

Über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher Thrombozyten*)

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Marburg/Lahn (Direktor: Prof. Dr. H. E. Bock)

H. D. Waller, G. W. Löhr, F. Grignani**), R. Gross

Unter den geformten Blutelementen nehmen die Thrombozyten als kernlose, zytoplasmatische Abkömmlinge der Megakariozyten mit Vakuolen, Mikrosomen und Mitochondrien schon morphologisch eine Sonderstellung ein, die ihrer komplexen Funktion in der Blutstillung und Blutgerinnung entspricht (neuere Übersichten u. a. bei Deutsch; Lüscher [1, 2] und Maupin [1]). Aus ihrer morphologischen Struktur lassen sich bereits wesentliche Stoffwechseleigenschaften ableiten: Als kernlose Zellen enthalten sie keine Desoxyribonucleinsäure, während der Gehalt an Ribonucleinsäuren verschieden beurteilt wird (Bestelli und Croci; Green; Maupin; Wagner). In ihrem Zytoplasma besitzen die Thrombozyten Enzyme der Glykolyse; das Vorhandensein von Mitochondrien läßt zusätzlich die Gegenwart des Zitronensäurezyklus und der Atmungskette erwarten. Der von verschiedenen Autoren (Bestelli und Croci, Born, Fantl und Ward, Lüscher [3] u. a.) beschriebene Gehalt der Thrombozyten an energiereichen Verbindungen, der weit über den zur Erhaltung der Plättchen erforderlichen Energiebedarf hinausgeht, macht eine Beziehung zwischen den energieliefernden Reaktionen und den mechanischen Funktionen der Thrombozyten wahrscheinlich.

Da dem Kohlenhydratstoffwechsel für die Energiebildung die größte Bedeutung zukommt, haben wir in der vorliegenden Arbeit in den Thrombozyten die Enzyme der Glykolyse, des Pentosephosphat- und des Zitronensäurezyklus und der Atmungskette quantitativ untersucht, um zu prüfen, ob die Plättchen diese

*) Die Untersuchungen wurden durch eine Beihilfe des Marburger Universitätsbundes wesentlich gefördert. Wir danken ferner der Fa. C. F. Boehringer u. Söhne, Mannheim, und der Deutschen Laevosan-Gesellschaft für die großzügige Überlassung von Enzymen, Coenzymen und Substraten.

**) Assistentente presso L'Istituto di Patologia medica dell'Universita di Cagliari (Italia), z. Z. Stipendiat des Europarates an der Medizinischen Universitätsklinik Marburg/Lahn.

drei Wege des Kohlenhydratabbaues komplett besitzen und somit aus der Sicht des Energiestoffwechsels als intakte Zellen anzusehen sind.

Außerdem wurde der Stoffwechsel mit seinen intermediären- und Endprodukten gemessen. Verschiedene Arbeiten über die Thrombozyten zeigten bereits das Vorhandensein eines Kohlenhydratstoffwechsels, wenn bisher auch nur vereinzelte Enzyme des Zuckerabbaues, wie die Milchsäuredehydrogenase (Campbell, Small und Dameshek; Koppel und Olwin; Wagner, Meyericks und Sparaco) und Succinodehydrogenase (Sumai und Bajes; Koppel und Olwin) quantitativ, halbquantitativ oder histochemisch bestimmt wurden. Andererseits hielt ein so sorgfältiger Untersucher wie Tullis noch 1953 eine Stoffwechselaktivität frisch isolierter oder konservierter Plättchen nicht für bewiesen. Summarische Messungen von Atmung und Glykolyse wurden von Bounameaux, Campbell und Mitarbeitern, Lüscher sowie Maupin (2) durchgeführt.

Glykogen wiesen u. a. Biachi und Bertelli, Gibb und Stowell, Heckner, Storti und Mitarbeiter, Wislocki u. a. nach. Andere Arbeiten befaßten sich mit dem Gehalt der Thrombozyten an Transaminasen, Peptidasen, ATPasen, Katalase, Peroxydase, Lipase, β -Glukuronidase, saurer Phosphatase, Sulfatasen, Karboanhydrasen, Histaminase, Glutathionreduktase. (Neueste Übersicht und Lit. bei Zucker und Borelli). Untersuchungen über zusammenhängende Enzymketten und deren Turnoverrate liegen u. W. für die Thrombozyten bisher nicht vor.

I. Methodik

A. Thrombozytengewinnung und -präparation

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ausschließlich Blut von klinisch gesunden Blutspendern verwandt. Die Entnahme erfolgte mittels silikonisierter V_2A -Kanülen, Blutabnahmegarnitur „Donafix“ der Firma Braun, Melsungen, mit Plastikschläuchen, silikonisierten, vorgekühlten Konservengläsern. Als Antikoagulans diente einheitlich eine 1%ige Lösung von Dinatriumaethylendiamintetraacetat (Sequestrene-Alrose bzw. Titriplex III-Bayer) in 0,7%iger Kochsalzlösung. Jeweils 405 ccm Blut wurden durch ein leichtes Vakuum in 45 ccm dieser Lösung eingeleitet. Die weitere Verarbeitung erfolgte ausschließlich in silikonisierten Gläsern, Pipetten usw. (Silikon Wacker „WS 60“). Das vorgemischte „Konservenblut“ wurde gleich nach der Entnahme in kleinen Zentrifugengläsern (8 ccm) bei $+4^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten bei 1000 r (= 100 g) zentrifugiert (Phywe „Eispirouette“), vorsichtig abpipettiert, in vorgekühlten Zentrifugengläsern von rund 50 ccm Inhalt gesammelt und bei $+4^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten mit 3000 r/min (= 1040 g) zentrifugiert. Das überstehende thrombozytenarme Plasma wurde durch Dekantieren entfernt, das Sediment anschließend mit einem Holzstäbchen vorsichtig aufgerührt. Die Thrombozyten wurden — je nach der in den einzelnen Abschnitten bezeichneten Methode — ungewaschen oder 1- bis 3mal mit physiologischer Kochsalzlösung in der Kühlzentrifuge gewaschen, in folgenden Suspensionsmitteln auf die gewünschte Zahl eingestellt:

1. *Humanalbumin — Kochsalz — Phosphatpuffer:*

- 8,1 g NaCl
 0,174 g KH_2PO_4
 0,960 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 15,0 g Humanalbumin, Aqua dest. ad 1000 ml.

2. *Bikarbonat-Ringer-Glukose-Lösung:*

(in kalziumfreier Modifikation)

- a) 6,2 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,1 g MgCl_2 ,
 2,0 g NaHCO_3 , Aqua dest ad 1000 ml.
 b) 97,0 ml Lösung (a) + 3,0 ml m/15 Phosphatpuffer
 nach Sørensen, pH 7,4 + 0,2 g Glukose.

Alle Thrombozytenzählungen wurden als Doppelbestimmungen nach der Technik von Feissly und Lüdin im Phasenkontrastmikroskop durchgeführt. Gezählt wurden jeweils die Thrombozyten im ersten Zentrifugat, im zweiten Zentrifugat, im überstehenden thrombozytenarmen Plasma, bei Waschungen ferner jeweils im Überstand und im resuspendierten Bodensatz, um durch Vergleich die Thrombozytenverluste und die Anwesenheit fermenthaltiger Thrombozytenrümpfer für die Bezugsgröße zu bestimmen. Bei einigen Untersuchungen wurden Kontrollen durch vergleichende Trübungsmessungen, Stickstoff- und Phosphorbestimmungen nach den von Gross und Schwick (1) angegebenen Verfahren durchgeführt.

