

## Werkgemeenschap Klinische Chemie; een moeilijk realiseerbaar ideaal

J. LINDEMANS<sup>1</sup> en I. VERMES<sup>2</sup>

Op 21 juni 1994 werd verkennenderwijs in een eerste wetenschappelijke bijeenkomst de Werkgemeenschap Klinische Chemie opgericht, met als doel een stabiel forum te creëren voor uitwisseling van wetenschappelijke kennis en ervaring, groei naar samenwerking tussen onderzoeksgroepen en last but not least, selectie van projecten die voor subsidiëring vanuit willekeurig welk fonds in aanmerking zouden kunnen komen. Door het houden van verscheidene samenkomsten voor belangstellende onderzoeksgroepen is geleidelijk een forum van ongeveer 35 deelnemers opgebouwd waarbinnen meestal langs thematische lijnen samenwerking en uitwisseling groeide. Ten aanzien van de belangrijkste motor voor het in beweging houden van de Werkgemeenschap, het perspectief op een subsidie voor een ingediend onderzoeksproject, is de Werkgemeenschap veel minder succesvol geweest. Het is helaas gebeven bij een eenmalige subsidie vanwege de Noyons Stichting en ondanks nadrukkelijke inspanningen van de wetenschapscommissie in die richting, zijn er geen perspectieven op gunstiger tijden.

In die wetenschap heeft de Werkgemeenschap enige jaren voortbestaan, ook om te bezien of de resterende doeleinden voldoende draagvlak boden voor continuering. Na de laatste wetenschappelijke vergadering in het najaar van 2000 is die vraag nog eens expliciet op de agenda van de wetenschapscommissie geweest en deze is tot de conclusie gekomen dat dat draagvlak toch te dun was om voortzetting te rechtvaardigen. Die conclusie werd ook gedeeld door het bestuur van

de NVKC en daarop is besloten de Werkgemeenschap niet zozeer definitief op te heffen als wel voorlopig in de ijskast te plaatsen. Daaraan was wel het besluit verbonden om één van de doelstellingen van de Werkgemeenschap, namelijk het bieden van ruimte voor mondelinge presentatie en bediscussiëren van goed wetenschappelijk onderzoek, in andere vorm te bereiken en wel door uitbreiding van de beschikbare tijd voor mondelinge presentaties tijdens de voorjaarsvergadering. Langs andere weg hebt u kennis kunnen nemen van de praktische invulling van dit voornemen, namelijk door introductie van parallelsessies met voordrachten geselecteerd uit het aanbod van abstracts.

Samenvattend: de activiteiten van de Werkgemeenschap zijn dus voorlopig beëindigd maar de wetenschapscommissie gaat integraal voort om de nog steeds geldige doelstellingen van de Werkgemeenschap te verwezenlijken. Om op een speciale wijze dit moment in het klinisch-chemisch wetenschapsland te markeren, worden samenvattingen van voordrachten van de laatste wetenschappelijke bijeenkomst hieronder gepubliceerd\*.

---

*Secretaris<sup>1</sup> en voorzitter<sup>2</sup> van de Werkgemeenschap Klinische Chemie.*

\* Voordrachten gehouden te Utrecht op 5 oktober 2000 op de bijeenkomst van de Werkgemeenschap Klinische Chemie.

### Koolhydraatdeficiënt transferrine in relatie tot de ijzerstatus

J. van PELT

*KCHL, Ziekenhuizen Noord-Limburg, Venlo/Venray.*

De belangrijkste functie van transferrine (Tf) is gelegen in het transport van ijzerionen van de darmwand naar de plaats van behoefte zoals het beenmerg of de lever. De procentuele bezetting van de twee ijzerbindingsplaatsen van Tf (verzadigingspercentage) weerspiegelt de ijzerstatus van het individu. Ook de totale hoeveelheid Tf (voorheen totale ijzerbindingscapaciteit) is gerelateerd aan de ijzerbehoefte. Is de behoefte groot zoals bij deficiëntie of ijzergebreksanemie, dan stijgt de hoeveelheid Tf om de opname van ijzer te bevorderen. Ook blijkt er een relatie van het koolhydraatdeficiënte transferrine (CDT) met de ijzerstatus. CDT is de fractie van de totale hoeveelheid Tf waarvan één of beide koolhydraatketens ontbreken,

