

## UNTERSCHIEDUNG UND VERHALTEN VON GLYKOGENFRAKTIONEN IN BLUTPLÄTTCHEN

E. WEBER, U. KLEINE UND H. WACHTER

Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg

(Direktor: Prof. Dr. O. Eichler)

(Received 23 February 1965: accepted 11 March 1965)

**Abstract**—Quantitative determination of glycogen in blood platelets from the pig were made, after extraction with KOH, by estimating enzymatically glucose released by acid hydrolysis. Under conditions in which the glycogen in the thrombocytes breaks down rapidly such as incubation at 37° in an electrolytic solution; or coagulation *in vitro*, the glycogen fraction measured by the enzyme method and the fraction obtained by estimation with Anthron both fell off. The kinetics of the glycogen reduction within these fractions varied with the conditions selected and these glycogen fractions which can be differentiated by means of KOH and TCE showed differences in the rate of decomposition.

EINE Retraktion des Blutgerinnsels tritt nur dann ein, wenn "intakte" Blutplättchen am Vorgang beteiligt sind. Die für diese "Intaktheit" verantwortlichen Fraktoren sind bisher unbekannt. In diesem Zusammenhang verdienen die labilen Bestandteile der Plättchen besonderes Interesse. Zu diesen zählt Glykogen, welches Absolutwerte wie im ruhenden Skelettmuskel erreicht (Woodside u. Kocholaty; Löhr *et al.*; Weber *et al.*; Olssen *et al.*).

Es ist seit langem bekannt, daß die Absolutwerte an Organglykogen stark von der Wahl des Extraktionsmittels bestimmt werden. Alkali-Auszüge ergeben höhere Werte als trichloressigsäure Extrakte. Man unterscheidet deshalb einen stärker gebundenen Anteil ("Desmoglykogen") von einer als "frei" oder "löslich" bezeichneten Fraktion ("Lyoglykogen"). Diese Differenzierung gewann an Bedeutung, als mehrfach, z.T. mit radiochemischen Methoden, gezeigt worden war, daß diesen beiden Fraktionen verschiedene funktionelle Wertigkeit zukommt (Bloom and Knowlton; Bloom *et al.*; Figuero und Pfeifer; Lourau und Meyer; Merrick und Meyer; Platner *et al.*; Russel und Bloom; Stetten und Stetten; Stetten *et al.*; Kits van Heijningen; u.a.m.).

Neuerdings hat sich ergeben, daß bei Ermittlung des stationären Glykogengehaltes mit Hilfe enzymatischer Verfahren niedrigere Werte gefunden wurden als mit der Anthronmethode (Koritz u. Munk; Balzer u. Palm). Es muß deshalb angenommen werden, daß von dem Anthronreagens eine weitere Fraktion miterfaßt wird, die KOH-unempfindlich und alkoholunlöslich ist. Es ist bisher nicht mitgeteilt worden, ob diese Feststellung auch für Thrombocyten zutrifft.

Bei früher durchgeföhrten Analysen fanden wir eine positive Korrelation zwischen dem Glykogengehalt von Plättchen und ihrem Retraktionsvermögen. (Weber *et al.*). Später zeigte sich, daß die Beteiligung der Plättchen an Gerinnungsvorgängen zu einem beschleunigten Glykogenzerfall führt, der durch den Ablauf der Retraktion noch weiter gefördert wird (Weber u. Unger).

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die mit der Anthron-bzw. enzymatischen Methode erfaßbaren Glykogenmengen in KOH-Extrakten aus Thrombocyten gemessen. Nachdem sich deutliche Differenzen ergeben hatten, untersuchten wir, welche der Fraktionen den während Inkubation und bei Gerinnungsprozessen sich labil verhaltenden Glykogen-Anteil stellen. Fernerhin prüften wir, wie sich die durch Trichloressigsäure bzw. KOH-Extraktion unterscheidbaren Glykogenfraktionen unter diesen experimentellen Bedingungen verhielten.

## METHODIK

### *I. Herstellung und Behandlung der Plättchensuspensionen*

Die Gewinnung des Blutes unter Zusatz von EDTA (1,7 g/1000 ml Blutmischung) und die Isolierung der Blutplättchen wurde wie früher beschrieben gehandhabt (Weber *et al.*). Die isolierten Plättchen wurden, bevor wir sie suspendierten (1 Gew. T. Zellen + 10 Vol. T. Medium), entweder zweimal in Plasma oder in Elektrolytlösung (0, 9% NaCl-Lösung 4 Vol. T. + 0,05 M Tris-Maleat-Puffer von pH 7,4 1 Vol. T.) gewaschen und im gleichen Milieu aufgeschwemmt. Jeweils 0,2 ml der Suspension pipettierten wir in Zentrifugenröhren mit Schliffstopfen ein.

Zur Auslösung der Gerinnung verwandten wir pro Röhrchen 0,05 ml in aqua dest. gelöstes Thrombin\* (60 NIH-Einheiten/ 0,75 ml aqua dest.) oder 0,005 ml einer CaCl<sub>2</sub>-Lösung (1 M) oder ein Gemisch aus beiden Substanzen. Blutplättchen, die in Elektrolytmedium suspendiert waren, setzten wir 0,01 ml Fibrinogenlösung† (60 mg in 1 ml aqua dest. gelöst) pro 0,2 ml Suspension zu. Die Zellaufschwemmung wurde im Eisbad bis zum Beginn der Inkubation gehalten, die bei 37° erfolgte. Anschließend wurden die Röhrchen wieder in Eiswasser gebracht und sofort mit KOH versetzt.