B. Enzymbestimmungen

Für die optischen Enzymbestimmungen wurden die Thrombozyten zytolysiert: 1 Volumteil Thrombozyten + 1 Volumteil m/20 Triäthanolaminpuffer pH 7,5 (TRAP) (7,5 g redest. Triäthanolamin, 15 ml 2 n HCl, 2,0 Äthylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz, quartzdest. Wasser ad 1000 ml) + 1 Volumteil quartzdest. Wasser + 0,3 Volumteil gesättigte wäßrige Digitoninlösung.

Nach 1stündiger Zytolyse Abtrennung der Stromata auf der Zentrifuge bei 3000 U./Min. über 10 Minuten.

Optische Tests:

Alle Fermentbestimmungen wurden bei pH 7,5, 25° C mit einer durchströmten Testküvette, einem Testvolumen von 2,0 bzw. 4,0 ml und einer Schichtdicke $d = 1,0$ bzw. 2,0 cm im Photometer „Eppendorf“ bei einer Wellenlänge von 366 m μ durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Fermentaktivität nach Bücher durch Bestimmung der Laufzeit der Reaktion zwischen zwei Extinktionsmarken gemessen. Laufzeit bei „fliegendem Start“ nach einem Vorlauf von 0,03 Extinktionsänderung für eine Extinktionsabnahme von 0,1 (dek. log.) in sec. ($\lg \frac{J_0}{J} = 0,030$ bis $\lg \frac{J_0}{J} = 0,130$).

$$\lg \frac{J_0}{J}$$

Als eine Fermenteinheit E bezeichnet Bücher

$$E = \frac{100}{\Delta t \text{ (sec.)}}$$

Eine Bücher-Einheit entspricht somit dem Substratumsatz von $1 \text{ mal } 10^{-6}$ Mol je Minute und je ml Testansatz.

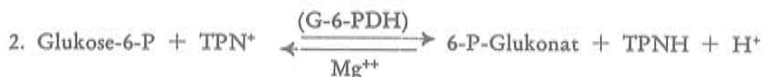
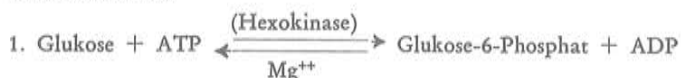
Wir bestimmten in den Thrombozyten die folgenden Fermente (Abkürzungen in Klammern):

Hexokinase	(Hexok.)
Diphosphofruktosealdolase	(Aldolase)
Trioseisomerase	(TIM)
L- α -Glycerophosphatdehydrogenase = Baranowski-Enzym	(GDH)

Phosphoglyceraldehyddehydrogenase	(PGADH)
3-Phosphoglycerat-1-Kinase	(PGK)
Enolase	
Pyruvatkinase	(PK)
Milchsäuredehydrogenase	(MDH)
Glukose-6-Phosphatdehydrogenase = Warburgsches Zwischenferment	(G-6-PDH)
6-Phosphogluconatdehydrogenase	(6-PGDH)
TPNH ₂ -Oxydase	
Isozitrone säuredehydrogenase	(IDH)
Succinodehydrogenase	(SuDH)
Äpfelsäuredehydrogenase	(ADH)
Myokinase	(MK)
Mg ⁺⁺ akt. ATPase	
Ca ⁺⁺ akt. ATPase	
Glutamat-Oxalacetattransaminase	(GOT)
Glutamat-Pyruvattransaminase	(GPT)
Alkalische Phosphatase	(Alk. Pase)

Hexokinasebestimmung nach Grignani und Löhr

Reaktionsschema:



Testansatz:

1 × 10⁻⁶ (Mole/ml) Glukose

5 × 10⁻⁷ (Mole/ml) TPN⁺

6,0 BE/ml G-6-PDH

8 × 10⁻⁶ (Mole/ml) MgCl₂

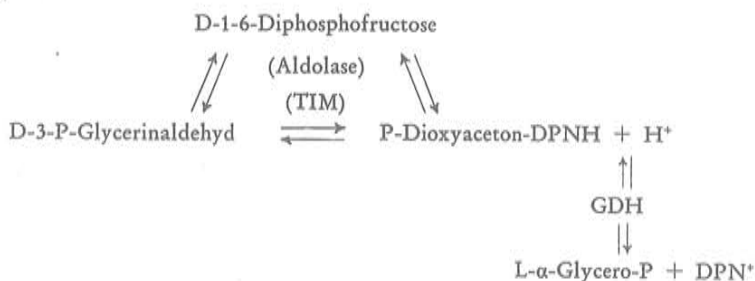
2 × 10⁻⁶ (Mole/ml) NaF

0,5 ml Thrombolysat (entsprechend etwa 1–2 × 10⁸ Plättchen)

TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit 1,92 × 10⁻⁶ Mol ATP/ml Vorlauf von Δext von 0,100.

Aldolasebestimmung nach Racker, Bücher und Mitarbeiter

Reaktionsschema:



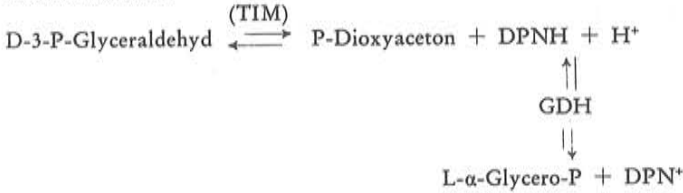
Testansatz:

$1,5 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) DPNH + H⁺
 $2,5 \times 10^{-6}$ (g/ml) GDH
 $0,5 \times 10^{-6}$ (g/ml) TIM
 0,5 ml Thrombolytat (entsprechend etwa $1-2 \times 10^8$ Plättchen)

TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit $4,0 \times 10^{-6}$ (Mole/ml) 1,6-Diphosphofruuctose.

Trioseisomerasebestimmung nach Beisenherz

Reaktionsschema:

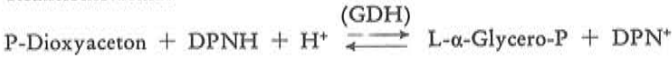
*Testansatz:*

$1,5 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) DPNH + H⁺
 $2,0 \times 10^{-6}$ (g/ml) GDH
 0,1 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 2×10^7 Plättchen)

TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit $3,3 \times 10^{-7}$ (Mole/ml). Triose-P-Esterlösung, die zu 50% P-Glyceraldehyd enthält. Vorlauf bis P-Dioxyaceton verbraucht.

L-α-Glycero-P-Dehydrogenasebestimmung nach Baranowski

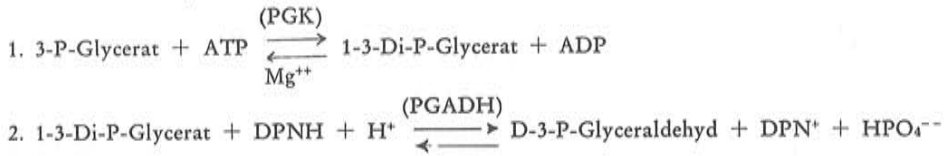
Reaktionsschema:

*Testansatz:*

$1,35 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) DPNH + H⁺
 0,5 ml Thrombolytat (entsprechend $1-2 \times 10^8$ Plättchen)
 TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit $2,0 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) P-Dioxyaceton.

