

## ÜBER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN GLYKOGENGEHALT UND RETRAKTIONSVERMÖGEN VON BLUTPLÄTTCHEN

ELLEN WEBER, WOLFGANG LITTMANN und ROSINA FREITAG

Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg\*

(Received 27 August 1962; accepted 12 October 1962)

**Abstract**—Swine thrombocytes were found to contain on average  $2.38 \pm 0.08$  per cent glycogen ( $n = 36$ ) calculated on the dry mass. Incubation of blood platelets in 0.9% NaCl at 37°C for 2 hr gave 20 per cent of the initial value for glycogen irrespective of whether a phosphate or bicarbonate buffer was used or whether EDTA or sodium citrate served as anticoagulant. In plasma and saline containing glucose the breakdown rate was retarded, here again independent of the buffer system used. About 15 per cent of the initial glycogen content was lost on incubating the platelets in plasma or NaCl solution at 0°C for 6 hr. Sodium fluoride ( $10^{-3}$  M) inhibited glycogen breakdown while 2:4 DNP had no effect.

Parallel measurements of the clot retraction of the incubated thrombocytes and glycogen content showed a high glycogen content gave good retraction and a low one poor retraction. The correlation coefficient calculated as  $r = 0.74$  is the expression linking both sets of values ( $p < 0.001$ ).

DAS Vorkommen von Glykogen in Thrombocyten war bis vor kurzem umstritten. Einerseits verliefen Versuche es aufzufinden ergebnislos,<sup>1, 2</sup> andererseits wurde es mehrfach auf histochemischem Weg nachgewiesen.<sup>3–7</sup> Die ersten quantitativen Daten legten Löhr *et al.*<sup>8</sup> für menschliche Blutplättchen vor. Woodside und Kocholaty<sup>9</sup> differenzierten 1960 die Kohlenhydrate in Menschen- und Rinderthrombocyten und zeigten, dass die Hälfte der Gesamtkohlenhydrate dieser Zellart aus Glykogen besteht. Übereinstimmend stellten die vorgenannten Autoren einen Glykogengehalt fest, der dem der Skelettmuskulatur entspricht.

Es sind in der Literatur überzeugende Hinweise dafür vorhanden, dass Glucoseabbau in den Plättchen und Retraction des Gerinnsels eng miteinander verknüpft sind.<sup>8, 10–13</sup> Bei diesem Vorgang wurde ein erhöhter Glucoseverbrauch bei gleichzeitiger Anhäufung von Milchsäure und ein signifikanter Abfall der ATP-Werte neben Anstieg des anorganischen Phosphates übereinstimmend beschrieben. Auf Grund dieser Kenntnisse und in Anbetracht der hohen stationären Konzentration schien es wünschenswert, das Hauptreservoir des Kohlenhydratstoffwechsels einer genauen Analyse zu unterziehen.

Ein weiterer Ansatzpunkt dieser Arbeit steht im Zusammenhang mit Problemen der Plättchen-Konservierung für Transfusionszwecke. Diese neuerdings in der Klinik eingeführte therapeutische Massnahme, z.B. bei Haemorrhagien thrombocytopenischer Patienten, erfordert die Bereitstellung sog. "intakter" Thrombocyten.

\* Direktor: Prof. Dr. O. Eichler.

Nach Untersuchungen von Racugglia und Bethell<sup>14</sup> darf die Aufbewahrungszeit nach der Blutentnahme maximal 24 Stunden, nach Ergebnissen von Baldini *et al.*<sup>15</sup> sogar höchstens 3 Stunden betragen, wenn ein haemostatischer Effekt erreicht werden soll.

Systematische Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit der für die Erhaltung der Integrität der Blutplättchen verantwortlichen Faktoren unter in vitro-Bedingungen und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Thrombocyten-Konservierung fehlen weitgehend.

## METHODIK

### 1. Blutgewinnung und Isolierung von Thrombocyten

Blut von Schweinen wurde beim Abstechen der Tiere im Schlachthof in silikonierten 1 l. Glasgefäßen aufgefangen, die 100 ml einer 1.7% Titriplex III-Lösung\* mit 0.9% NaCl-enthielten. Durch Differentialzentrifugation der Blutmischung in einer Kühlzentrifuge bei +4° (5 Min mit  $2200 \times g$  zur Gewinnung des thrombocytenhaltigen Plasmas, 20 Min mit  $4600 \times g$  zum Absetzen der Plättchen aus dem Plasma) wurden die Thrombocyten isoliert und anschliessend in dem zu prüfenden Medium gewaschen. Die Hauptmenge dieser Plättchen wurde darin suspendiert und nach Ablauf der Inkubationszeit ein weiteres Mal abgesetzt. Ein kleiner Teil der Zellen wurde ohne Inkubation sofort anschliessend ein zweites Mal gewaschen. Die von diesen Thrombocyten ermittelten Werte wurden als Glykogengehalt der frischen Blutplättchen angesehen.

Alle Inkubationsmedien enthielten Titriplex III: den Elektrolytlösungen wurde jeweils 1 mg Titriplex/ml zugesetzt, in dem Plasma befand sich die anfangs zur Verhütung der Blutgerinnung zugegebene Titriplexmenge. Eine Ausnahme bildeten lediglich die im Ergebnisteil unter Ziffer 1b zitierten, mit Na-Citrat als Antikoagulans durchgeführten Versuche. In diesem Fall wurde der NaCl-Lösung bei der Inkubation kein Titriplex zugefügt.