### *II. Glykogenbestimmung*

1. Mit enzymatischer Methodik nach KOH-Extraktion (Methode I) Nach der Maceration von je 0,2 ml der Plättchensuspension mit 1 ml 30% KOH bei 100° (20 Min) wurde das nach der Vorschrift von Seifert *et al.* erhaltene glykogenhaltige Sediment in 1 ml HCl (1n) gelöst und 2 h im verschlossenen Röhrchen im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Die Entfernung der wässrigen Phase erfolgte innerhalb 2–3 h im Vakuum bei 35°, den zurückbleibenden weißen Rückstand lösten wir in 1 ml H<sub>2</sub>O. Die bei der Hydrolyse entstandene Glucose wurde dann mit Hilfe von Glucose-Oxydase (Biochemica Test Combination; C. F. Boehringer & Soehne GmbH Mannheim) enzymatisch bestimmt. Die auf diese Weise gemessene Glykogenmenge wurde als Fraktion e bezeichnet.

2. Anthronmethode. (a) nach KOH-Extraktion (Methode II): Zu je 0,2 ml Plättchen-Suspension fügten wir 0,175 ml KOH (30%) und macerierten den Röhrcheninhalt 30 Min im siedenden Wasserbad. Der weitere Arbeitsgang richtete sich nach der Vorschrift von Fong *et al.* Entsprechend des auf das Fünffache erhöhten KOH-Volumens steigerten wir die Wasserzugabe um den gleichen Faktor. Die gemessene Glykogenmenge wurde Fraktion A genannt.

\* Test-Thrombin; Behringwerke Marburg.

† Fibrinogen vom Rind; Behringwerke Marburg.

(b) nach Trichloressigsäure-Extraktion (Methode III): Etwa 500 mg der feuchten Thrombocytenmasse wurde in 2 ml TCE\* (5%) eingewogen, mit einem Teflonhomogenisator bearbeitet und abgesezt. Wir unterzogen den Rückstand einer dreimaligen Nachextraktion mit je 1,5 ml der TCE. Die Überstände wurden gesammelt und mit TCE auf 10 ml aufgefüllt. Je 2 ml dieses Extraktes diente zur Glykogenbestimmung nach v.d. *Vies*.

3. Modifikation der Methodik zur Erfassung von Glykogen im Rückstand nach TCE-Extraktion.

Für die Versuche, in denen wir das Verhalten des Glykogengehaltes der Zellen im TCE-Extrakt und in dessen Rückstand prüften, mußten wir die Analysenmethoden modifizieren. Es zeigte sich, daß der durch TCE nicht extrahierbare Glykogenanteil nur wenige Prozent des Gesamtglykogens betrug und daher die Mengen zu klein waren, um bei üblichem Vorgehen eine genaue Messung zu gewährleisten.

Wir fügten zu 1, 1 ml einer Zellsuspension 2 ml TCE (6%) zu, homogenisierten und extrahierten wie oben beschrieben insgesamt viermal. 2 ml des auf 10 ml aufgefüllten TCE-Extraktes wurden mit 1,5 ml KOH (60%) in verschlossenen Röhrchen mit Schliffstopfen 20 Min gekocht. Nach dem Abkühlen gaben wir 3,7 ml Alkohol (95%) zur Glykogenfällung zu und arbeiteten nach der oben angeführten Methode von Seifter *et al.* weiter.

Der Rückstand der TCE-Extraktion wurde, um noch anhaftendes Glykogen zu entfernen, zunächst mit aqua dest. gewaschen. Nach Bestimmung des Gesamtgewichtes der Sedimente überführten wir einen aliquoten Teil in Röhrchen mit Schliffstopfen und macerierten ihn 20 min bei 100° mit 1 ml KOH (30%). Der weitere Versuchsablauf entspricht den obigen Angaben (s. II/1). Die Glykogenbestimmung erfolgte nach saurer Hydrolyse mit der enzymatischen Methode.

## ERGEBNISSE

### 1. Der Glykogengehalt frisch isolierter Thrombocyten gemessen mit drei verschiedenen Methoden

Um die mit drei verschiedenen Verfahren ermittelten stationären Glykogenkonzentrationen in frisch isolierten, zweimal mit Plasma gewaschenen Plättchen direkt miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils die von einem Tier stammenden Zellen zur Aufarbeitung nach den zwei bzw. drei Vorschriften aufgeteilt.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht der gemittelten Ergebnisse wieder. Die in mg pro Gramm feuchte Plättchenmasse gemessenen Werte wurden hierfür in den auf die trockene Zellmasse bezogenen, prozentualen Glykogenanteil umgerechnet. Das mittlere Trockengewicht der über Nacht bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 105° gehaltenen Thrombocyten von 6 Schweinen betrug  $16,3 \pm 0,49\%$ . Die Tabelle zeigt, daß Extraktion mit KOH und anschließende Bestimmung mit Anthron die höchsten Werte lieferte. Setzt man diese gleich 100%, so umfaßt die mit TCE/Anthron messbare Menge 81%, während man mit der enzymatischen Methode, trotz der Extraktion mit KOH, nur auf 51% kommt.

Bei den Zellen von 7 Tieren wurden parallelgehend Methode II und III angewandt. In dieser Gruppe ist der mit Methode III zu messende Glykogenanteil höher und beträgt 93%.