oftewel de som van de a-, mono- en disialotransferrinevarianten die wordt bepaald na kolomchromatografische scheiding. De hoeveelheid CDT kan in absolute maat worden uitgedrukt (U/l, CDTect-test) of relatief t.o.v. de totale hoeveelheid Tf (%CDT-test in procenten). CDT wordt steeds vaker gebruikt als marker voor chronisch overmatig alcoholgebruik.

Bij een onderzoek met 99 patiënten met een Hb < 7,0 mmol/l bleek er, zoals verwacht, een omgekeerd lineair verband tussen de hoeveelheid Tf en de logaritme van de ferritineconcentratie. Ook bleek er eenzelfde verband tussen CDT en de log[ferritine]. De verhouding CDT/Tf bleek onafhankelijk van de ijzerstatus. Bij uitbreiding van het onderzoek met ijzerdeficiënte

patiënten (ferritine < 25 µg/l), maar met een Hb > 7,0 mmol/l, bleken in totaal 5 van de 11 mannen en 8 van de 18 vrouwen een CDTEct-concentratie hoger dan de grenswaarde te vertonen (resp. 20 en 26 U/l) (1).

Als onderdeel van de Eindhovens Perimenopausaal Osteoporosis Studie werd bij 331 vrouwen in de leeftijd van 46-54 jaar CDT gemeten. Deze vrouwen gebruikten geen alcohol en werden aan de hand van hun menstruatiepatroon verdeeld in pre-, peri- en postmenopausaal. Het bleek dat premenopausale vrouwen gemiddeld een hogere CDT-waarde (15,2 U/l) hadden dan postmenopausale vrouwen (13,6 U/l;  $p < 0.016$ ). Tevens bleek de gemiddelde CDT-waarde bij pre- en perimenopausale vrouwen afhankelijk van de tijdsduur vanaf de laatste menstruatie. Vrouwen met een menstruatie minder dan een maand geleden hadden gemiddeld een hogere CDT (15,4 U/l) dan vrouwen met een laatste menstruatie 1 tot 12 maanden geleden (13,0 U/l;  $p < 0.01$ ). Ook de mate van bloedverlies tijdens de menstruatie bleek van invloed. Vrouwen met zwaar bloedverlies hadden gemiddeld een hogere CDT-waarde (15,3 U/l), dan vrouwen met licht bloedverlies (13,3 U/l;  $p < 0.17$ ) (2).

Een andere opvallende afhankelijkheid van CDT met de ijzerstatus bleek bij de meting van CDT in navelstrengbloed en bij neonaten ter vaststelling van referentiewaarden met het oog op de diagnostiek van congenital disorders of glycosylation en galactosemie. In navelstrengbloed van gezonde neonaten bleek de CDT-hoeveelheid gemiddeld 54 U/l (range 28-98 U/l; grenswaarde mannen 20 U/l) bij een normale transferinehoeveelheid. Deze verhoogde CDT-waarden bleken in de eerste levensweken te dalen tot hoognormalewaarden met een halfwaardetijd van 8

dagen (3). Bij zwangere vrouwen zijn aan het eind van de zwangerschap juist verhoogde hypersialofracties aangetoond (4). De verhoogde hyposialofracties bij het kind in utero lijken belangrijk voor de transplacentaire ijzeropname en de verhoogde hypersialofracties bij de zwangere voor de ijzerafgifte aan de placenta. Na de geboorte valt deze adaptatie van het kind namelijk direct weg.

Concluderend kan gesteld worden dat bij toegenomen ijzerbehoefte bijvoorbeeld bij bloedverlies of ijzerdeficiëntie, de hoeveelheid Tf toeneemt. Deze toename gaat gepaard met een evenredige toename van het CDT, wat leidt tot valspositieve CDT-waarden bij ferripriev patiënten en hogere CDT-waarden bij premenopausale vrouwen in vergelijking tot postmenopausale vrouwen. Bij kinderen in utero blijkt tevens een opvallende vermeerdering van de hoeveelheid CDT t.o.v. Tf op te treden, wat leidt tot hoge absolute en relatieve CDT-waarden.