Die geschilderten Arbeitsgänge erfolgten alle unter ständiger Kühlung auf Eisbadtemperatur.

### 2. Glykogenbestimmung

(a) *Im trichloressigsäuren Extrakt nach van der Vies*<sup>16</sup>. Von der abzentrifugierten, feuchten Thrombocytenmasse wurde etwa ein Gramm zu 4 ml 5% TCE† eingewogen und in einem Teflonhomogenisator extrahiert. Der Rückstand wurde einer dreimaligen Nachextraktion mit je 3 ml 5% TCE unterworfen. Die Überstände wurden gesammelt und mit TCE auf 20 ml aufgefüllt. Je 2 ml dieses Extraktes dienten zur Glykogenbestimmung nach der Methode von v.d. Vies.<sup>16</sup>

(b) *Im KOH-Extrakt nach Fong et al.*<sup>17</sup> Die isolierten Thrombocyten wurden über Nacht in einem Trockenschrank bei 105° getrocknet. In 1–3 mg der Trockenmasse erfolgte die Bestimmung des Glykogengehaltes nach Fong *et al.*<sup>17</sup> Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung vorgenommen und der Mittelwert errechnet.

In beiden der angewandten Methoden diente Anthron zur kolorimetrischen Erfassung des Glykogens. Nur bei dem Vorgehen nach Fong *et al.*<sup>17</sup> war dieser Messung eine Fällung des Glykogens mit Alkohol vorgeschaltet.

\* Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure; Fa. Merck, Darmstadt.

† Trichloressigsäure.

### 3. Bestimmung der Gerinnsel-Retraktion nach MacFarlane<sup>18</sup>

In ein ausgeglühtes Röhrchen wurden etwa 20 mg feuchte Thrombocytenmasse in plättchenfreies Plasma des gleichen Tieres eingewogen und 2 ml einer 0.024 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugegeben. Auffüllung mit Plasma auf 10 ml und gute Durchmischung des Inhaltes. Als Verschluss des Röhrchens diente ein Gummistopfen. Dieser war mit einem Draht durchbohrt, dessen Ende zur Abscheidung des Koagulums als Öse ausgebildet war. Nach  $1\frac{1}{2}$  h Inkubationszeit in einem Brutschrank bei 37°C wurde der Gummistopfen mit Draht und anhaftendem Gerinnsel von dem Röhrchen entfernt und die Menge des Serumrückstandes als Mass des Retraktionsvermögens gewertet.

## ERGEBNISSE

### 1. Der Glykogengehalt in Schweinethrombocyten unter verschiedenen Bedingungen

(a) *Der Glykogengehalt frisch isolierter Thrombocyten.* Der durchschnittliche Glykogengehalt frisch isolierter, zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschener Schweinethrombocyten betrug bei 36 Tieren  $2.38 \pm 0.08\%$  bezogen auf das Trockengewicht der Plättchen. Der höchste gemessene Wert wurde mit 3.49% bestimmt, der kleinste mit 1.26%. Bei den 36 Schweinen lag der Glykogenbestand von 15 Tieren zwischen 2.40% und 3.00%, bei 15 weiteren zwischen 1.80 und 2.40%.

Nach Roe *et al.*<sup>19</sup> extrahiert KOH aus Gewebe auch Substanzen, die mit Alkohol fällbar und wasserlöslich sind, anthronpositiv reagieren, sich von Glykogen aber durch ihre Dialysierbarkeit unterscheiden. Entsprechende Prüfung der Aussenflüssigkeit nach Dialyse von Glykogen, welches wir durch KOH-Extraktion aus Thrombocyten gewonnen hatten, ergab 1.87% anthronpositive Substanzen. Eine ins Gewicht fallende Beeinflussung unserer Versuchsergebnisse kommt demnach nicht in Betracht.

Die gemessenen Glykogenwerte liegen nach unsereren Erfahrungen mit bei 0 °C inkubierten Thrombocyten (s.u.) um maximal 20% unter den *in vivo* vorkommenden. Dies entspricht dem Anteil, mit dessen Verlust man während der Aufarbeitung der Thrombocyten rechnen muss. Von der Blutgewinnung bis zur Blockierung der enzymatischen Reaktionen vergingen höchstens 6 Stunden.

Auch Woodside und Kocholaty<sup>9</sup> haben eine grosse Streubreite im Glykogengehalt von Menschen- und Rinderplättchen gesehen, wenn die Dauer der Thrombocyten-isolierung variierte.

Mit Hilfe des bei 33 Tieren bestimmten mittleren Trockengewichtes der Thrombocyten von  $12 \pm 0.23\%$  lässt sich der Anteil von Glykogen an der feuchten Plättchenmasse zu 0.29% berechnen. Da 1 g feuchte bzw. 120 mg trockene Thrombocytenmasse rund  $3.6 \times 10^{10}$  Zellen enthielt, sind in  $10^{10}$  Plättchen 0.81 mg Glykogen vorhanden.

Wurde die Extraktion der Plättchen mit TCE vorgenommen, so ergab sich bei 30 Schweinen ein mittlerer Glykogengehalt von  $2.10 \pm 0.11\%$  der Trockenmasse.

