

ÜBER VERÄNDERUNGEN DES GLYKOGENGEHALTES IN BLUTPLÄTTCHEN WÄHREND DER GERINNUNG

ELLEN WEBER und WOLFGANG UNGER

Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg*

(Received 29 March 1963; accepted 29 August 1963)

Abstract—Pig thrombocytes, incubated in plasma at 37°, to which thrombin had been added, lost their glycogen reserve more rapidly than untreated control samples. Recalcification, which led to retraction of the clots, emphasised this accelerated glycogen breakdown. Similar results were obtained with saline solution.

Interruption of the clotting and retraction processes, once they had begun, by Ca^{2+} -complex formers (EDTA) almost completely halted the accelerated glycogen breakdown.

Metabolic inhibitors (final concentration 10^{-3}M) such as 2,4-dinitrophenol and NaF had no effect on the glycogen breakdown rate after recalcification. Only mono-iodoacetic acid, which regularly stopped retraction, was able almost to suspend the glycogen reduction induced by CaCl_2 .

In platelet homogenates there was a sharp fall-off in the stationary glycogen concentration within the first five minutes, irrespective of the presence of added Ca^{2+} -ions.

These results are evidence of the involvement of the blood platelet glycogen reserves in the process of clotting and, particularly, of retraction.

IN EINER VORAUSGEHENDEN ARBEIT¹ BEFASSTEN WIR UNS MIT DEM VERHALTEN DES GLYKOGENS IN SCHWEINETHROMBOCYTEN UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN. IN ALIQUOTEN TEILEN VON PLÄTTCHENSUSPENSIONEN BESTIMMTEN WIR GLEICHZEITIG DAS RETRAKTIONSVERMÖGEN. DABEI STELLTE SICH HERAUS, DASS EINE POSITIVE KORRELATION ($r = +0,75$) ZWISCHEN DEM GLYKOGENBESTAND IN DEN THROMBOCYTEN UND IHRER RETRAKTILITÄT BESTAND. ES LAG NAHE, IN ERWEITERUNG HEUTE GELTENDER ANSCHAUUNGEN (LITERATUR S.¹) EINE FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON GLYKOGEN FÜR DEN GERINNUNGS- UND DEN RETRAKTIONSVORGANG ZU VERMUTEN. DEN GLYKOGENGEHALT IN SCHWEINETHROMBOCYTEN IM VERLAUF DIESER PROZESSE ZU UNTERSUCHEN, BILDET DEN GEGENSTAND DER VORLIEGENDEN ARBEIT.

METHODIK

Die Thrombocyten aus titriplexhaltigem† Blut von Schlachtschweinen wurden, wie früher beschrieben¹, gewonnen und einmal in Plasma gewaschen. Wir stellten eine Zellsuspension in Plasma her (1 Teil Thrombocytenmasse + 10 Teile Plasma, dies entspricht $6 \cdot 10^6$ Plättchen/mm³) und pipettierten davon jeweils 0,2 ml in Zentrifugenröhrchen mit Schliffstopfen ein. Zur Auslösung der Gerinnung verwandten wir 0,05 ml in aqua dest. gelöstes Thrombin‡ (60 NIH-Einheiten/0,75 ml aqua dest.) oder 0,005 ml einer CaCl_2 -Lösung (1M) oder ein Gemisch aus beiden Substanzen. Den Kontrollen wurde meist 0,05 ml physiologische Kochsalzlösung zugesetzt. Auf diese Zugabe

* Direktor: Prof. Dr. O. Eichler.

† Titriplex III = Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure = EDTA; Fa. Merck, Darmstadt.

‡ Test-Thrombin der Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn.

verzichteten wir zeitweise, da es sich zeigte, dass unter beiden Bedingungen identische Ergebnisse resultierten.

In einigen Versuchen suspendierten wir die Plättchen in NaCl-haltigem Milieu. Hierbei wurden die isolierten Zellen nach zweimaliger Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung in ein Medium folgender Zusammensetzung eingebracht: 0,8% NaCl, 0,1% Glucose, $\frac{1}{10}$ vol. isotonischer Phosphatpuffer² bzw. $\frac{1}{3}$ vol. Tris (oxymethyl) aminomethan-Maleatpuffer³ von pH = 7,4. Thrombinzugabe wie oben; CaCl₂-Zusatz: 0,005 ml einer 0,5 M Lösung; gegebenenfalls Beimischung von 0,01 ml einer 4% Fibrinogen*-Lösung (Endkonzentration: 0,16%).

