioactiviteitspeil in het milieu, na intracardiale toediening van een speurdosis plasmagebonden $^{59}\text{Fe(III)}$. De speurdosis bedroeg $2 \mu\text{C}$. Voor verdere bijzonderheden wordt verwezen naar hoofdstuk V, § 1. De proefdieren - welke eerst 10 dagen in het laboratorium verbleven - werden twee dagen voor het begin van het experiment van een urinecatheter voorzien. Tijdens het experiment kon zodoende de urine als radioactiviteitsbron worden geëlimineerd. Enkele voorafgaande proeven toonden aan, dat pas 6 tot 8 uur na toediening van de speurdosis met de feces radioactiviteitscontaminatie van het water optrad. In een kortdurend experiment hoeft dus met de fecale radioactiviteitsuitscheiding geen rekening te worden gehouden. De proefdieren werden met MS 222 verdoofd waarna eerst een kieuwdekselcanule werd aangebracht en vervolgens de speurdosis $^{59}\text{Fe(III)}$ intracardiaal werd toegediend. De canule stelde ons in staat om periodiek monsters te nemen van het water dat de kieuwen gepasseerd was. Pas nadat de proefdieren in aparte bakken uit hun verdoving waren bijgekomen, werden ze overgebracht in de urinecollectiekamers. Tijdens het bijkomen werd voortdurend gecontroleerd of er op de plaats waar de naald was ingebracht verlies van radioactiviteit optrad. Indien dit het geval was, dan werden de vissen uit het experiment genomen. De kamers waren gevuld met ontchloord kraanwater, dat gedurende het experiment voortdurend via een koolfilter

werd rondgepompt met een snelheid van 100 ml/min. De vissen bevonden zich met de kop tegen de stroomrichting in. De temperatuur van het water bedroeg 18°C.

Om het halve uur werd het koolfilter vernieuwd en werd zowel de radioactiviteit van het koolfilter als van het water gemeten. De urine is in 2 uur's fracties opgevangen. In deze fracties werden zowel de ijzerconcentratie als de radioactiviteit bepaald. De experimenten duurden 6 uur, het aantal proefdieren bedroeg 5. De verkregen resultaten zijn in figuur VI, 5 grafisch weergegeven. De radioactiviteitsuitscheiding in de urine en in het milieu zijn cumulatief als functie van de tijd uitgezet. De resultaten van twee 40 uur durende experimenten zijn niet in de figuur opgenomen, doch in de tekst vermeld.



Figuur VI, 5.

Radioactiviteitsuitscheiding na intracardiale toediening van 2 µC plasmagebonden $^{59}\text{Fe(III)}$ als functie van de tijd. De curven zijn cumulatief weergegeven en hebben betrekking op de uitscheiding via de urine (—) en de uitscheiding via lichaamsmembranen (----). Het aantal proefdieren is 5. Alle waarnemingen vallen in het gearceerde gebied.

De cumulatieve curve voor het in het water uitgescheiden radioactieve ijzer verloopt anders dan die voor het in de urine uitgescheiden radioactieve ijzer. Enerzijds vlakt de curve eerder af, anderzijds ligt het bereikte maximum hoger. De afvlakking zet na 5 uur reeds in, doch is tussen de 8 en 14 uur na aanvang van het experiment het meest markant. Na 6 uur is in de urine $0,34 \pm 0,10\%$ van de ingebrachte speurdosis terechtgekomen, in het water is daarentegen $1,05 \pm 0,12\%$ van de toegediende dosis uitgescheiden. Na verloop van 40 uur zijn deze percentages respectievelijk $0,50\%$ en $1,36\%$. De monsters die via de kieuwdekselcanule zijn verkregen tonen aan, dat het water dat de kieuwen is gepasseerd, per volume eenheid meer radioactiviteit bevat dan het gemengde water in de collectiekamer. Het verschil is in het begin van het experiment maximaal en neemt in de loop van de tijd af.

De discontinue verzameltechniek, en het gebrek aan dynamische gegevens over het ventilatiesysteem, sluiten kwantitatieve uitspraken over de functie van de kieuw in de ijzeruitscheiding uit. De monsters werden namelijk verkregen door juist voorafgaand aan het openen van de kieuwdeksel met behulp van een 1 ml spuit, 0,2 ml water aan te zuigen; 1 ml zo verzamelde ventilatievloeistof werd op radioactiviteit bepaald. Een continu volgen van de radioactiviteitsuitscheiding door de kieuw was met deze techniek niet mogelijk. Voorts zou voor ieder verkregen 1 ml monster het corresponderende ventilatievolume bekend moeten zijn, teneinde de uitscheiding van radioactief ijzer door de kieuw te kunnen berekenen. De verkregen resultaten wettigen evenwel het vermoeden, dat de kieuw een rol speelt in de ijzeruitscheiding.

Ijzerkleuringen met Berlijnsblauw volgens Perl op kieuwen afkomstig uit proefdieren met een normale ijzerstatus tonen slechts zeer sporadisch ijzer in de perifere cellen aan. Na ijzerbelasting valt de Berlijnsblauw kleuring daarentegen duidelijk positief uit. Het kleurbare ijzer bevindt zich dan voornamelijk in perifere cellen welke in direct contact staan met het omringend milieu.

Zoals figuur V,3 weergeeft neemt de specifieke activiteit van de kieuw na intracardiale toediening van $^{59}\text{Fe(III)}$, de eerste tijd sterk toe om na ongeveer 10 uur een maximum te doorlopen. We hebben in hoofdstuk V gesteld, dat dit verloop in principe te verklaren is, als we minimaal twee compartimenten aannemen, een klein compartiment in evenwicht met het plasmaijzer en een relatief groot compartiment dat langzaam ijzer met het kleine compartiment uitwisselt. Het is in dit verband van belang, dat we in

het laatste supernatant, dat bij fractionering van goed bloedvrij gespoelde kieuwen verkregen wordt, zie hoofdstuk II en § 5 van dit hoofdstuk, transferrine hebben kunnen aantonen. Kwantitatieve transferrinebepalingen volgens Marcini, wezen uit dat het transferrinegehalte per gram nat gewicht uitgedrukt voor de kieuw en voor het zeeltenplasma gelijk is. Het transferrinegehalte per gram nat gewicht bedraagt $22 \cdot 10^{-3}$ μmol . Op grond van het gemeten heminegehalte van de eiwitfractie (= laatste supernatant) staat vast, dat slechts 0,1% van het aanwezige transferrine afkomstig kan zijn uit bloed dat nog in de kieuw is achtergebleven. Het transferrine is dus in de interstitiële ruimte of in de intracellulaire ruimte aanwezig. Enkele experimenten toonden aan, dat na intracardiale toediening van een speurdosis plasma-gebonden $^{59}\text{Fe(III)}$ de specifieke activiteit van het ijzer in de transferrinefractie, de specifieke activiteit van het plasmaijzer volgt, maar met een factor 5 tot 8 kleiner is. We dienen hierbij te bedenken, dat de transferrinefractie werd verkregen door het laatste supernatant (= totale eiwitfractie) na 24 urige dialyse tegen een 0,1 molair Tris 0,5 molair NaCl buffer, pH = 8,2, over een Sephadex G 150 kolom, onder gebruikmaking van de genoemde buffer te fractioneren en die fracties te verzamelen welke positief op de kwalitatieve transferrinebepaling volgens Ouchterlony reageerden. Een zuivere transferrinefractie werd zodoende niet verkregen, zodat reductie van de specifieke activiteit van het transferrineijzer ten gevolge van bijmenging van ijzer met een relatief geringe specifieke activiteit niet uitgesloten is.

§ 4. HET BEPALEN VAN DE DRINKRATIO IN VERBAND MET HET BE- REKENEN VAN HET ORALE IJZERAANBOD

We hebben reeds vermeld, dat met behulp van de in hoofdstuk III beschreven proefopstelling de netto ijzeropname wordt bepaald. De vraag is nu langs welke weg of langs welke wegen het ijzer wordt opgenomen. Het meest voor de hand ligt, dat het ijzer via de darmmucosa wordt geabsorbeerd. We mogen evenwel de kieuw en mogelijk ook andere lichaamsmembranen niet a priori uitsluiten.

Een oriënterend onderzoek over de relatieve betekenis van de ijzerabsorptie via de darmmucosa verrichtten wij door het bepalen van de drinkratio. Onder de drinkratio wordt verstaan de hoeveelheid water welke onder gedefinieerde experimentele condities door de vis per gewichts- en tijds-eenheid oraal wordt opgenomen. Op grond van de gemeten drinkratio kan

vervolgens worden berekend of de hoeveelheid water welke dagelijks oraal wordt opgenomen, de berekende hoeveelheid dagelijks geabsorbeerd ijzer kan verklaren. Voor de bepaling van de drinkratio hebben we gebruik gemaakt van de door Evans (1968) beschreven techniek. Kort gezegd, komt deze techniek erop neer, dat de opname van polyvinylpyrrolidone- ^{125}J uit het experimentele milieu wordt bepaald. Daar het PVP- ^{125}J de darmwand niet kan passeren, is het voldoende slechts de darm en de darminhoud op radioactiviteit te onderzoeken. Gezien het feit dat ^{125}J een γ -straler is, levert dit geen experimentele moeilijkheden op.

Het zal duidelijk zijn, dat beslissend voor de te volgen procedure is, dat de osmolaliteit, de zuurgraad en de temperatuur van het experimentele milieu en van het milieu waarin de ijzeropname wordt gemeten - zie hoofdstuk III en IV - gelijk zijn. Voorts zullen de proefdieren zorgvuldig moeten zijn geacclimatiseerd onder condities die voor het experimentele milieu karakteristiek zijn, dus bij gelijke osmolaliteit, zuurgraad en temperatuur. Evenals het milieu in de in hoofdstuk III beschreven proefopstelling bestond het acclimatisatiemilieu uit kunstmatig zoetwater. De pH en de temperatuur van het acclimatisatiemilieu waren respectievelijk 7 en 20°C . Acclimatisatie vond plaats bij 10, 26 en 70 mosmol/kg, waarbij de waarde van 26 mosmol/kg overeenkomt met de osmolaliteitswaarde van het in hoofdstuk III beschreven milieu. De drinkratio werd bepaald bij dezelfde osmolaliteit waarbij de proefdieren geacclimatiseerd waren, dus respectievelijk bij 10, 26 en 70 mosmol/kg. Het experimentele milieu bestond uit kunstmatig zoetwater, waaraan PVP- ^{125}J was toegevoegd tot aan een radiochemische concentratie van 330 dpm/ml. Het totale volume bedroeg 5 liter. De pH en de temperatuur waren - als bij het acclimatisatiemilieu - 7 en 10°C respectievelijk. De proefdieren werden zonder verdoofd te zijn naar het experimentele milieu overgebracht, waarin ze vervolgens 2 uur verbleven. Na het verblijf in het experimentele milieu werden de zeelten voor een half uur overgeplaatst in een niet-radioactief milieu van gelijke osmolaliteit, pH en temperatuur, dit teneinde verlies van radioactiviteit door de slokdarm bij het verwijderen van de darm te voorkomen. Uit de opgenomen hoeveelheid radioactiviteit en de radiochemische concentratie van het milieu kan de drinkratio worden berekend. Tabel VI,7 geeft de resultaten weer.

Tabel VI,7.

osmolaliteit acclim. milieu (mosmol/kg)	aantal proefdieren	drinkratio ($\mu\text{mol}/100 \text{ g vis/uur}$)
10	3	242 $\pm$ 38
26	3	171 $\pm$ 34
70	3	147 $\pm$ 40

Drinkratio gemeten bij verschillende waarden voor de osmolaliteit van het milieu. Gemiddelde $\pm$ de standaarddeviatie.

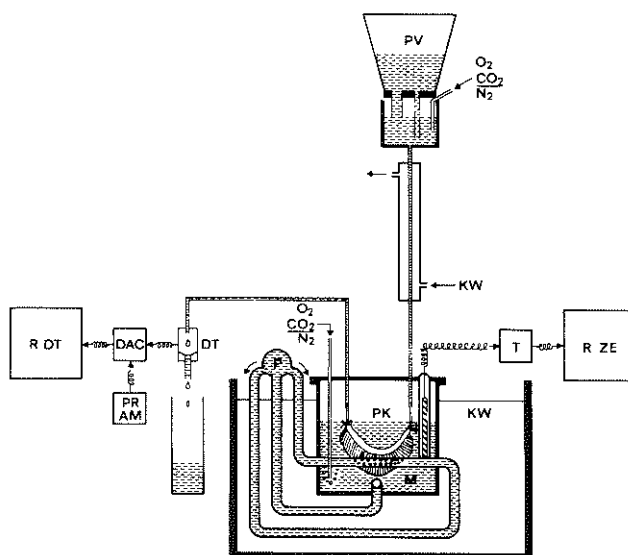
Als we ons baseren op de in § 3 van hoofdstuk III gegeven waarden voor het ijzergehalte en het radioactiviteitsniveau - welke exemplarisch zijn voor het kunstmatig zoetwater van de proefopstelling - dan kunnen we berekenen, dat een drinkratio van 170 $\mu\text{l}/100 \text{ g vis/uur}$ een oraal ijzeraanbod van 1,0 nmol/100 g vis/24 uur zekerstelt. De in hoofdstuk IV beschreven ijzeropname van gemiddeld 1,12 nmol/100 g vis/24 uur kan door het orale ijzeraanbod worden verklaard. We moeten dan evenwel aannemen, dat het oraal aangeboden ijzer voor praktisch 100% wordt geabsorbeerd. Bovendien moet in aanmerking worden genomen, dat in de in hoofdstuk IV beschreven experimenten niet de absolute maar de netto ijzeropname wordt gemeten. Het is dus niet onwaarschijnlijk, dat alternatieve absorptiemechanismen werkzaam zijn.

§ 5. DE IJZEROPNAME DOOR DE KIEUW

Proefopstelling

De ijzeropname door de kieuw kan het beste worden bestudeerd met behulp van de perfusietechniek. We hebben gebruik gemaakt van de door Rankin* (1971) beschreven perfusieopstelling, waarin enkele wijzigingen waren aangebracht. Figuur VI,6 geeft de opstelling schematisch weer. De belangrijkste wijziging betreft de perfusiekamer. De kieuwlamellen werden hierin niet zoals dit bij Rankin het geval is, in beweging gehouden door

* Wij danken Dr. J.C. Rankin voor de ons geboden mogelijkheid de perfusietechniek op zijn laboratorium (Bangor, Engeland) te bestuderen.