(b) *Das Verhalten des Glykogenbestandes in Plättchen bei Suspension in Elektrolytlösungen.* In Thrombocyten, die bei 37 °C in gepufferter, physiologischer NaCl-Lösung von pH 7.4 inkubiert wurden, kam es innerhalb der ersten beiden Stunden zu einem raschen Glykogenzerfall, dem eine Phase mit verminderter Abbauges-

schwindigkeit folgte. Aus Fig. 1 geht hervor, dass es dabei gleichgültig ist, ob ein Puffersystem mit Phosphat (—●—●—) oder mit Bikarbonat (—□—□—) verwendet wird. Eine deutliche Verzögerung erfuhr der Glykogenabbau in ungepufferter Kochsalzlösung von pH 5 (—○—○—). Ohne Bedeutung für den Glykogengehalt blieb der Zusatz von Titriplex III (—○—○—).

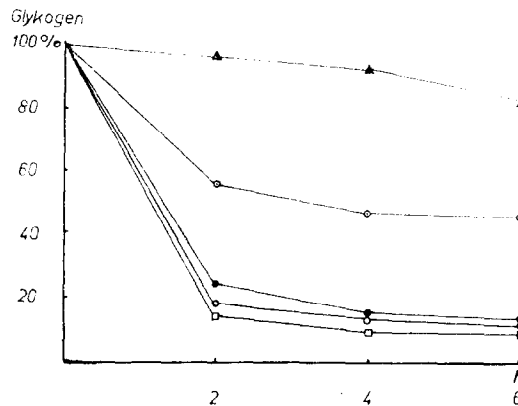


FIG. 1. Das Verhalten des Glykogenspiegels in Schweinethrombocyten während der Inkubation bei 0 °C in Plasma oder 0.9% NaCl-Lösung (—▲—▲—) bzw. bei 37 °C in 0.9% NaCl-Lösung (—○—○—), in 0.9% NaCl-Lösung von pH 7.4 (mit Phosphatpuffer —●—●—, mit Bikarbonatpuffer —□—□—) oder in 0.9% NaCl-Lösung von pH 7.4, die im Gegensatz zu den anderen Medien kein Titriplex III enthielt (—○—○—). Die Glykogenkonzentrationen sind auf der Ordinate in Prozenten der Ausgangswerte aufgetragen. Diese entsprechen dem Glykogengehalt der Plättchen zu Inkubationsbeginn (100%). Angegeben sind jeweils die Durchschnittswerte mehrerer Experimente; Anzahl der untersuchten Tiere siehe Tabelle 1 oder 2.

Das Blut von drei Tieren wurde ohne Titriplex III aufgearbeitet, indem wir als Antikoagulans Na-Citrat (3.8%: Verdünnung mit Blut 1:5) wählten. Auch dem phosphatgepufferten Inkubationsmedium wurde im Gegensatz zu sonst kein Titriplex beigemischt.

Ein Verlust an das umgebende Milieu über eine Permeabilitätsänderung der Plättchenmembran ist für Glykogen sehr unwahrscheinlich. Zudem haben wir diese Möglichkeit für Thrombocyten in gepufferter Elektrolytlösung mit und ohne 2,4-DNP-Zusatz durch Prüfung des Überstandes der Inkubationsmedien auf Vorhandensein von Glykogen ausgeschlossen. Es liess sich in keinem Fall nachweisen, obwohl die Plättchen unter beiden Bedingungen die gleiche, hohe Abbauquote für Glykogen aufwiesen (s.u.).

Fig. 1 zeigt weiterhin, dass durch Eisbadtemperatur der Glykogenabbau wirksam verlangsamt wird (—▲—▲—). Nach 6 Stunden waren allerdings doch nahezu 20 Prozent des ursprünglichen Glykogengehaltes verloren gegangen. Daraus ergibt sich, dass die für die Isolierung der Plättchen beanspruchte Zeit auf ein Minimum beschränkt bleiben muss.

Zu einer merklichen Behinderung des Glykogenabfalles bei 37 °C führte die Vergiftung der Thrombocyten mit NaF ( $10^{-3}$  M) wie Fig. 2 (—▲—▲—) zeigt. Nach zwei Stunden waren noch 62.2% des Ausgangswertes an Glykogen nachweisbar, also nahezu das Dreifache der Kontrollansätze.

Dagegen blieb 2,4-DNP in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M ohne Einfluss auf die Zerfallsgeschwindigkeit des Glykogens. Ebenso wie in den unvergifteten Vergleichspräparaten waren hier nach 2 Stunden bereits rund 80 Prozent des ursprünglich vorhandenen Glykogens abgebaut (Fig. 2, —●—●—).

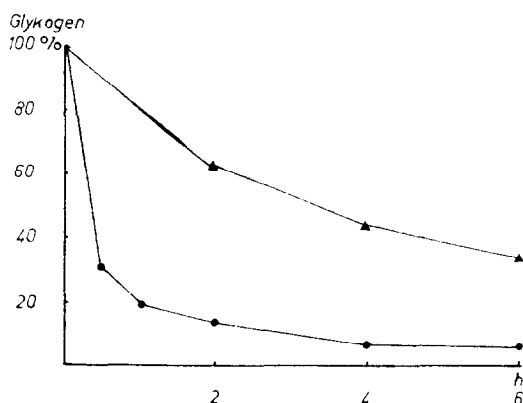


FIG. 2. Der Einfluss von NaF ( $10^{-3}$  M; —▲—▲—) und von 2,4-Dinitrophenol ( $10^{-3}$  M; —●—●—) auf den Glykogenabbau in Schweinethrombocyten, die bei 37 °C in 0.9% NaCl-Lösung von pH 7.4 (Phosphatpuffer) inkubiert waren. Zur Bezeichnung der Ordinate siehe Legende von Fig. 1. Ein-gezeichnet sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Experimenten; Anzahl der untersuchten Tiere siehe Tabelle 1 oder 2.