\* TCE = Trichloressigsäure.

TABELLE 1. MITTLERE STATIONÄRE GLYKOGENKONZENTRATIONEN IN FRISCH AUS EDTAPLASMA ISOLIERTEN SCHWEINE-BLUTPLÄTTCHEN BESTIMMT MIT DREI VERSCHIEDENEN METHODEN. ANGABE IN PROZENTEN DES TROCKENGEWICHTES DER ZELLMASSE  $\pm$  MIT- TLERER FEHLER DES MITTELWERTES.

| Methode | Extraktions-<br>mittel | Analysenmethode                       | n  | Glykogen (%)        |
|---------|------------------------|---------------------------------------|----|---------------------|
| I       | KOH                    | Hydrolyse und enzymatische Bestimmung | 20 | 1,14 $\pm$ 0,05 51  |
| II      | KOH                    | Antron                                | 20 | 2,25 $\pm$ 0,08 100 |
| III     | TCE                    | Antron                                | 7  | 1,82 $\pm$ 0,13 81  |

\* Prozentualer Vergleich der mit den drei Methoden erfaßten Glykogenmenge.

Thrombocyten, die vor Anwendung der enzymatischen Bestimmung zweimal mit NaCl-Lösung (0,9%) gewaschen worden waren ( $n = 9$ ), wiesen einen Glykogen-Bestand von  $2,69 \pm 0,17$  mg/g auf, gegenüber  $1,93 \pm 0,11$  mg/g bei den aus Plasma isolierten Zellen. Unter Berücksichtigung der festeren Packung der Zellen im Plättchen/Elektrolytmedium-Sediment als im Plättchen/Plasma-Sediment (Intercellularraum durchschnittlich 30% gegenüber 40%; Eichler *et al.*) konnte man bei mit NaCl-Lösung gewaschenen Thrombocyten eine um das 1,165fache höhere Glykogenkonzentration erwarten. Wir fanden aber das 1,39fache, also 19,5% mehr. Es wirkt sich dabei wahrscheinlich u.a. die gegenüber den anderen beiden Gruppen um die Hälfte kleinere Anzahl der Versuchstiere aus.

Die hier angegebenen Daten decken sich weitgehend mit den früher mitgeteilten (für Methode II  $2,38 \pm 0,08$ %; für Methode III  $2,10 \pm 0,13$ %. Weber *et al.*). Es waren damals allerdings ausschließlich zweimal mit NaCl-Lösung gewaschene Zellen analysiert worden, so daß die Werte um den Faktor 1,165 über den jetzigen liegen sollten. Dies trifft für die seinerzeit nach Methode III bestimmten Werte genau zu, während die mit Methode II gemessenen damals etwas tiefer lagen. Wir führen diese Erscheinung auf methodische Unterschiede zurück, die besonders in der Handhabung der Plättchenmasse nach ihrer Isolierung bestehen: wir trockneten früher die Zellen vor der Behandlung mit KOH; heute geben wir sie dagegen sofort nach der Inkubation in KOH und vermeiden so mit Sicherheit einen bei Trocknungsbeginn nicht auszuschließenden Glykogenabfall.

## 2. Verhalten des enzymatisch ermittelten Glykogenbestandes bei Inkubation und bei Gerinnungsprozessen

Nachdem mit dem enzymatischen Verfahren durchschnittlich nur halb so viel Glykogen nachweisbar war wie mit der Antronmethode, haben wir die früher beschriebenen Versuchsanordnungen wieder aufgegriffen und geprüft, wie sich diese Glykogenanteile bei Inkubation oder im Gerinnungsablauf verhalten. Die durchschnittlichen Kurvenverläufe sind in Abbildung 1a und 1b wiedergegeben.

Die Gegenüberstellung mit den früheren durch KOH/Antron erhaltenen Resultaten ergibt qualitativ eine fast völlige Übereinstimmung: im Plasmamilieu erfolgt der langsamste Glykogen-Abbau, während Plättchen in Elektrolytmedien oder nach Auslösen von Gerinnungsprozessen sowohl im Plasma wie in Salzlösungen einen rapiden Verlust des Polysaccharides erleiden. In der Plättchen-Plasma-Suspension läßt sich der Effekt von Thrombin und  $\text{CaCl}_2$  an Hand der verschiedenen Zerfalls geschwindigkeiten differenzieren; für die Zellaufschwemmung im Elektrolytmedium trifft dies nicht zu. In quantitativer Hinsicht fällt auf, daß jetzt der sich schließlich

einstellende, konstante Glykogenspiegel nur 20% oder weniger des Ausgangswertes beträgt, damals bei Ausführung der Analyse mit KOH/Anthron bei rund 30% oder höher lag.