3-Phosphoglyceraldehyddehydrogenasebestimmung nach Bücher und Mitarbeiter

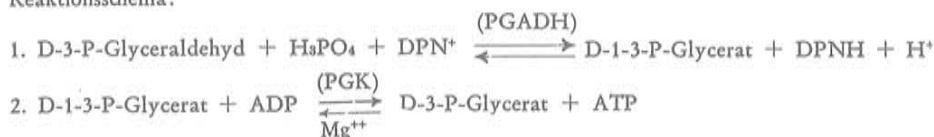
Reaktionsschema: (Rücktest)

*Testansatz:*

$1,2 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) DPNH + H⁺
 $7,0 \times 10^{-5}$ (Mole/ml) 3-P-Glycerat
 $3,3 \times 10^{-6}$ (Mole/ml) MgSO₄
 $1,2 \times 10^{-6}$ (Mole/ml) red. Glutathion (jeweils frisch angesetzt und neutralisiert)
 10,0 (BE/ml) PGK
 0,5 ml Thrombolytat (entsprechend etwa $1-2 \times 10^8$ Plättchen)
 TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit $1,7 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) ATP.

3-Phosphoglycerat-1-Kinasebestimmung nach B ü c h e r

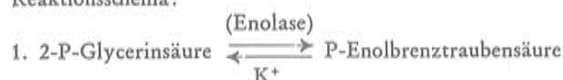
Reaktionsschema:

*Testansatz:*

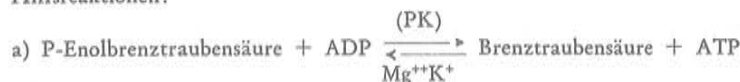
siehe PGADH-Test, jedoch statt PGK Zusatz von PGADH im Überschuß (etwa 20 BE/ml).

Enolasebestimmung nach B ü c h e r

Reaktionsschema:



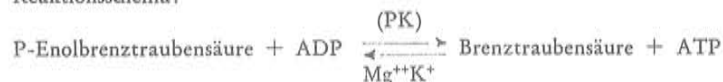
Hilfsreaktionen:

*Testansatz:*

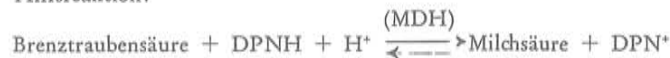
- $2,0 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) ADP
 $7,5 \times 10^{-5}$ (Mole/ml) KCl
 $7,5 \times 10^{-6}$ (Mole/ml) MgSO_4
 $1,5 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) $\text{DPNH} + \text{H}^+$
 $5,0 \times 10^{-6}$ (g/ml) PK
 $5,0 \times 10^{-6}$ (g/ml) MDH
 0,5 ml Thrombolysat (entsprechend $1-2 \times 10^6$ Plättchen)

TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit 6×10^{-7} (Mole/ml) 2-P-Glycerat.*Pyruvatkinasebestimmung nach Negelein*

Reaktionsschema:



Hilfsreaktion:

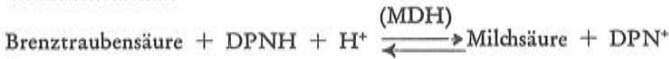
*Testansatz:*

- $1,5 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) $\text{DPNH} + \text{H}^+$
 $2,3 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) ADP
 $8,0 \times 10^{-6}$ (Mole/ml) MgSO_4
 $7,5 \times 10^{-5}$ (Mole/ml) KCl
 $35,0 \times 10^{-6}$ (g/ml) MDH
 0,2 ml Thrombolysat (entsprechend etwa 6×10^7 Plättchen)

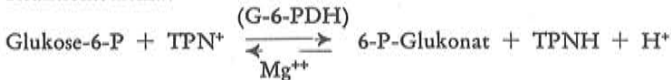
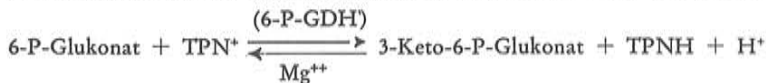
TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit $1,5 \times 10^{-6}$ (Mol/ml) P-BTS.

Milchsäuredehydrogenasebestimmung nach Kubowitz und Ott

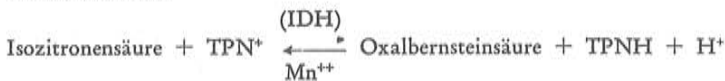
Reaktionsschema:

*Testansatz:*1,5 × 10⁻⁷ (Mole/ml) DPNH + H⁺0,2 ml Thrombolytat (entsprechend 6 × 10⁷ Plättchen)TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit 1,7 × 10⁻⁶ (Mole/ml) Brenztraubensäure.*Glukose-6-Phosphatdehydrogenasebestimmung nach Kornberg und Horecker*

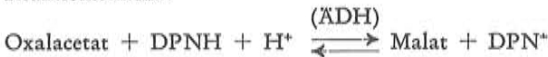
Reaktionsschema:

*Testansatz*1,7 × 10⁻⁷ (Mole/ml) TPN⁺1,25 × 10⁻⁵ (Mole/ml) MgCl₂1,0 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 4—5 × 10⁸ Plättchen)TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit 2,0 × 10⁻⁷ (Mole/ml) Glukose-6-Phosphat.*6-Phosphoglukonatdehydrogenasebestimmung nach Horecker und Smyrniotis**Testansatz:*1,0 × 10⁻⁷ (Mole/ml) TPN⁺1,25 × 10⁻⁵ (Mole/ml) MgCl₂1,0 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 4—5 × 10⁸ Plättchen)TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit 4,8 × 10⁻⁷ (Mole/ml) 6-P-Glukonat.*Isozitrone Säuredehydrogenasebestimmung nach Bücher und Baum*

Reaktionsschema:

*Testansatz:*1,5 × 10⁻⁷ (Mole/ml) TPN⁺4,0 × 10⁻⁶ (Mole/ml) MnSO₄1,0 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 4—5 × 10⁸ Plättchen)TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit 1,3 × 10⁻⁶ (Mole/ml) Isozitrone Säure (allofrei).*Äpfelsäuredehydrogenasebestimmung nach Bücher und Schimassek*

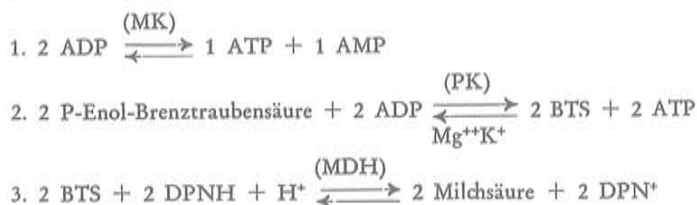
Reaktionsschema:

*Testansatz:*3,0 × 10⁻⁷ (Mole/ml) DPNH + H⁺0,5 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 2 × 10⁸ Plättchen)TRAP ad 2,0 ml, Vorinkubation für 10 Minuten bei 25° C zur Umsetzung der in den Plättchen enthaltenen BTS, Start der Reaktion mit 2 × 10⁻⁶ Mole/ml frisch angesetzter, im Eisbad auf-

bewahrter Oxalacetat (das Oxalacetat wird in wenigen Minuten spontan zu Pyruvat dekarboxyliert und muß deshalb sofort eingesetzt werden).