Die Thrombocyten suspensionen wurden bis zum Beginn der Inkubation im Eisbad gehalten. Diese erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei 37°. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Röhrchen wieder in Eiswasser gestellt, sofort mit je 0,175 ml 30% KOH beschickt und kurz geschüttelt.

Die Glykogenbestimmung führten wir mit der Anthronmethode nach Fong *et al.*⁴ aus. Nach Maceration des Röhrcheninhaltes durch 30 min Kochen im siedenden Wasserbad wurde entsprechend des auf das Fünffache erhöhten KOH-Volumens auch die Wasserzugabe um den gleichen Betrag erhöht. Der gesamte Arbeitsgang von der Inkubation bis zur Anthronzugabe erfolgte im gleichen Zentrifugenröhrchen. Jedes Einzelergebnis stellt die gemittelten Resultate von zwei getrennt inkubierten und aufgearbeiteten Kontroll-bzw. Versuchsansätzen dar.

Die Kontrolle des pH-Wertes mit der Glaselektrode ergab für die in Plasma suspendierten Plättchen nach einer Stunde Inkubation bei 37° pH = 6,8 (Ausgangswert um pH = 7,4), ohne Unterschied, ob die Gerinnung ausgelöst worden war oder nicht. In der Elektrolytlösung war bereits nach 30 min der pH-Wert auf 6 abgesunken.

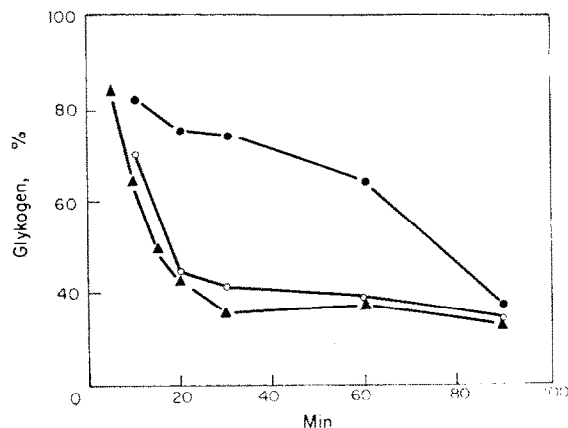


ABB. 1. Verlauf des Glykogengehaltes in Thrombocyten, welche in titriplexhaltigem Plasma bei 37° inkubiert wurden, nach Auslösen der Gerinnung durch Thrombin (4 NIH-Einheiten/0,25 ml Suspension) (●), durch CaCl₂ (▲) oder Rekalkifizierung (○). Die Kurven geben die Durchschnittswerte aus jeweils 5 bis 10 Versuchen wieder, ausgedrückt in Prozenten der zu jedem Zeitpunkt gleich 100 Prozent gesetzten Glykogenkonzentration der nicht zur Gerinnung gebrachten Kontrollen.

ERGEBNISSE

Das zur Auslösung der Gerinnung verwendete Thrombin bewirkte in den Titriplex-haltigen Thrombocyten-Suspensionen in Übereinstimmung mit Angaben von Bettex-Galland und Lüscher⁵ sowie von Zucker und Borrelli⁶ nur eine Gerinnung. Eine Retraktion des Gerinnsels trat lediglich in den rekalkifizierten Proben auf. Den Verlauf des Glykogengehaltes in den verschiedenen Versuchsansätzen veranschaulicht Abb. 1. Die Glykogenkonzentration der Kontrollen ist für jeden Zeitpunkt gleich

* Fibrinogen vom Rind; Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn.

100 Prozent gesetzt. Die Kurven geben den Glykogenbestand der Proben in Prozenten der jeweiligen Kontrollwerte wieder. Man erkennt, dass sowohl Thrombinzusatz wie auch Rekalkifizierung zu einer Beschleunigung des Glykogenabbaues führt, deren Intensität sich aber in beiden Fällen unterscheidet.