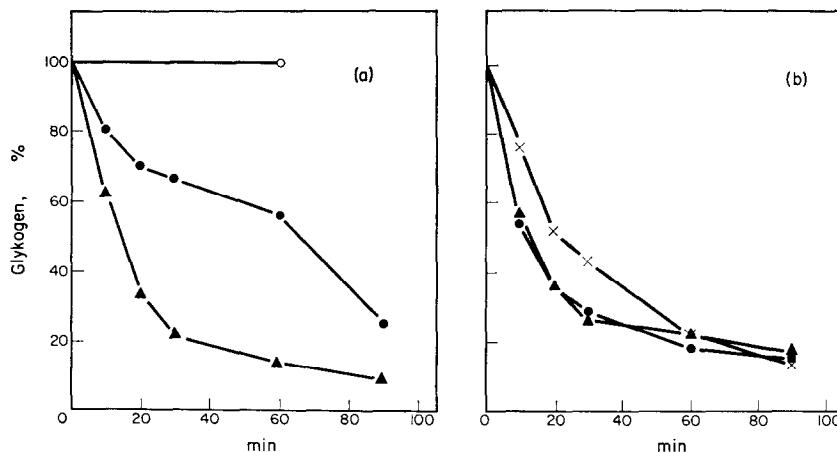


ABB. 1. Verhalten des mit KOH/enzymatischer Bestimmung (Methode I) erfaßten Glykogenbestandes von Plättchensuspensionen bei 37°. Die Kurven geben durchschnittliche Werte aus 3-9 Versuchen, ausgedrückt in Prozenten des Ausgangswertes, wieder.

- (a) Plättchenaufschwemmung in EDTA-haltigem Plasma, ohne weiteren Zusatz —○—○—, nach Auslösen der Blutgerinnung durch Thrombin (4 NIH-E/0,25 ml) —●—●— oder durch 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (5  $\mu\text{l}/0,2 \text{ ml}$ ) —▲—▲—.
- (b) Plättchenaufschwemmung in Elektrolytlösung, ohne weiteren Zusatz —×—×—, nach 4 NIH-E Thrombin/0,25 ml oder nach Gerinnungseinleitung in fibrinogenhaltigem Milieu durch Thrombin und 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (5  $\mu\text{l}/0,2 \text{ ml}$ ) —▲—▲—.

### 3. Unterscheidung von Glykogenfraktionen durch Anwendung von Anthron und enzymatischer Bestimmung

Nachdem sich mit KOH-Antron mehr Glykogen (Fraktion A) nachweisen ließ als mit KOH/ enzymatische Bestimmung (Fraktion e), konnte das Verhalten der unbekannten, nur mit Anthron faßbaren Glykogenfraktion a über die Beziehung  $A = e + a$  berechnet werden. Die Verminderung dieser drei Fraktionen in Blutplättchen während der Gerinnung, ausgelöst durch Thrombin oder  $\text{CaCl}_2$  ist in Abbildung 2a und 2b dargestellt. Die unterste Kurve ist jeweils mit Hilfe der enzymatischen Methode\* und die mittlere durch Anwendung von Anthronreagenz gewonnen.

Die oberste Kurve zeigt den berechneten Verlauf von Fraktion a auf.

Die mit Anthron erhaltene Kurve ist der Arbeit von Weber und Unger entnommen. Die dort auf die jeweils mitlaufende Kontrolle des betreffenden Zeitpunktes bezogenen Prozentangaben sind jetzt von dem gleich 100% gesetzten Ausgangswert abgeleitet.

Es stellt sich heraus, daß im allgemeinen der Glykogenverlust in Plättchen, die bei 37° in Plasma inkubiert sind—zumindest innerhalb der ersten 90 Minuten—weniger stark ist, als wir unseren ersten Versuchen entnommen haben, nach denen innerhalb zweier Stunden 50% des ursprünglichen Vorrates verloren gingen. Es stehen inzwischen den früher mitgeteilten vier Versuchen mehr als 25 gegenüber, die bestätigen, daß tatsächlich im genannten Zeitraum die Glykogenkonzentration sich nur wenig ändert. Gewisse methodische Unterschiede, die zum Teil oben erwähnt wurden, könnten für diese Differenzen von Bedeutung sein.

\* Diese beiden Kurven sind identisch mit zwei der in Abb. 1a dargestellten.

Abbildung 2a und 2b macht deutlich, daß in Blutplättchen, welche an Gerinnungsvorgängen teilnehmen, in den ersten 30 Minuten nicht nur die mit der enzymatischen Methode gemessene Fraktion e, sondern gleichzeitig auch die nur mit Anthron zu fassende Fraktion a abnimmt. Dies gilt unabhängig davon, ob die Gerinnung durch Thrombin oder durch  $\text{CaCl}_2$  in Gang gebracht wurde.