Figuur VI,6.

Schematische weergave van de kieuwperfusieopstelling.

PK perfusiekamer; M ijzermilieu; KW koelwater; PV perfusievloeistof reservoir; P pomp; ZE zuurstofelectrode; RZE recorder zuurstofelectrode; DT druppelteller; RDT recorder druppelteller; PRAM programmachakelaar; DAC digitaal analoog convertor.

de totale kieuwboog in het milieu mechanisch te bewegen, doch door middel van een systeem van geperforeerde polytheen slangen van waaruit continu over het gehele geëxponeerde oppervlak van de kieuwboog van beide kanten water werd gelanceerd. Dit water werd door middel van twee peristaltische pompen met een grote capaciteit uit de perfusiekamer aangezogen. De perfusie vond plaats onder condities van een constante hydrostatische druk. Het niveau van de perfusievloeistof bevond zich 50 cm boven dat van de kieuw-inlaat. De perfusievloeistof had in het efferente systeem een hoogte van 10 cm te overbruggen. De temperatuur van het water in de perfusiekamer en van de perfusievloeistof werden constant op een temperatuur van 17°C gehouden. De druppelsnelheid werd continu met behulp van een fotoelectrische cel vervolgd. Het aantal druppels dat per minuut de efferente canule verliet, werd op een recorder uitgezet.

Kieuwperfusiepreparaat

Een half uur voordat de vis werd opgeofferd werd 5000 i.e. heparine intraperitoneaal toegediend. Na door een slag op de kop verdoofd te zijn, werden de kieuwen zeer voorzichtig uit de vis verwijderd. De zorgvuldig van elkaar gescheiden kieuwbogen werden bij 4°C in een fysiologische zoutoplossing, waaraan heparine was toegevoegd bewaard tot ze voor perfusie gebruikt werden. Ze verbleven nooit langer dan 3 uur in fysiologisch zout. De afferente en de efferente arteriën werden gecanuleerd met PP 90 polythene slang waarvan de interne en de externe diameter respectievelijk 0,86 en 1,27 mm bedroegen. De afferente canule was hierbij met gehepariniseerd fysiologisch zout gevuld. De canules werden met "catgut" (jenilene 00) om de gecanuleerde arteriën gefixeerd, waarna de twee uiteinden van de kieuwboog nogmaals geheel werden afgebonden. Toch kon het optreden van lekkage niet geheel worden uitgesloten. Nadat de canules waren aangebracht, werd de kieuw met Ringer-PVP (zie verderop) vanuit het reservoir bloedvrij gespoeld. Als er op het oog geen lekkage waarneembaar was, werd de kieuw naar de perfusiekamer overgebracht.

Experimentele procedure

De experimentele procedure wordt bepaald door de aspecten welke onderzocht zullen worden. We kunnen deze aspecten als volgt rangschikken:

1. de invloed van de externe ijzerconcentratie op de ijzerabsorptie
2. de invloed van perfusie met zeeltenplasma op de ijzerabsorptie
3. de invloed van de samenstelling van het perfusiemedium op de ijzerafgifte aan de perfusievloeistof.

Gezien het grote misluktingspercentage, dat inherent is aan de perfusietechniek, beperken wij ons tot het bestuderen van de ijzeropname bij twee extreme ijzerconcentraties, te weten 0,1 en 10,0 $\mu\text{mol/l}$. In het totaal zijn 40 perfusies verricht. Slechts die perfusieexperimenten - 9 in het totaal - waarbij niet meer dan 5% lekkage optrad, zullen worden besproken. Vier van deze experimenten zijn uitgevoerd bij een ijzerconcentratie van 0,1 $\mu\text{mol/l}$ en vijf experimenten bij een concentratie van 10,0 $\mu\text{mol/l}$. Het experimentele milieu in de perfusiekamer bestond uit 150 ml kunstmatig zoetwater waaraan Fe(III)citraat was toegevoegd tot aan de gewenste concentratie. Dit Fe(III)citraat was van te voren homogeen gemengd met 20 of 40 μC

dragervrij $^{59}\text{Fe(III)}$ citraat. De pH van het experimentele milieu werd op $7,0 \pm 0,3$ gesteld. De osmolaliteit bedroeg 24 ± 3 mosmol/kg.

Als perfusiemedium werd gebruikt zeeltenplasma, humaan plasma en 'zoetwaterpaling'-Ringer volgens Chan (1967) waaraan per liter 20 g polyvinylpyrrolidone en 1 g glucose was toegevoegd. Gedurende één experiment werd het perfusiemedium gewisseld, zodat zodoende de invloed van de samenstelling van de perfusievloeistof op de opname van ijzer kon worden bestudeerd. Zowel het water in de perfusiekamer als het perfusiemedium werden doorborreld met een gasmengsel bestaande uit 96% O_2 en 4% CO_2 . In ieder experiment werd een niet geperfundeerde referentiekieuw meegenomen. De referentiekieuw was van tevoren met Ringer-PVP bloedvrij gespoeld, de bloedvaten waren met 'catgut' afgebonden, dit teneinde lekkage vanuit het water in de perfusiekamer naar de bloedbaan te voorkomen.

De experimenten duurden in de regel 3 uur. Na afloop van het experiment werden zowel de perfusiekieuw als de referentiekieuw overgebracht in een niet-radioactief kunstmatig zoetwatermedium en door middel van perfusie met Ringer-PVP nogmaals goed nagespoeld. Alvorens te worden gefractioneerd werden de kieuwen waarvan de kraakbeenboog was verwijderd op radioactiviteit gemeten. Voor de fractioneringsprocedure wordt verwezen naar hoofdstuk II.

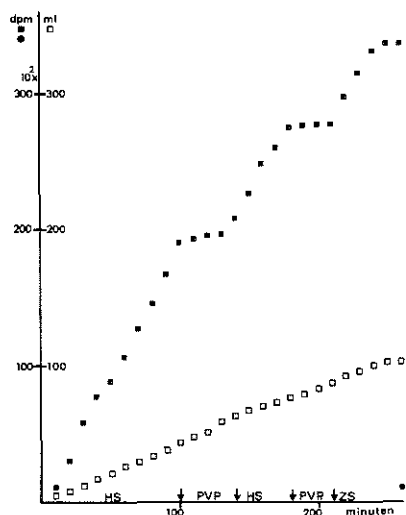
Resultaten

We zullen bij de bespreking van de resultaten eerst ingaan op de invloed van de externe ijzerconcentratie en op de invloed van de samenstelling van de perfusievloeistof op de ijzerabsorptie en op de ijzerdoorgifte aan het perfusiemedium. In laatste instantie zal de invloed van perfusie als zodanig op de ijzeropname worden besproken en wel aan de hand van een vergelijking van de resultaten die verkregen zijn met de geperfundeerde en de niet geperfundeerde kieuwen.

De gemiddelde loopsnelheid van de perfusievloeistof bedroeg voor de 9 experimenten 19 ± 4 ml/uur. De loopsnelheid was onafhankelijk van het gebruikte perfusiemedium. Figuur VI,7 geeft de resultaten van twee experimenten grafisch weer. De door de perfusievloeistof opgenomen radioactiviteit is cumulatief uitgezet. De hoeveelheid radioactiviteit die na afloop in de perfusiekieuw aanwezig is, is eveneens in de figuur aangegeven. De hoeveelheid perfusievloeistof welke de kieuw is gepasseerd, is cumulatief in de figuur opgenomen.

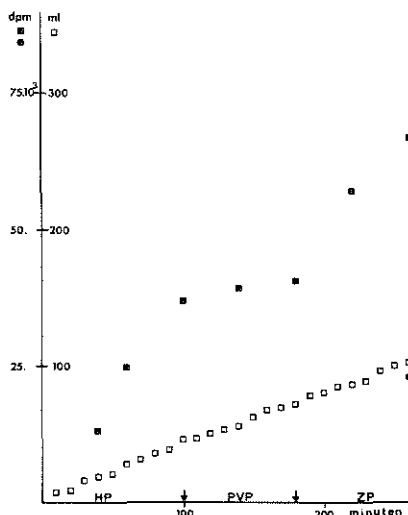
Figuur VI,7_a.

[Fe] = 0,1 $\mu\text{mol/l}$, specifieke activiteit
Fe milieu = $30,2 \cdot 10^8$ dpm/ μmol .



Figuur VI,7_b.

[Fe] = 10 $\mu\text{mol/l}$, specifieke activiteit
Fe milieu = $22,8 \cdot 10^6$ dpm/ μmol .



Kieuwperfusie-experiment. Weergegeven is het cumulatieve verloop van de radioactiviteit in het perfusiemedium en van de hoeveelheid perfundaat dat het kieuwpreparaat gepasseerd heeft. Voorts is de hoeveelheid radioactiviteit welke na perfusie in het kieuwpreparaat aanwezig is in de figuur opgenomen (symbool o).

HP humaan plasma; PVP Ringer-PVP; ZP zeeltenplasma; ↓ geeft het tijdstip aan dat de perfusievloeistof gewisseld wordt.

Hoewel de doorstromingssnelheid vrijwel constant is, zijn er duidelijke verschillen waar te nemen in de opname van radioactiviteit door het Ringer-PVP enerzijds en het plasma anderzijds. De totale hoeveelheid door kieuw en perfusievloeistof opgenomen radioactief ijzer is duidelijk afhankelijk van de externe ijzerconcentratie. Bij een hoge ijzerconcentratie wordt een hoge totale radioactiviteitsopname gemeten en vice versa.

De ijzerdoorgifte aan de perfusievloeistof kan op grond van gemis aan informatie niet worden berekend. Het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de pool waaruit het perfundaat het ijzer betreft, zou daartoe bekend moeten zijn. Wel kunnen we op grond van de totale radioactiviteitsopname een uitspraak doen over de hoeveelheid ijzer welke door de kieuw en het perfundaat tesamen, uit het milieu is opgenomen. De con-

stante specifieke activiteit van het ijzer in het milieu kunnen we dan immers als referentie gebruiken. We hebben de totale ijzeropname per 100 g vis per dag berekend op grond van het eerste stijgende deel van de verkregen cumulatieve radioactiviteitscurven. Hierbij is aangenomen, dat de radioactiviteit van de kieuw evenredig met de tijd toeneemt, zodat de hoeveelheid radioactiviteit die na verloop van 100 minuten in de kieuw aanwezig is, kan worden afgeleid. Voor de in figuur VI, 7 weergegeven experimenten bedraagt de zo berekende ijzeropname bij een ijzerconcentratie van 0,1 en 10,0 $\mu\text{mol/l}$ respectievelijk 0,4 en 26 nmol/100 g vis/24 uur.

De resultaten doen vermoeden, dat het plasma een veel betere transporteur is voor het door de kieuwcellen opgenomen ijzer dan het Ringer-PVP medium. We moeten hierbij evenwel aantekenen, dat het vermelde verschil in gedrag van het Ringer-PVP en het plasma niet in alle experimenten even duidelijk aan de dag treedt. In ongeveer 60% van het aantal uitgevoerde experimenten was het verschil in radioactiviteitsopname zeer markant, in de overige experimenten was het verschil in meer of mindere mate aanwezig. Daar in de laatste categorie proeven ook de totale opname van radioactief ijzer was verhoogd, is het waarschijnlijk dat lekkage een rol speelt bij het verdoezelen van genoemd verschil.

Bij een concentratie van 0,1 $\mu\text{mol Fe/l}$ wordt een gemiddelde ijzeropname berekend van $0,4 \pm 0,1$ nmol/100 g vis/24 uur. Bij een concentratie van 10 $\mu\text{mol/l}$ bedraagt de berekende ijzeropname gemiddeld 20 ± 6 nmol/100 g vis/24 uur. Een toename van de ijzerconcentratie met een factor 100 leidt tot een toename van de totale ijzeropname met een factor 50. Opmerkelijk is, dat de bijdrage van de hoeveelheid radioactiviteit in de kieuw aan de totale hoeveelheid opgenomen radioactiviteit in de experimenten verricht bij de lage ijzerconcentratie relatief veel groter is dan in de experimenten verricht bij de hoge ijzerconcentratie. In procenten van de totale radioactiviteitsopname uitgedrukt bedraagt de bijdrage van de kieuw bij een ijzerconcentratie van 0,1 en 10 $\mu\text{mol/l}$ respectievelijk 30 en 5% gemiddeld. Op een mogelijke verklaring voor dit verschil komen we verderop terug. Geen der experimenten toonde voor het zeeltenplasma en het humane plasma een verschil aan in de opname van radioactiviteit. Uit het verschil in uitkomst dat wij bij de perfusie verkrijgen als respectievelijk Ringer-PVP en plasma wordt gebruikt, zou kunnen worden geconcludeerd, dat een plasmafactor bijvoorbeeld transferrine een rol speelt.

Na afloop van het experiment was er in de referentiekieuw systema-

tisch meer radioactiviteit per gram nat gewicht aanwezig dan in de geperfundeerde kieuw. De discrepantie bleef gehandhaafd als bij de perfusiekieuw de door de perfusievloeistof opgenomen radioactiviteit werd verdisconteerd. Wordt de radioactiviteitsopname van de referentiekieuw op 100% gesteld, dan bedraagt de gemiddelde totale radioactiviteitsopname van de perfusiekieuw 78% (55% - 90%). Over de oorzaak van dit verschil kunnen we slechts vermoedens uitspreken. Zo zou een door de perfusie gestimuleerde mucusecretie kunnen resulteren in een gereduceerde permeabiliteit voor het Fe(III)-citraat. Zeker is, dat de geringe oedeemvorming die tijdens de perfusie optreedt (tot 5% van het oorspronkelijk nat gewicht toe) het verschil niet kan verklaren.

We hebben, zoals reeds eerder vermeld, de kieuwbogen na beëindiging van het experiment gefractioneerd, teneinde de specifieke activiteit van het ijzer in de verschillende fracties te bepalen. Omdat we evenwel over de efficiëntie van de scheidingsmethode nog geen betrouwbare informatie hadden, zijn in de onderstaande tabel (tabel VI, 8) de resultaten van de gecombineerde fractie van kernen, mitochondrieën, micro- en liposomen weergegeven. Ook wat de eiwitfractie betreft, hebben de weergegeven resultaten betrekking op het totale - niet verder gefractioneerde - eiwit. De specifieke activiteit van het ijzer in het milieu en in het zeeltenplasma is weergegeven. Voorts is het quotiënt van de specifieke activiteit van het ijzer in de deeltjesfractie (= kernen, mitochondrieën, micro- en liposomen) en van het ijzer in de eiwitfractie in de tabel opgenomen.