#### Literatuur

1. Pelt J van, Azimi H. False positive CDTEct values in patients with low ferritin values. *Clin Chem* 1998; 44: 2219-2220.
2. Leusink GL, Smeets-Goevaers CG, Breed GA, Keijzer JJ, Pelt J van. Carbohydrate-deficient transferrin in relation to the menopausal status of women. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 172-175.
3. Pelt J van, Bakker JA, Velmans MH, Spaapen LJH. Carbohydrate-deficient transferrin values in neonatal and umbilical cord blood. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 253-256.
4. Jong G de, Eijk HG van. Functional properties of the carbohydrate moiety of human transferrin. *Int J Biochem* 1989; 21: 253-263.

## Flow cytometry of apoptotic cell death

### I. VERMES

*Medical Spectrum Twente, Hospital Group, Enschede*

The term apoptosis or programmed cell death defines a genetically encoded cell-death program, which is morphologically and biochemically distinct from necrosis or accidental cell-death. The characteristic morphological signs of apoptosis (cellular shrinkage, membrane blebbing, nuclear condensation and fragmentation) are the final results of a complex biochemical cascade of events which is an integral part of the physiological homeostasis. Techniques designed to identify, quantitate and characterize apoptosis are numerous, but flow cytometry (FCM) remains the methodology of choice to study the apoptotic cascade in relation to cell type, trigger and time. Apoptosis starts with cell shrinkage, expressed by changes in cell light-scatter signals. Initially the integrity of the cell membrane remains intact during apoptosis (but not during necrosis) which can be utilized for quantitative analysis of the number of vital, apoptotic and necrotic cells by the rate of the uptake and retention of certain DNA dyes. Hydrolytic enzymes, caspases, members of a family of cysteine proteases, degrade

macromolecular structures of the cell, like DNA and cytoskeleton, which underly the morphological changes during apoptosis. Demonstration of the presence and/or the activation of these caspases by FCM is a tool to demonstrate apoptosis in cell suspension. An early event of apoptosis is the transition of the mitochondrial transmembrane potential which is reflected by the loss of the cell ability to accumulate cationic lipophilic fluorochromes. At this stage, when the cell has passed the point of no return, caspase-activated DNase is activated, inducing extensive DNA cleavage. Cleavage of DNA may yield double-stranded and single-stranded breaks which can be demonstrated with FCM by in situ nick translation (ISN) or Tdt-mediated nick end labelling (TUNEL) techniques. Due to the activation of DNase and subsequent leakage of the low molecular weight DNA from the apoptotic cell the cellular DNA content decreases which can be demonstrated by reduced DNA stainability of the cell. A change of the architecture of the plasma membrane during apoptosis

involves the redistribution of phosphatidylserine in the outer leaflets of the membrane. The cell-surface exposure of phosphatidylserine, which is characteristic for the dying cell, can be visualized by using Annexin V label. Degradation of the intracellular structures, crosslinking of proteins and alterations of membrane properties result in blebbing and finally in formation of apoptotic bodies which can be measured

by FCM based on the content of the vesicles. All described FCM-apoptosis assays have a solid experimental basis and have been used successfully in basic research on molecular and biochemical mechanisms of apoptosis. In various clinical settings the ability to follow the apoptotic process in patients' samples may offer the rationale for optimal treatment schedule.