Adenylkinase- (Myokinase-) Bestimmung nach Adam und Bücher

Reaktionsschema:



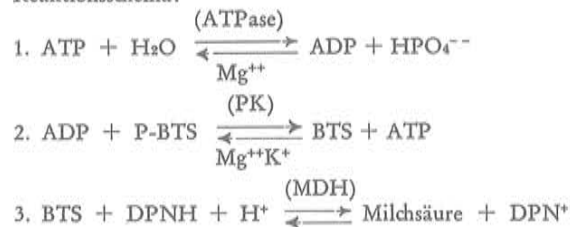
Testansatz:

$2,2 \times 10^{-7}$ (Mole/ml)	DPNH + H ⁺
$2,5 \times 10^{-6}$ (Mole/ml)	P-Enol-BTS
$2,5 \times 10^{-5}$ (Mole/ml)	MgSO ₄
$7,5 \times 10^{-6}$ (Mole/ml)	KCl
$1,25 \times 10^{-7}$ (Mole/ml)	AMP
$1,0 \times 10^{-6}$ (Mole/ml)	ATP
$1,0 \times 10^{-5}$ (g/ml)	MDH
$1,0 \times 10^{-5}$ (g/ml)	PK

TRAP ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit 0,2 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 1×10^8 Plättchen).

Mg⁺⁺ akt. ATPase-Bestimmung nach Löhr und Grignani

Reaktionsschema:



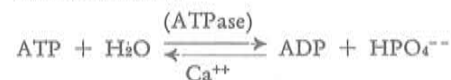
Testansatz:

$3,3 \times 10^{-7}$ (Mole/ml)	DPNH + H ⁺
$8,0 \times 10^{-7}$ (Mole/ml)	P-BTS
$2,5 \times 10^{-5}$ (Mole/ml)	MgCl ₂
$8,0 \times 10^{-5}$ (Mole/ml)	KCl
$5,0 \times 10^{-6}$ (Mole/ml)	ATP
$5,0 \times 10^{-6}$ (g/ml)	PK
$5,0 \times 10^{-6}$ (g/ml)	MDH

m/20 Zitrat-NaOH-Puffer pH 6,5 ad 3,0 ml, d = 2 cm. Start der Reaktion mit 0,2 ml Thrombolytat (entsprechend 1×10^8 Plättchen).

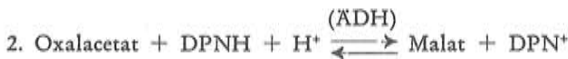
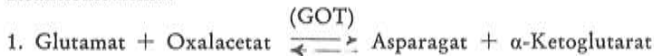
Ca⁺⁺ akt. ATPase-Bestimmung nach Perry

Reaktionsschema:

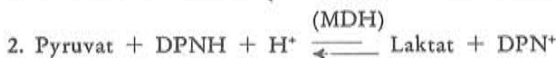
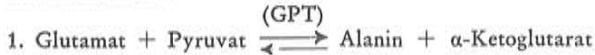


Testansatz:

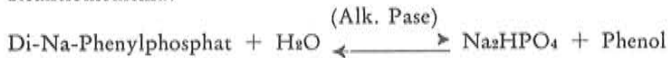
2,08 ml m/10 Glycinpuffer pH 9,5

 2×10^{-5} (Mole) CaCl_2 0,5 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 2×10^8 Plättchen)Start mit 1×10^{-5} (Mole) ATPV = 3,0 ml. 60 Min. Inkubation bei $+ 25^\circ \text{C}$. Abstoppen der Reaktion mit 3,0 ml 6%iger HClO_4 , Phosphatbestimmungen). Messung gegen einen Leeransatz, dem erst nach der Entweißung ATP zugesetzt wird.*Glutamat-Oxalacetattransaminasebestimmung* nach La Due, Wroblewski und Karmen
Reaktionsschema:*Testansatz:* $3,22 \times 10^{-5}$ (Mol/ml) Asparagat $2,0 \times 10^{-7}$ (Mol/ml) $\text{DPNH} + \text{H}^+$ 8×10^{-6} (g/ml) ADH0,5 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 2×10^8 Plättchen)0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4 ad 2,9 ml, Start der Reaktion mit 7×10^{-6} Mol/ml α -Ketoglutarat nach einer Vorinkubation für 15 Minuten bei 25°C .*Glutamat-Pyruvattransaminase* nach La Due, Wroblewski und Karmen

Reaktionsschema:

*Testansatz:* $3,3 \times 10^{-5}$ (Mol/ml) Alanin $1,6 \times 10^{-7}$ (Mol/ml) $\text{DPNH} + \text{H}^+$ $3,3 \times 10^{-6}$ (g/ml) MDH1,0 ml Thrombolytat (entsprechend etwa $4-5 \times 10^8$ Plättchen)0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4 ad 2,9 ml, Start der Reaktion mit 7×10^{-6} Mol/ml α -Ketoglutarat nach einer Vorinkubation für 15 Minuten bei 25°C .*Alkalische Phosphatasebestimmung* nach Kirberger und Martini

Reaktionsschema:

*Testansatz:*

2,0 ml 0,01 m Di-Na-Phenylphosphatlösung

2,0 ml 0,095 m Karbonat-Bikarbonatpufferlösung pH 9,0

5 Min. Vorinkubation bei 37°C .+ 0,4 ml Thrombolytat (entsprechend etwa 1×10^8 Plättchen)15 Min. Inkubation bei 37°C , Abstoppen der Reaktion mit 1,8 ml Phenolreagenz (nach Folin-Ciocalteu) Zentrifugieren 5 Min., 2 ml Überstand + 3,0 ml 1 m Karbonatlösung.Messung der Extinktion bei 578 mmy, $d = 1,0$ cm gegen Leerwert.

$\Delta_{\text{ext.}} = 0,552$ (nach Eichkurve) = 94×10^{-6} g Phenol = 1×10^{-6} Mol

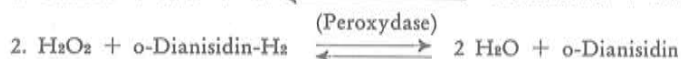
$\Delta_{\text{ext.}}$ je 15 Min. $\times 7,24 \times$ Verdünnungsfaktor der Thrombozyten gleich Bücher-Einheiten je Stunde.

C. Optische Substratbestimmungen

Die optischen Substratbestimmungen wurden an Thrombozytensuspensionen in Bikarbonat-Ringer-Glukoselösung (Zusammensetzung siehe unter Abschnitt A) pH 7,4 durchgeführt. Die Thrombozyten wurden nach dem Temperatenausgleich nach 0- und 60minütiger Inkubation bei 37° C den Warburgtrögen entnommen und sofort mit dem gleichen Volumen 0,6 m HClO₄ enteiweißt. Abtrennung des Eiweißniederschlages auf der Zentrifuge und Neutralisation mit KOH (Merck-Indikatorpapier).

Enzymatische Glukosebestimmung nach Biochemica Boehringer

Reaktionsschema:



Testansatz:

0,4 ml bidest. Wasser (etwa 200 mg KF je Liter enthaltend)

+ 0,1 ml Thrombozyten (entsprechend etwa 5×10^7 Plättchen)

+ 0,5 ml 0,6 m HClO₄, Abtrennung des Niederschlages auf der Zentrifuge

$5,0 \times 10^{-5}$ g Peroxydase

$1,25 \times 10^{-3}$ g Glukoseoxydase

$1,7 \times 10^{-4}$ g o-Dianisidin-H₂

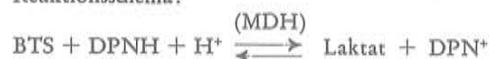
ad 5,0 ml 0,12 m Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml enteiweißter Thrombozytenüberstand.

35 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen, Ablesung von Δ_{ext} zwischen Leerwert und Ansatz bei λ 436 m μ , $d = 1,0$ cm. Kontrolle durch Mitlaufenlassen eines Glukosestandardansatzes.

