

## PRIMJENA RADIOAKTIVNOG KROMA (51 Cr) PRI ODREĐIVANJU DUŽINE ŽIVOTA ERITROCITA

S. M. LEWIS, I. ŠIMONVIĆ i A. MENIGA

*Department of Haematology Postgraduate Medical School, London,  
Interna klinika Medicinskog Fakulteta u Zagrebu i Zavod za fizikalnu biokemiju  
Škole narodnog zdravlja »A. Štampar«, Medicinskog Fakulteta u Zagrebu*

(Primljeno 3. XII. 1958.)

Proučavanje dužine života eritrocita pojednostavnjeno je upotrebom radioaktivnog kroma, a njegovom primjenom u mogućnosti smo pratiti ponašanje bolesnikovih eritrocita nakon autotransfuzije, kao i ponašanje eritrocita davaoca u bolesniku. Opisane su metode tih istraživanja i raspravljena su tumačenja za različne tipove krivulja. Prikazani su primjeri krivulja dužina života eritrocita kod različitih oblika hemolitskih anemija. Eritrociti, koji su označeni radioaktivnim kromom, mogu se također upotrebiti za određivanje mjesta raspada eritrocita *in vivo*, a taj test može biti od naročite koristi za splenektomiju.

Određivanje dužine života eritrocita važno je za proučavanje i dijagnostiku hemolitskih procesa. Otprilike stotinu godina nastoje se eksperimentima na ljudima i životinjama pronaći najprikladnije metode.

Prijašnji tehnički postupci sastojali su se u određivanju brzine regeneracije eritrocita poslije gastrointestinalnih krvarenja kod čovjeka ili eksperimentalnih krvarenja kod životinja. Ashby (1) je primijenio metodu diferencijalne aglutinacije eritrocita i tako omogućio znatan napredak.

Primjena radioaktivnih izotopa najznačajnije je dostignuće na tom području. God. 1953. Ebaugh, Emerson i Ross (2) primijenili su za označavanje eritrocita natrijev kromat, koji je sadržavao Cr<sup>51</sup>. Ta je metoda naročito korisna, jer se njome mogu pratiti i eritrociti bolesnika u njegovu vlastitom organizmu i eritrociti davaoca u bolesniku. Tu su metodu kasnije tehnički dotjerali Mollison i Veall (3). Radioaktivni krom je najprikladniji za taj postupak. Visoka specifična aktivnost postizava se Szilard-Chalmersovom reakcijom. Krom se primjenjuje u šestorovaljanom obliku kao natrijev kromat (Na<sub>2</sub>Cr<sup>51</sup>Q<sub>4</sub>) otopljen u fiziološkoj otopini kuhinjske soli (sa pH = 7,0). Zbog visoke specifične aktivnosti dovoljna je za označavanje eritrocita vrlo mala količina kro-

ma. Donohue (4) je primijenio za označavanje eritrocita različite koncentracije kroma. S koncentracijama između 0,6–20  $\mu\text{g/ml}$  eritrocita dobio je konsistentne rezultate u proučavanju dužine života eritrocita. Doze od 50  $\mu\text{g}$  pokazale su se izrazito neprikladne zbog znatno bržeg nestajanja kroma iz cirkulacije. Poželjno je, da se eritrociti označavaju s manje od 10  $\mu\text{g}$  kroma na mililitar eritrocita.

Radioaktivni krom ulazi u eritrocite kao šestorovaljani anion, čvrsto se veže za hemoglobin i vjerojatno prelazi u trovaljani kation (5). Kad se eritrocit raspadne, oslobađa se trovaljani kation kroma. On je relativno netopljiv pri pH krvi i lako stvara koloidne komplekse (6). To je vjerojatno razlog, da trovaljani krom ne ulazi ponovo u druge eritrocite, nego se odlaže u retikuloendotelnom sistemu. Odatle se vrlo sporo izlučuje urinom.

Da bi se krom vezao na hemoglobin, treba da bude dovoljno dugo u kontaktu s eritrocitima in vitro. Taj se proces dosta brzo odvija pri sobnoj temperaturi. Označavanje eritrocita kromom je uspješnije, ako se kao antikoagulans upotrebi A. C. D.\* mjesto heparina.