### Mutations in the human pyruvate kinase gene leading to pyruvate kinase deficiency in the Netherlands

R. van WIJK<sup>1</sup>, E. HUIZINGA<sup>2</sup>, G. RIJKSEN<sup>3</sup> and W.W. van SOLINGE<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry, University Medical Center Utrecht<sup>1</sup>, Department of Crystal & Structural Chemistry, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University<sup>2</sup> and Jordan Laboratory, Department of Haematology, University Medical Center Utrecht<sup>3</sup>*

Mutations in the liver (L) and red cell (R) type pyruvate kinase gene (PKLR) are associated with pyruvate kinase deficiency, a disorder causing hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. The phenotypic expression of the disease is variable. In this study, 23 Dutch families with pyruvate kinase deficiency were characterized at the molecular level. Three dimensional computer modelling was used in order to obtain an insight in the effect of the mutations on structure and allosteric interactions of the molecule. In addition we evaluated the phenotypic expression of the disease in relation to the detected mutations in these patients. In total, 22 different mutations were found, thirteen of which were specific for the Dutch population. In addition, a novel polymorphic c→t substitution at nt -109 in the PKR promoter was identified. Three mutations were nonsense and frameshift mutants, three mutations resulted in aberrant RNA splicing and sixteen were missense mutations. Of the total number of mutations, 59% were located in exons 7, 9 and 11 (world wide 43%). Strikingly, in contrast to the world

wide spectrum of mutations, no mutations were found in exon 8. The most common mutations were G1529A (24%) and C1456T (13%), in agreement with the international population, and one exclusively Dutch mutation (G331A) with a prevalence of 13%. Two unrelated patients were homozygous (G1529A). All other clinically affected patients were compound heterozygous. Using computer modelling of the missense mutants, we were able to divide the mutants into three categories. Those that directly affect binding of substrate or regulatory molecules, those disturbing domain interfaces involved in allosteric regulation and those that are likely to disrupt the overall structural integrity of one of the domains. Correlation studies of the molecular defect with the phenotypic expression are currently underway. Identifying the molecular basis of mutations underlying this rare disorder will help to obtain more insight into the mechanisms involved in the variable clinical phenotype of PK deficient patients.

### Moleculair-biologische diagnostiek van hemolytische anemieën met een membraan defect

P.F.N. FRANCK

*Ziekenhuis Leyenburg, Den Haag*

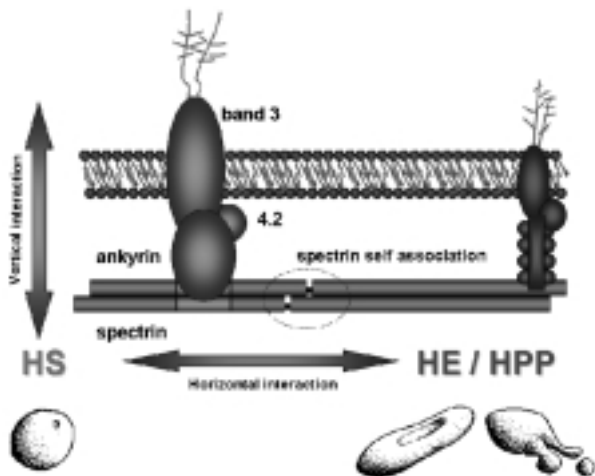
Het klinisch-chemisch en hematologisch laboratorium van het Ziekenhuis Leyenburg in Den Haag doet onderzoek naar de oorzaken van hemolytische anemie die hun oorzaak vinden in afwijkingen in de erythrocytenmembraan. De bekendste vormen hiervan zijn hereditaire elliptocytose (HE) en hereditaire sferocytose (HS). In de afgelopen jaren heeft het laboratorium een aantal moleculair-biologische technieken opgezet zowel op het gebied van eiwit- als van DNA-analyse.

De membraan van de erythrocyt is opgebouwd uit een dubbele laag van fosfolipiden en cholesterol. Deze membraan wordt ondersteund door een zogenaamd membraanskelet. Buiten versteviging van de membraan is het membraanskelet ook verantwoordelijk voor de vervormbaarheid van de cel.