Brenztraubensäurebestimmung nach Kubowitz und Ott

Reaktionsschema:



Testansatz:

$4,0 \times 10^{-7}$ Mol DPNH + H⁺

2,0 ml enteiweißter Thrombozytenüberstand

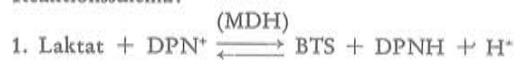
TRAP ad 4,0 ml, $d = 2,0$ cm, etwa 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen, bis die spontane Extinktionsabnahme des DPNH + H⁺ beendet ist (C z o k). Start der Reaktion mit etwa 1×10^{-6} g MDH.

Berechnung der BTS-Konzentration c:

$$c = \frac{\Delta_{\text{ext}} \times \text{Testvol.} \times \text{Verd.-Faktor}}{\epsilon_{\text{DPNH}} \times \text{eingesetzte ml Thromboc.}} \text{ (Mole/ml)}$$

Milchsäurebestimmung nach Hohorst

Reaktionsschema:



Testansatz:

$1,0 \times 10^{-2}$ g DPN⁺

0,2 ml enteiweißter Thrombozytenüberstand.

Glykokoll-NaOH-Hydrazinpuffergemisch (pH 9,35) (107,1 g Glycin [(Sörensen), 2,856 g Titriplex III, 37,128 g Hydrazin [Merck] ad 1000 ml Aqua quarzdest. Mit NaOH täglich frisch auf pH 9,35 einstellen) ad 2,0 ml, Start der Reaktion mit $2,0 \times 10^{-5}$ g MDH. Berechnung siehe BTS-Bestimmung.

Adenosintriphosphatbestimmung nach Bücher und Pfleiderer

Reaktionsschema siehe PGADH-Rücktest

Testansatz:

$5,0 \times 10^{-7}$ Mole DPNH + H⁺

$7,0 \times 10^{-5}$ Mole 3-P-Glycerat

$1,0 \times 10^{-5}$ Mole MgSO₄

$3,6 \times 10^{-6}$ Mole red. Glutathion (jeweils frisch anges. und neutralisiert)

$1,0 \times 10^{-5}$ g PGADH

2,0 ml enteiweißter Thrombozytenüberstand

TRAP ad 4,0 ml, d = 2,0 cm, Start der Reaktion mit $2,0 \times 10^{-5}$ g PGK.

Berechnung siehe BTS-Bestimmung.

Adenosindiphosphatbestimmung und Adenosinmonophosphatbestimmung nach Adam und Bücher

Reaktionsschema siehe Myokinasebestimmung

Testansatz:

$6,6 \times 10^{-7}$ Mol DPNH + H⁺

$7,5 \times 10^{-6}$ Mol P-Enol BTS

$7,5 \times 10^{-5}$ Mol MgSO₄

$2,25 \times 10^{-4}$ Mol KCl

$3,0 \times 10^{-6}$ Mol ATP

$1,0 \times 10^{-5}$ g MDH

TRAP ad 4,0 ml, d = 2,0 cm, Start der ADP-Reaktion mit $1,0 \times 10^{-5}$ g PK. Nach Stillstand der Extinktionsabnahme (Δ ext entspricht umgesetztem ADP) Start der AMP-Bestimmung mit $2,0 \times 10^{-5}$ g Myokinase. Berechnung siehe BTS-Bestimmung.

D. Manometrische Bestimmungen

Zur Bestimmung des Gesamtstoffwechsels wurden die Sauerstoffaufnahme und die Gesamtsäurebildung nach der Methode von Warburg mit der Gefäßpaarmethode gemessen. Die Retention fixer Säuren konnte vernachlässigt werden, da die Plättchen nach unseren Untersuchungen wegen ihres geringen Eiweißgehaltes keine meßbare Retention zeigten. Die nach den obigen Angaben abgetrennten und präparierten Plättchen wurden zu einer Konzentration von $5-8 \times 10^8$ Zellen je ml in Ca⁺⁺ freier Bikarbonat-Ringerlösung pH 7,4 mit 0.01 mol Glukose/Liter suspendiert. Zusammensetzung der Bikarbonat-Ringerlösung: siehe Abschnitt A.

Die Untersuchungen wurden in silikonisierten Warburg-Kästen durchgeführt.

Testansatz:

t = 37° C, Gas: O₂ + 5% CO₂, pH 7,4.

Thermobarometer mit 3,0 bzw. 7,0 ml Bikarbonat-Ringerlösung. Ansatz: je 2 Kästen mit 3,0 bzw. 7,0 ml Thrombozytensuspension. Zur Sättigung mit dem Gas Durchströmen der Gefäße für 10 Min. unter Schütteln (120/Min., d = 2,0 cm) im Thermostaten, anschließend Temperatursausgleich für 10 Minuten, Manometerablesungen in Abständen von 10 Min. Milchsäure — Brenztraubensäure — und Glukosebestimmung (siehe oben) sofort nach Temperatursausgleich

(Nullwert) und nach 60 Minuten nach Abstoppen der Reaktion durch Zusetzen gleicher Volumina 0,6 m HClO₄.

Berechnung: O₂-Aufnahme in 10⁻⁶ Mol/h/10¹¹ Thrombozyten, Kohlensäurebildung in 10⁻⁶ Mol/h/10¹¹ Thrombozyten durch Subtraktion der Laktat- und Pyruvatbildung von der Gesamtsäurebildung.

Summarische Bestimmung des Substratumsatzes über die Atmungskette durch Messung der — Cyanid-hemmbareren Atmung:

Reaktionsschema:



Testansatz:

t = 37° C, Gas: Luft, pH 7,4, Kegel (silikonisiert) mit Einsatz und Seitenbirne, direkte Messung der O₂-Aufnahme unter Absorption der gebildeten Kohlensäure.

Hauptraum: 2,0 ml Thrombozytensuspension in Albumin-NaCl-Phosphatlösung

2,2 × 10⁻⁶ Mol Glukose

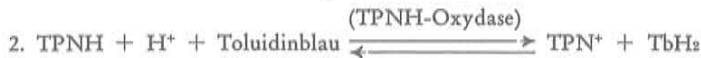
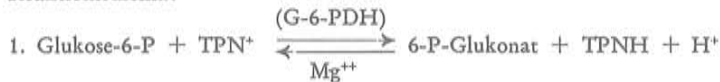
2,0 × 10⁻⁶ Mol KCN (0,1 ml)

Einsatz: 0,2 ml n Na OH (Filterröllchen)

Vergleichsansätze ohne KCN-Zusatz. Temperatenausgleich und Ablesung wie oben. Berechnung der CN⁻-hemmbaren Atmung aus der Differenz der Sauerstoffaufnahme dieser Ansätze mit und ohne KCN-Zusatz in 10⁻⁶ Mol O₂ je 10¹¹ Thrombozyten und Stunde.

TPNH-Oxydase

Reaktionsschema:



Testansatz:

t etc. siehe oben

Hauptraum: 2,0 ml Thrombozytensuspension in Alb.-NaCl-Phosphatlösung

2,2 × 10⁻⁶ Mol Glukose

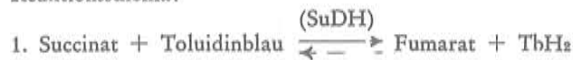
1,0 × 10⁻⁶ Mol Toluidinblau (0,1 ml)

Einsatz: 0,2 ml n NaOH (Filterröllchen)

Vergleichsansätze ohne Zusatz von Tb. Berechnung der Succinodehydrogenaseaktivität aus der Differenz der Sauerstoffaufnahme dieser Ansätze mit und ohne Zusatz von Tb in 10⁻⁶ Mol 1/2 O₂ je 10¹¹ Thrombozyten und Stunde.