We zullen ons wat de interpretatie van de in tabel VI, 7 gegeven resultaten betreft beperken tot de gegevens in de 4e kolom, te weten de quotiënt van de specifieke activiteit van het ijzer in de deeltjesfractie en in de eiwitfractie. Voor de experimenten uitgevoerd bij een ijzerconcentratie van 10 $\mu\text{mol/l}$ vinden we, dat de quotiënten verkregen voor de perfusie en de referentiekieuw significant in waarde verschillen (t-toets $0,001 < p < 0,005$). Bij een ijzerconcentratie van 0,1 $\mu\text{mol/l}$ zijn de waarden voor het quotiënt niet significant verschillend. Wel worden er voor de perfusieexperimenten uitgevoerd bij de twee ijzerconcentraties, significante verschillen gevonden voor de waarde van het genoemd quotiënt (t-toets $0,01 < p < 0,05$). Een en ander zou erop kunnen wijzen, dat bij een geringe ijzeropname (externe ijzerconcentratie 0,1 $\mu\text{mol/l}$) relatief meer ijzer voor de ijzerbehoefte op cellulair niveau wordt zekergesteld. Bij een grote ijzeropname daarentegen kan meer van het geabsorbeerde ijzer aan de circulatie worden afgestaan.

Tabel VI, 8.

[Fe] milieu (μ mol/l)	s. a. Fe milieu (dpm/ μ mol)	s. a. Fe fracties (dpm/ μ mol)				s. a. Fe deeltjes s. a. Fe eiwit		s. a. Fe zeeltenplasma (dpm/ μ mol)
		deeltjes		eiwit		perfusie	referentie	perfusie
		perfusie	referentie	perfusie	referentie			
0,1 (n=4)	$41 \cdot 10^8$	$22 \cdot 10^4$	$35 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^4$	7,8	8,5	$4,1 \cdot 10^4$
	s. d. $9 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$	$0,8 \cdot 10^4$	$0,9 \cdot 10^4$	1,2	1,6	$1,2 \cdot 10^4$
10 (n=5)	$23 \cdot 10^6$	$28 \cdot 10^3$	$11 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^4$	5,9	8,1	$11 \cdot 10^3$
	s. d. $6 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^4$	0,6	0,9	$3,5 \cdot 10^3$

De in de perfusie-experimenten verkregen resultaten zijn hier samengevat. Weergegeven zijn gemiddelden $\pm$ de standaarddeviatie van de genoemde grootheden. Onder de 'deeltjes'fractie wordt de gecombineerde fractie der celorganellen verstaan. Onder de eiwitfractie wordt het supernatant verstaan dat na centrifugatie bij 19000 g (70 min.) wordt verkregen.

Wordt de kieuw niet geperfundeerd en vervalt zodoende de mogelijkheid om het opgenomen ijzer aan de perfusievloeistof af te geven, dan zien we dat de waarde van het quotiënt in vergelijking tot de geperfundeerde kieuw is verhoogd. De eiwitfractie kan daarom globaal als een transportfractie worden opgevat, waarbij het er van afhangt in welke richting het ijzertransport domineert, naar het plasma of naar de celinsluitsels (kernen, mitochondriën, micro- en liposomen).

HOOFDSTUK VII

DISCUSSIE

In het algemeen gesproken, wijzen de verkregen resultaten erop, dat de wegen waarlangs zich het metabolisme van het ijzer bij de zeelt voltrekt dezelfde zijn als die bij de hogere vertebraten. Dit is niet verwonderlijk, ook voor de klasse der vissen geldt, dat een groot percentage van het totale lichaamsijzer voorhanden is als hemoglobineijzer (tabel VII, 2), zodat verwacht mag worden, dat ook bij de lagere vertebraten de ijzerhuishouding reeds grotendeels ten dienste staat van de erythropoiese en dat het voor de vertebraten karakteristieke erythropoietische systeem als het ware uniforme-eisen aan de ijzerhuishouding heeft opgelegd. Anders gezegd, aan de voor de vertebraten karakteristieke ontwikkeling van de erythropoiese, in kwantitatieve zin, ligt de ontwikkeling van een systeem ten grondslag dat de ijzerbehoefte van de erythropoiese zeker stelt. De algemene aspecten van dit systeem zijn:

1. Hercirculatie van het ijzer dat bij de afbraak van erythrocyten vrij komt.
2. Compensatie van de optredende ijzerverliezen door absorptie van ijzer.
3. Interne buffering van de ijzerkinetiek enerzijds door middel van ijzeropslag in de vorm van ferritine en hemosiderine en anderzijds door mobilisatie van het aldus opgeslagen ijzer.
4. Transport van ijzer in de vorm van transferrine.

Wij bewezen, dat evenals het transferrine der hogere vertebraten, het transferrine van de zeelt per molecuul 2 atomen ijzer bindt. Het transferrine-molecuul van de zeelt heeft een moleculaire massa van ongeveer 81.000 en een aminozuursamenstelling welke slechts weinig van de samenstelling van het humane transferrine verschilt (Van Eijk et al., 1972). Ook de amino-

zuursamenstelling van het volgens de door Van Kreel (1972) beschreven zuiveringsprocedure verkregen zeeltenferritine is bepaald. Ook hier werd een resultaat verkregen, dat slechts in geringe mate van het humane ferritine verschilde.

Uit deze inleidende woorden moge blijken, dat de hoekstenen van het ijzermetabolisme der teleosten reeds dezelfde zijn als die der hogere vertebraten. Dit impliceert niet, dat het systeem bestaande uit de erythropoiese enerzijds en de ijzerhuishouding anderzijds niet zeer specifieke aanpassingen kan vertonen. We hebben ons in dit onderzoek juist ten doel gesteld inzicht te krijgen in die aspecten van de ijzerhuishouding welke adaptieve veranderingen hebben ondergaan.

We zullen bij onze beschouwing uitgaan van de in tabel VII,1 weergegeven resultaten van een door ons uitgevoerd onderzoek naar de ijzerstatus van verschillende zoet- en zoutwaterteleosten. De vissen waren direct na vangst met Ringer-PVP bloedvrij gespoeld. Het bloedvolume werd voor alle soorten op 4,5% gesteld. We moeten hierbij aanmerken, dat dit percentage hoger is dan het gemiddelde percentage (3%) dat bijvoorbeeld Prosser (1966) opgeeft. Er zijn evenwel aanwijzingen, dat de in de regel toegepaste bepalingstechniek (kleurstofverdunningsmethode) tot onderschatting van het werkelijke volume aanleiding geeft. Zo komt Smith (1966) na correctie voor de aanvankelijk ongelijkmatige verdeling van de toegediende kleurstof bij een aantal Salmonidae tot een waarde van 6%. De weergegeven resultaten zijn, met uitzondering van die van de zeelt, gemiddelden van 3 exemplaren. De waarnemingen van de zeelt hebben betrekking op 30 exemplaren. De gegevens van de rat zijn ontleend aan het onderzoek van Bobeck-Rutsaert (1973), in ons laboratorium verricht.

Het gemiddelde ijzergehalte van zoet- en zoutwatervissen bedraagt $0,35 \mu\text{mol/g}$ natgewicht. Voor de mens en de rat bedraagt deze waarde respectievelijk 1,0 en $0,9 \mu\text{mol/g}$ natgewicht. De gegevens over de mens zijn ontleend aan Vannotti (1970). Hoewel de gehalten betrekking hebben op het natgewicht, lijkt ons het gevonden verschil tussen het ijzergehalte van de vissen enerzijds en van de zoogdieren anderzijds reëel. Het watergehalte betrokken op het vetloze lichaamsgewicht bedraagt voor de zoogdieren 71-73%. Ook voor de zoet- en zoutwatervissen worden percentages van 70-74 opgegeven (Holmes et al., 1970), zodat ook het ijzergehalte berekend op basis van het drooggewicht voor vis en zoogdier met een factor 2,7 ($= 0,95 : 0,35$) zal verschillen.

Tabel VII, 1.

Resultaten van het vergelijkend onderzoek naar de ijzerstatus van verschillende zoet- en zoutwatervissen.
Ter vergelijking zijn de waarden voor de rat in de tabel opgenomen.

	$\mu\text{mol Fe}$							$\mu\text{mol Fe/g drooggewicht}$						
	Bloed	Nier	Milt	Lever	Darm	Spier	Skelet	Nier	Milt	Lever	Darm	Spier	Skelet	$\mu\text{mol Fe/g dier}$
Zeelt	39	8,6	17,5	30,0	1,2	9,0	3,0	11,2	56,2	48,9	2,5	0,4	0,1	0,4
Blank voorn	26	5,0	14,5	22,0	0,8	6,5	1,5	9,5	45,0	39,3	2,2	0,4	0,1	0,4
Kroes karper	40	9,1	15,0	34,2	1,4	11,0	3,5	10,2	40,0	37,5	2,8	0,5	0,05	0,35
Brasem	45	2,7	1,6	16,0	0,8	10,0	6,5	2,5	7,6	6,5	0,9	2,3	3,3	0,25
Forel	45	1,5	0,8	5,5	0,7	15,5	4,5	6,3	16,5	17,8	1,4	1,3	0,15	0,35
Schol	25	1,9	0,76	4,7	1,8	5,5	2,5	4,2	34,3	5,7	1,61	2,6	0,05	0,2
Schar	30	1,35	3,30	5,9	2,5	5,0	1,8	7,55	110,0	3,9	1,86	3,4	0,05	0,2
Kabeljauw	70	3,95	1,40	4,4	11,3	18	7,5	7,4	11,9	2,9	1,35	4,3	0,06	0,25
Wijting	50	0,8	1,20	3,9	1,1	22	4,0	4,4	53,3	3,4	0,73	5,6	0,08	0,3
Haring	40	0,4	0,70	1,6	0,8	15	6,5	3,0	90,0	2,9	1,38	11,1	1,50	0,3
Makreel	120	20,3	12,50	5,2	5,0	30	13,0	47,8	256,0	3,0	1,90	14,2	1,82	0,5
Hosmakreel	80	18,5	12,70	6,4	3,2	25	10,5	59,5	88,9	4,7	2,10	11,0	0,10	0,5
Rat (wistar)	160	3,5	4,2	19,4	2,5	45,0	2,5	7,5	34,8	7,7	3,0	2,5	0,1	0,9
	Beenmerg		Huid					Huid						
	3,5		13					0,8						

De vraag dringt zich op of dit hogere ijzergehalte verklaard kan worden door een hoger gehalte aan hemoglobineijzer, waarbij we onder hemoglobineijzer die fractie van het aan hemoglobine gebonden ijzer verstaan welke zich in de bloedbaan bevindt en welke zodoende bij doorspoelen verwijderd kan worden. In tabel VII,2 is het ijzergehalte per gram natgewicht, het hemoglobineijzer per gram natgewicht en het hemoglobineijzer als percentage van het totale ijzer weergegeven.

Tabel VII,2.

Ijzergehalte per g natgewicht, gehalte aan hemoglobineijzer per g natgewicht en het hemoglobineijzer uitgedrukt als percentage van het totale lichaamsijzer, berekend op grond van de in tabel VII,1 gegeven resultaten.

	$\mu\text{mol Fe/g}$ natgewicht	$\mu\text{mol Hb (Fe)/g}$ natgewicht	Hb (Fe) in % van totaal Fe
Zeelt	0,4	0,13	34
Blank voorn	0,4	0,10	32
Kroes karper	0,35	0,12	33
Brasem	0,25	0,13	51
Forel*	0,35	0,17	58
Schol	0,2	0,09	56
Schar	0,2	0,10	57
Kabeljauw	0,25	0,14	57
Wijting	0,3	0,14	57
Haring	0,3	0,18	58
Makreel	0,5	0,30	55
Horsmakreel	0,4	0,27	49
Rat	0,9	0,53	62
Mens	1,0	0,65	61

* Handelsexemplaren.

Inderdaad is het gehalte aan hemoglobineijzer per natgewicht uitgedrukt voor de mens en de rat een factor 2 tot 4 hoger dan voor de vis. Dat dit een algemeen verschijnsel is, kunnen we concluderen uit de door Drabkin (1951) opgegeven waarden voor het hemoglobinegehalte per gram lichaamsgewicht voor hond, rund en paard. Omgerekend naar ijzer zijn deze gehalten respectievelijk 0,82, 0,71 en 0,68 $\mu\text{mol Hb (Fe)/g}$ natgewicht. Hoewel het hemoglobineijzer uitgedrukt als percentage van het totale ijzer een veel minder duidelijk verschil tussen de vissen en de zoogdieren te zien geeft dan het

totale ijzergehalte per gram lichaamsgewicht, is het hemoglobineijzer als percentage van het totale ijzer bij de vissen lager. De waarden die we voor de haring en de forel vinden, grenzen aan die van mens en rat, bij de zeelt daarentegen wordt in vergelijking tot mens en rat een 50% lagere waarde gevonden. Dit betekent, dat het gehalte aan niet-hemoglobineijzer per gram natgewicht in de groep der vissen een zeer variabele factor is. De actieve vissen zijn gekenmerkt door een relatief hoog gehalte aan hemoglobine in het bloed. Men raadplege bijvoorbeeld Prosser (1966) en Gelineo (1969). Zo worden voor de makreel hemoglobineconcentraties opgegeven variërend van 7,6 - 9,9 $\mu\text{mol/l}$. Onze waarnemingen zijn hiermee in overeenstemming. Nemen we als maat voor het hemoglobinegehalte de door ons gemeten ijzerconcentratie in het bloed, dan vinden we voor de makreel, de horsmakreel, de forel en de haring respectievelijk waarden van 7,7, 4,8, 6,2 en 5,3 mmol Hb (Fe)/l. De overige door ons onderzochte vissoorten hebben een aanzienlijk lager Hb (Fe) gehalte. Zo wordt voor de schol en de schaar een Hb (Fe) gehalte gemeten van 2,9 en 2,4 mmol/l. Voor de zeelt vinden we een Hb (Fe) gehalte van 3,5 mmol/l bloed. Zoals uit tabel VII,2 blijkt, is ook het hemoglobineijzer per gram natgewicht uitgedrukt bij de actieve vissen relatief hoog, doch is dit gehalte vergeleken met mens en rat altijd nog een factor 2 lager.

Het is duidelijk, dat er in de groep der beenvissen ook wat de verdeling van het ijzer over de verschillende organen en weefsels betreft, een zeer grote variabiliteit bestaat. Tussen de zoet- en zoutwatervissen onderling bestaan opvallende verschillen. Zo is het quotiënt van het ijzer per gram drooggewicht van milt en lever voor de zoutwatervissen systematisch hoger dan voor de zoetwatervissen. Wat de betekenis van deze verschuiving is weten wij niet.