Radioaktivni krom ima poluvrijeme raspadanja od 27,8 dana. Raspadanje se sastoji u hvatanju elektrona iz »K« elektronske ljuske. Tom reakcijom atom kroma prelazi u atom vanadija, uz emisiju X-zraka energije 4,37 i u 8% dezintegracija, gama zrake energije 4,37 KeV-a i u 8% dezintegracija, gama zrake energije 0,32 MeV-a.

#### TEHNICKI POSTUPAK

U epruvetu, koja sadržava 5 ml sterilnog A. C. D. antikoagulansa, dodaje se 15 ml krvi. Nakon centrifugiranja ukloni se plazma. Sedimentiranim stanicama doda se 50–100  $\mu\text{c}$  natrijeva kromata i uzorak se brzo i pažljivo promiješa. To je važno, jer svi eritrociti treba da budu jednomojno izloženi kromu. Nakon miješanja uzorak se ostavi otprilike 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Stanice se isperu dva do tri puta sterilnom fiziološkom otopinom natrijeva klorida. Nakon posljednjeg ispiranja i centrifugiranja razrijede se sedimentirani eritrociti s fiziološkom otopinom na volumen od otprilike 25 ml. Od tog se volumena navuče u posebno baždarenu špricu točno 20 ml. To se lako postigne i uz uvjete sterilnog postupka primjenom svinute igle u obliku slova »U« (7). Čitav sadržaj šprice uštrca se bolesniku intravenozno. Dio ostatka krvi razrijedi se vodom u odnosu 1 : 100 i upotrebi kao standard za određivanje volumena krvi. Dva puta, nakon 10 i 20 minuta, izvadi se bolesniku oko 5 ml krvi uz dodatak antikoagulansa. Idući se uzorak krvi izvadi nakon 24 sata, a zatim u odgovarajućim intervalima, koji zavise od brzine razaranja eritrocita u cirkulaciji. Da bi se postigli što povoljniji geometrijski uvjeti za mjerenje radioaktivnosti, izvađeni se uzorci krvi hemoliziraju dodatkom saponina.

\* (citrična kiselina, natrijev citrat i dekstroza).

Najprikladniji i najosjetljiviji način mjerenja radioaktivnosti  $\text{Cr}^{51}$  je mjerenje gama zračenja u scintilacionom brojaču. »Well« oblik brojača s kristalom natrijeva jodida ima mnogo prednosti.

Semipermanentni solidni standard može se lako prirediti dodatkom  $\text{Cr}^{51}$  u tri ml otopljenog agara. Nakon miješanja otopina se skruti. Ako se standard priredi sa  $0,5 \mu\text{c}$  kroma, dat će otprilike 50.000 impulsa na minutu i može se upotrebljavati više mjeseci.

#### IZRAČUNAVANJE DUŽINE ŽIVOTA ERITROCITA

Izračunavanje se vrši uz pretpostavku, da su označeni eritrociti jednomojerno izmiješani s ostalim eritrocitima u cirkulaciji i da je brzina opadanja radioaktivnosti proporcionalna brzini razgradnje eritrocita.

Obično se primjenjuje ovaj izraz:

$$\left( \text{Preostala aktivnost (\%)} \right)_{\text{Cr}^{51} \text{ na dan »t«}} = \frac{N \text{ dana »t«}}{N \text{ dana »0«}} \times \frac{N \text{ standarda izmjereno na dan »0«}}{N \text{ standarda izmjereno na dan »t«}} \times 100$$

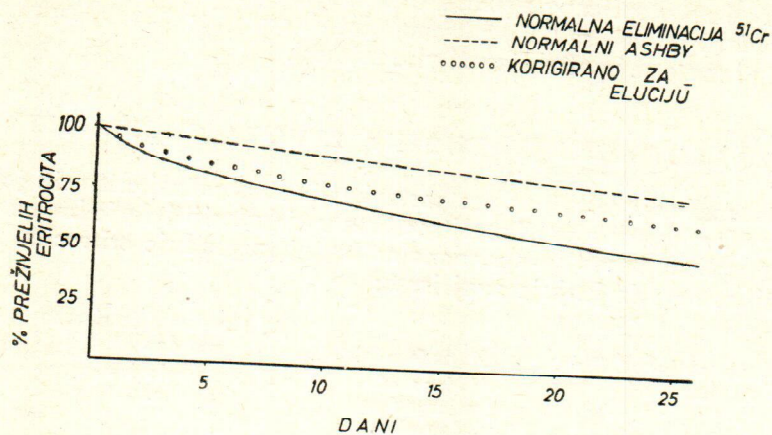
$N$  = broj impulsa u minuti  
 »t« = vrijeme iskazano u danima  
 »0« = početno vrijeme.