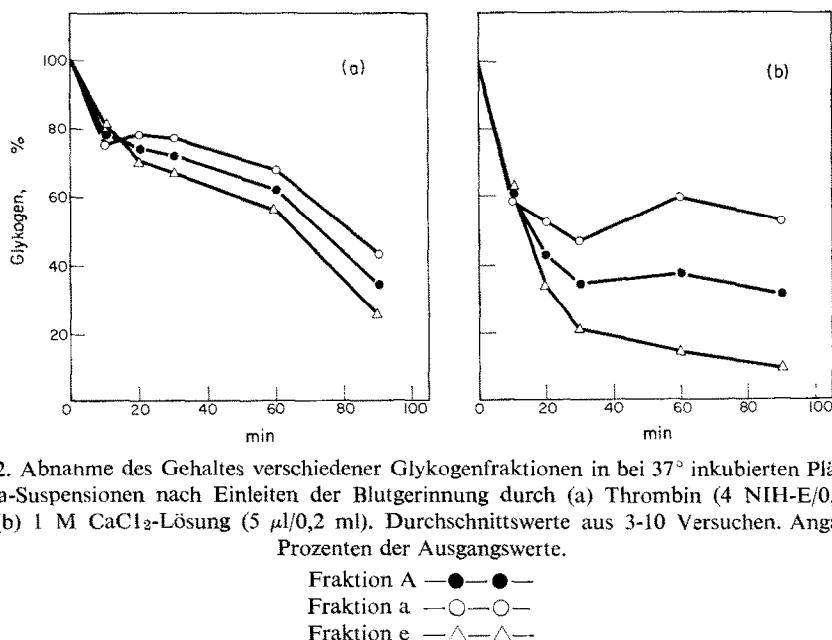


ABB. 2. Abnahme des Gehaltes verschiedener Glykogenfraktionen in bei  $37^\circ$  inkubierten Plättchen-Plasma-Suspensionen nach Einleiten der Blutgerinnung durch (a) Thrombin (4 NIH-E/0,25 ml) oder (b) 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (5  $\mu\text{l}/0,2$  ml). Durchschnittswerte aus 3-10 Versuchen. Angaben in Prozenten der Ausgangswerte.

Fraktion A —●—●—  
 Fraktion a —○—○—  
 Fraktion e —△—△—

In allen Fraktionen ist die Zerfallsgeschwindigkeit bis zur 10. Minute gleich und verringert sich dann in den drei Fraktionen, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß. Sie ist am geringsten in Fraktion a.

Eine entsprechende Betrachtung des Verhaltens der drei Glykogenfraktionen in Plättchen, die in Elektrolytlösung bei  $37^\circ$  ohne weitere Zusätze gehalten wurden, ist den stark umrandeten Rubriken der Tabelle 2 zu entnehmen.

TABELLE 2. ABBAU VERSCHIEDENER GLYKOGENFRAKTIONEN IN PLÄTTCHEN/PLASMA/SUSPENSIONEN NACH AUSLÖSEN DER GERINNUNG DURCH RECALCIFIZIERUNG ODER DURCH THROMBIN SOWIE IN PLÄTTCHEN/ELEKTROLYTLÖSUNG-SUSPENSIONEN BEI INKUBATION. AUFBEWAHRUNGSTEMPERATUR IN ALLEN FÄLLEN  $37^\circ$ .

| Min. | Fraktion A                                |          | Glykogen (%) |   |          |       | Fraktion a                                |          |       |
|------|---|----------|--------------|---|----------|-------|---|----------|-------|
|      | Gerinnungsauslösung durch $\text{CaCl}_2$ | Thrombin | Inku-        | Gerinnungsauslösung durch $\text{CaCl}_2$ | Thrombin | Inku- | Gerinnungsauslösung durch $\text{CaCl}_2$ | Thrombin | Inku- |
| 10   | 100                                       | 100      | 100          | 100                                       | 100      | 100   | 100                                       | 100      | 100   |
| 20   | 70  | 95       | 88           | 54  | 86       | 70    | 88  | 104      | 106   |
| 30   | 56  | 92       | 73           | 33  | 83       | 57    | 80  | 103      | 89    |

Die Form der Gegenüberstellung mußte hier modifiziert werden, weil in den zur Auswertung mithin angezogenen Experimenten von Weber und Unger die ersten Messungen mit der Anthronmethode erst nach 10 Minuten erfolgt waren. Diese Resultate waren damals als Bezugsbasis gewählt und gleich 100% gesetzt worden. Beim Vergleich mit den jetzt auf enzymatischem Weg gewonnenen Ergebnissen wurde daher bei der Berechnung des prozentualen Glykogengehaltes ebenfalls von der 10. Minute ausgegangen.

Auch bei Inkubation der Plättchen in Elektrolytlösung geht die Abnahme der Fraktion a am langsamsten vonstatten. Sie ist 10 Minuten nach Beginn der Messung noch vollständig erhalten und hat sich nach weiteren 10 Minuten erst um etwa 10% verringert.

Wir haben die gleiche Art der Berechnung —Glykogenbestand in der 10 Minute als Bezugspunkt— auch für die Gerinnungsversuche angewandt und zum Vergleich ebenfalls in Tab. 2 eingetragen. Diese Art der Darstellung für die 3 Versuchsanordnungen erscheint gerechtfertigt durch den Umstand, daß Differenzen in der Abbaugeschwindigkeit erst ab der 10. Minute einsetzen. Es bestätigt sich die gegenüber Fraktion a größere Labilität der Fraktionen A und e. Es wird evident, was sich bereits aus dem Kurvenverlauf in Abb. 2a und 2b herauslesen läßt, daß in den mit Thrombin versetzten Suspensionen Fraktion a innerhalb 30 Minuten nicht weiter abnimmt, ähnlich wie bei Inkubation der Plättchen im Elektrolytmedium. Erst nach 60 Minuten setzt ein schnellerer Zerfall in den 3 Glykogenfraktionen ein, der wahrscheinlich mit einer Desintegration der Plättchen zusammenhängt. Induziert man dagegen den Gerinnungsvorgang durch Recalzifizierung, so bleibt Fraktion a zwar die stabilste Fraktion, verliert aber doch sukzessive an Umfang.

#### 4. Unterscheidung von Glykogenfraktionen durch Anwendung von Trichloressigsäure und KOH

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3a und 3b graphisch wiedergegeben. In beiden Darstellungen liegt die Kurve des Rückstandes über der des TCE-löslichen Glykogens. Dies bedeutet, daß unter den Bedingungen beider Versuchsanordnungen die Abbaugeschwindigkeit der nur durch KOH extrahierbaren Fraktion geringer ist.