De ijzerstatus van de zeelt kunnen we karakteriseren door een relatief laag gehalte aan hemoglobineijzer, een relatief hoge waarde voor het totale ijzer per gram natgewicht en diensgevolge een relatief hoog gehalte aan niet-hemoglobineijzer. Dit niet-hemoglobineijzer of beter het zich niet in de bloedcirculatie bevindende ijzer is voor 65% aanwezig in de lever en in de milt. Tot slot van deze inleiding zouden we willen stellen, dat we de vissen in vergelijking tot de zoogdieren (mens, rat) kunnen karakteriseren door een relatief laag ijzergehalte per gram natgewicht, een relatief laag gehalte aan hemoglobineijzer - zowel per ml bloed als per gram lichaamsgewicht uitgedrukt - en diensgevolge door een gemiddeld lage waarde voor het hemo-

globineijzer uitgedrukt als percentage van het totale ijzer. Wat deze laatste parameter betreft dienen we bij het vergelijken van vissen en zoogdieren voorzichtig te zijn, omdat ons over de variabiliteit van deze parameter bij de zoogdieren nagenoeg geen informatie ter beschikking staat.

Aan de basis van ons onderzoek staat de vraag of de zeelt het in zijn milieu aanwezige ijzer, dat zich niet als metaboolijzer in zijn voedsel (organismen) bevindt, kan absorberen en zo ja of de mate waarin dit gebeurt de optredende ijzerverliezen compenseert.

We hebben hiertoe een proefopstelling ontwikkeld waarvan het kernpunt is, dat het in het water aanwezige ijzer in een dynamisch evenwicht verkeert met een neerslag van $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Stumm et al. (1960) berekenden, dat bij neutrale pH de concentratie van oplosbaar $\text{Fe}(\text{III})$ in een oplossing welke met $\text{Fe}(\text{OH})_3$ verzadigd is of anders gezegd welke met een $\text{Fe}(\text{OH})_3$ neerslag in een dynamisch evenwicht verkeert, maximaal $0,32 \mu\text{mol/l}$ kan bedragen, namelijk $1 \cdot 10^{-9} \mu\text{mol Fe}^{3+}/\text{l}$, $6 \cdot 10^{-15} \mu\text{mol Fe}(\text{OH})^{2+}/\text{l}$, $2 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol Fe}(\text{OH})_2^+/ \text{l}$ en $3 \cdot 10^{-1} \mu\text{mol Fe}(\text{OH})_3/\text{l}$. Wat de concentratie van het $\text{Fe}(\text{OH})_3$ betreft baseerde Stumm zich op het onderzoek van Gayer et al. (1956) en Lengweiler et al. (1961a). Deze namen aan, dat het $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ongedissocieerd molecuulair-dispers in oplossing was. Latere onderzoeken (Lengweiler et al., 1961b) wezen evenwel uit, dat het hier toch een colloïdale dispersie betrof. Het feit dat niet alle radioactiviteit welke in ons experimentele milieu aanwezig was ultragefiltreerd kon worden - slechts 60% was ultrafiltreerbaar - moge dit ondersteunen. Gemiddeld bedroeg de ijzerconcentratie van ons experimentele milieu $0,18 \mu\text{mol/l}$ met uiterste grenzen van $0,10$ en $0,26 \mu\text{mol/l}$. Zoals in hoofdstuk III werd vermeld, was zowel de ijzerconcentratie als de specifieke activiteit van het in het milieu aanwezige ijzer gedurende de experimentele periode constant. Er kon geen verschil in specifieke activiteit worden aangetoond tussen de wel en de niet ultrafiltreerbare ijzerfracties. Bij een ijzerconcentratie van gemiddeld $0,18 \mu\text{mol/l}$ werd een ijzeropname gemeten van $1,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$. Teneinde na te gaan of het gedurende de experimentele periode optredende verlies aan radioactiviteit door de vis de berekende waarde voor de ijzerabsorptie beïnvloedt, bestudeerden we het radioactiviteitsverlies bij 10-daagse ijzeropname-experimenten. Stellen we de in het lichaam van de vis teruggevonden hoeveelheid radioactiviteit op 100%, dan meten we een urinaire radioactiviteitsuitscheiding van $0,3$ en $0,4\%$. De resultaten van enkele oriënterende proeven over het fecale radioactiviteitsverlies zijn moeilijk te interpreteren, omdat de feces

waarschijnlijk een mengpool is van niet geabsorbeerd ijzer en uitgescheiden ijzer. Nemen we evenwel een 100-procentige absorptie van het oraal aangeboden ijzer aan, zodat de gemeten hoeveelheid radioactiviteit volledig is toe te schrijven aan de uitgescheiden fractie, dan kunnen we een fecaal radioactiviteitsverlies berekenen van ongeveer 8%. Corrigeren we voor dit verlies, dan wordt voor de totale ijzeropname van de zeelt een waarde gevonden van $1,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$.

De gevolgde experimentele procedure stelde ons niet in staat een uitspraak te doen over de weg waarlangs het ijzer wordt geabsorbeerd. Zoals in hoofdstuk VI werd beschreven, is de dagelijks met het drinkwater aangevoerde hoeveelheid ijzer voldoende om de gemeten ijzeropname te verklaren. We dienen dan evenwel een 100-procentige absorptie in het maag-darmkanaal aan te nemen, wat niet waarschijnlijk lijkt. Indien er nog andere wegen zijn waarlangs ijzer kan worden geabsorbeerd, dan zal het bovengenoemde correctiepercentage uiteraard lager zijn. Een gedeelte van de in de feces aanwezige radioactiviteit is dan immers toe te schrijven aan niet geabsorbeerd ijzer afkomstig uit het milieu.

De vraag dringt zich op of de gemeten ijzeropname de optredende ijzerverliezen compenseert. Wat de bestudering van de ijzerexcretie betreft, wordt verwezen naar de in hoofdstuk VI beschreven experimenten. Onder experimentele omstandigheden welke overeenkomen met die van de proefopstelling waarin de ijzeropname gemeten werd, bedroeg het urinaire ijzerverlies $7,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$ (tabel VI, 3). Voor het fecale ijzerverlies werd onder gelijke experimentele condities $14,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$ gemeten, zodat alleen reeds met de urine en de feces samen $22 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$ wordt uitgescheiden. We moeten dus het in het hoofdstuk III beschreven ijzermilieu als een submarginaal ijzermilieu karakteriseren en concluderen, dat de absorptie van "oplosbaar" ijzer niet voldoende is om de ijzerbalans in evenwicht te houden.

In hoofdstuk VI is op de kwantitatieve aspecten van de ijzeruitscheiding ingegaan. In het algemeen kunnen we stellen, dat de ijzeruitscheiding binnen bepaalde grenzen regelbaar is. Bij een langdurig submarginaal ijzeraanbod werd voor het urinaire en fecale ijzerverlies een waarde gevonden van gemiddeld $7,7 \cdot 10^{-3}$ en $14,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$. Een verblijf van 6 dagen in een milieu met $20 \mu\text{mol Fe(III)citraat}/\text{l}$ gaf aanleiding tot een duidelijk verhoogde ijzeruitscheiding. Zo werd voor de uitscheiding via de urine en de feces respectievelijk een waarde gemeten van $15,8 \cdot 10^{-3}$ en

$20,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$. Enkele controle-experimenten toonden aan, dat de toename van de uitscheiding niet het gevolg was van de aanwezigheid van citraat in het milieu, zodat het waarschijnlijk is, dat de verhoogde uitscheiding het gevolg is van een toegenomen ijzeropname. Dat dit inderdaad het geval is, zal verderop blijken.

We kunnen de vraag stellen of de hoeveelheid met het drinkwater opgenomen ijzer in principe de ijzerbehoefte van de zoet- en zoutwaterteleosteen kan dekken. Wanneer we aannemen dat de zeelt model mag staan, dan bedraagt het ijzerverlies $40 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/100 \text{ g vis}/24 \text{ uur}$. Als we voorts voor de gemiddelde drinkratio van de zoet- en de zoutwatervis een waarde van respectievelijk 2 en 15 ml/100 g vis/24 uur mogen veronderstellen - zie de overzichtstabellen van Bentley (1971) en Conte (1969) - dan kunnen we berekenen, dat de minimale ijzerconcentratie van het zoete water en van het zeewater respectievelijk 20 en 3 $\mu\text{mol}/\text{l}$ moeten bedragen, wil het orale ijzeraanbod even groot zijn als het gestelde ijzerverlies. Goldberg (1965) geeft voor zeewater een gemiddelde ijzerconcentratie van 0,2 $\mu\text{mol}/\text{l}$ op. De ijzerconcentratie van het zoete water kan variëren van enkele onderdelen van een μmol tot honderden $\mu\text{mol}/\text{l}$ (Hutchinson, 1957). Het zeewater bevat dus te weinig ijzer om een oraal ijzeraanbod mogelijk te maken dat gelijk is aan het gestelde ijzerverlies. Wat de zoetwatervis betreft, hier kan het orale ijzeraanbod groter zijn dan het optredende ijzerverlies. Met enige terughoudendheid zouden we willen stellen, dat althans de zoutwaterteleosteen, mits niet in het bezit van alternatieve absorptiemechanismen, wat de ijzervoorziening betreft afhankelijk zijn van hun voedselketen en dat deze afhankelijkheid voor de zoetwaterteleost op zijn minst sterk gereduceerd is. In de bovenstaande beschouwing is sprake van een minimale ijzerconcentratie. De werkelijke ijzerconcentraties zullen waarschijnlijk aanzienlijk hoger dienen te zijn, omdat we mogen aannemen, dat niet alle - in het natuurlijk milieu - voorkomende ijzerverbindingen even goed beschikbaar zijn voor het organisme. Het meeste ijzer in het natuurlijk oppervlaktewater zal voorhanden zijn als gesuspendeerd ferrihydroxide of als organische ijzercomplexen. Een gedeelte van het gesuspendeerde ijzerhydroxide is waarschijnlijk opgenomen of geadsorbeerd aan sestonische deeltjes als klei en plankton. Dat deze verbindingen gedeeltelijk in aanmerking komen voor absorptie in het maag-darmkanaal is aannemelijk, doch experimentele gegevens over de beschikbaarheid van de in de natuur voorkomende ijzerverbindingen zover ons bekend ontbreken. Op de vraag, of de in verhouding tot de ijzerconcentratie in ons expe-

rimentele milieu vaak hogere ijzerconcentraties in het natuurlijk milieu van de zoetwatervis aanleiding geven tot een toename van de ijzerabsorptie, kunnen we wegens gemis aan informatie geen antwoord geven.

Hoe kunnen we onder gecontroleerde experimentele condities de ijzeropname van de vis bij relatief hoge ijzerconcentraties bestuderen, waarbij onder relatief hoge ijzerconcentraties concentraties van 10-20 $\mu\text{mol/l}$ worden verstaan? Het zal duidelijk zijn, dat bij uitsluiting van de slecht gekarakteriseerde ijzercomplexen uit het natuurlijk water, het ijzer onder neutrale condities bij genoemde concentraties als een colloïdale suspensie van ferrihydroxide aanwezig zal zijn. Het zeer instabiele karakter van dergelijk hooggeconcentreerde ferrihydroxide suspensies (Pa Ho Hsu et al., 1972) sluit toepassing in een experimentele opstelling uit. Een andere mogelijkheid is, gebruik te maken van complexoren, zoals bijvoorbeeld citraat, NTA, EDTA en dergelijke. Het nadeel is de beperkte stabiliteit bij proeven van langere duur.

De experimenten van Machado Cruz (1966) toonden aan, dat de goudvis uit een ferrisulfaat milieu (gemiddeld 35 $\mu\text{mol Fe(III)/l}$) in sterke mate Fe opneemt. Als we met Stumm aannemen dat het ijzer volgens de reactie $\text{Fe}^{3+} + \text{SO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{Fe}(\text{SO}_4)^+$, 25°C $K = 1,5 \cdot 10^4$ gecomplexeed is, dan zal het ijzer hoofdzakelijk als $\text{Fe}(\text{SO}_4)^+$ + ion beschikbaar zijn.

In onze experimenten met het kieuwpreparaat hebben we gebruik gemaakt van citraat als stabilisator van een hoge ijzerconcentratie. We konden aantonen, dat er bij een ijzerconcentratie van 10 $\mu\text{mol Fe(III)citraat/l}$ - omgerekend naar 100 g vis - een ijzerabsorptie via de kieuw optrad van $20 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol/24 uur}$. Zie hoofdstuk VI, § 5.

Dit doet de vraag rijzen hoe groot de ijzerabsorptie door de gehele vis is bij deze hoge ijzerconcentratie. Vier oriënterende experimenten, uitgevoerd bij een Fe(III)citraat concentratie van 10 $\mu\text{mol/l}$, wezen uit, dat de ijzeropname door de gehele vis $(43 \pm 10) \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol/100 g vis/24 uur}$ bedroeg. De ijzeropname werd berekend op grond van de specifieke activiteit van het ijzer in het milieu en de opgenomen hoeveelheid radioactiviteit. Bedenken we, dat het urinaire en het fecale ijzerverlies bij een externe ijzerconcentratie van 20 $\mu\text{mol Fe(III)citraat/l}$ samen ongeveer $36 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol/100 g vis/24 uur}$ bedraagt (tabel VI, 5 en VI, 6), dan mogen we concluderen, dat de zeelt onder bepaalde experimentele condities het ijzerverlies kan compenseren met het uit het milieu geabsorbeerde ijzer.

Onder condities van een stabiele ijzerbalans verliest de zeelt dus dagelijks

$40 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol}/100$ g lichaamsgewicht. Dit komt neer op ongeveer 1 ‰ van het totale lichaamsijzer dagelijks. Bij de mens bedraagt het ijzerverlies als de ijzerstatus normaal is ongeveer 0,2 ‰ van het totale lichaamsijzer per dag. Hierbij is aangenomen, dat de totale hoeveelheid ijzer op 80,4 mmol mag worden gesteld en dat het dagelijks ijzerverlies $1,8 \cdot 10^{-2}$ mmol bedraagt (Bothwell, 1958). Ook voor de rat kan een dagelijks ijzerverlies van 0,2 ‰ van het totale lichaamsijzer worden berekend, zie verderop in deze discussie.