Razumije se, da se kao standard može upotrebiti uzorak krvi izvađen na dan »0«, ili sve uzorke treba mjeriti u isto vrijeme, t. j. oko 26 dana od početka pokusa. Prvi postupak sadržava pogrešku čestog pipetiranja i eventualnog onečišćenja uzorka. Drugim postupkom ne dobiva se uvid u rezultate sve do kraja pokusa.

#### OCJENA TRAJANJA ŽIVOTA ERITROCITA

Ako Ashbyjeve rezultate dužine života eritrocita prikažemo grafički, dobijemo pravac, koji siječe apscisu nakon 110–120 dana. Vremenski tok pada radioaktivnosti kroma u krvi je međutim krivulja (3). To pokazuje, da radioaktivnost uzorka krvi nakon određenog vremena (iskazana u procentima) nije direktno proporcionalna s dužinom života eritrocita. Ta razlika nastaje zbog elucije kroma iz eritrocita. Iako se rezultati korigiraju s obzirom na eluciju, pad aktivnosti još uvijek nije linearan. Razlika je najveća u početku (Slika 1.). Taj se nerazmjer pokušava protumačiti mehaničkim oštećenjem eritrocita pri označavanju kromom, toksičnim djelovanjem kroma na eritrocite, tendencijom kroma da obilnije prodire u starije eritrocite ili tako da elucija nije konstantna (4,8).

Od upotrebjene količine kroma polovica nestane iz cirkulacije nakon  $26 \pm 2$  dana. Ta je brojka prilično konstantna kod normalnih ljudi. Vjerojatno je to najbolji indeks brzine raspadanja eritrocita, jer ne



Sl. 1

zavisi od korekcionih faktora. No taj jednostavni indeks ima i nedostataka. On sam ne može pokazati oblik krivulje života eritrocita. Zato treba korigirati rezultate s obzirom na eluirani krom.

#### KOREKCIJE ZA ELUCIJU

Krom se eluira iz eritrocita prilično jednomjerno. Polovica početne količine ( $T^{1/2}$ ) izluči se nakon otprilike 70 (64–77) dana (2,8). Ako se na pr.  $T^{1/2} = 64$  dana ubilježi na semilogaritamskom papiru kao 50% elucije, onda se mogu sve ostale vrijednosti u međuvremenu očitati iz grafikona. Prema tome se može korigirati procent preostalog kroma u cirkulaciji za bilo koji dan ovom formulom:

$$\% \text{ preživjelih eritrocita} = \frac{\text{izmjereni \% kroma u cirkulaciji}}{100} \times \frac{100}{\text{očekivani preostali \% kroma (očitani iz grafikona)}}$$

Ta se metoda korekcije može primijeniti, ako se eritrociti razaraju brzo. Kod sporijeg ili normalnog razaranja dobiveni se rezultati preračunavaju empiričkom formulom prema Ashbyjevim rezultatima:

$$\frac{\% \text{ preživjelih eritrocita na dan } t}{\% \text{ izmjereni } Cr^{51} \text{ na dan } t} \times \frac{\text{normalna dužina života eritrocita prema Ashbeyu na dan } t}{\text{normalno } Cr^{51} \text{ preživljavanje na dan } t}$$

Ashbyjev procent preživjelih eritrocita može se izračunati za određeni dan (t) prema ovoj formuli:  $\frac{110 - t}{100} \times 100$ . Normalne vrijednosti za procent preživjelih eritrocita izračunane iz mjerenja pomoću  $Cr^{51}$  dali su Mollison i Veall (3).

#### KOREKCIJE ZA RANU ELUCIJU KROMA

U prvim je satima eliminacija  $Cr^{51}$  znatno brža. To bi ukazivalo na znatno brže razaranje eritrocita, nego što se doista dešava. Ta se pogreška metode može grafički ispraviti ekstrapoliranjem linearnog dijela krivulje do vrijednosti 100% s time, da ta nova točka postaje vrijeme 0. Dosljedno tome treba prilagoditi vrijeme na apscisi.