In einer Versuchsserie blieb trotz Thrombinzugabe die Gerinnung aus. Bei der Glykogenanalyse differierten diese Proben nicht von den Kontrollen. Auch bei gelegentlichem Ausbleiben der Gerinnung konnten wir die gleiche Erscheinung beobachten.

Zur Auslösung der Gerinnung verwendeten wir kurzfristig Thrombokinase : CaCl_2 . Trotz deutlicher Gerinnung war kein Abfall der Glykogenwerte festzustellen, in den ersten Minuten ergab sich sogar ein Anstieg. Eine Analyse der zugesetzten Thrombokinase-Lösung mit unserer Methode deckte die Ursache auf. Zogen wir die durch das Thrombokinasepräparat eingebrachte Glykogenmenge von den einzelnen Proben ab, so fanden wir wieder die bei Gerinnung zu erwartende Abnahme des Glykogengehaltes. Bei der aufgrund dieses Vorkommnis durchgeführten Prüfung des von uns verwendeten Thrombins konnten wir kein Glykogen nachweisen.

Folgende Versuchsanordnung sollte dazu dienen, weitere Hinweise zur Frage der Beziehung zwischen Glykogenabbau und Retraktion zu liefern: Röhrchen mit je 0,2 ml der Thrombocytensuspension wurden unmittelbar vor dem Einbringen in das Wasserbad rekalkifiziert, die Kontrollen ohne Zusätze belassen. Zur Verlangsamung der Vorgänge wählten wir 25° als Inkubationstemperatur. Sofort nach Sichtbarwerden der ersten Ausflockungserscheinungen, was in dieser Anordnung nach 4,5 bis 5 min der Fall war, beschickten wir die Hälfte der Versuchsröhrchen mit je 0,03 ml einer überschüssigen EDTA-Lösung zum Wegfangen der Ca^{++} -Ionen. Die Durchmischung des Inhaltes wurde mit einem Platindraht vorgenommen, an dem sich sofort die ausgeflockten Partikel abschieden. Dieses Koagulum wurde abgestreift und veränderte in der verbleibenden Inkubationszeit weder seine Form noch seine Ausdehnung. In Kontrollversuchen hatten wir uns zuvor davon überzeugt, dass die zugesetzte Menge EDTA, sofort nach der Rekalkifizierung gegeben, ausreichte, um mit Sicherheit die Gerinnung der Thrombocyten-Aufschwemmung zu verhindern. Nach 60 min wurden die Kontrollen und die anderen Röhrchen auf ihren Glykogengehalt untersucht. Die

TABELLE 1.

Prozentualer Glykogengehalt von Thrombocytensuspensionen in Titriplex-haltigem Plasma bezogen auf den Glykogenbestand von Kontrollen. Diese enthielten keine weiteren Zusätze, während die Versuchsröhrchen entweder zu Versuchsbeginn rekalkifiziert und 5 min später mit überschüssiger Titriplexlösung versetzt wurden (A) oder nur den Calciumzusatz erhielten (B). Temperatur des Wasserbades 25° ; Inkubationsdauer: 60 min.

| Versuch | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------|----|----|----|----|
| A | 75 | 68 | 84 | 82 |
| B | 46 | 34 | 56 | 48 |
| Differenz | 29 | 34 | 28 | 34 |

Ergebnisse sind in Tabelle 1 niedergelegt. Die Kupierung zumindest des Retraktionsvorganges durch das Hinzufügen von EDTA führte in jedem Fall zu einem um 28–34 Prozent höheren Glykogenbestand—bezogen auf die Kontrollen—als im retrahierenden Gerinnsel.