Het tweede aspect van dit onderzoek was inzicht te krijgen in het ijzermetabolisme op orgaanniveau. We hebben hiertoe het begrip utilisatie gedefinieerd als de hoeveelheid ijzer die een bepaald orgaan per tijdseenheid uit het plasma opneemt. Een belangrijke voorwaarde voor de toepasbaarheid van het utilisatiebegrip is, dat het orgaan gedurende de tijd waarover de utilisatie wordt berekend geen radioactiviteit aan enig ander compartiment afstaat of dat het verlies van radioactiviteit gedurende dit tijdsverloop bekend is, zodat voor het verlies gecorrigeerd kan worden. Voorts mag het orgaan slechts uit het plasmacompartiment ijzer betrekken. Het utilisatiebegrip kan, zoals in hoofdstuk IV werd uiteengezet, ook worden toegepast op een ijzercompartiment in een orgaan, zoals bijvoorbeeld op het heminecompartiment van nier en kopnier. Het zal op grond van de gestelde voorwaarden voor de toepasbaarheid van de utilisatieformule duidelijk zijn, dat voor verschillende organen de berekeningsmethode onder bepaalde omstandigheden niet tot betrouwbare resultaten kan leiden. Zo ontvangt de milt niet slechts ijzer uit het plasma maar, zoals uit de in hoofdstuk V, § 2 beschreven experimenten blijkt, in belangrijke mate van de erythrocyten welke in de milt worden afgebroken. Dit betekent, dat bij experimenten van lange duur voor de hoeveelheid radioactiviteit, welke bij de afbraak van de erythrocyten vrijkomt, gecorrigeerd moet kunnen worden, hetgeen niet mogelijk is. Wat de lever betreft wijzen de in hoofdstuk IV verkregen resultaten erop, dat de afgeleide utilisatieformule tot inadequate resultaten leidt als het gemerkte ijzer door de darm wordt opgenomen. Het ijzer in het voor meting toegankelijke plasmacompartiment kan dan niet als het direct aan de lever voorgeschakelde compartiment worden beschouwd. Het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer in de mengpool der sinussoïden zou bekend moeten zijn. Als de speurdosis $^{59}\text{Fe(III)}$ daarentegen intracardiaal wordt toegediend, zal de specifieke activiteit van het ijzer in de mengpool en van het ijzer in plasma niet essentieel verschillen; de berekeningsmethode zal over de eerste uren

van de in figuur V,3 gegeven tijdschaal tot een betrouwbare benadering van de utilisatie door de lever leiden.

Voor de nier en de kopnier tesamen werd op grond van de in hoofdstuk IV verkregen resultaten een utilisatie berekend van $0,39 \mu\text{mol Fe/dag}$. Deze waarde is gecorrigeerd voor het verlies van radioactiviteit aan de nieuw gevormde en in circulatie gebrachte erythrocyten. Na intracardiale toediening van de speurdosis wordt voor de nier en de kopnier respectievelijk een utilisatie berekend van $0,21$ en $0,13 \mu\text{mol/dag}$. Deze waarden behoeven geen correctie, omdat ze berekend zijn over de eerste 3 uur van de in figuur V,5 gegeven tijdschaal. Het verlies van radioactiviteit aan de erythrocyten is dan te verwaarlozen. Wat de nier en de kopnier betreft, leidt de toepassing van de utilisatieberekening tot consistente resultaten. In hoofdstuk IV en V werd uiteengezet, dat de berekende ijzeropname van nier en kopnier de behoefte aan ijzer voor de erythrocytenaanmaak dekt. Op grond van de door Hevesy et al. (1964) bepaalde levensduur van de erythrocyten van de zeelt (150 dagen) kan de minimale ijzerbehoefte van het erythropoietische systeem voor de door ons gebruikte zeelten namelijk worden gesteld op gemiddeld $0,26 \mu\text{mol/dag}$.

Voor de lever wordt na intracardiale toediening van de speurdosis, op grond van het verloop van de specifieke activiteit van het ijzer gedurende de eerste 4 uur (fig. V,3), een utilisatie berekend van $0,13 \mu\text{mol/dag}$. Voor het verlies van radioactiviteit aan de gal kan niet worden gecorrigeerd. De in hoofdstuk IV beschreven experimenten - ijzeropname vanuit het milieu - gaven voor de lever een utilisatie te zien van $0,17 \mu\text{mol/dag}$.

Zowel de resultaten verkregen in de ijzeropname-experimenten als die verkregen na intracardiale toediening van de speurdosis wijzen erop, dat het plasma niet de belangrijkste ijzerbron voor de milt is. Berekenen we de utilisatie op grond van de na intracardiale inbreng van de speurdosis verkregen curve voor de specifieke activiteit van het ijzer in de milt, dan wordt een utilisatie gevonden van $0,03 \mu\text{mol/dag}$. De berekening is gebaseerd op de eerste 4 uur van de tijdschaal. De gevonden waarde moet als een reële benadering worden beschouwd, omdat de radioactiviteitstoename van de milt gedurende de eerste uren niet kan worden verklaard door concentratie in de milt van nieuw gevormde en dus radioactieve erythrocyten.

Tabel VII,3 geeft de berekende utilisatiewaarden voor de belangrijkste ijzerhoudende organen samenvattend weer. Ook het perifere erythrocytencompartiment is in de tabel opgenomen. Onder de "utilisatie" van dit compartiment

dient dan te worden verstaan het aantal μmol ijzer dat vanwege de dagelijkse erythrocytenaanmaak in de circulatie komt.

Tabel VII,3.

orgaan of orgaancompartiment	utilisatie ($\mu\text{mol Fe/dag}$)
lever	0,13
milt	0,03*
nier	0,21
kopnier	0,13
erythropoietische systeem	0,30
(hemine van nier, kopnier en erythrocyten)	
erythrocyten	0,30

* Dit betreft opname uit het plasma, via de erythrocyt komt ruw geschat 0,3 $\mu\text{mol/dag}$ binnen.

We zien dat alleen reeds de lever, de milt en de totale nier 0,5 $\mu\text{mol/dag}$ uit het plasma betrekken.

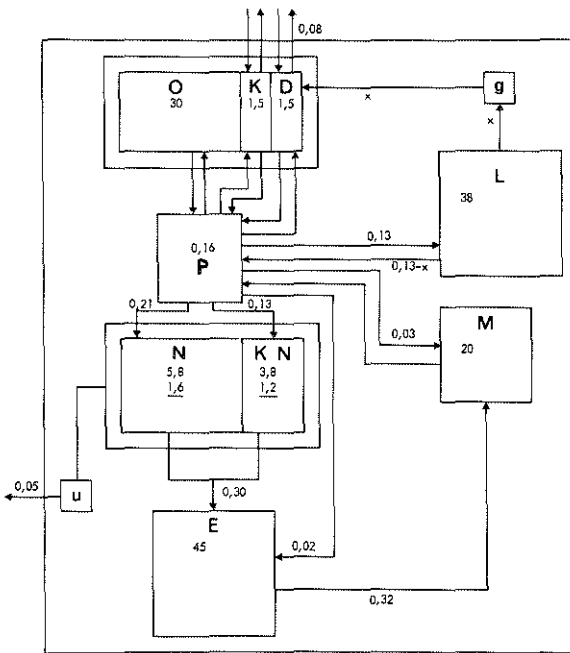
Een controle op de gegevens is mogelijk door een berekening van het ijzertransport door het plasma. Op grond van de in figuur V,1 weergegeven verdwijningscurve van het plasmaijszr wordt een halfwaardetijd ($t_{1/2}$) berekend van 4,4 uur. Dit komt neer op een "turnover"tijd (t_1) van 6,3 uur ($t_1 = t_{1/2}/0,695$). In 6,3 uur wordt uit de plasmapool een hoeveelheid ijzer gemetaboliseerd, welke gelijk is aan de hoeveelheid ijzer die onder "steady state" condities in de plasmapool aanwezig is. Zoals in hoofdstuk V, § 1 is vermeld, bedroeg het geschatte bloedvolume van de proefdieren die voor het bepalen van de verdwijningscurve gebruikt zijn gemiddeld 14 ml. Het gemeten microhematocriet had voor de gebruikte populatie een waarde van $0,30 \pm 0,02$, zodat het plasmavolume bij benadering op gemiddeld 9,8 ml kan worden gesteld. De ijzerconcentratie van het plasma bedroeg $16 \pm 2 \mu\text{mol/l}$, er kan dus voor het plasma een gemiddeld ijzergehalte van 0,16 μmol worden aangenomen. We moeten op grond van de berekende "turnover"tijd concluderen, dat er in 6,3 uur 0,16 μmol aan het plasma wordt onttrokken. Dit komt neer op 0,6 $\mu\text{mol/dag}$. Zoals we hebben vermeld, zal nu op grond van de berekende utilisaties een dagelijks transport van 0,5 μmol naar de lever, de milt, de nier en de kopnier moeten plaatsvinden, hetgeen van dezelfde grootte is.

We kunnen nu voor de interne ijzerkinetiek het volgende schema opstellen (figuur VII, 1).

Het zal duidelijk zijn, dat het hier een vereenvoudigde weergave van de werkelijke kinetiek betreft. Niet alle aspecten van de meerfasige verdwijningscurve van het plasmaijzer (fig. V, 1) zijn in de berekeningen verwerkt. Toch lijkt het ons gewettigd om op grond van deze weergave conclusies te trekken. We zullen ter vergelijking het door Pollycove gegeven schema over de verdeling en de kinetiek van het ijzer bij de mens opnemen (fig. VII, 2).

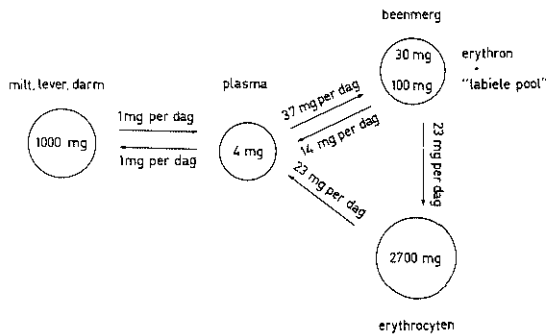
Zoals we hebben gezien, wordt bij de zeelt het ijzer in de plasmapool per dag ongeveer 4 maal vernieuwd. Bij de mens bedraagt deze vernieuwingsfactor ongeveer 10 maal de totale hoeveelheid ijzer welke in de plasmapool aanwezig is. In absolute zin is dus het transportcompartiment bij de mens aanzienlijk actiever dan bij de zeelt. Voor het humane plasma wordt een gemiddelde waarde van $28 \mu\text{mol/l}$ opgegeven. Voor de zeelt hebben wij een gemiddelde waarde van $22 \pm 4 \mu\text{mol/l}$ gevonden, een gemiddelde dat betrekking had op 10 proefdieren. De ijzerbindingscapaciteit en het ijzergehalte van het plasma bedroegen voor deze zeeltenpopulatie respectievelijk $42,5 \pm 4,5$ en $14,3 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$. Drukken we het relatieve ijzertransport door het plasma uit als het quotiënt van het dagelijkse ijzertransport door het plasma en van het totale lichaamsijzer, dan wordt voor de mens een waarde berekend van $8,5 \cdot 10^{-3}$ en voor de zeelt een waarde van $4,5 \cdot 10^{-3}$, zodat ook in relatieve zin het transportcompartiment bij de mens actiever is. De hoeveelheid ijzer welke dagelijks vanuit het plasmacompartiment naar het beenmerg respectievelijk naar de nier en de kopnier wordt vervoerd, bedraagt voor de mens 9 maal de hoeveelheid ijzer welke in het plasma aanwezig is en voor de zeelt 2 maal deze hoeveelheid. Bij de mens wordt dus 90% van het dagelijks door het plasma vervoerde ijzer afgegeven aan het erythropoietische systeem, bij de zeelt bedraagt deze afgifte slechts 50% van het dagelijks getransporteerde kwantum. De erythropoiese stelt dus bij de zeelt minder grote eisen aan het transportsysteem.

Hoe kunnen we het relatief grote ijzertransport naar de niet-erythropoietische organen en weefsels bij de zeelt verklaren? Het is niet waarschijnlijk dat dit hoge transport in verband staat met een snelle vernieuwing van de ijzerhoudende enzymsystemen. Zoals uit het schema blijkt, neemt de lever een belangrijke plaats in het niet-erythropoietisch gerichte ijzertransport in. Een mogelijke verklaring is, dat we de vis - wat het ijzer betreft - ten opzichte van de situatie bij de mens als een relatief "open systeem" moeten



Figuur VII, 1.

Verdeling en kinetiek van ijzer bij de zeelt. De getallen naast de pijlen geven de hoeveelheden ijzer aan in μmol welke dagelijks in de aangeduide richtingen worden getransporteerd. De overige getallen staan voor de ijzergehalten van de diverse organen. De onderstreepte getallen geven de hoeveelheid ijzer aan welke aanwezig is in het heminecompartiment van nier en kopnier. P plasma; N nier; KN kopnier; E erythrocyten; L lever; M milt; K kieuw; D darm; O overige weefsels en organen; G gal; U urine.



Figuur VII, 2.

Verdeling en kinetiek van ijzer bij de mens volgens Pollycove (1963).

beschouwen, zodat we de relatief hoge ijzertransporten welke niet in direct verband staan met de erythropoiese zouden kunnen interpreteren als eliminatieprocessen van eenmaal geabsorbeerd ijzer. De geponeerde ijzeruitscheiding via de gal zou hier een voorbeeld van kunnen zijn.