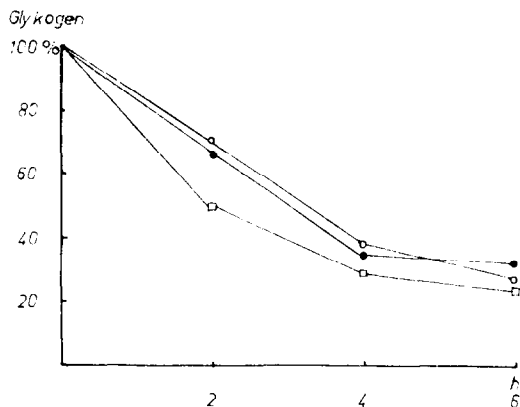


FIG. 3. Der Glykogenzerfall in Schweinethrombocyten nach Suspension der Zellen bei 37 °C in Plasma (—□—□—), oder in 0.9% NaCl-Lösung, welche 0.2% Glukose enthielt (pH 7.4; Phosphatpuffer —●—●—; Bikarbonatpuffer —○—○—). Zur Bezeichnung der Ordinate siehe Legende von Fig. 1. Jede Kurve gibt die gemittelten Werte mehrerer Experimente wieder; Anzahl der untersuchten Tiere siehe Tabelle 1 oder 2.

(c) *Das Verhalten von Glykogen in Blutplättchen bei Suspension in Plasma; Einfluss von Glucose.* Der Glykogengehalt von Thrombocyten, die bei 37 °C in Plasma inkubiert wurden, nahm innerhalb der ersten vier Stunden etwa linear ab (Fig. 3, —□—□—). Dieser langsamere Zerfall des Polysaccharides in Plättchen, welche in Plasma suspendiert waren gegenüber solchen, die in Elektrolytlösungen inkubiert wurden, konnte

durch den Glucosegehalt des Plasmas bedingt sein. Tatsächlich erreichten wir eine wesentliche Verlangsamung des Glykogenzerfalles, wenn wir der physiologischen NaCl-Lösung 200 mg Glucose/100 ml zusetzten wiederum ohne Beeinflussung durch die Art des angewandten Puffers (Fig. 3, —●—●— bzw. —○—○—). Der Abbau erfolgte jetzt über die ersten vier Stunden streng linear.

Inkubation der Blutplättchen bei 0 °C in Plasma ergab die gleiche Verlustquote für Glykogen wie bei Suspension in physiologischer Kochsalzlösung bei dieser Temperatur (Fig. 1, —▲—▲—).

## 2. Der Zusammenhang zwischen Plättchen-Glykogen und Retraktionsvermögen

In einem kleinen Teil der nach Inkubation abgesetzten Thrombocytenmasse wurde—parallel zur Glykogenbestimmung—das Retraktionsvermögen gemessen. Die für eine Versuchsanordnung und Inkubationszeit gemittelten Werte des Serumrückstandes sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die ausgepresste Serummenge

TABELLE 1. ÜBERSICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE VON RETRAKTIONSMESSUNGEN AN ZWEIMAL IM SUSPENSIONSMEDIUM GEWASCHENEN ODER BEI 37 °C MEHRERE STUNDEN INKUBIERTEN THROMBOCYTEN

(Alle Elektrolyt-Lösungen enthielten 0.1% Titriplex III, Plasma die bei der Blutgewinnung zugesetzte Titriplex-III-Menge. Die Werte in ml geben den mit einer modifizierten MacFarlane-Technik bestimmten Serumrückstand nach abgeschlossener Retraktion des Gerinnsels an, *n* bedeutet die Anzahl der untersuchten Tiere.)

Medium	<i>n</i>	Inkubationsdauer (Stunden)			
		0	2	4	6
		ml	ml	ml	ml
NaCl-Lösung 0.9%* (Phosphat-Puffer)	2	9.4	9.4	9.3	9.2
NaCl-Lösung 0.9% + 0.2% Glukose (Bikarbonat-Puffer)	3	8.9	8.4	8.5	7.9
NaCl-Lösung 0.9% + 0.2% Glukose (Phosphat Puffer)	3	9.1	9.1	7.5	4.6
NaCl-Lösung 0.9% (Phosphat-Puffer) kein Titriplex III	3	9.0	9.4	6.9	5.8
Plasma	4	8.5	8.1	6.5	6.3
NaCl-Lösung 0.9% (Bikarbonat-Puffer)	3	8.9	8.1	6.0	5.2
NaCl-Lösung 0.9% (Phosphat-Puffer)	2	9.1	7.0	3.0	3.0
NaCl-Lösung 0.9% (pH 5.0)	4	8.2	5.5	3.0	3.0
NaCl-Lösung 0.9% + NaF 10 <sup>-3</sup> M (Phosphat-Puffer)	3	9.3	6.4	5.3	4.7
NaCl-Lösung 0.9% + 2.4-DNP 10 <sup>-3</sup> M (Phosphat-Puffer)	3	9.3	3.9†	3.0	2.0

\* Die Inkubation erfolgte hier bei 0°C.

† Die Inkubationsdauer betrug in diesem Fall 30 Minuten, in den beiden folgenden Spalten 1 bzw. 2 Stunden.

schwankte für nicht inkubierte Blutplättchen, deren Behandlung sich nur in der Zusammensetzung der Waschflüssigkeit unterschied, zwischen 9·4 und 8·5 ml. Lediglich mit ungepufferter NaCl-Lösung gewaschene Thrombocyten lagen mit 8·2 ml geringfügig tiefer.