#### KOREKCIJA ZA PROMJENE VOLUMENA KRVI

Promjene volumena krvi za vrijeme pokusa obično su neznatne, pa se najčešće ta korekcija ne primjenjuje. Ako se radi o bolestima, gdje su moguće veće oscilacije volumena krvi, treba primijeniti korekciju. Za promjene u prvim danima približna se korekcija može postići samim hematokritom:

$$\frac{\% \text{ preživjelih eritrocita na dan } t}{\% \text{ hematokrit na dan } t} \times \frac{\text{hematokrit na dan } 0}{\text{hematokrit na dan } t}$$

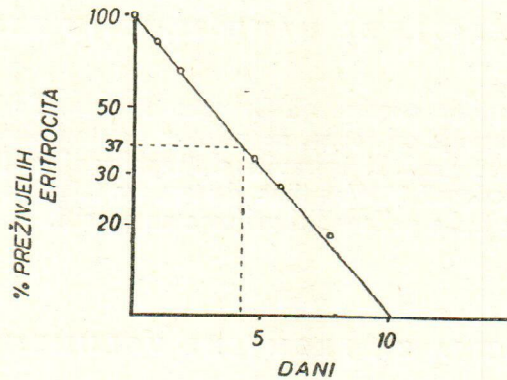
#### OBLICI KRIVULJE DUŽINE ŽIVOTA ERITROCITA

Oblici krivulje života eritrocita zavise od brzine i promjena brzine razaranja eritrocita. Ako se radi o populaciji normalnih eritrocita, krivulja će biti vrlo slična pravcu. Ekstrapolacijom krivulje do apscise dobiva se srednje trajanje života eritrocita od 110–120 dana.

## SLUČAJNO RAZARANJE ERITROCITA

(»random destruction«)

Pod slučajnim (engleski: random) razaranjem eritrocita razumijevamo proces, pri kojem svaki eritrocit ima jednaku vjerojatnost, da će se raspasti u nekom određenom vremenu. Taj se proces događa bez obzira na starost stanica. Uzrok je obično hemolizin, koji može u određeno vrijeme razoriti samo određeni broj stanica, ili sekvestracija eritrocita, na koje su vezana antitijela. Krivulja je u tom slučaju eksponencijalna pa na semilogaritamskom papiru daje pravac. Srednje trajanje života eritrocita može se očitati na apscisi, ako se na nju spusti okomica iz točke



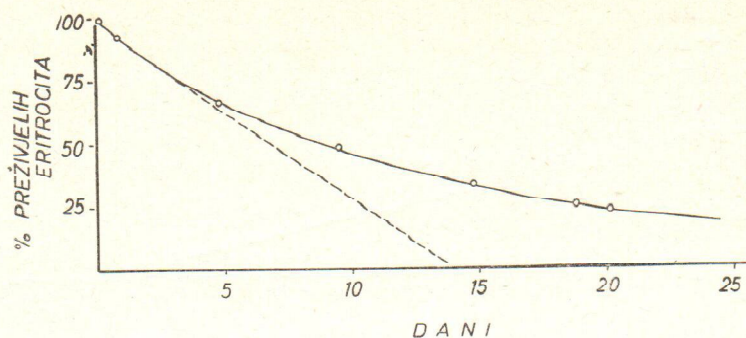
Sl. 2

na krivulji, koja predstavlja 37% preživjelih eritrocita (9) (slika 2). Takve se krivulje dobivaju kod stečenih hemolitskih anemija s antitijelima.

## MANJE VRIJEDNI ERITROCITI

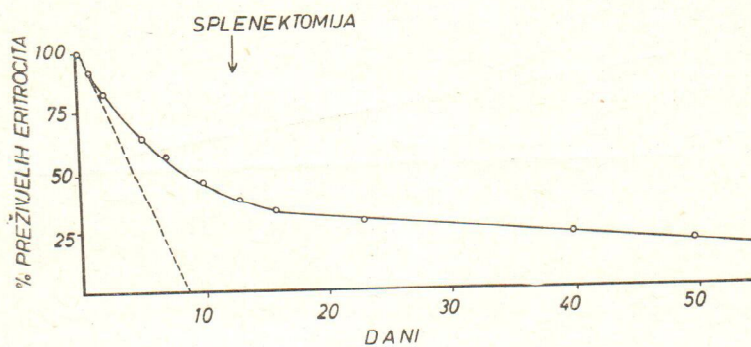
Kod nekih se hemolitskih anemija stvaraju manje vrijedni eritrociti, koji imaju skraćeni život. Ovdje se razaranje odvija na isti način kao i kod normalnih osoba, ali do njega dolazi ranije. To se događa kod hereditarne sferocitoze i eliptocitoze, a eventualno i zbog trajnog djelovanja nekog toksina u krvi.