In hoofdstuk I hebben we gesteld, dat het quotiënt van de dagelijkse ijzeropname en van de dagelijkse ijzerbehoefte van het erythropoietisch systeem een goede parameter is voor de relatieve milieu-onafhankelijkheid van de erythropoiese. We zullen er bij onze beschouwing van uitgaan, dat de totale ijzerbalans van het organisme in evenwicht is. Eerder in dit hoofdstuk werd vermeld, dat de ijzerabsorptie in een 20 μ molair kunstmatig zoetwater - Fe(III)citraat milieu het optredend ijzerverlies compenseert. De gemeten ijzerabsorptie bedroeg ongeveer $43 \cdot 10^{-3}$ μ mol/100 g vis/dag. Stellen we de ijzerbehoefte van het erythropoietische systeem op 0,3 μ mol/dag, dan bedraagt de waarde van de genoemde parameter bij benadering 0,43. Voor de mens bedraagt de waarde van de parameter ongeveer 0,04, waarbij de berekening gebaseerd is op een dagelijkse ijzerbehoefte van het erythropoietisch systeem van 0,41 mmol/dag en een noodzakelijke ijzeropname van $0,18 \cdot 10^{-3}$ mmol/dag. De levensduur van de erythrocyten van de rat (wistar) bedraagt 60 dagen. Bij een totale hoeveelheid hemoglobineijzer van 160 μ mol kan de dagelijkse ijzerbehoefte van het erythropoietisch systeem worden gesteld op 2,65 μ mol/dag. Het urinaire ijzerverlies werd door Bobeck-Rutsaert (1973) gemeten en bedroeg gemiddeld $15 \cdot 10^{-3}$ μ mol/dag. Nemen we naar analogie van de mens een dagelijks fecaal ijzerverlies van 0,2 % van het totale lichaamsijzer, dan komt dit neer op een verlies van in totaal $30 \cdot 10^{-3}$ μ mol/dag. Voor de genoemde parameter kan nu een waarde worden berekend van 0,01. Dit betekent dus, dat bij de mens en de rat in vergelijking tot de zeelt aan de economie van het lichaamsijzer veel hogere eisen worden gesteld en dat ook in deze zin dus het ijzermetabolisme van de mens en de rat als een relatief meer "gesloten systeem" dient te worden opgevat. De eerder genoemde verschillen van de dagelijkse ijzeruitscheiding uitgedrukt als promillage van het totale lichaamsijzer en de implicatie voortvloeiend uit de weergegeven transportschema's (fig. VII,1 en fig. VII,2) zijn met deze visie in overeenstemming.

Het laatste aspect van ons onderzoek betrof de wegen waarlangs ijzer kan worden geabsorbeerd en waarlangs ijzer kan worden uitgescheiden. We hebben kunnen aantonen, dat - althans in een citraatmilieu - de kieuw een rol in de ijzeropname vervult. Bij een concentratie van 0,1 μ mol Fe(III)ci-

traat/l werd een ijzeropname berekend van 0,4 nmol/100 g vis/24 uur. Bij een concentratie van 10 μ mol/l bedroeg de opname 20 nmol/100 g vis/24 uur. Doch roept de experimentele procedure twijfels op. Het citraat-ion is weliswaar in staat om het ijzer als complex te binden en daardoor in oplossing te houden, doch de complexen hebben zeer sterk de tendens om aan te groeien, zodat de experimenten plaatsvinden in een inhomogeen milieu. De beschikbaarheid van het ijzer zal daardoor van de tijd afhankelijk kunnen worden. De lineairiteit van de gemeten ijzeropname in de tijd geeft óf aan dat deze factor van geen betekenis is, óf dat niet de concentratie van de voor absorptie geschikte ijzercomplexen maar het absorptieproces zelf de bepalende factor in de opname is.

Zoals we in hoofdstuk VI, § 5 hebben beschreven, bestond er een groot verschil in ijzeropname door de perfusievloeistof als deze bestond uit humaan- of zeeltenplasma enerzijds of Ringer-PVP anderzijds. De conclusie dat hier een plasmafactor bijvoorbeeld transferrine een rol speelt, ligt voor de hand. Daar het geen verschil maakt of in de perfusie-experimenten humaan- of zeeltenplasma wordt gebruikt, moeten we voor deze transportfunctie van het transferrine aannemen, dat er geen soort specificiteit bestaat. Experimenten waarbij erythrocyten van de zeelt geïncubeerd werden met zeeltenplasma of met humaanplasma dat van te voren met $^{59}\text{Fe(III)}$ was gemerkt, gaven een geheel ander beeld te zien. Bij incubatie met zeeltenplasma kon wel radioactiviteit in de heminefractie van de erythrocyten worden aangetoond, bij incubatie met humaanplasma trad vrijwel geen inbouw van radioactief ijzer in de heminefractie op. Ook de totale opname van radioactiviteit door de erythrocyten was bij incubatie met humaanplasma sterk gereduceerd. We moeten dus wat betreft de overdracht van transferrinegebonden ijzer naar de erythrocyt concluderen, dat het transferinemolecuul een sterk soort specifieke werking heeft. Dit is in overeenstemming met de door Verhoef (1973) gevonden resultaten. Hoewel de twee experimenten (perfusie, incubatie) in strikte zin niet vergelijkbaar zijn, mag de mogelijkheid, dat in de perfusie-experimenten een andere plasmafactor dan transferrine een rol speelt, niet uit het oog worden verloren.

In hoofdstuk IV, § 2 werd op de rol van de darm ingegaan. Op grond van de in figuur IV, 3 weergegeven resultaten werd geconcludeerd, dat het door de darmwand opgenomen ijzer niet of onvolledig met het in de darm aanwezige depot ijzer wordt vermengd, alvorens het aan het serum wordt doorgegeven. De resultaten wijzen erop, dat - althans onder de heersende experi-

mentele omstandigheden - de ijzerabsorptie en de ijzerdoorgifte naar het plasma, niet wordt beheerst door een mucosa-blok in de betekenis die Granick (1946) en Hahn (1943) hieraan gaven.

Wat de ijzeruitscheiding betreft hebben we kunnen aantonen, dat deze voornamelijk via de feces en de urine verloopt. Voorts zijn er aanwijzingen dat ook de kieuw een functie in de ijzerexcretie vervult (hoofdstuk VI). Een belangrijke component van de feces wordt gevormd door de gal. In hoofdstuk IV, § 2, werd de hypothese naar voren gebracht, dat het door de darmwand opgenomen ijzer via het galsynthetiserend systeem in de lever - voor een gedeelte en zonder grote verdunning - in het darmlumen kan worden uitgescheiden. De hypothese was gebaseerd op de waarneming, dat gedurende de 10-daagse periode van de in hoofdstuk IV beschreven ijzeropname-experimenten, de specifieke activiteit van het ijzer in de gal vele malen hoger was dan de specifieke activiteit van het ijzer in het plasma (fig. IV, 5). Na intracardiale toediening van een plasmagebonden speurdosis $^{59}\text{Fe(III)}$ worden evenwel andere resultaten verkregen (fig. V, 4). Aanvankelijk is de specifieke activiteit van het ijzer in de gal hoger dan de specifieke activiteit van het ijzer in de lever. Twaalf uur na toediening van de speurdosis zijn beide specifieke activiteiten binnen de nauwkeurigheid van de meettechniek aan elkaar gelijk geworden. Hoe zijn beide waarnemingen met elkaar in overeenstemming te brengen? De bloedtoevoer van de lever is van dien aard, dat het arteriële bloed en het onder anderen uit de darmwand afkomstige veneuze bloed pas na menging in de sinussoïden van de lever met de levercellen in contact komt (Elias en Bengendorf, 1963). De aanvankelijk in vergelijking tot de specifieke activiteit van het ijzer in de lever verhoogde specifieke activiteit van het ijzer in de gal, zoals we dit na intracardiale toediening van de speurdosis waarnemen, en het voortdurend hoger zijn van de specifieke activiteit van het ijzer in de gal vergeleken met de specifieke activiteit van het ijzer in de lever, zoals dit het geval is als het ijzer direct uit het milieu wordt geabsorbeerd, kunnen we nu als volgt verklaren. We nemen hier toe aan, dat de gal ijzer ontvangt uit een relatief klein ijzercompartiment dat in evenwicht is met het ijzer in de sinussoïdale mengpool. Na opname van ijzer uit het milieu (hoofdstuk IV), dat een zeer hoge specifieke activiteit heeft, neemt de specifieke activiteit van het ijzer in het uit de darmwand afkomstige bloed sterk toe, zodat de specifieke activiteit van het ijzer in de sinussoïdale mengpool hoger is dan die van het ijzer in het plasma van het arteriële bloed. Gezien de lineairiteit van de ijzeropname door de gehele

vis als functie van de tijd, fig. IV,1, is dit een conditie die gedurende de gehele experimentele periode zal gelden. Het ijzer dat nu vanuit het kleine compartiment in de gal wordt uitgescheiden, zal dus steeds een hoge specifieke activiteit hebben. Dat de specifieke activiteit van het ijzer in de lever lager is dan die van het in de gal uitgescheiden ijzer betekent, dat het ijzer in het kleine compartiment langzaam met een relatief groot compartiment in de lever uitwisselt. Dat na intracardiale toediening van de speurdosis de specifieke activiteit van het ijzer in de gal aanvankelijk hoger is dan die van het ijzer in de lever, vindt eveneens zijn verklaring in de hoge specifieke activiteit van het ijzer in de sinussoïdale mengpool en dus ook in het geponeerde kleine ijzercompartiment van waaruit ijzer in de gal wordt uitgescheiden. De specifieke activiteit in dit compartiment zal, gezien het veronderstelde evenwicht, evenwel parallel aan de verdwijningscurve van het plasmaijzer afnemen, zodat ook het uit dit compartiment in de gal uitgescheiden ijzer een afnemende specifieke activiteit zal vertonen. Als we nu aannemen, dat de gal niet slechts uit het kleine compartiment ijzer ontvangt maar eveneens uit het geponeerde grote compartiment, dan zal het verloop van de specifieke activiteit in de gal na verloop van tijd steeds meer bepaald worden door het uit dit grote compartiment afkomstige ijzer. Op den duur zal dus de specifieke activiteit van het ijzer in de gal gelijk worden aan die van het ijzer in het grote compartiment, zodat de in fig. V,4 weergegeven resultaten op grond van de twee compartimenten verklaard kunnen worden. Terloops zij hier opgemerkt, dat ook van Kreel's (1972) experimenten over de ferritinesynthese in de rattenlever het bestaan van een klein compartiment met een hoge turnover aannemelijk maken.

Dat de gal een rol speelt in de ijzeruitscheiding moge anderzijds blijken uit het resultaat van ijzerbelastingsexperimenten. Na intramusculaire toediening van respectievelijk 10, 30 en 50% van de totale hoeveelheid lichaamsijzer in de vorm van Fe(III)citraat (pH=7) werden na 24 uur de volgende ijzerconcentraties in de gal gemeten $0,41 \pm 0,10$, $0,60 \pm 0,10$ en $1,10 \pm 0,30$ $\mu\text{mol/ml}$. De gemiddelden hebben betrekking op de waarden gevonden bij drie verschillende proefdieren. Als geen ijzer werd toegediend, bedroeg de gemiddelde ijzerconcentratie $0,30 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/ml}$. We kunnen berekenen hoeveel gal er dagelijks in het darmlumen moet worden uitgescheiden om het totale fecale ijzerverlies dat dagelijks optreedt te kunnen verklaren. Zo bedraagt het fecale ijzerverlies onder submarginale ijzercondities (tabel IV,5) $14,3 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol/100 g vis/dag}$. Voor een 300 g wegende vis dient nu dagelijks $1,4 (=0,41/0,30)$

ml gal te worden uitgescheiden. Als we bedenken, dat de inhoud van de galblaas ongeveer 0,15 ml bedraagt, dan lijkt een rol van de gal in de ijzeruitscheiding waarschijnlijk.

Op de ijzeruitscheiding door de nier zijn we in hoofdstuk VI uitvoerig ingegaan. We zullen hier volstaan met nogmaals te onderstrepen, dat de in fig. VI,5 gegeven specifieke activiteitscurven voor het ijzer in de urine slechts te begrijpen zijn, als we het bestaan van een verdunningspool in het excretieapparaat poneren. Dit is in overeenstemming met de in hoofdstuk IV beschreven 10-daagse experimenten waar een radioactiviteitsuitscheiding in de urine werd gemeten van 0,3-0,4% van de totale hoeveelheid door de vis opgenomen radioactiviteit. Zouden we aannemen, dat het in de urine uitgescheiden ijzer direct uit het plasma geklaard ijzer betreft, dan dient het radioactiviteitsverlies 6% te bedragen. De gemeten radioactiviteitsuitscheiding kan slechts verklaard worden als we een verdunningspool in de nier aannemen.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een onderzoek over het ijzermetabolisme van de zeelt beschreven. De in dit onderzoek verkregen resultaten worden voor zover mogelijk vergeleken met gegevens over het ijzermetabolisme der zoogdieren. Het doel van deze vergelijking is meer inzicht te krijgen in de eigen aard van het ijzermetabolisme van de vis en van het zoogdier.

Hoofdstuk I gaat in op die aspecten welke in een vergelijkend onderzoek van belang zijn. Uitgegaan wordt van het gegeven, dat de ijzerhuishouding van de mens gekenmerkt wordt door een gering vermogen om eenmaal geabsorbeerd ijzer uit te scheiden. Als het ijzeraanbod oorspronkelijk als marginaal mag worden opgevat, is dit gesloten karakter van de ijzerhuishouding te begrijpen. Minisering van het ijzerverlies is dan een noodzakelijke voorwaarde om de erythropoiese te stabiliseren en is dan van adaptieve aard. Deze verklaring zou ondersteund worden als zou blijken, dat de ijzerhuishouding van dieren levend onder condities van een overmatig ijzeraanbod in vergelijking tot die van de mens als meer open dient te worden opgevat. Bij een zoetwatervis als de zeelt is een dergelijk overmatig ijzeraanbod niet onwaarschijnlijk. Aan de basis van ons onderzoek staat dan ook de vraag, of de zeelt het zich in zijn milieu bevindende ijzer dat zich niet in zijn voedsel bevindt, in voldoende mate kan absorberen om de optredende ijzerverliezen te dekken.

Enkele implicaties van homoio- en poikilothermie op de erythropoiese en in ruimere zin op de ijzerhuishouding komen aan de orde. Voorts wordt ingegaan op de opname door de vis van zware metalen en in het bijzonder van ijzer. De geraadpleegde literatuur wordt vermeld.

Hoofdstuk II is gewijd aan de materialen en methoden die bij dit onderzoek doorlopend zijn gebruikt. Specifieke methodieken komen in de be-

treffende hoofdstukken aan de orde.

In hoofdstuk III wordt ingegaan op de chemie van ijzer in een waterig milieu. Op basis van de weergegeven theoretische aspecten is een proefopstelling ontwikkeld, welke gekenmerkt wordt door een constante ijzerconcentratie en een constante $^{59}\text{Fe(III)}/^{56}\text{Fe(III)}$ verhouding in de tijd. De ijzerconcentratie kan niet experimenteel worden gevarieerd en bedraagt gemiddeld $0,18 \mu\text{mol/l}$. Het principe bouwt erop, dat het in het water colloïdaal-dispers verdeelde ijzer in dynamisch evenwicht is met een neerslag van ferrihydroxide.