TABELLE 2. ZUSAMMENSTELLUNG DER PARALLEL DURCHFÜHRTEN RETRAKTIONSMESSUNGEN UND GLYKOGENBESTIMMUNGEN AN ZWEIMAL IM SUSPENSIONS-MEDIUM GEWASCHENEN ODER BEI 37 °C MEHRERE STUNDEN INKUBIERTEN THROMBOCYTEN

(Die Ergebnisse der Retraktionsmessungen aus Tabelle 1 (*R*) wurden in drei Gruppen eingestuft und folgendermassen gekennzeichnet: gute Retraktion +, mässige Retraktion +-, schlechte oder fehlende Retraktion 0. Die entsprechenden Serumrückstände betrugen in Gruppe I >8·4 ml, in Gruppe II 8·4–6·5 ml, und in Gruppe III <6·5 ml. Die Prozentwerte geben den Glykogengehalt der Plättchen als Anteil ihres Trockengewichtes bei Beginn der Retraktionsmessung an, *n* bedeutet die Anzahl der untersuchten Tiere. Über Titriplex-III-Zusätze s. Legende von Tabelle 1.)

Medium	<i>n</i>	Inkubationsdauer (Stunden)							
		0		2		4		6	
		<i>R</i>	%	<i>R</i>	%	<i>R</i>	%	<i>R</i>	%
NaCl-Lösung 0·9%* (Phosphat-Puffer)	2	+	2·83	+	2·66	+	2·48	+	2·35
NaCl-Lösung 0·9% + 0·2% Glukose (Bikarbonat-Puffer)	3	+-	2·30	+-	1·63	+-	0·89	—	0·61
NaCl-Lösung 0·9% + 0·2% Glukose (Phosphat-Puffer)	3	+	2·72	+	1·80	—	0·97	0	0·88
NaCl-Lösung 0·9% (Phosphat-Puffer) kein Titriplex III	3	+-	2·55	+-	0·51	—	0·39	0	0·34
Plasma	4	+-	1·94	—	0·90	—	0·40	0	0·28
NaCl-Lösung 0·9% (Bikarbonat-Puffer)	3	+	2·30	—	0·38	0	0·22	0	0·21
NaCl-Lösung 0·9% (Phosphat-Puffer)	2	+	1·61	—	0·41	0	0·27	0	0·22
NaCl-Lösung 0·9% (pH 5·0)	4	—	2·21	0	1·29	0	1·10	0	1·06
NaCl-Lösung 0·9% + NaF 10 <sup>-3</sup> M (Phosphat-Puffer)	3	+-	2·33	0	1·46	0	1·16	0	0·77
NaCl-Lösung 0·9% + 2·4-DNP 10 <sup>-3</sup> M (Phosphat-Puffer)	3	+	2·34	0	0·77†	0	0·46	0	0·40

\* Die Inkubation erfolgte hier bei 0°.

† Die Inkubationsdauer betrug in diesem Fall 30 Minuten, in den beiden folgenden Spalten 1 bzw. 2 Stunden.

Bei Betrachtung von Tabelle 1 fällt deutlich die verschiedene Beeinflussung des Retraktionsvermögens über mehrere Stunden in Abhängigkeit der angewandten Inkubationsbedingungen auf.

Stellt man nun Glykogengehalt und Retraktionsvermögen der Plättchen einander gegenüber wie es Tabelle 2 zeigt, so lassen sich die gesamten Ergebnisse trotz der

verschiedenen Versuchsbedingungen unter einem einheitlichen Gesichtspunkt zusammenfassen. Im allgemeinen ist eine gute Retraktion mit einem hohen Glykogengehalt und umgekehrt eine schlechte Retraktion mit einem kleinen Glykogenbestand gekoppelt.

Eine gewisse Ausnahme bildeten die in Kochsalz-Lösung von pH 5 inkubierten Plättchen. In diesem Milieu war der Glykogenzerfall zwar langsamer als bei physiologischen pH-Werten, aber die durch das schwach saure Medium gesetzte Schädigung der Retraktion scheint nicht voll reversibel zu sein. Bei mit NaF vergifteten Plättchen zeigte sich trotz verhältnismässig hoher Glykogenkonzentration erwartungsgemäss eine schlechte Retraktion wegen der Verwertungsstörung von Glucose, bedingt durch die blockierte Glykolyse. Nach 2,4-DPN-Zusatz war das Retraktionsvermögen bereits nach 30 Minuten aufgehoben.

Die Einteilung der Retraktionsergebnisse in drei Gruppen (s. Tabelle 2) entspricht dem Aspekt der Gerinnsel. Dieses machte bei Gruppe I nur einen Bruchteil des Gesamtvolumens aus und war bei Gruppe II noch deutlich retrahiert, während es bei Gruppe III ganz oder zum weit überwiegenden Teil das Gesamtvolumen ausfüllte.