In einer weiteren Versuchsanordnung untersuchten wir bei 25° rekalkifizierte Thrombocyten suspensionen neben Proben, die zusätzlich mit Monojodessigsäure, NaF bzw. 2,3-Dinitrophenol, jeweils in einer Endkonzentration von 10^{-3} M angewendet, vergiftet worden waren (Abb. 2). Die Gerinnung trat in allen Fällen auf. Einen nur geringfügig verringerten Glykogengehalt, bezogen auf die nicht rekalkifizierten Kontrollen, stellten wir in den mit Monojodessigsäure versetzten Röhrchen

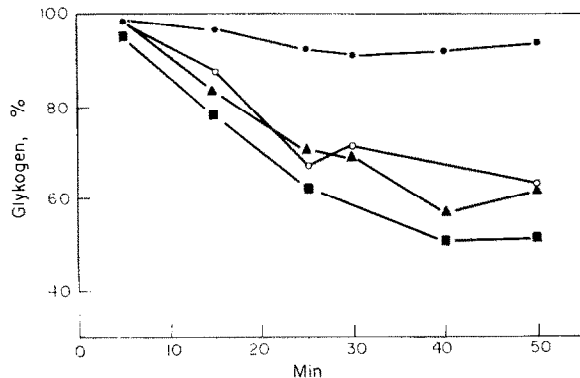


ABB. 2. Verlauf des Glykogengehaltes von Plättchen-Aufschwemmungen in titriplethaltigem Plasma nach Rekalkifizierung ohne weitere Zusätze (○), bzw. nach gleichzeitiger Gabe von Monojodessigsäure (●), NaF (▲), oder 2,4-Dinitrophenol (■) (Endkonzentration jeweils 10^{-3} M). Angabe in Prozenten der Glykogenkonzentration parallel laufender, nicht rekalkifizierter Kontrollen. Durchschnittswerte aus zwei Versuchen; Inkubationstemperatur 25°.

fest. Allerdings wies ihr Inhalt niemals Zeichen einer Gerinnselretraktion auf. In Bezug auf diese Funktion verhielten sich die Plättchenaufschwemmungen, wenn sie mit NaF oder mit 2,4-Dinitrophenol vergiftet worden waren, verschieden. Zum Teil fehlte die Retraktion, zum Teil war sie angedeutet oder mässig ausgebildet. Der Glykogenabbau aber verlief wie in den unvergifteten, rekalkifizierten, also retrahierenden Proben, vielleicht etwas beschleunigt unter dem Einfluss von 2,4-Dinitrophenol. Offensichtlich handelte es sich bei dem mit NaF oder 2,4-Dinitrophenol vergifteten Plättchen um einen nur teilweise gehemmten Retraktionsvorgang.

Die bisher ausgeführten Versuche sagen nichts darüber aus, ob die Retraktion des Gerinnsels an den Abbau des Glykogenvorrates in den Thrombocyten gebunden ist, oder, ob dieser Glykogenzerfall nur eine Folge der Aufhebung der Zellintegrität im Verlauf von Gerinnung und Retraktion darstellt. Uns schien es daher wichtig, das Verhalten von Glykogen auch in homogenisierten Thrombocyten-Suspensionen zu untersuchen.

Nach Herstellung der Plättchen-Aufschwemmung unterwarfen wir einen aliquoten Teil einer gründlichen Homogenisierung in der Kälte. Das Ausmass der Zellertrümmerung wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes kontrolliert. Vom Homogenat pipettierten wir wiederum je 0,2 ml in die Versuchsröhrchen. Die Hälfte der homogenathaltigen Ansätze wurde rekalkifiziert. Nicht homogenisierte Thrombocyten-Suspension des gleichen Tieres, ebenfalls bei 37° inkubiert, diente als Kontrolle und Bezugswert.

Die in Tabelle 2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass bereits nach 5 min die gesamte, abbaufähige Glykogenmenge verloren gegangen ist und, dass dabei der Zusatz von CaCl_2 höchstens in den ersten min eine Rolle spielt.

Zur Beurteilung, inwieweit sich Einflüsse des umgebenden Plasmamilieus auf den Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombocyten während der Gerinnung auswirken, haben wir Gerinnung und Retraktion bei 37° in einer Salzlösung ablaufen lassen.

TABELLE 2.