In hoofdstuk IV worden experimenten over de ijzeropname door de vis uit het water beschreven. Er wordt gebruik gemaakt van de in hoofdstuk III beschreven proefopstelling. Bij een gemiddelde ijzerconcentratie van $0,18 \mu\text{mol/l}$ bedraagt de dagelijkse ijzeropname gemiddeld $1,12 \text{ nmol Fe/100 g vis}$.

Op grond van de verkregen curven die de specifieke activiteit van het ijzer in het plasma en van het orgaanijzer als functie van de tijd weergeven, worden globale uitspraken gedaan over het ijzermetabolisme. Van het door de darmwand geabsorbeerde ijzer moet worden aangenomen, dat een deel zonder grote verdunning in de lever direct via de gal kan worden uitgescheiden. Om tot kwantitatieve uitspraken over het ijzermetabolisme op orgaanniveau te komen, hebben wij het begrip utilisatie ingevoerd. Utilisatie is gedefinieerd als de hoeveelheid ijzer welke door een orgaan of door een bepaald ijzercompartiment in een orgaan dagelijks uit het plasma wordt opgenomen. Een methode om de utilisatie te berekenen wordt beschreven.

Voor de belangrijkste organen zijn de utilisatiewaarden gegeven. Voor het erythropoietische systeem - heminecompartiment van nier en kopnier - leidt de rekenmethode tot fysiologisch interpreteerbare utilisatiewaarden. De berekende dagelijkse ijzeropname van het erythropoietisch systeem bedraagt $0,39 \mu\text{mol}$, hetgeen voldoende is om de ijzerbehoefte van dit systeem volledig te dekken.

Hoofdstuk V is gewijd aan experimenten die tot doel hebben de interne ijzerkinetiek te bestuderen. Er wordt gebruik gemaakt van de "klassieke" methode welke erop neerkomt, dat na toediening van een speurdosis plasmagebonden $^{59}\text{Fe(III)}$ het verloop van de specifieke activiteit van het plasma-ijzer en van het ijzer in de organen wordt bepaald. Na een globale bespreking van de resultaten, worden op grond van de specifieke activiteitscurven voor de belangrijkste organen de utilisatiewaarden berekend (tabel

VII, 3). De resultaten komen goed met de eerder berekende utilisatiewaarden overeen.

In dit hoofdstuk worden eveneens experimenten beschreven over de erythrocyten-afbrekende functie van de milt. De toegediende speurdosis bestaat hier uit erythrocyten welke in vivo met $^{59}\text{Fe(III)}$ zijn gemerkt.

Er kan worden aangetoond, dat de milt een belangrijk erythrocyten-afbrekend orgaan is. De experimentele resultaten wijzen erop, dat het ijzer dat vrijkomt bij de afbraak van het hemoglobine in de milt - mogelijk als hemosiderine - wordt opgeslagen. Het in de erythrocyten aanwezige niet-hemoglobineijzer wordt bij afbraak van de erythrocyt snel gemobiliseerd en opgenomen door de lever.

In hoofdstuk VI wordt ingegaan op de ijzerexcretie en op enkele aspecten van de ijzerabsorptie. De ijzeruitscheiding via urine en feces zijn kwantitatief bestudeerd onder condities van een beperkt en een overmatig ijzeraanbod. Na een 10 dagen durend verblijf in kunstmatig zoetwater met een ijzerconcentratie van 4 nmol/l, bedraagt de ijzeruitscheiding via de urine en de feces respectievelijk 7,7 en 14,3 nmol/100 g vis/dag.

De in hoofdstuk IV vermelde ijzeropname uit het water dekt de optredende ijzerverliezen niet, zodat het gebruikte experimentele milieu als submarginaal dient te worden opgevat.

Bij een ijzerconcentratie van 20 $\mu\text{mol Fe(III)citraat/l}$ bedraagt het ijzerverlies via urine en feces respectievelijk 15,8 en 20,5 nmol/100 g vis/dag. De ijzerabsorptie in een 10 $\mu\text{molair Fe(III)citraat milieu}$ bedraagt 43 nmol/100 g vis/dag, zodat onder bepaalde experimentele condities het ijzerverlies kan worden gecompenseerd door de ijzeropname uit het water. Op de ijzeruitscheiding in de urine wordt dieper ingegaan. De hoeveelheid in de urine uitgescheiden ijzer wordt voornamelijk bepaald door het ijzer dat afkomstig is uit een in het excretieapparaat te plaatsen ijzerpool. De rol die de kieuw speelt in de ijzeruitscheiding, is kwalitatief bestudeerd.

Wat de ijzerabsorptie betreft, is nagegaan of de drinkratio groot genoeg is om de in hoofdstuk IV vermelde ijzerabsorptie te verklaren uit het met het drinkwater aangeboden ijzer. Dit is inderdaad het geval, doch er moet dan een 100 procentige absorptie in de darm worden aangenomen, hetgeen niet waarschijnlijk lijkt. De vraag wordt gesteld of de kieuw een aanvullende absorptieroute voor het opgeloste ijzer is. Door middel van perfusie-experimenten kan worden aangetoond, dat de kieuw ijzer uit een $\text{Fe(III)citraat milieu}$ absorbeert en aan de perfusievloeistof doorgeeft. Bij een ijzerconcentratie van 10 $\mu\text{mol/l}$ bedraagt de absorptie 26 nmol/100 g vis/dag. Er kan

geen verschil in ijzerabsorptie worden aangetoond als in plaats van zeelten-plasma humaanplasma als perfusiemedium wordt gebruikt. Wel is de absorptie bij perfusie met Ringer-Polyvinylpyrrolidone sterk gereduceerd.

Hoofdstuk VII. De experimentele resultaten worden nogmaals besproken en wel in wijder verband. De resultaten van een door ons uitgevoerd onderzoek naar de ijzerstatus van verschillende zoet- en zoutwatervissen zijn in de bespreking opgenomen. Aan de basis van dit onderzoek staat de vraag, of de zeelt wat het ijzer betreft als onafhankelijk van zijn voedsel kan worden beschouwd. We kunnen aannemelijk maken dat dit in het natuurlijk milieu in principe het geval kan zijn.

We hebben enkele parameters ingevoerd om de ijzerhuishouding van de zeelt enerzijds en van mens en rat anderzijds van elkaar af te grenzen. Deze parameters zijn:

1. het dagelijks ijzerverlies als promillage van het totale lichaamsijzer;
2. het percentage van het dagelijks door het plasmacompartment vervoerde ijzer dat aan het erythropoietisch systeem wordt afgegeven;
3. het quotiënt van de dagelijkse ijzerabsorptie en van de dagelijkse ijzerbehoefte onder condities van een stabiele ijzerbalans.

Deze laatste parameter kan worden beschouwd als een maat voor de relatieve milieu-onafhankelijkheid van de erythropoïese. De zeelt verliest dagelijks 1‰ van het totale lichaamsijzer. Bij de mens en de rat bedraagt dit verlies 0,2‰. Wat de percentuele ijzerleverantie aan het erythropoietisch systeem betreft, deze bedraagt voor de zeelt 50% en voor de mens 90% van de hoeveelheid ijzer welke dagelijks door het plasma wordt vervoerd. Het quotiënt van ijzerabsorptie en ijzerbehoefte van het erythropoietisch systeem bedraagt voor de zeelt 0,43 en voor de mens en rat respectievelijk 0,04 en 0,01. Op grond van deze vergelijkende gegevens wordt geconcludeerd dat de ijzerhuishouding van de zeelt in vergelijking tot die van de mens en de rat als een relatief "open" systeem dient te worden opgevat.

De berekende utilisatiewaarden maken het opstellen van een schema van de ijzerkinetiek bij de zeelt mogelijk. Een dergelijk schema wordt gegeven. Ter vergelijking is het schema van Pollycove (1963) over de ijzerkinetiek bij de mens opgenomen.

Tot slot worden enkele specifieke problemen betreffende de ijzeropname en de ijzeruitscheiding besproken. Op de mogelijke functie van de gal in de ijzeruitscheiding wordt nader ingegaan. Ook de resultaten van de kieuw perfusie-experimenten worden besproken, dit met het oog op het al dan niet bestaan van een soortspecifieke activiteit van het transferrinemolecuul.

SUMMARY

This thesis is based upon a study of iron metabolism in the tench (*Tinca tinca* L.). The results are as far as possible compared with data about the iron metabolism of mammals. The object of this comparative study is to improve insight into the peculiar character of the metabolism of iron in fish and mammals.

Chapter I deals with those aspects which are of interest for a comparative study like the present one. The point from which we start is that the iron metabolism in man is characterized by the fact that humans are able to a small extent only to secrete iron once it has been absorbed. When it is allowed to take the supply of exogenous iron as originally limited, we can understand this "closed" character of the iron economy. Given this and in view of the stabilization of the erythropoiesis it is a necessary condition to minimize the loss of iron, minimization which is then of an adaptive nature. This explanation would get support if it should appear, that the iron economy of animals living under conditions of excessive supply of iron as compared with that of man had to be described as relatively "open". Such an abundant supply of iron is not improbable with a freshwater fish like the tench. For this reason the basic question of this study is whether the tench can absorb iron which does not form part of its food in sufficiently large quantities to compensate for its losses. Some implications of homoiothermy and poikilothermy on the erythropoiesis and in a wider sense on the iron economy are discussed. We further investigated the matter of the absorption of heavy metals and especially of iron by the fish by means of a study of the literature.

Chapter II deals with the materials and methods currently used in the course of this study. More specific methods are described in the chap-

ters concerned.

In chapter III a description is given on the chemistry of iron in an environment of water. On the basis of the reported theoretical aspects we developed an experimental procedure which is characterized by a constant iron concentration and a constant $^{59}\text{Fe(III)}/^{56}\text{Fe(III)}$ ratio in time. The concentration of iron is experimentally not variable; the mean value is $0.18\ \mu\text{mol/l}$. Essentially the experimental set-up is based on a dynamic equilibrium between the colloid-dispersed iron in the water and a sediment Fe(III)-hydroxide .

In chapter IV experiments are described dealing with the absorption of iron from water by the fish. We used the experimental procedure mentioned in chapter III. With a mean iron concentration of $0.18\ \mu\text{mol/l}$ we measured an average daily iron absorption of $1.12\ \text{nmol}/100\ \text{g fish}$. Based on the graphs obtained representing the specific activity of iron in the plasma and of iron in the organs as a function of time, some rough statements are made about the iron economy. To explain the results of the system formed by the intestine-liver-bile we must assume that part of the iron absorbed can be excreted in the bile-fluid without great dilution in the liver. We introduced the concept "utilization" to make possible quantitative statements about the metabolism of iron on organ-level. Utilization has been defined as the amount of iron taken up daily from plasma by an organ or organ-compartment. A method to calculate this utilization is given. We calculated the utilization for the most important iron-containing organs and tissues. The same was done for the utilization of the haemine-compartment of the kidney, the erythropoietic organ of the tench. The iron daily taken up by the haemine-compartment amounts to $0.34\ \mu\text{mol}$, a value sufficient to cover the need of the erythropoietic system completely.

Chapter V deals with experiments concerning the internal iron-dynamics. We used the "classical" method of administering a tracer dose $^{59}\text{Fe(III)}$ bound to plasma and following the course of the specific activity of plasma- and organ-iron in time. After coarsely interpreting the results we calculated the utilization value for the most important iron-containing organs (table VII, 3).

The results are in agreement with utilization values previously calculated (chapter IV).

In this chapter we also described experiments concerning the destruction of erythrocytes in the spleen. We administered erythrocytes which in advance

were labeled in vivo with $^{59}\text{Fe(III)}$. The experimental results indicate that the iron set free by destruction of the haemoglobine molecule is stored in the spleen, possibly in the form of haemosiderine. The non-haemoglobine iron present in the erythrocyten is very quickly mobilized and taken up by the liver.

Chapter VI treats of the secretion of iron and of some aspects of the iron absorption. The secretion of iron via urine and faeces has been studied quantitatively under conditions of a limited and excessive supply of iron. After a stay of 10 days in artificial freshwater with an iron concentration of 4 nmol/l the secretion of iron via urine and faeces amounted to 7.7 and 14.3 nmol/100 g fish per day respectively. The absorption of iron from water mentioned in chapter IV does not cover the loss of iron suffered, so that the experimental environment has to be considered as submarginal in terms of iron. With a concentration of iron of 20 $\mu\text{mol Fe(III)citrate/l}$ the loss of iron via urine and faeces amounts to 15.8 and 20.5 nmol/100 g fish per day respectively. In a 10 $\mu\text{mol/l}$ Fe(III)citrate environment we measured a daily absorption of iron of 43 nmol/100 g fish, so that under certain experimental conditions the loss of iron can be compensated by the absorption of iron from water. The secretion of iron in urine was further investigated. The bulk of the urinary iron descends from an iron pool localized in the secretion apparatus. To be able to explain the obtained experimental results, we must moreover postulate a process by which iron is uncoupled from serum-transferrin immediately before excretion. Under our experimental conditions however, this process is of minor importance. The part the gill plays in the secretion of iron has been studied qualitatively. With respect to the absorption of iron we were able to show that the drinking rate is sufficiently large to explain the iron absorption mentioned in chapter IV from the supply of iron with the drinking water. However, a percentage of absorption in the intestine has to be assumed as large as 100%, which seems to be not very probable. The question arises whether the gill fulfills the part of a supplementary way of absorption for the iron dissolved. By means of perfusion experiments we could prove that a gill-preparate can absorb iron from a ferricitrate environment, passing it to the perfusion liquid. With a concentration of iron of 10 $\mu\text{mol/l}$ the absorption amounts to 26 nmol/100 g fish per day. There is no demonstrable difference in absorption if instead of tench plasma, human plasma as perfusion medium was used. Perfusion with Ringer-Polyvinylpyrrolidone, however,

reduced iron absorption sharply, although the perfusion rate was not influenced.

Chapter VII. The experimental results once again make a subject for discussion, but now in a wider context. The results of an investigation made by us concerning the iron status of several fresh- and saltwater fishes from part of this discussion.

Of fundamental importance the question arises as to whether the tench can be considered not to depend on food for iron. We can reasonably prove that given a natural environment the answer to the question is yes in principle. We have introduced some parameters with the purpose of separating the iron economy of the tench on the one hand and of man and rat on the other hand.

The parameters were:

1. The daily loss of iron as promillage of the total quantity of body iron;
2. The percentage of iron daily conveyed through the plasma iron compartment;
3. The quotient of the daily absorption of iron and the daily need of iron under conditions of a stable iron balance.

This latter parameter can be considered as a measure for the relative independency of environment of the erythropoiesis.