Het membraanskelet is opgebouwd uit een aantal eiwitten, waarvan spectrine de belangrijkste is. Spec-

trine bestaat uit twee langgerekte moleculen ( $\alpha$ - en  $\beta$ -spectrine) die als een dimeer in elkaar gevlochten zijn. Zij gaan via een kop-staart-interactie een onderlinge binding aan, waardoor een tetrameer ontstaat. Deze tetrameren zijn op hun beurt weer gekoppeld aan het zogenaamde actine/tropomyosinecomplex. Dit complex vormt het verbindingspunt voor verschillende tetrameren. De op deze wijze verbonden eiwitten vormen een hexagonaal netwerk aan de binnenzijde van de erythrocytenmembraan. Het skelet is op haar beurt weer gekoppeld aan het eiwit 'Band 3' dat een integraal onderdeel van de membraan is. Deze koppeling geschiedt via het eiwit ankyrine. Naast deze algemene opbouw en verankering van het skelet aan de membraan bestaan nog meer eiwitverbindingen die echter voor het onderzoek naar membraanafwijkingen van minder belang zijn.

Van oudsher worden de afwijkingen aan de erythrocyt



**Figuur 1.** Erythrocytaire membraanafwijkingen

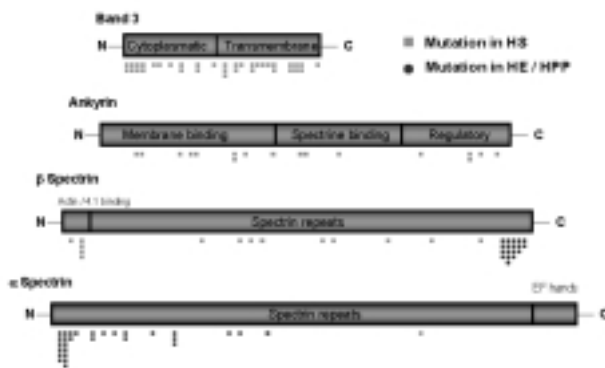
ingedeeld naar de morfologie van de cellen. Het idee bestaat nu, dat de mutaties die samenhangen met elliptocytose, fouten in eiwitten veroorzaken die de interactie van skelet met membraan in de horizontale richting beïnvloeden. De bolvorm van sferocytten zou veroorzaakt worden door veranderingen in eiwitten die effect hebben op de verticale interacties (figuur 1). De analyse van elliptocytose beperkt zich tot enkele genen. Tot nu toe zijn vrijwel alleen mutaties in de genen van  $\alpha$ - en  $\beta$ -spectrine aangetroffen en dan ook nog in zogenaamde “hot spots”. Deze mutaties komen vooral voor in het gebied van het gen dat codeert voor de regio binnen spectrine die betrokken is bij de interactie tussen dimeren (self association site). Dit is dan het N-terminale deel van  $\alpha$ -spectrine en het C-terminale deel van  $\beta$ -spectrine. De mutaties die betrokken zijn bij HS zijn minder geconcentreerd binnen het genoom. Bij deze groep van mutaties spelen verschillende eiwitten een rol, waaronder ankyrine,  $\alpha$ - en  $\beta$ -spectrine en Band 3. De mutaties komen over de gehele lengte van de genen voor (figuur 2).

### Soluble transferrin receptor (sTfR) in pregnancy

F.V. VELZING-AARTS<sup>1</sup>, D.A.J. DIJCK-BROUWER<sup>1</sup>, A.S.B. MENSINK<sup>1,2</sup>, C. RENFRUM<sup>2</sup>, F.P.L. van der DIJS<sup>2</sup> and F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>

*Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital<sup>1</sup> and Analytic Diagnostic Center, Curaçao<sup>2</sup>*

**Introduction.** Pregnancy is characterized by higher iron requirement in support of the developing fetus and placenta, and the expansion of the maternal red blood cell (RBC) mass. Physiologic adaptations include mobilization of maternal iron stores and augmentation of dietary iron absorption. Insufficient adaptation may cause functional iron shortage. Establishment of an ensuing iron deficiency is important, though troublesome, since pregnancy per se alters most parameters of iron status irrespective of the genuine whole body iron stores. Soluble transferrin receptor (sTfR) is a recently recognized iron-status parameter. Expression of the transferrin receptor (TfR) on cellular surfaces reflects the cell's functional iron need as part of a finely tuned system that regulates intracellular iron content. The serum con-