Glykogengehalt in homogenisierten Thrombocyten-Suspensionen in Prozenten der parallel inkubierten Zell-Aufschwemmung. Durchschnittswerte aus zwei Versuchen. Inkubation bei 37°.

| Zeit, Min | Glykogen, % | |
|--------------|--------------------|----|
| | +CaCl ₂ | |
| 5 | 17 | — |
| 10 | 18 | 30 |
| 20 | 20 | 22 |
| 30 | 20 | 22 |

Zugabe von Thrombin führte hier zu makroskopisch sichtbaren Thrombocyten-Aggregaten und zu mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskopes erkennbaren, ausgeprägten Zeichen der viskösen Metamorphose der Zellen. Nach zusätzlicher Fibrinogen-Gabe traten auch Gerinnung und Retraktion auf. Der Verlauf des Glykogengehaltes unter diesen Bedingungen geht aus den Abb. 3a und 3b hervor. Der in Übereinstimmung mit den in unserer 1. Mitteilung beschriebenen Ergebnissen deutlich

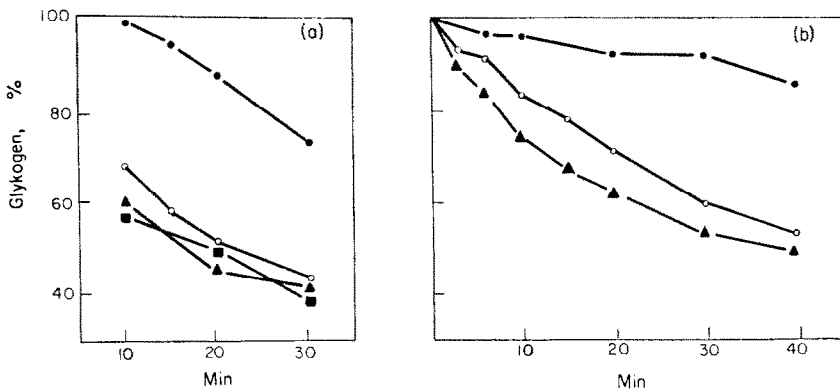


ABB. 3. Veränderungen des Glykogenbestandes von Thrombocyten-Suspensionen in synthetischem Milieu (0,8% NaCl, 0,1% Glucose, $\frac{1}{4}$ vol Tris-Maleat-Puffer von pH 7,4. Durchschnittswerte aus je drei Versuchen. Kontrolle (●), Zusatz von Thrombin (○), von Thrombin + CaCl₂ (■) oder von Thrombin + CaCl₂ + Fibrinogen (▲). A) Inkubationstemperatur 37°; die Prozentangaben beziehen sich auf den nach 10 min gemessenen Wert des Kontrollansatzes. B) Inkubationstemperatur 25°. Als Bezugswert wurde hier die Kontrolle zum Zeitpunkt Null gewählt.

schnellere Glykogenzerfall in gepufferten Elektrolyt-Medien veranlasste uns hier, als Bezugspunkt die 10-min-Kontrolle festzulegen. Bereits nach 10 min war ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrolle und den Thrombin-haltigen Versuchsansätzen zu erkennen (Abb. 3a). Alle Proben wiesen dann, unabhängig von der Art der Zusätze, die gleiche Zerfallsgeschwindigkeit auf. Dies bedeutet, dass im Elektrolyt-Medium bereits nach 10 min die Vorgänge zu Ende gelaufen waren, die im Plasma

rund 90 min in Anspruch nehmen. Um Informationen über den interessierenden, vorausgegangenen Zeitabschnitt zu erhalten, wiederholten wir die Versuche bei 25° zur Verlangsamung der Prozesse. Hierbei zeigte sich, wie Abb. 3b lehrt, dass eine prinzipielle Differenz durch die verschiedenen Medien nicht bedingt ist. Wieder führte Thrombin allein zugesetzt zu einer weniger beschleunigten Glykogenabnahme als zusammen mit Fibrinogen und CaCl_2 gegeben. Mit diesen Versuchen ist auch bewiesen, dass allein die visköse Metamorphose der Plättchen genügt—ohne Zusammenhang mit der Ausfällung des Fibrins, das in den lediglich mit Thrombin versetzten Röhrchen ja fehlte—um den gegenüber unbehandelten Kontrollen beschleunigten Glykogenzerfall zu verursachen.