Succinodehydrogenase nach Kubowitz und Lüttgens

Reaktionsschema:



Testansatz:

t etc. siehe oben

Hauptraum: 2,0 ml Thrombozytensuspension in Alb.-NaCl-Phosphatlösung

2,4 × 10⁻⁶ Mol Na-Succinat (0,2 ml)

2,0 × 10⁻⁶ Mol KCN (0,1 ml)

1,0 × 10⁻⁶ Mol Toluidinblau (0,1 ml)

Vergleichsansätze ohne Zusatz von Tb. Berechnung der Succinodehydrogenaseaktivität aus der Differenz der Sauerstoffaufnahme dieser Ansätze mit und ohne Zusatz von Tb in 10^{-6} Mol $1/2$ Ca je 10^{11} Thrombozyten und Stunde.

II. Versuche und Ergebnisse

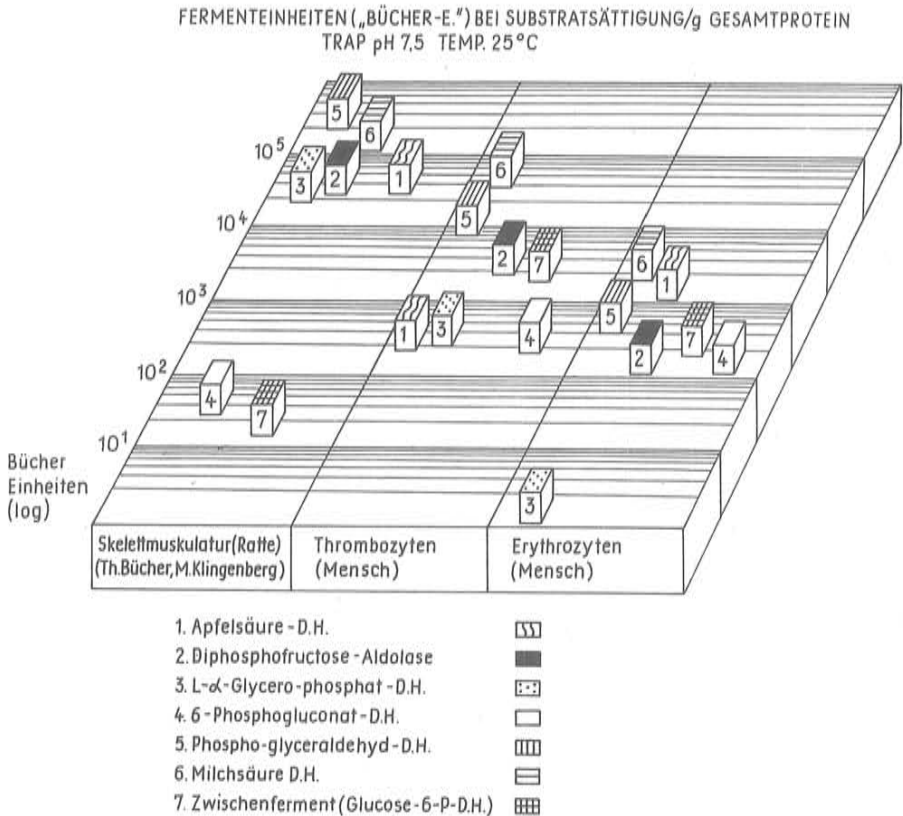
Wir führten zunächst Enzymbestimmungen an ungewaschenen isolierten Thrombozyten durch, die in Albumin-NaCl-Phosphatpuffer pH 7,4 suspendiert waren (Einzelheiten siehe Abschnitt A). Die Aktivitäten sind in Bücher-Einheiten je 10^{11} Plättchen in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1

Enzyme	Mittel in Bücher-Einheiten je 10^{11} Thromboz.	Zahl der Untersuchungen
Hexokinase	244 ± 25,1	10
Aldolase	449 ± 43	14
Trioseisomerase	15 080 ± 1320	14
L- α -Glycero-Phosphatdehydrogenase	64 ± 9	13
Phosphoglyceraldehyddehydrogenase	1 620 ± 89	15
3-Phosphoglycerat-1-Kinase	647 ± 110	10
Enolase	1 290 ± 123	13
Pyruvatkinase	6 540 ± 555	12
Milchsäuredehydrogenase	5 340 ± 407	14
Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	380 ± 39	13
6-Phospho-Glukonatdehydrogenase	52 ± 3	6
TPNH ₂ -Oxydase	163 ± 13	14
Isozitroneisäuredehydrogenase	181 ± 21	15
Succinodehydrogenase	39 ± 7	4
Äpfelsäuredehydrogenase	42 ± 4	10
CN ⁻ -hemmbare Atmung	45 ± 3	6
Myokinase	630 ± 29	10
Mg ⁺⁺ -ATPase	749 ± 40	11
Ca ⁺⁺ -ATPase	424 ± 30	9
Alkalische Phosphatase	50 ± 8	7
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	89 ± 9	11
Glutamat-Pyruvat-Transaminase	42 ± 6	7

Die Tabelle 1 zeigt, daß der Gehalt der Plättchen an Enzymen der Glykolyse und der ATP-Spaltung sehr hoch ist, während die Fermente des Pentosephosphat- und Zitronensäurezyklus sowie der Atmungskette in geringerer Menge gefunden werden. Von den glykolytischen Enzymen ist die Hexokinaseaktivität am niedrigsten, so daß die Einschleusung der Glukose in die Glykolyse deren begrenzende Reaktion ist. Das Enzymmuster der Thrombozyten (Abb. 1) ist ähnlich dem der

Säugetiermuskulatur aufgebaut und weist auf analoge Beziehungen zwischen Stoffwechsel und Funktion wie bei der Muskulatur hin (siehe auch Tabelle 6).



Enzymbestimmungen allein gestatten keine Aussage über den effektiven Substratumsatz in Systemen von Enzymketten, da für die Durchflußraten auch noch die Konzentrationen an Metaboliten, Co-Enzymen und Ionen bestimmend sind. Wir haben daher Stoffwechselgrößen und energiereiche Phosphate in den Plättchen gleicher Präparation gemessen. Die Daten sind in *Tabelle 2* in 10^{-6} Mol für je 10^{11} Thrombozyten aufgeführt. Die Messungen wurden unter aeroben Bedingungen vorgenommen.

Die Zusammenstellung in *Tabelle 2* ergibt, daß von der verbrauchten Glukose unter aeroben Versuchsbedingungen über die Hälfte als Pyruvat und Laktat wiedergefunden werden und nur ein Fünftel zu CO_2 verbrannt wird. Dieser Befund

bestätigt die aus der intrazellulären Enzymverteilung abzuleitende Vermutung eines Überwiegens der Glykolyse über den oxydativen Glukoseabbau.