Die Unregelmäßigkeiten im Verlauf der Kurve, welche den Glykogengehalt im Rückstand aufzeichnet, sind bedingt durch die sich hier stärker auswirkende Streubreite der Methodik. Schon bei Inkubationsbeginn sind nur rund 10% des Gesamtglykogens im Rückstand enthalten. Es stehen anfangs durchschnittlich 1,75 mg Glykogen/g feuchte Plättchenmasse in der TCE-Fraktion 0,172 mg/g im Rückstand gegenüber.

Führt man eine Signifikanzberechnung der Mittelwertsunterschiede der Abbaurate von Glykogen im TCE-Extrakt und in dessen Rückstand durch, so ergibt sich für die recalzifizierten Plättchen/Plasma-Proben in jedem gemessenen Zeitpunkt ein p-Wert, der gleich oder kleiner ist als 0,05 (Tabelle 3). In den in Elektrolytlösungen suspendierten Zellen wird diese Grenze erst nach 30 Min unterschritten.

Die Höhe des Absolutwertes von p sowie die Art des Kurvenlaufes lassen es möglich erscheinen, daß bei Erhöhung der Versuchszahl auch in Plättchen/Elektrolytlösung-Suspensionen schon zu einem früheren Zeitpunkt signifikante Differenzen erreicht werden.

#### DISKUSSION

Die dargestellten Befunde zeigen, daß man bei dem Versuch, die quantitativen Veränderungen von Blutplättchenglykogen mit verschiedenen Methoden zu erfassen, keine einheitlichen Resultate erhält. Offensichtlich messen die verschiedenen Me-

thoden nur teilweise das gleiche Substrat. Wie aus unseren Experimenten hervorgeht, erfaßt die Anthronmethode annähernd das Doppelte (Fraktion A) der enzymatischen Methode (Fraktion e). Es wird die Beziehung  $A = e + a$  angewandt, in der a den

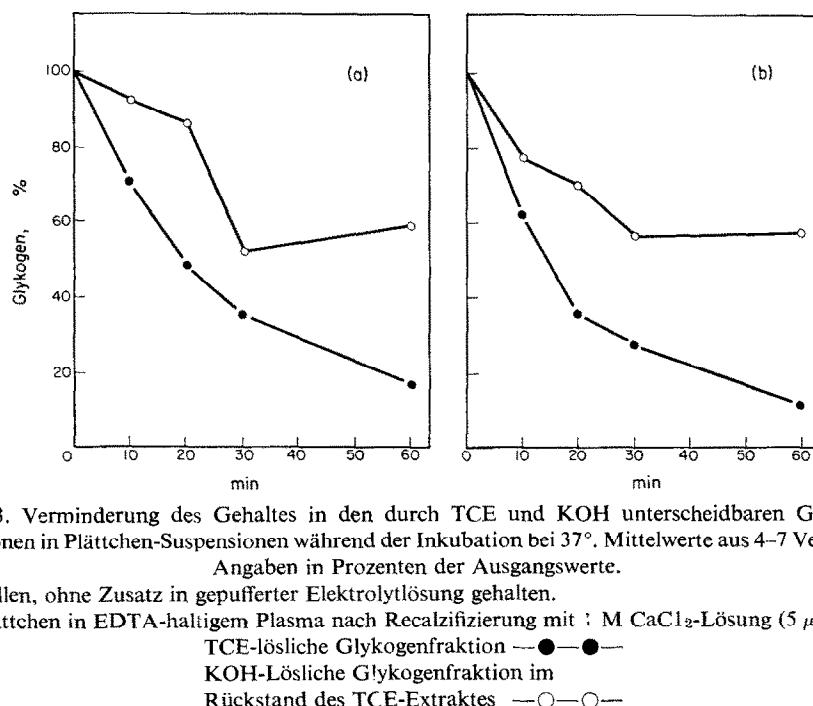


ABB. 3. Verminderung des Gehaltes in den durch TCE und KOH unterscheidbaren Glykogenfraktionen in Plättchen-Suspensionen während der Inkubation bei 37°. Mittelwerte aus 4-7 Versuchen.

Angaben in Prozenten der Ausgangswerte.

(a) Zellen, ohne Zusatz in gepufferter Elektrolytlösung gehalten.

(b) Plättchen in EDTA-haltigem Plasma nach Recalzifizierung mit: M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung ( $5 \mu\text{l}/0,2 \text{ ml}$ )

TCE-lösliche Glykogenfraktion —●—●—  
 KOH-Lösliche Glykogenfraktion im  
 Rückstand des TCE-Extraktes —○—○—

TABELLE 3. BERECHNUNG DER SIGNIFIKANZ VON MITTELWERTSDIFFERENZEN DER ABBAURATE DER DURCH TCE UND KOH UNTERSCHIEDBAREN GLYKOGENFRAKTIONEN IN PLÄTTCHENSUSPENSIONEN BEI 37°. A: ZELLEN NACH ZWEIMALIGEM WASCHEN IN ELEKTROLYTLÖSUNG SUSPENDIERT; B: ZELLEN IN RECALZIFIZIERTEM EDTA-PLASMA

| Min. | A                                   | B                                    |
|------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 10   | $p < 0,2$<br>$n = 4$<br>$t = 1,81$  | $p < 0,05$<br>$n = 7$<br>$t = 2,28$  |
| 20   | $p < 0,1$<br>$n = 4$<br>$t = 2,00$  | $p < 0,05$<br>$n = 5$<br>$t = 2,40$  |
| 30   | $p < 0,05$<br>$n = 4$<br>$t = 2,72$ | $p < 0,01$<br>$n = 5$<br>$t = 7,39$  |
| 60   | $p < 0,02$<br>$n = 4$<br>$t = 3,79$ | $p < 0,001$<br>$n = 5$<br>$t = 5,37$ |

“Glykogen”-Anteil bezeichnet, der zwar durch Anthron, nicht aber durch die enzymatische Methode bestimmt wird.