Um uns Klarheit über das Ausmass der stochastischen Verbundenheit der beiden Grössen zu verschaffen, haben wir zunächst die unter vergleichbaren Bedingungen (phosphatgepufferte NaCl-Lösung) erzielten Resultate in ein Scatterdiagramm eingetragen (Fig. 4). Es wurden nur die Wertepaare aufgenommen, bei denen eine gute

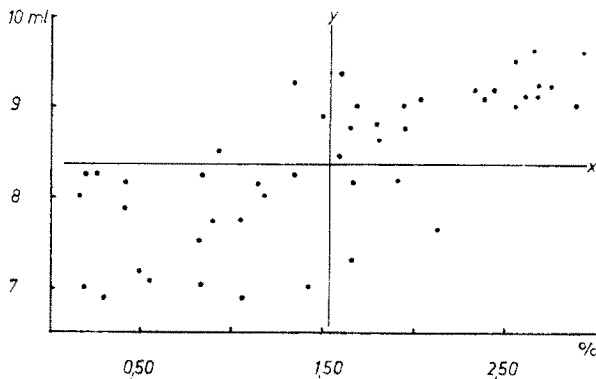


FIG. 4. Korrelation zwischen dem Glykogengehalt in Schweinethrombocyten (Angabe in Prozenten der trockenen Plättchenmasse) und dem als Ausdruck des Retraktionsvermögens dieser Zellen nach MacFarlane ermittelten Serumrückstand (ml). Die über der X-Achse eingezeichneten Punkte bedeuten eine gute, die unterhalb liegenden eine mässige Retraktion. Entsprechend stellen die Punkte, welche rechts der Y-Achse liegen einen hohen, die links davon aufgetragenen einen niedrigen Glykogengehalt dar.

oder mässige Retraktion vorlag, d.h. bis zu einem Serumrückstand von 6.5 ml, sodass kein strafferer Zusammenhang durch Erfassung von funktionsuntüchtigen Thrombocyten (fehlende Retraktion bei niedrigem Glykogengehalt) vorgetäuscht wird.

Die Verteilung der Punkte lässt sich eindeutig durch den Korrelationskoeffizienten beschreiben. Er wurde nach Doerffel<sup>20</sup> berechnet und zeigte den hohen Wert von



$r_1 = +0.74$ . Mit  $p_1 < 0.001$  erwies er sich bei den 47 Wertpaaren als hoch signifikant.

Der Korrelationskoeffizient wurde auch unter Einbeziehung aller Versuchsbedingungen—mit Ausnahme der Vergiftungsexperimente—bestimmt. Zwar betrug er jetzt nur noch  $r_2 = +0.62$ , aber die Signifikanz des Zusammenhanges war, bedingt durch die höhere Anzahl der Experimente (89 Wertepaare), praktisch die gleiche ( $p_2 < 0.001$ ;  $t_1 = 7.22$ ;  $t_2 = 7.36$ ).

#### DISKUSSION

Die bisher mitgeteilten Glykogenwerte von Blutplättchen im Vergleich zu den in anderen Organen ermittelten gibt Tabelle 3 wieder. Da sich einige Werte nicht auf das

TABELLE 3. ÜBERSICHT ÜBER DIE BISHER MITGETEILTEN QUANTITATIVEN GLYKOGENANALYSEN IN THROMBOCYTEN IM VERGLEICH ZUM GLYKOGENGEHALT ANDERER ZELLARTEN

Species	n*	Zellart	Glykogen % des Trockenge†	Extraktionsmittel	Literatur
Mensch	6	Thrombocyten	2.34 $\pm$ 0.17	KOH	Woodside und Kocholaty <sup>9</sup>
Rind	6	Thrombocyten	2.26 $\pm$ 0.36	KOH	
Mensch	6	Thrombocyten	2.42 $\pm$	?	Löhr <i>et al.</i> <sup>8</sup>
Schwein	36	Thrombocyten	2.38 $\pm$ 0.08	KOH	Diese Arbeit
Mensch	10	Leukocyten	2.12 $\pm$	KOH	Leikin <sup>22</sup>
Mensch	20	Lymphocyten	4.73 $\pm$	KOH	
Mensch	25	Leukocyten	6.17 $\pm$	KOH	Esmann <sup>21</sup>
Mensch		Skelettmuskel	2.0 -- 4.0	?	Lohmann und Ohlmeyer <sup>30</sup>
Ratte		Skelettmuskel	1.8	KOH	Bloom und Knowlton <sup>31</sup>
Mensch		Leber	4–28	KOH	Cremer und Fühner <sup>33</sup>

\* Anzahl der untersuchten Individuen

†  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes.

‡ Umgerechnet auf Trockengewicht nach Angaben von Woodside und Kocholaty<sup>3</sup>.

§ Umgerechnet auf Trockengewicht nach Angaben von Bird, Clements und Becker<sup>33</sup> und von Willstätter und Rohdewald<sup>34</sup>.

Trockengewicht des betreffenden Gewebes bezogen, wurden sie mit Hilfe von Literaturangaben umgerechnet. Soweit angegeben wurde die Art der Gewebsextraktion mit aufgeführt. Die Ergebnisse stellen sicher, dass entgegen früher geäußerten Ansichten<sup>1, 2</sup> Glykogen ein Bestandteil der Thrombocyten darstellt. Auffällig ist die nahezu vollständige Übereinstimmung für die drei geprüften Species, obwohl drei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen an den Analysen beteiligt waren. Aus der Tabelle geht weiterhin hervor, dass der Glykogenbestand in Thrombocyten bezogen auf das Trockengewicht dem des Skelettmuskels entspricht und ausserhalb des Blutes nur von Lebergewebe übertroffen wird. In Leukocyten<sup>21</sup>, nach Leikin<sup>22</sup> besonders in Lymphocyten, finden sich ähnlich hohe Konzentrationen für Glykogen wie in den Plättchen.

Über das Verhalten von Glykogen in inkubierten Thrombocyten haben unseres Wissens nur Woodside und Kocholaty<sup>9</sup> Befunde publiziert.