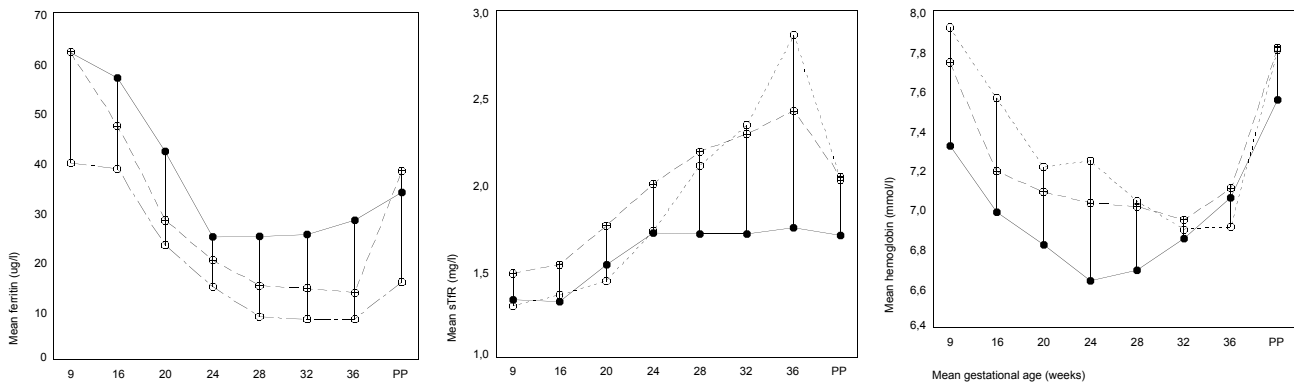


**Figuur 2.** Positie van mutaties in de genen voor erythrocytaire membraaneiwitten

Algemeen hematologisch onderzoek naar hemolytische anemieën met een membraandefect zoals de morfologie, osmotische resistentie, aantal reticulocyten, LDH-activiteit en haptoglobine-gehalte geven dikwijls geen eenduidig beeld. Om die reden wordt eerst ektocytometrisch onderzoek op de erythrocyten uitgevoerd. Bij dit onderzoek wordt binnen een ektocytometer een shear stress op de erythrocyten uitgeoefend in media met verschillende osmolaliteit. Onder deze condities verandert de erythrocyt sterk van vorm. Men drukt de vervormbaarheid uit in een zogenaamde Deformability Index (DI). Door deze DI (y) uit te zetten tegen de osmolaliteit (x) onder constante shear stress, vindt men karakteristieke vervormbaarheidsprofielen voor de verschillende typen hemolytische anemie. Op basis van die bevindingen begint dan de zoektocht naar de onderliggende mutaties. Binnen het Ziekenhuis Leyenburg is een moleculair-biologische strategie ontwikkeld om op efficiënte wijze de mutaties op te sporen.

centration of truncated TfR fragments (i.e. sTfR) is directly proportional to the intact cellular TfR content, and since the TfR is mainly found on developing RBC, circulating sTfR is strongly dependent on erythroid mass. After an initial decrease, erythropoietic activity rises with advancing pregnancy to reach a maximum around 28 weeks of gestation. A changing sTfR concentration in the first half of pregnancy, if any, is therefore likely to reflect the changing erythropoietic activity, with diminutive influence after 28 weeks of gestation. We investigated whether sTfR is useful in assessing iron status during pregnancy, with special focus on its second half.

**Material and methods.** The study group was composed of 83 apparently healthy women living in the island of Curaçao (Netherlands Antilles). They had



**Figure 1.** Courses of the mean concentrations of serum ferritin ( $\mu\text{g/l}$ ; left), plasma soluble transferrin receptor ( $\text{mg/l}$ ; middle) and hemoglobin ( $\text{mmol/l}$ ; right) from 9-36 weeks of gestation and at 3 months postpartum. All women ( $n = 62$ ) had CRP concentrations within the reference range. They were subdivided on the basis of their serum ferritin at 28, 32 and 36 weeks of gestation. Those with serum ferritin levels  $\leq 12 \mu\text{g/l}$  at all three occasions were regarded as having depleted iron stores ( $-\text{O}-$ ; group A;  $n = 19$ ), while women with serum ferritin levels  $> 12 \mu\text{g/l}$  at all three occasions were considered to have adequate iron stores ( $-\bullet-$ ; group C;  $n = 22$ ). The remaining group ( $-\oplus-$ ; group B;  $n = 21$ ) was considered to have intermediate iron stores.