Die interessierende Frage, um welche Verbindung(en) es sich bei dem durch Anthron zusätzlich erfaßten “Glykogen” handelt, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

Anthron ist ein universelles Reagenz auf Kohlenhydrate; die Behandlung der Gewebsextrakte mit 30% KOH bei 100° und die anschließende Ausfällung mit Alkohol eliminieren aber naturgemäß eine Reihe der interferierenden Substanzen.

Es hat sich weiterhin herausgestellt, daß die Glykogenabnahme in Thrombocyten bei Inkubation oder während der Gerinnung nicht nur auf Kosten von Fraktion a oder e erfolgt. Beide Fraktionen verringern sich bei der Gerinnung nur innerhalb der ersten 10 Minuten in gleichem Ausmaß, dann bleibt die Zerfallsgeschwindigkeit von Fraktion a deutlich hinter der von Fraktion e zurück. Es läßt sich ab diesem Zeitpunkt auch zwischen beiden Arten der Gerinnungsauslösung unterscheiden. In den mit Thrombin versetzten, gerinnenden Proben nimmt Fraktion a innerhalb der nächsten 20 Minuten nicht mehr weiter ab, wohl aber, wenn auch nur geringsfügig, in den recalzifizierten Ansätzen. Ähnlich wie die Plättchen/Plasma-Suspensionen mit Thrombin verhalten sich die in Elektrolytmilieu suspendierten Zellen.

Diese Beobachtungen lassen zunächst zwei Interpretationen zu. Fraktion a wird nur im Fall der recalzifizierten Plättchen/Plasma-Suspensionen in stärkerem Maße abgebaut, in Ansätzen also, die von der Vorphase bis zur Retraktion den kompletten Gerinnungsvorgang durchlaufen. Im Gegensatz hierzu werden bei den mit Thrombin versetzten Proben die Vorphase sowie die erste Phase übersprungen und die Retraktion kommt nicht in Gang (EDTA-Plasma!). Die Fraktion a ist an einer oder mehreren dieser Phasen beteiligt. Der zeitliche Verlauf—keine schnellere Abnahme als in den anderen Fraktionen zu Anfang, dagegen anhaltender Abbau nach 10 Minuten im Falle der recalzifizierten Proben—spricht für die Mitwirkung von Fraktion a bei der Retraktion. Offenbar bestehen Unterschiede in der funktionellen Wertigkeit dieser Fraktionen.

Fernerhin hat sich in unseren Versuchen die öfters beschriebene Erscheinung bestätigt, daß die quantitativen Veränderungen im TCE-unlöslichen, nur mit KOH extrahierbaren Glykogenrückstand nicht identisch sind. Sowohl bei Inkubation wie auch bei Beteiligung der Zellen an der Blutgerinnung *in vitro* (Recalzifizierung) zersetzen sich die beiden Fraktionen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Selbst wenn mit der Bezeichnung TCE-lösliche und KOH-lösliche Fraktion eine willkürliche Trennung des Glykogenpools in Abhängigkeit der Wirksamkeit der angewandten Methoden (z.B. Intensität des Homogenisierens; vergl. Roe u. Mit.) durchgeführt wird, ändert sich nichts an der Tatsache, daß dieses Glykogenpool nicht einheitlicher Natur zu sein scheint.

Früher hatte man geglaubt, diese unterscheidbaren Fraktionen durch eine Bindung an verschiedene chemische Bestandteile der Zelle, z.B. Proteine, erklären zu können. Heute ist es durch die Kenntnisse, welche uns die Elektronenmikroskopie und die biochemische Aufarbeitung fraktionierter Zellhomogenate vermittelt haben, am wahrscheinlichsten geworden, daß Glykogen nicht nur im Zytoplasma verteilt ist, sondern auch bestimmten Zellstrukturen zugeordnet sein kann. Diese Verteilung variiert nach Untersuchungen von Tata an der Hundeleber in reversibler Weise mit dem Funktionszustand der Zelle. Eine enge Bindung zwischen Glykogen und seinen synthetisierenden und spaltenden Fermenten besteht ebenfalls (Sutherland u. Wosilait; Leloir u. Goldemberg; Tata). In diesen Gegebenheiten könnte der Schlüssel zur Deutung der veränderlichen Extrahierbarkeit von Glykogen liegen.

Die prinzipiell gleichartige Ausstattung der Thrombocyten mit Ultrastrukturen (De Marsh, Kautz u. Motulsky; Feissly, Gautier u. Marcovici; Schultz u. Hiepler;

u.a.m.; Literaturliste siehe bei Marcovici, Gautier u. Jean), wie wir sie auch von anderen tierischen Tellen kennen, läßt es sicher erscheinen, daß auch in dieser spezialisierten Zellart mit ähnlichen Vorgängen zu rechnen ist. Damit wäre die wechselnde Festigkeit der Glykogenbindung innerhalb der Zellen erklärt (Zur Lokalisierung von Glykogen in Blutplättchen mit elektronenmikroskopischer Technik siehe Jean u. Gautier).