Nach eintägiger Lagerung in Vollblut wiesen daraus isolierte Thrombocyten nur rund 50 Prozent der durchschnittlichen Glykogenmenge frisch aufgearbeiteter Zellen

auf. Wurde eine zusätzliche Inkubation der isolierten Plättchen von 16 Stunden bei 0 °C in NaCl-Lösung angeschlossen, so ging nur ein weiteres Zehntel des zu Inkubationsbeginn noch vorhandenen Glykogens verloren. Daraus wurde geschlossen, dass in Vollblut der Kohlenhydratsstoffwechsel schneller abläuft als in Kochsalzlösung. Diese Vermutung können wir nicht bestätigen.

Wenn man eine gleichmässige Abbaugeschwindigkeit von Glykogen in den Plättchen bei 0 °C annimmt, so stimmen die von Woodside und Kocholaty<sup>9</sup> mitgeteilten Werte gut mit den von uns gemessenen überein.

In keinem Fall, auch nicht in den unter Glucose-Zusatz durchgeführten Versuchen, haben wir einen Anstieg des Glykogenspiegels bei Inkubation beobachtet. Eine Glykogensynthese, die überdie Nachlieferung abgebauter Mengen hinausging, fand also nicht statt. Die Ursache der unter Glucose-Zusatz bzw. im Plasmanilieu beobachteten langsameren Abbaurate für Glykogen ist unklar.

Glykogen erweist sich nach unseren Erfahrungen als ausprägiert labiler Zellbestandteil der extravasierten Thrombocyten. Dies trifft auch unter annähernd physiologischen Bedingungen zu, wie sie die Inkubation von Plättchen in Plasma bedeutet. Es scheint daher möglich, dass Glykogen einer der Faktoren darstellt, die für die Integrität der Blutplättchen wesentlich sind und, dass die Schwierigkeiten der Plättchenkonservierung für Transfusionszwecke zumindest zum Teil auf diesen Gegebenheiten beruhen.

Die Entdeckung des überraschend hohen ATP-Gehaltes in Thrombocyten<sup>23, 24</sup> führte zur Untersuchung ihres intermediären Stoffwechsels in Abhängigkeit vom Gerinnungs- und Retraktionsvorgang. Born<sup>10</sup> beschrieb 1956 erstmals einen ATP-Abfall in Blutplättchen nach Auslösung der Gerinnung, ein Befund, der inzwischen mehrfach bestätigt wurde.<sup>8, 11, 12</sup> Lüscher<sup>25</sup> hat ebenfalls 1956 darauf hingewiesen, dass die Gerinnselfretraktion mit Milchsäure-Bildung einhergeht. Sie versagt, wenn durch Zerstörung der Plättchen die Milchsäureproduktion unmöglich gemacht wird. Gross<sup>26</sup> und Bettex-Galland und Lüscher<sup>11</sup> zeigten, dass eine Beziehung zwischen ATP-Konzentration in Thrombocyten und der Retraktions-Aktivität besteht. Als weiterer Beweis für den Zusammenhang zwischen Gerinnselfretraktion und Energiestoffwechsel der Plättchen, ist das Ausbleiben der Retraktion nach Zusatz von Hemmstoffen der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus und der Atmungskettenphosphorylierung anzusehen,<sup>8, 11, 13, 27-29</sup> ebenso die Befunde, die an Plättchen von Patienten mit Glanzmann-Naegelerischer Thrombopathie erhoben wurden.<sup>8, 27</sup> Aus diesen Beobachtungen geht, wie schon anfangs erwähnt, mit grosser Wahrscheinlichkeit hervor, dass für die Retraktion weitgehend glykolytische Vorgänge in den Thrombocyten die energieliefernden Prozesse stellen.

Die Verhältnisse liegen in Wirklichkeit komplizierter, da trotz der weit überwiegenden glykolytischen Aktivität der Blutplättchen auch mit Hemmern des Zitronensäurezyklus und mit Atmungsgiften eine Aufhebung der Retraktion erreicht werden kann, obwohl nach Bettex-Galland und Lüscher<sup>11</sup> die Sauerstoffaufnahme der Plättchen bei Zugabe von Thrombin sicher nicht gefördert, eher sogar gehemmt wird.

Bei diesen Untersuchungen ist der in Thrombocyten nachgewiesene, grosse Glykogen-Vorrat unberücksichtigt geblieben. Unsere Experimente ergaben ein einheitliches Resultat insofern, als weitgehend ein hoher Glykogen-Gehalt mit einer guten Retraktion, niedriger Glykogen-Bestand dagegen mit schlechtem Retraktionsvermögen, vergesellschaftet war. Die quantitative Beschreibung dieser Verhältnisse

durch den Korrelationskoeffizienten  $r$  zeigte mit  $r = +0.74$  und  $p < 0.001$  eine hochsignifikante Verknüpfung der beiden Wertereihen an. Welcher Art die Bedeutung des Glykogens für den Retraktionsprozess im einzelnen ist, kann zunächst an Hand des mathematisch-statistischen Zusammenhanges nur vermutet werden und bedarf weiterer experimenteller Klärung. Nach den bisher über den Thrombocyten-Stoffwechsel vorliegenden Daten und den heute geltenden Anschauungen erscheint auch die funktionelle Zuordnung beider Grössen möglich.