uncomplicated pregnancies resulting in healthy singleton babies. Blood samples were collected at a mean gestation of 9 weeks, at 16, 20, 24, 28, 32 and 36 weeks, and at about 3 months after delivery. Hemoglobin was immediately determined and serum and plasma were stored at  $-70^\circ \text{C}$  until analysis of plasma sTfR (Orion Diagnostica), serum ferritin (IMX, Abbott) and serum C-reactive protein (CRP; Beckmann Array) by immunochemical methods. Twenty-one women with one or more CRP concentrations above the reference range (i.e.  $\leq 0.8 \text{ mg/l}$ ) from week 24-36 were initially excluded. The remaining 62 women were subdivided on the basis of their serum ferritin at 28, 32 and 36 weeks of gestation. Those with serum-ferritin levels  $\leq 12 \mu\text{g/l}$  at all three occasions were regarded to have depleted iron stores (group A,  $n = 19$ ), while women with serum ferritin levels  $> 12 \mu\text{g/l}$  at all three occasions were considered to have adequate iron stores (group C,  $n = 22$ ). The remaining group (group B,  $n = 21$ ) was considered to have intermediate iron stores. Within-group differences were investigated with the paired Student's t-test, corrected for type-1 errors, if necessary. Between-group differences were investigated with the Mann-Whitney U-test, corrected for type-1 errors.  $P < 0.05$  was considered significant.

**Results.** Figure 1 shows the courses of ferritin (left), sTfR (middle) and Hb (right) for the three subgroups with advancing gestation. Groups B and C had lower sTfR at week 9, compared with postpartum concentrations. Between-group ferritin differences were observed at 24 weeks (C vs A), at 28, 32 and 36 weeks (differences between all 3 groups) and postpartum (C vs A). Between-group differences for sTfR occurred at 32 and 36 weeks (C vs A, and C vs B), and for Hb at weeks 9 (C vs B, and C vs A), 16 (C vs A), 24 (C vs A, and C vs B) and 28 (C vs A). From week 24-36, Hb increased in group C, remained

stable in group B, and decreased in group A. Of the 21 women with increased CRP, only 4 had CRP  $> 2.5 \text{ mg/l}$ . Three of these 4 had ferritin  $> 12 \mu\text{g/l}$  at weeks 28, 32 and 36. Their sTfR increments from week 28 to 36 amounted to 0.45, 0.39 and  $-0.10 \text{ mg/l}$ .

**Discussion.** Lower sTfR at 9 weeks, compared with levels at 3 months postpartum, may reflect the initial decrease of erythropoietic activity in early pregnancy. The subsequent sTfR increase in group C (adequate iron stores) and the reach of a plateau from week 24 may reflect an increasing erythropoiesis that subsequently reaches a steady state. The steadily increasing sTfR of group A (depleted stores) in week 24-36, compared with group C, is likely to reflect increasing erythropoiesis on which a developing iron depletion is superimposed. We have no explanation for the initially higher Hb in groups A and B, compared with C, but the subsequent Hb courses in week 24-36 were consistent with classification of the women according to their iron status in the second half of pregnancy. Classification of women with normal CRP according to their ferritin levels in week 28-36 indicated the value of sTfR for iron-status assessment in late pregnancy. Lack of sTfR concentrations differences between women with depleted stores and intermediate stores in week 32-36 suggests that sTfR is more sensitive than ferritin in that period. The relatively high increment of sTfR from week 28-36 in 2 women with ferritin  $> 12 \mu\text{g/l}$  and CRP  $> 2.5 \text{ mg/l}$  suggests that a normal ferritin does not necessarily reflect adequate iron stores in women with clearly increased acute phase proteins.

**Conclusion.** Determination of sTfR may be useful to assess iron status in the second half of pregnancy. This may especially apply to conditions at which ferritin levels are questionable, such as during inflammation.