Unsere Befunde zeigen, daß der funktionellen Unterscheidbarkeit von Glykogenfraktionen durch Extraktion mit KOH und TCE als weitere Möglichkeit die Anwendung von Anthron und enzymatischer Methode zur Seite gestellt werden kann. Bei den auf diese Weise zu differenzierenden Fraktionen handelt es sich den vorgelegten Resultaten nach nicht um identische Verbindungen.

### ZUSAMMENFASSUNG

In Blutplättchen vom Schwein wurde nach Extraktion mit KOH Glykogen quantitativ durch enzymatische Bestimmung der aus ihm nach saurer Hydrolyse freigesetzten Glucose bestimmt. Durchschnittlich enthielt die trockene Plättchenmasse  $1,14 \pm 0,051$  % Glykogen. Vergleichsweise mit Anthron gemessene Extrakte ergaben annähernd das Doppelte dieses Wertes.

Beim Einhalten von Bedingungen unter denen Glykogen in den Thrombocyten rasch zerfällt (Inkubation bei  $37^\circ$  im Elektrolytmilieu; Einleiten der Blutgerinnung *in vitro*) nahm sowohl die mit der enzymatischen Methode gemessene Glykogenfraktion e wie auch die nur durch Anthron zu fassende Glykogenfraktion a ab. Die Kinetik der Glykogenverminderung innerhalb dieser Fraktionen variierte mit den gewählten Bedingungen.

Die durch KOH und TCE unterscheidbaren Glykogenfraktionen zeigten unter den eben erwähnten Bedingungen ebenfalls Differenzen in der Abbaugeschwindigkeit.

### LITERATURVERZEICHNIS

1. H. BALZER und D. PALM, *Arch. exp. Pathol. Pharmakol.* **243**, 65 (1962).
2. W. L. BLOOM und G. C. KNOWLTON, *Am. J. Physiol.* **173**, 545 (1953).
3. W. L. BLOOM, G. T. LEWIS, M. Z. SCHUMPERT und T. SHEN, *J. Biol. Chem.* **188**, 631 (1951).
4. Q. B. DE MARSH, J. KAUTZ und A. G. MOTULSKY, *J. clin. Investig.* **34**, 929 (1955).
5. O. EICHLER, E. WEBER und M. PURWAHAB, *Z. physiol. Chemie* **325**, 97 (1961).
6. R. FEISLY, A. GAUTIER und J. MARCOVICI, *Rev. Hematol.* **12**, 397 (1957).
7. E. FIGUERO und A. PFEIFER, *Arch. Biochem.* **99**, 357 (1962).
8. J. FONG, F. L. SCHÄFFER und P. L. KIRK, *Arch. biochem. Biophys.* **45**, 319 (1953).
9. G. JEAN und A. GAUTIER, *C.r. Acad. Sci.* **253**, 2274 (1961).
10. A. J. M. KITS van HEIJNINGEN, *Arch. biochem. biophys.* **102**, 456 (1963).
11. S. B. KORITZ und A. MUNK, *Biochim. biophys. Act.* **39**, 543 (1960).
12. L. F. LELOIR und S. H. GOLDEMBERG, *J. biol. Chem.* **235**, 919 (1960).
13. G. W. LÖHR, H. D. WALLER und R. GROSS, *Dtsch. med. Wschr.* **86**, 897 (1961).
14. M. LOURAU und F. MEYER, *J. Physiol. (Paris)* **50**, 5 (1958).
15. I. MARCOVICI, A. GAUTIER und G. JEAN, *Haematologica* **46**, 921 (1961).
16. A. W. MERRICK und D. K. MEYER, *Am. J. Physiol.* **177**, 441 (1954).
17. J. OLSEN, A. DAHLQUIST und A. NORDEN, *Act. med. Scand.* **174**, 123 (1963).
18. W. S. PLATNER, J. L. SHIELDS und F. A. PURDY, *Am. J. Physiol.* **207**, 42 (1964).
19. J. H. ROE, J. M. BALEY, R. R. GRAY und J. N. ROBINSON, *J. biol. Chem.* **236**, 1244 (1961).
20. J. A. RUSSEL und W. L. BLOOM, *Am. J. Physiol.* **183**, 345 (1955).
21. H. SCHULZ und E. HIEPLER, *Klin. Wschr.* **37**, 273 (1959).
22. S. SEIFTER, S. DAYTON, B. NOVIC und E. MUNTWYLER, *Arch. biochem. Biophys.* **25**, 191 (1950).

23. M. R. STETTEN und D. STETTEN JR., *J. biol. Chem.* **207**, 331 (1954).
24. M. R. STETTEN, H. M. KATZEN und D. STETTEN JR., *J. biol. Chem.* **232**, 475 (1958).
25. E. W. SUTHERLAND und W. D. WOSILAIT, *J. biol. Chem.* **218**, 459 (1956).
26. J. R. TATA, *Biochem. J.* **90**, 284 (1964).
27. J. VAN DER VIES, *Biochem. J.* **57**, 410 (1954).
28. E. WEBER, W. LITTMANN und R. FREITAG, *Biochem. Pharmac.* **12**, 145 (1963).
29. E. WEBER und W. UNGER, *Biochem. Pharmac.* **13**, 23 (1964).
30. E. E. WOODSIDE und W. KOCHOLATY, *Blood* **16**, 1173 (1960).