Tab. 2

Substrate	10^{-6} Mol	Zahl der Untersuchungen
O ₂ -Aufnahme/h	86,3 ± 6,4	8
Gesamtsäurebildung/h	176,0 ± 15,1	8
Pyruvatbildung/h	3,9 ± 0,4	6
Laktatbildung/h	76,4 ± 11,9	6
CO ₂ -Bildung/h (errechnet)	95,7 ± 10,4	6
Glukoseverbrauch/h	74,8 ± 5,6	9
R.Q. (respir. Quotient)	1,1 ± 0,1	6
ATP	21,5 ± 1,1	25
ADP	6,9 ± 0,5	25
AMP	16,1 ± 1,5	15

Auffallend ist der hohe Gehalt der Plättchen an energiereichen Phosphaten trotz der länger dauernden Präparation zur Isolierung der Zellen. Das Verhältnis von ATP zu ADP von 3,1 zu 1, wie es unter günstigen Bedingungen auch in anderen tierischen und menschlichen Geweben gefunden wird, spricht für die Intaktheit des Thrombozytenstoffwechsels nach der Isolierung.

Um die Plättchen möglichst frei von plasmatischen Adsorbaten zu gewinnen, haben wir die Thrombozyten 1- bis 3mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend für die Enzym- und Stoffwechseluntersuchungen in Humanalbumin-NaCl-Phosphatpufferlösung bzw. in Bikarbonat-Glukose-Ringerlösung resuspendiert. Vergleichende Enzymbestimmungen und Stoffwechseluntersuchungen an ungewaschenen und gewaschenen Thrombozyten ergeben für alle gemessenen Größen einen unterschiedlichen Abfall durch den Einfluß der Waschung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt (Enzymaktivität in Bücher-Einheiten je 10^{11} Plättchen), Mittelwerte aus je 3 Versuchen.

Aus der Tabelle 3 geht hervor, daß von den gemessenen Enzymen die Pyruvatkinase (PK) und die 3-Phosphoglycerat-1-Kinase (PGK), beide Phosphatgruppen-übertragende Fermente, besonders leicht aus den Plättchen herausgewaschen werden. Außer diesen beiden Enzymen kommt es zu einem besonders großen Verlust der L- α -Glycerophosphatdehydrogenase (GDH) und Isozitrone Säuredehydrogenase (IDH) (siehe auch Gross, Löhr und Waller). Durch diese Enzymverluste tritt eine Beeinträchtigung des Plättchenstoffwechsels ein, insbesondere durch die Auswaschung der phosphatübertragenden Fermente eine Störung der ATP-Bildung, wie die Tabelle 4 zeigt. Die Stoffwechselgrößen sind in 10^{-6} Mol je 10^{11} Plättchen angegeben (Mittelwerte von je 3 Ansätzen).

Tab. 3

Enzyme	Ungewaschene Thrombozyten	1mal gewaschene Thrombozyten	2mal gewaschene Thrombozyten	3mal gewaschene Thrombozyten
Aldolase	598	544	484	212
TIM	17 620	16 443	16 163	9 480
GDH	70	31	14	0
PGADH	1 253	1 048	881	842
PGK	715	490	410	230
Enolase	1 496	1 483	1 335	1 042
PK	6 820	3 723	1 441	515
MDH	5 172	5 227	4 777	3 600
G-6-PDH	425	346	280	212
TPNH-Oxydase	141	138	80	—
IDH	185	149	51	29
MK	584	516	502	—
alk. Phosphatase	78	74	60	—
GOT ^{*)}	212	237	149	—
GPT ^{*)}	80	85	59	—

*) jeweils nur 1 Ansatz.

Die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen nach den Waschungen einen deutlichen Abfall des Stoffwechsels der Plättchen (Plättchenatmung und Glukoseverbrauch). Von den Adenylsäuren fällt nach der 2. Waschung durch den Verlust der phosphatübertragenden Fermente PGK und PK lediglich das ATP stark ab, während die ADP und AMP-Werte noch im Bereich der Streuung der Ausgangswerte bleiben. Erst nach der 3. Waschung kommt es wahrscheinlich durch Zytolyse zu einem starken Verlust aller Enzyme und Adenylsäuren.

Tab. 4

Substrate	Ungewaschene Thrombozyten	1mal gewaschene Thrombozyten	2mal gewaschene Thrombozyten	3mal gewaschene Thrombozyten
O ₂ -Aufnahme/h ^{*)}	47,2	28,2	31,2	—
Glukoseverbrauch/h	118,2	87,5	47,5	—
ATP	23,9	20,2	8,5	6,2
ADP	7,7	7,3	6,4	6,4
AMP	15,8	14,7	12,6	9,2
Summe Adenylsäuren	47,4	42,2	27,5	21,8

*) Die hier angegebenen O₂-Aufnahmen sind nicht mit denen der Tabelle 2 vergleichbar, da in diesen Ansätzen die Plättchen in Albumin-NaCl-Phosphatlösung suspendiert waren und die Messungen mit der Absorptionsmethode (direkte Messung der O₂-Aufnahme) unter Luft durchgeführt wurden.

Zum Vergleich wurde an 3 Gesunden der Einfluß ähnlicher Waschungen auf die Thrombozytenfaktoren 3 und 4 (Bestimmungen mittels des Johnson-Tests nach Gross und Schwick [2]) und auf die Retraktion (Bestimmung nach Fonio und Henseler) ermittelt. Wie wir früher fanden (Gross, Löhr und Waller) hat mehrfaches Waschen auf die Aktivität des Thrombozytenfaktors 3 in den üblichen Testen, z. B. im Thromboplastingenerationstest, keinen meßbaren Einfluß. In der obengenannten, besonders empfindlichen Faktor-3-Bestimmung stiegen die Gerinnungszeit und vor allem die Aktivierungszeit mit der Zahl der Waschungen leicht an. Die (flache) Kurve der Heparinaktivierung ließ bis zur 2. Waschung keine Veränderung erkennen, von der 3. Waschung ab nahm die Antiheparinaktivität ab. Mit hochnormaler Thrombozytenmenge (300 000/cmm) hatten 3 Waschungen keinen statistisch gesicherten Einfluß auf die nach Fonio-Henseler gemessenen Gerinnsellängen; das Gesamtvolumen der retrahierten Clots ließ aber eine Verschlechterung erkennen. Mit unter-schwelligem Konzentrationen (100 000/cmm) wurde der ungünstige Einfluß der Waschungen manifest. Im Vergleich zu dem in Tabelle 4 angegebenen Abfall der energiereichen Phosphate läßt diese Beobachtung Schlüsse auf die für die Retraktion noch erforderliche „kritische“ ATP-Konzentration zu. Wie wir anlässlich von Untersuchungen auf Fragen der Thrombozyten-Konservierung schon feststellten (Gross, Waller, Löhr [2]), sind die Thrombozytenfaktoren 3 und 4 in den zirkulierenden Plättchen präformiert und vom weiteren Stoffwechsel weitgehend unabhängig, während die Fähigkeit zur Retraktion die Aufrechterhaltung eines bestimmten Energiepotentials zur Voraussetzung hat.

Bei einer kleineren Anzahl unserer Ansätze traten trotz gleichartiger Präparation Plättchenagglomerationen auf. Die Enzymaktivitäten und Stoffwechselgrößen dieser agglomerierten Zellen waren deutlich erniedrigt und entsprachen etwa denen 2- bis 3mal gewaschener Thrombozyten. Bei der Auswertung unserer Ergebnisse in Tabelle 1 bis 4 wurden diese Ansätze daher nicht berücksichtigt.