Krivulja se prikazuje na aritmetičkom papiru. Srednje trajanje života eritrocita dobiva se ekstrapolacijom početnog dijela krivulje na apscisu (slika 3).



Sl. 3

Na slici 4 prikazan je utjecaj splenektomije na dužinu života eritrocita kod bolesnika s hereditarnom sferocitozom. Jasno se vidi, da je razaranje eritrocita nakon operacije znatno sporije.

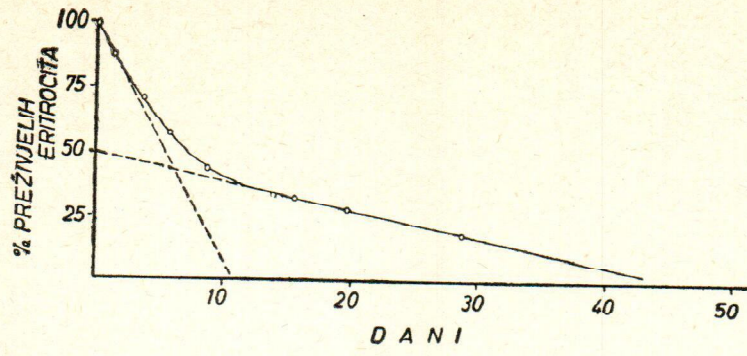


Sl. 4

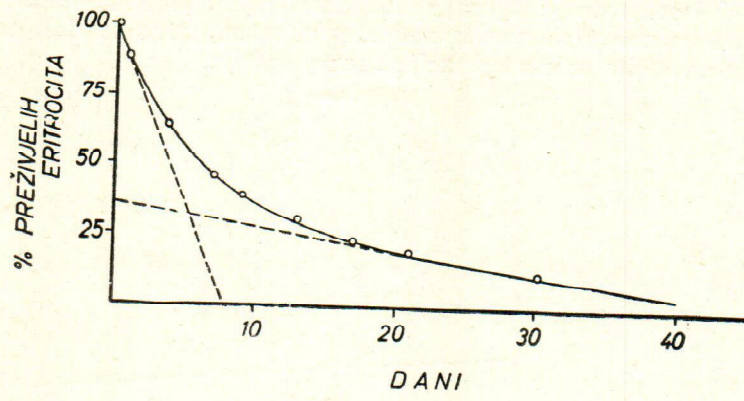
#### DVOSTRUKA POPULACIJA ERITROCITA

Dvije populacije eritrocita, s različitom dužinom života, mogu se naći kod paroksizmalne noćne hemoglobinurije (slika 5), srpaste anemije (slika 6) i kratko vrijeme nakon transfuzije krvi.

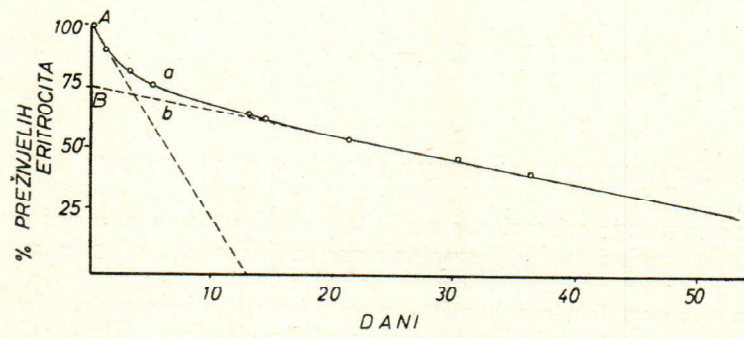
Dvostruka populacija eritrocita, za razliku od jednostruke, odrazit će se u krivulji sa znatno dužim i širim završnim dijelom (slika 7). Produženjem linearnog dijela krivulje do ordinate pokazat će se proporcije



Sl. 5



Sl. 6



Sl. 7



pojedinih populacija. Srednje trajanje života stanica s dužim životom očitava se na mjestu, gdje krivulja siječe apscisu. Prvi se dio krivulje sastoji od primjesa obiju populacija. Da se odijeli populacija s kraćim životom, koja predstavlja samo AB komponentu ordinate (slika 7), moraju se izračunati podaci za pojedine točke krivulje u vremenu »t« pomoću formule:

$$\frac{\% \text{ život populacije}}{\text{s kraćim trajanjem u vremenu »t«}} = \frac{\overline{ab}}{\overline{AB}} \times 100 \quad (\text{slika 7})$$