The tench loses 1‰ of the total quantity of body iron daily. For man and rat this quantity amounts to 0.2‰. The percentual supply of iron to the erythropoietic system amounts to 50% for the tench and 90% of the quantity of iron daily conveyed through the plasma for man. The quotient of the iron absorption and the need of iron of the erythropoietic system amounts to 0.43 for the tench and 0.04 and 0.01 respectively for man and rat. On the bases of these comparative data the conclusion is made, that the iron economy of the tench as compared with that of man and rat has to be considered as a relatively "open" system.

The utilization values calculated made it possible to set up a scheme of iron kinetics for the tench (fig. VII, 1). For sake of comparison the scheme of Polycove about the iron kinetics of man was added.

Finally some specific problems with respect to the absorption and secretion of iron are discussed; also the probable function of the bile in the secretion of iron and the results of the gill perfusion experiments are discussed, the latter in view of the existence or not of a species-specific activity of the transferrin molecule.

LITERATUURLIJST

- ANTHONY, E.H.; J.Exp.Biol., 38, 93 (1961a); 38, 109 (1961b).
- ASCHAN, O.; J.Prakt.Chemie, 77, 172 (1908).
- BENTLEY, P.J.; Endocriness and Osmoregulation, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1971).
- BERG, A.; Mem.Ist.Ital.Idrobiol., 23, 163 (1968).
- BOBECK-RUTSAERT, M.; Acta Haematologica (in press) (1973).
- BOTHWELL, T.H.; PIRZIO-BIROLI, G. and FINCH, G.H.; J.Lab.Clin. Med., 51, 24 (1958).
- BURKE, J.D.; Nature, 212, 46 (1966).
- CAMERON, J.N. and WOHLSCHLAG, D.E.; J.Fish.Biol., 2, 167 (1970).
- CERNY, K.; Acta Societatis Zoologicae Bohemoslavacae, 32, 131 (1968).
- CHAN, D.K.O.; CHESTER JONES, U.; HENDERSON, J.W. and RANKIN, J.C.; J.Endocrin., 37, 297 (1967).
- CHENY, B.A.; LOTHE, K.; MORGAN, E.H.; SOOD, S.K. and FINCH, C.A.; Am.J.Physiol., 212, 376 (1967).
- CLEVELAND, P.; HICKMAN, J.R. and TRUMP, B.F.; Fish Physiology, Vol.1. Ed. Hoar and Randall, A.P., New York, London (1969).
- CONTE, F.P.; Fish Physiology, Vol.1. Ed. Hoar and Randall, A.P., New York, London (1969).
- COOPER, L.H.N.; Proc.Roy.Soc. (London) (B), 124, 299 (1937).
- COOPER, L.H.N.; J.Mar.Biol.Ass., 27, 314 (1948).
- DRABKIN, D.L.; Physiol.Rev., 31 (1951).
- DUURSMA, E.K. and SEVENHUYSEN, W.; Neth.J.Sea Res., 3, 95 (1966).
- EISLER, R.; J.Fish.Res.Bd.Can., 28, 1223 (1971).
- EISLER, R. and GARDNER, G.J.; J.Fish.Biol., 5, 131 (1973).
- ELIAS, H. and BENGELSDORF, H.; Acta anat. (Basel), 14, 297 (1963).

- EVANS, D.H.; *Comp.Biochem.Physiol.*, 25, 751 (1968).
- EIJK, H.G. VAN; VAN DIJK, J.P.; VAN NOORT, W.L.; LEYNSE, B. and MONTFOORT, C.H.; *Scand.J.Haemat.*, 9, 267 (1972).
- FALKNER, N.W. and HOUSTON, A.H.; *J.Fish.Res.Bd.Canada*, 23, 1109 (1966).
- FEITKNECHT, W.; *Z.Elektrochem.*, 63, 34 (1959).
- FREEMAN, R.A. and EVERHART, W.H.; *Trans.Am.Fish.Soc.*, 100, (1971).
- GARDNER, G.R. and YEVICH, P.P.; *J.Fish.Res.Bd.Canada*, 27, 2185 (1970).
- GAYER, K.H. and WOONTNER, L.; *J.Phys.Chem.*, 60, 1569 (1956).
- GELINEO, S.; *Extrait du Bull.T.46 de l'Académie serbe des Sciences et des Arts. Classe des Sciences mathématiques et naturelles*, 12, 25 (1969), Belgrado.
- GLASER, B.E.A.; *Academisch Proefschrift, Med. Fac. Rotterdam* (1970).
- GOLDBERG, E.D.; *Chemical Oceanography*; Ed. J.P. Riley and G. Skirrow, A.P., London (1965).
- GRANICK, S.; *J.Biol.Chem.*, 164, 737 (1946).
- GRESHAM, A.; Barnett, M.F.; SMITH, S.V.; *Med.Lab.Tech.*, 28, 197 (1971).
- HAHN, P.T.; *Exp.Med.*, 78, 169 (1943).
- HAIDER, G.; *Zoöl.Anz.*, 177, 348 (1966).
- HAIDER, G.; *Zoöl.Anz.*, 181, 203 (1968).
- HALLBERG, L.; HARTHWERTH, H.G. and VANNOTTI, A.; *Iron Deficiency, Collognia Geigy*, A.P.London, New York (1970).
- HERSHBERGER, W.K.; *Trans.Am.Fish.Soc.*, 99, 207 (1970).
- HEVESY, G.; LOCKNER, D. and SLETTEN, K.; *Acta Physiol.Scand.*, 60, 256 (1964).
- HOLETON, G.F.; *J.Exp.Biol.*, 54, 239 (1971).
- HOLETON, G.F. and RANDALL, D.J.; *J.Exp.Biol.*, 46, 297 (1967); 46, 317 (1967).
- HOLMES, W.N. and DONALDSON, E.H.; *Fish Physiology, Vol. I. Ed. Hoar and Randall*, A.P., New York, London (1970).
- HSU, P.H. and RAGONE, S.E.; *J.Soil Science*, 23, 17 (1972).
- HUFF, R.L.; HENNESSY, T.G.; AUSTIN, R.E.; GARCIA, J.F.; ROBERTS, B.M. and LAWRENCE, J.H.; *J.Clin.Invest.*, 29, 1041 (1950).
- HUFF, R.L.; ELMLINGER, P.J.; GARCIA, J.F.; ODA, J.M.; COCKRELL, M.C. and LAWRENCE, J.H.; *J.Clin.Invest.*, 30, 1512 (1951).

- HUTCHINSON, G.E.; A Treatise on Limnology. Vol.1. Ed. J. Wiley and Sons, New York (1957).
- JOHNSTON, R.; J.Mar.Biol.Ass.U.K., 44, 87 (1964).
- KLEIBER, M.; Nature, 175, 342 (1955).
- KREEL, B.K. VAN; Academisch Proefschrift Med.Fac.Rotterdam (1972).
- LARSON, K. and Olsen, S.; Beret.Minst.Landbr.Fisk.dan.biol.Stn., 50, 1 (1948).
- LENGWEILER, H.; BUSER, W. and FEITKNECHT, W.;
Helvetica Chimica Acta, 44, 796 (1961a).
Helvetica Chimica Acta, 44, 805 (1961b).
- LEIJNSE, B.; Chemisch Weekblad no. 59, deel 60, 525 (1964).
- LEWIS, W.M. and PETERS, C.; Ind.Wastes, 1, 145 (1956).
- LOCKNER, D.; PETTERSSON, Å. and ERICSON, U.; Int.J.Radiat. Biol., 21, 559 (1972).
- MACCANCE, R.A. and WIDDOWSON, E.M.; Lancet, 233, 680 (1937).
- MACHADO CRUZ, J.A.; Bull.Off.Int.Epiz., 65, 715 (1966).
- MAN, Y.K. and WADSWORTH, G.R.; Clin.Sci., 36, 479 (1969).
- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O. and HEREMANS, J.F.; Immunochemistry, 2, 235 (1965).
- MASHIKO, K. and JOZUKA, K.; Annotationes Zoöl.Jap., 37, 41 (1964).
- MOLNÁR, Gy; and TAMÁSSY, E.; J.Fish.Biol., 2, 167 (1970).
- MOUNT, D.I.; Wat.Res., 2, 215 (1968).
- NAKATANI, R.E.; Disposal of Radioactive Wastes etc. Vienna: IAEA, 809 (1966).
- OHLE, W.; Naturwissenschaften, 23, 480 (1935).
- PIRZO-BIROLI, G. and FINCH, C.H.; J.Lab.Clin.Med., 55, 216 (1960).
- POLLYCOVE, M.; Iron Metabolism, Ciba Symposion (1963).
- PRECHT, J.; CHRISTOPHERSEN, J. and HENSEL, H.; Temperatur und Leben. Springer Verlag, Berlin (1955).
- PROSSER, C.L.; BAR, L.M.; PINC, R.D. and LANER, C.Y.; Physiol. Zoöl., 30, 137 (1957).
- PROSSER, C.L. and BROWN, F.A.; Comparative Animal Physiology, Sec. Ed. (1966).
- RAMSAY, W.M.N.; Clin.Chim.Acta, 2, 221 (1957).
- RANKIN, J.C. and MAETZ, J.; J. Endocrin., 51, 621 (1971).
- ROEDER, M. and ROEDER, R.H.; J.Nutrition, 90, 86 (1966).
- ROMEIS, B.; Mikroskopische Technik. 16e Auflage, Oldenbroug, R. Verlag, München (1968).

- ROSA, H.; Fish.Biol.Branch. FAO/58/2/951 (1958).
- SCHIEMENZ, F.; Allg.Fisch Ztg., 62, 71 (1937).
- SCHUBARTH, H.; Z.Mikrosk.Forsch., 75, 428 (1966).
- SHAPIRO, J.; J.Am.Waterworks Ass., 56, 1062 (1964).
- SHAPIRO, J.; Proc. of an I.B.P.symp., 202 (1966) Amsterdam.
- SHARNY, L.; WASSERMAN, R.; SCHWARTZ, L. and TENDLER, D.; Ann. N.Y.Acad.Sci., 108, 230 (1963).
- SLETTEN, K.; LOCKNER, D. and HEVESY, G.; Int.J.Radiat.Biol., 8, 317 (1964).
- SMITH, L.S.; J.Fisheries Res.Board Com., 23, 1439-1446 (1966).
- SPOOR, W.A.; Federation Proc. 10, 131 (1951).
- STUMM, W. and LEE, G.F.; Schweiz.Z.Hydrobiol., 22, 295 (1960).
- TAVENIER, P.; Academisch Proefschrift, Med.Fac., Rotterdam (1971).
- TAVENIER, P.; RAAYMAKERS, C.E.; VAN ELJK, H.G. and LEIJNSE, B.; Clin.Chim.Acta, 32, 63 (1971).
- THUNELL, S.; Clin.Chim.Acta, 11, 321 (1963).
- TOPF, W.; Zööl.Anz., 150, 92 (1953).
- TRINDER, P.J.; J.Clin.Pathol., 9, 170 (1956).
- VANNOTTI, Z.; HALLBERG, L.; HARTHWERTH, H.G. and VANNOTTI, A.; Iron Deficiency, Colloquia Geigi, A.P. London, New York (1970).
- VERHOEF, N.J.; KREMERS, J.H. and LEIJNSE, B.; Biochimica et Biophysica Acta, 304, 114 (1973).
- WADSWORTH, G.R. (1969); Zie Man, Y.K. and Wadsworth, G.R. (1969).
- WEATHERLEY, A.H.; J.Anim.Ecol., 28, 73 (1959).
- WEDEMEIJER, G.; J.Fish.Res.Bd.Canada, 27, 909 (1970).
- WILDE, M.A. DE and HOUSTON, A.H.; J.Fish.Res.Bd.Canada, 24, 2267 (1967).
- YU, M.L.; KILEY, C.W.; SAROT, D.A. and PERLMUTTER, A.; J.Fish. Res.Bd.Canada, 28, 47 (1971).
- ZANJANI, E.D.; YU, M.L.; PERLMUTTER, A. and GORDON, A.S.; Blood, 33, 573 (1969).
- ZILVERSMIT, D.B.; ENTENMAN, C. and FISHLER, M.C.; J.Gen.Physiol., 26, 325 (1943).
- ZILVERSMIT, D.B.; Nature, 175, 863 (1955).
- ZWILLENBERG, H.H.L.; Academisch Proefschrift, Verlag Huber, H., Bern, Stuttgart (1964).

N A S C H R I F T

Bij de voltooiing van dit proefschrift wil ik gaarne de gelegenheid aangrijpen om allen te bedanken, die de bewerking hiervan mogelijk hebben gemaakt.

Hooggeleerde Leijnse, hooggeachte promotor. U dank ik voor de enthousiaste wijze waarmee U dit onderzoek heeft begeleid en voor de vele suggesties zonder welke dit onderzoek niet mogelijk was geweest.

Zeergeleerde Van Eijk. U betuig ik mijn dank voor de vele waardevolle aanwijzingen, die ik tijdens dit onderzoek van U mocht ontvangen en voor de nauwgezette wijze waarop U als co-referent het proefschrift heeft beoordeeld.

Zeergeleerde Zeilmaker. U dank ik voor de accurate wijze waarmee U als co-referent het proefschrift van commentaar heeft voorzien. Uw kritiek heeft geleid tot duidelijke verbeteringen in het manuscript.

De heer A.J. Lagerwerf ben ik veel dank verschuldigd voor de enthousiaste en nauwgezette wijze waarop hij het experimentele werk heeft verricht.

Het immunochemische werk werd verricht door de heer W.L. van Noort. Ik ben hem hiervoor zeer erkentelijk.

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

CURRICULUM VITAE

Op verzoek van de Medische Faculteit te Rotterdam

In 1959 werd te Delft door mij het examen H.B.S.-B afgelegd, waarna inschrijving aan de Universiteit te Leiden volgde met als studierichting biologie.

Het candidaatsexamen werd in 1964 afgelegd. Na het behalen van het candidaatsexamen werd als doctoraal-programma experimentele dierkunde gekozen, met als hoofdvak dieroecologie (Prof. Dr. K. Bakker) en als bijvakken ontwikkelingsgenetica (Prof. Dr. H.J. Gloor) en anthropogenetica (Dr. L.N. Went). Het doctoraalexamen werd in 1968 afgelegd. In 1969 trad ik in dienst als wetenschappelijk medewerker op de afdeling Chemische Pathologie van de Medische Faculteit te Rotterdam, waar onder leiding van Prof. Dr. B. Leijnse het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht.