DISKUSSION

Die visköse Metamorphose der Blutplättchen und die Gerinnsel-Retraktion sind als endergone Prozesse anzusehen. Die ersten Hinweise, dass Stoffwechselvorgänge in den Thrombocyten die hierfür notwendige Energie liefern, ergaben sich 1956. Sowohl Bounameaux⁷ wie auch Lüscher⁸ nahmen an Hand ihrer Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen dem Abbau von Glucose in den Plättchen und der Retraktion an. Auf Grund weiterer, in die gleiche Richtung weisender Befunde gilt heute allgemein die Glykolyse der Thrombocyten als Energiequelle für die visköse Metamorphose und die Retraktion (vergl.¹). Die letztlich aus Glucose gewonnene, im ATP gespeicherte Energie wird auf noch unbekannte Art freigesetzt und verwertet. Seit es gelungen ist, aus den Blutplättchen ein dem Muskel-Aktomyosin vergleichbares kontraktiles Protein, das Thrombosthenin, zu isolieren und zu charakterisieren, wurden der Muskelkontraktion prinzipiell ähnliche Mechanismen für die Formänderung der Thrombocyten und für die Retraktion des Gerinnsels vermutet.⁹

Unsere Annahme,¹ dass nicht nur der im Suspensionsmilieu vorhandenen Glucose* Bedeutung zukommt, sondern auch dem in den Plättchen gestapelten Glykogenvorrat, wird durch die hier vorgelegten Ergebnisse weiter gestützt. Wir haben gezeigt, dass seine Menge im Verlauf von Gerinnungsvorgängen in den beteiligten Plättchen schneller abnimmt als in den funktionell ruhenden Zell-Suspensionen. Dabei ergaben sich folgende wesentliche Beobachtungen:

1. Es kommt in gerinnenden oder retrahierenden Proben niemals zu einem sofort einsetzenden abrupten Glykogen-Verlust.
2. Allein die visköse Metamorphose der Plättchen genügt, unabhängig von einer Fibrin-Ausfällung, um einen beschleunigten Glykogen-Zerfall zu bewirken.
3. Die Geschwindigkeit des Zerfalls wird unter den Bedingungen, die zu einer Retraktion des Gerinnsels führen (Recalcifizierung des EDTA-haltigen Plasmamilieus bzw. Zugabe von Fibrinogen zu der Elektrolyt-Lösung) noch mehr gesteigert.

Dies bedeutet, dass unter dem maximalen Energiebedarf während der Retraktion die zur Verfügung stehende Glykogen-Menge schneller gespalten wird. Entsprechendes fanden Bettex-Galland und Lüscher⁵ sowie Zucker und Borrelli¹⁰ für ATP. Damit ist eine Proportionalität zwischen Energiebedarf und Energiefreisetzung gewahrt, die sehr für eine Kopplung der beiden Vorgänge spricht. Offensichtlich sind Reaktionen

* Hierbei bleibt offen, ob Glucose direkt abgebaut wird, oder ob ihre Verwertung über die Bildung von Glykogen erfolgt.

beteiligt, die nur bei Anwesenheit von Ca^{++} , evt. auch Mg^{++} , vorsichgehen (vergl.¹¹ sowie¹²).

Es lassen sich für die Richtigkeit unserer Vorstellungen, vor allem auch hinsichtlich der bevorzugten Verwertung von Glykogen für den Retraktions-Prozess, eine Reihe von Befunden anführen: Blockiert man die in Gang gekommene Retraktion durch Entzug von Ca^{++} , so wird gleichzeitig die Glykogen-Abnahme gestoppt, obwohl das hierfür benutzte EDTA selbst keinen Einfluss auf den Glykogen-Gehalt von Blutplättchen ausübt.¹ Nur Monojodessigsäure, welche als einziges der angewandten Stoffwechselgifte zur vollständigen Unterdrückung der Retraktion führt, hebt die Beschleunigung des Glykogen-Abbaues auf. Die Zerstörung der Struktur von Thrombocyten durch Homogenisieren unter Verlust ihrer funktionellen Eigenschaften, bewirkt einen abrupten Abfall der Glykogen-Konzentration, zeichnet sich also durch eine grundsätzlich andere Kinetik der Glykogen-Verarmung aus als die Gerinnungsprozesse. Schliesslich sei darauf hingewiesen, dass Glykogen im Blut nur in den Leukocyten und in den Plättchen vorhanden ist, also in den Formelementen, die eine mechanische Arbeit (amöboide Bewegungen, Phagocytose bzw. visköse Metamorphose und Gerinnsel-Retraktion) leisten (vergl. die Ergebnisse von Karnovsky und Sbarra¹³ sowie von Pavlov.¹⁴