Efektivna srednja dužina života eritrocita može se izračunati idućim izrazom:

$$\frac{100}{\frac{\% \text{ populacija A}}{\text{srednja dužina života populacije A}} + \frac{\% \text{ populacija B}}{\text{srednja dužina života populacije B}}}$$

#### POVRŠINSKO BROJENJE

Mjerenjem aktivnosti na površini tijela s osjetljivim scintilacionim brojačem može se odrediti mjesto, gdje se razaraju eritrociti označeni sa Cr<sup>51</sup> (10, 11, 12). Eritrociti se označuju sa Cr<sup>51</sup> na isti način, kao što je prije opisano. Prvo se mjerenje vrši 30 minuta nakon uštrcavanja označenih eritrocita, a zatim svaki drugi dan. Tom se metodom lako otkriva uloga slezene kod različitih hemolitskih procesa. Prema tome će rezultat takvog ispitivanja indicirati ili kontraindicirati splenektomiju.

Određivanje dužine života eritrocita važno je u kliničkoj i eksperimentalnoj medicini. Važnost te metode najviše dolazi do izražaja u dijagnostici i proučavanju hemolitskih procesa. Metoda, u kojoj se eritrociti označavaju radioaktivnim kromom, ima nekoliko prednosti: Ona je tehnički jednostavna, a omogućava interpretaciju i zamršenijih procesa. Pritom je važno istaknuti, da se tom metodom mogu promatrati eritrociti davaoca u njegovoj vlastitoj cirkulaciji i u cirkulaciji druge osobe. Malom modifikacijom metode za određivanje trajanja života eritrocita može se odrediti i mjesto razaranja eritrocita.

#### Literatura

1. Ashby, W.: J. exp. Med., 29 (1919) 267.
2. Ebaugh, F. G., Emerson, C. P. and Ross, J. F.: J. clin. Invest., 32 (1953) 1260.
3. Mollison, P. L. and Veall, N.: Brit. J. Haemat., 1 (1955) 62.
4. Donohue, D. M., Motulsky, A. G., Giblett, E. R., Pirzio-Biroli, G., Viranuwatti, V. and Finch, C. A.: Brit. J. Haemat., 1 (1956) 249.
5. Gray, S. J. and Sterling, K.: J. clin. Invest., 29 (1950) 1604.
6. Visek, W. J., Whitney, I. B., Kuhn, U. S. G. and Comar, C. L.: Proc. Soc. exp. Biol., 84 (1953) 610.

7. Lewis, S. M.: *Lancet*, 1 (1958) 105.
8. Hughes Jones, N. C. and Mollison, P. L.: *Clin. Sci.*, 15 (1956) 207.
9. Mollison, P. L.: »Blood Transfusion in Clinical Medicine« 2nd Ed., Blackwell, Oxford, 1956.
10. Jandl, J. H., Greenberg, M. S., Yonemoto, R. H. and Castle, W. B.: *J. clin. Invest.*, 35 (1956) 842.
11. Korst, D. R., Clatanoff, D. V. and Schilling, R. F.: *Clin. Res. Proc.*, 3 (1955) 195.
12. Hughes Jones, N. C. and Szur, L.: *Brit. J. Haemat.*, 3 (1957) 320.

*Summary*

THE USE OF RADIOACTIVE CHROMIUM ( $\text{Cr}^{51}$ ) IN THE  
DETERMINATION OF RED CELL SURVIVAL.

By usage of radioactive chromium, the labelling of erythrocytes for the study of cell survival has been simplified and it is possible to study the behaviour of a patient's own cells after auto transfusion as well as the behaviour of donor cells in the patient. The methods for these investigations are described and the interpretation of different types of curves are discussed.

Examples are given of the survival pattern in various forms of haemolytic anaemia. Chromium labelled-erythrocytes can also be used for the estimation of the assessment of sites of destruction of erythrocytes *in vivo*. This latter test is of especial use in determining the value of splenectomy in controlling haemolysis.

*Department of Haematology, Postgraduate Medical School,*

*London*

*Department of Medicine, Medical Faculty, University of Zagreb*

*Zagreb*

*Department of Physical Biochemistry*  
*»A. Stampar« School of Public Health*  
*Medical Faculty, University of Zagreb*  
*Zagreb*