#### ZUSAMMENFASSUNG

In Schweinethrombocyten fanden sich durchschnittlich  $2.38 \pm 0.08\%$  Glykogen ( $n = 36$ ) bezogen auf die Trockenmasse. Bei  $37^\circ\text{C}$  in  $0.9\%$  NaCl-Lösung inkubierte Blutplättchen wiesen nach 2 Stunden nur noch 20 Prozent des Ausgangswertes an Glykogen auf ohne Unterschied, ob mit Phosphat oder mit Bikarbonat gepuffert und, ob ÄDTA oder Na-Citrat als Antikoagulans verwendet wurde. Eine langsamere Abbaurate zeigte sich in Plasma und in glucosehaltiger Kochsalzlösung, wiederum unabhängig von den angewandten Puffersystemen. Nach 6 Stunden Inkubation der Plättchen in Plasma oder NaCl-Lösung von  $0^\circ\text{C}$  waren rund 15 Prozent des ursprünglichen Glykogenbestandes verloren gegangen. NaF ( $10^{-3}\text{ M}$ ) bewirkte eine Hemmung des Glykogenzerfalles, 2,4-DNP blieb dagegen ohne Einfluss.

Parallel zur Glykogenbestimmung ausgeführte Messungen des Retraktionsvermögens der inkubierten Thrombocyten ergaben einheitlich eine Kopplung von guter Retraktion mit hohem Glykogenbestand und von schlechter Retraktivität mit niedrigem Glykogengehalt der Plättchen. Ausdruck der Zuordnung beider Wertereihen ist der zu  $r = +0.74$  errechnete Korrelationskoeffizient ( $p < 0.001$ ).

#### LITERATUR

1. R. WAGNER, *Arch. Biochem.* **11**, 249 (1946).
2. U. ZINGONI, *Arch. Fisiol.* **50**, 359 (1952).
3. R. P. GIBB und R. E. STOWELL, *Blood* **4**, 569 (1949).
4. M. WACHSSTEIN, *Blood* **4**, 54 (1949).
5. G. B. WISLOCKI, J. J. RHEINGOLD und E. W. DEMPSEY, *Blood* **4**, 562 (1949).
6. E. STORTI, S. PERUGINI und M. SOLDATI, *Acta Haematol. (Basel)* **10**, 144 (1953).
7. F. HECKNER, *Acta Haematol. (Basel)* **16**, 1 (1956).
8. G. W. LÖHR, H. D. WALLER und R. GROSS, *Dtsch. med. Wschr.* **86**, 897 (1961).
9. E. E. WOODSIDE und W. KOCHOLATY, *Blood* **16**, 1173 (1960).
10. G. V. R. BORN, *J. Physiol.* **133**, 61 (1956).
11. M. BETTEX-GALLAND und E. F. LÜSCHER, *Thromb. Diath. haem.* **4**, 178 (1960).
12. M. B. ZUCKER und J. BORRELLI, *Blood Platelets* (herausgegeben von S. A. JOHNSON u.a.). Little, Brown, Boston (1961).
13. Y. BOUNAMEAUX, *Experientia* **12**, 355 (1956).
14. G. RACCUGLIA und F. H. BETHELL, *Amer. J. clin. Path.* **34**, 495 (1960).
15. M. BALDINI, N. COSTEA und W. DAMASHEK, *Blood* **16**, 1669 (1960).
16. J. VAN DER VIES, *Biochem. J.* **57**, 410 (1954).
17. J. FONG, F. L. SCHÄFFER und P. L. KIRK, *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 319 (1953).
18. R. G. MACFARLANE, *Lancet*, 1199 (1939).
19. J. H. ROE, J. M. BAILEY, R. R. GRAY und J. N. ROBINSON, *J. biol. Chem.* **236**, 1244 (1961).
20. K. DOERFFEL, *Z. analyt. Chem.* **185**, 1 (1962).
21. V. ESMANN, *Scand. J. clin. lab. Invest.* **13**, 134 (1961).
22. S. L. LEIKIN, *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.* **106**, 286 (1961).
23. A. BESTETTI und P. F. CROSTI, *Atti Soc. lombarda Sci. med. biol.* **10**, 284 (1955).
24. G. V. R. BORN, *J. Physiol.* **133**, 618 (1956).

25. E. F. LÜSCHER, *Experientia* **12**, 294 (1956).
26. R. GROSS, *Bibl. haemat. (Basel)* **9**, 92 (1959).
27. R. GROSS, G. W. LÖHR und H. D. WALLER, *Proceedings of the Fourth International Congress on Biochemistry* Vol. X, p. 92. Pergamon Press, London (1959).
28. H. D. WALLER, G. W. LÖHR, O. KARGES und R. GROSS, *Transactions of the Seventh International Congress on Haematology, Rome* (1958).
29. H. D. WALLER, G. W. LÖHR, F. GRIGNANI und R. GROSS, *Thromb. Diath. haem.* **3**, 520 (1959).
30. K. LOHMANN und P. OHLMEYER, *Physiol. Chemie* (herausgegeben von B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ). Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956).
31. W. L. BLOOM und G. C. KNOWLTON, *Amer. J. Physiol.* **173**, 545 (1953).
32. H. D. CREMER und J. FÜHR, *Hoppe-Seyler/Thierfelder Handbuch der physiologisch-pathologisch-chemischen Analyse* (10. Auflage). Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1953).
33. R. M. BIRD, J. A. CLEMENTS und L. M. BECKER, *Cancer* **4**, 1009 (1951).
34. R. WILLSTÄTTER und M. ROHDEWALD, *Hoppe-Seyl. Z.* **247**, 115 (1937).