ZUSAMMENFASSUNG

In Plasma bei 37° inkubierte Schweinethrombocyten, denen Thrombin zugesetzt worden war, verloren ihren Glykogenbestand schneller als unbehandelte Kontrollansätze. Rekalzifizierung, welche zu einer Gerinnselretraktion führte, verstärkte diese Beschleunigung des Glykogenabbaues. In Kochsalzlösung wurden entsprechende Resultate erhalten.

Eine Unterbrechung der angelaufenen Gerinnungs- und Retraktionsvorgänge durch Ca^{++} -Komplexbildner (EDTA) unterband den beschleunigten Glykogenzerfall fast vollständig.

Stoffwechselinhibitoren (Endkonzentration 10^{-3} M) wie 2,4-Dinitrophenol und NaF blieben ohne Einfluss auf die Rate der Glykogenabnahme nach Rekalzifizierung. Nur Monojodessigsäure, die regelmässig die Retraktion unterdrückte, hob die durch CaCl_2 induzierte Glykogen-Verminderung weitgehend auf.

In Plättchenhomogenaten kam es zu einem abrupten Abfall der stationären Glykogenkonzentrationen innerhalb der ersten 5 min, unabhängig von der Anwesenheit zugesetzter Ca^{++} -Ionen.

Die Ergebnisse sprechen für die Beteiligung der intracellulären Glykogenreserven von Blutplättchen an den Gerinnungs- und insbesondere den Retraktionsvorgängen.

Anmerkung—Der Research Corporation, New York, danken wir für die Bereitstellung von Mitteln, den Behringwerken, Marburg/Lahn, für die Überlassung von Versuchsmengen ihrer Präparate Test-Thrombin, Affenhirn-Thrombokinasen und Fibrinogen vom Rind.

LITERATUR

1. E. WEBER, W. LITTMANN und R. FREITAG, *Biochem. Pharmacol.* **12**, 145 (1963).
2. H. RAUEN (Herausgeb.) *Biochemisches Taschenbuch*, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956) S.655.
3. G. GOMORI, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **68**, 354 (1948).
4. J. FONG, F. L. SCHÄFFER und P. L. KIRK, *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 319 (1953).
5. M. BETTEX-GALLAND und E. F. LÜSCHER, *Thromb. Diath. Haemor.* **4**, 178 (1960).

6. M. B. ZUCKER und J. BORRELLI, *J. appl. Physiol.* **12**, 453 (1958).
7. Y. BOUNAMEAUX, *Experientia* **12**, 355 (1956).
8. E. F. LÜSCHER, *Experientia* **12**, 294 (1956).
9. M. BETTEX-GALLAND und E. F. LÜSCHER, *Nature* **184**, 276 (1959); *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 536 (1961).
10. M. B. ZUCKER und J. BORELLI, in *Blood Platelets* (herausgeg. von S. A. Johnson u.a.) Little, Brown, Boston (1961) S.383.
11. Y. BOUNAMEUX und J. LECOMTE, in Z. M. BACQ, *Ions alcalinoterreux, Tome 1*, in *Handbuch der experimentellen Pharmakologie Ergänzungswerk* Bd. 17, Teil 1, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963, S.86.
12. G. W. LÖHR, H. D. WALLER und R. GROSS, *Dtsch. Med. Wschr.* **86**, 897 (1961).
13. M. L. KARNOVSKY und A. J. SBARRA, *Fed. Proc.* **18**, 257 (1959).
14. B. A. PAVLOV, *Terapeuticheskii Arkhiv (Moskau)* 44 (1960).