III. Diskussion

Nach den vorgenannten Messungen enthalten die Thrombozyten die vollständigen Enzymketten der Glykolyse, des Pentosephosphatzyklus und Zitronensäurezyklus sowie der Atmungskette, wie es auf Grund ihrer morphologischen Struktur zu erwarten war. Nach unseren Untersuchungen besitzen die Thrombozyten außerdem sowohl Ca- wie auch Mg^{++} -abhängige ATPasen, Myokinase und Transaminasen. Im Enzymmuster der Blutplättchen (siehe Abb. 1 und Tabelle 1) überwiegen die Aktivitäten der glykolytischen Enzyme weit über die Fermente des Pentosephosphat- und Zitronensäurezyklus. Wir können damit die

Beobachtung von Koppel und Olwin nicht bestätigen, die in Versuchen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) eine besonders hohe Aktivität der Bernsteinsäure-, Glycerophosphat- und Äpfelsäuredehydrogenase fanden. Unsere Bestimmungen der intermediären und Stoffwechselendprodukte geben als Folge dieser Enzymverteilung auch unter aeroben Bedingungen einen vorwiegend glykolytischen Abbau der Kohlenhydrate wieder. Über die Hälfte der in der Zeiteinheit verbrauchten Glukose wurde als Pyruvat und Laktat wiedergefunden, und nur etwa ein Fünftel wurde zu Kohlensäure und Wasser verbrannt. Wir verweisen in diesem Zusammenhang auf die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Schulz und Hiepler, nach denen die Thrombozyten eine relativ geringe Zahl besonders kleiner Mitochondrien enthalten. Etwa ein Viertel der verbrauchten Glukose konnte in den von uns bestimmten Stoffwechselendprodukten nicht wiedergefunden werden. Wir glauben nicht, daß dieser Befund auf methodische Fehler zurückzuführen ist, da die enzymatische Glukosebestimmung mit der Glukoseoxydase spezifisch und sehr empfindlich ist. Auch liegt die Streuung des Mittelwertes viel niedriger als das Glukosedefizit.

Wir vermuten, daß ein Teil der Glukose zu Glykogen, Aminosäuren und Lipiden metabolisiert wird. Storti und Mitarbeiter; Reingold und Wislocki; Heckner; Gibb und Stowell konnten in den Blutplättchen reichlich Glykogen nachweisen, während Gerok und Gross sowie Morita fast alle freien Aminosäuren in den Thrombozyten fanden. Hinsichtlich des Sauerstoffverbrauches der Thrombozyten stimmen wir mit Maupin (3) überein; mit den von Maupin angegebenen Daten für die Kohlensäurebildung ist ein Vergleich nicht möglich, da dieser keine Angaben über fixe Säuren gemacht hat. Die auch von Campbell, Small und Dameshek beschriebene Anhäufung von Laktat, welche etwa mit unseren Werten übereinstimmt, findet ihre Erklärung in der niedrigen Aktivität der Enzyme des Zitronensäurezyklus. Das glykolytisch gebildete Pyruvat kann im Trikarbonsäurezyklus nur zum Teil weiter verbrannt werden.

Nach unseren Untersuchungen liegt die begrenzende Reaktion der Glykolyse für die Thrombozyten in der Glukoseeinschleusung durch die Hexokinase, wie wir es auch an Erythrozyten und Leukozyten beobachten konnten. Bei allen drei Blutzelltypen lag die Hexokinaseaktivität von den glykolytischen Enzymen weit aus am niedrigsten und betrug nur etwa die Hälfte der ebenfalls niedrigen Aldolaseaktivität. Eine Bestätigung dieses Befundes erhielten wir durch die Beobachtung, daß durch Zusatz von hochgereinigter Hefehexokinase zu Plättchenzytolysaten in zweifach höherer Konzentration als in normalen Plättchen die Glykolyserate auf das Doppelte gesteigert werden konnte. Eine weitere Steigerung der Glykolyse durch noch höhere Hexokinasezusätze war jedoch nicht möglich, da dann die Aldolase zum begrenzenden Enzym wurde. Die Streuung der

Mittelwerte (σ_M) der von uns gemessenen Enzyme liegt zwischen 5 und 15% der jeweiligen Mittel und damit wesentlich höher, als wir sie bei Erythrozyten fanden (unter 5%) (Löhr, Waller, Karges). Die größere Streuung bei den Thrombozyten ist nicht durch die angewandten Enzymbestimmungsmethoden bedingt, sondern ist auf die Unsicherheit der Bezugsgröße zurückzuführen. Die Thrombozytenzählung erfaßt die morphologisch intakten Plättchen und nicht die bei der Isolierung entstehenden kleineren enzymhaltigen Zelltrümmer. Trotz vorsichtiger Präparation in silikonisierten und gekühlten Gefäßen sowie Bestimmung der Plättchenverluste in den Überständen war eine Verringerung dieses methodischen Fehlers nicht möglich.

Berechnet man unter Zugrundelegung der für die einzelnen Enzyme bekannten Umsatzzahlen (pH 7,4 bis 7,6, 25° C, Substratsättigung) den Anteil der aktiven Enzymproteine am Gesamtprotein der Blutplättchen (nach Maupin; Fantl, Ward; Gross und Schwick [1] im Mittel etwa 175 mg Protein je 10^{11} Plättchen), so machen die in Tabelle 6 aufgeführten 11 Enzyme in den Blutplättchen etwa 2% des gesamten Thrombozyteneiweißes aus. Von den in Tabelle 6 nicht besonders aufgeführten Enzymen waren uns Umsatzzahlen nicht zugänglich.

In der Skelettmuskulatur beträgt der Anteil der gleichen Enzyme am Gesamteiweiß etwa 10%, in den Erythrozyten dagegen nur etwa 0,1%. In der Tabelle 5 wird der Anteil der einzelnen Enzyme am Gesamtprotein von den Thrombozyten mit denen der Erythrozyten und der Skelettmuskulatur verglichen. Die Daten für die Skelettmuskulatur entnahmen wir den Arbeiten des Bücherschen Arbeitskreises, wobei die Werte, soweit sie auf das Feuchtgewicht der Muskulatur bezogen waren, mit dem Faktor 5,6 auf Gesamteiweiß umgerechnet wurden (nach Beisenherz, Boltze, Bücher und Mitarbeiter). Die Werte für die Erythrozyten wurden z. T. unseren früheren Arbeiten entnommen (Löhr, Waller und Karges; Bock, Waller, Löhr und Karges).

Nach Tabelle 5 liegt der Anteil der aufgeführten Enzyme am Gesamtprotein bei den Thrombozyten zwischen dem der Erythrozyten und der Skelettmuskulatur. Er ist bei den Thrombozyten etwa zwanzigmal höher als in den Erythrozyten und nach Abzug des Hämoglobianteils vom Gesamteiweiß der Erythrozyten (etwa 90%) noch doppelt so hoch. Die Enzymmuster von Thrombozyten und Skelettmuskulatur zeigen Ähnlichkeiten.

Auffallend ist der hohe ATP-Gehalt der Blutplättchen, der im Mittel $21,5 \times 10^{-6}$ Mol je 10^{11} Plättchen oder $1,2 \times 10^{-7}$ Mol je mg Thrombozyteneiweiß beträgt. Der Thrombozyt enthält — bezogen auf das Gesamtprotein — etwa 150mal mehr ATP als der Erythrozyt. Er gehört somit sicher zu den energiereichsten Zellen überhaupt. Der hohe ATP-Gehalt der Thrombozyten steht in Beziehung zu der mechanischen Funktion der Plättchen bei der Retraktion. Wir

konnten zeigen, daß durch Hemmung der ATP-liefernden Reaktionen der Glykolyse die Retraktionsfähigkeit der Thrombozyten aufgehoben werden kann (Gross, Löhr, Waller [1]; Waller, Löhr, Karges und Gross). Auch die Befunde von Bounameaux, der mit Na-Fluorid die Retraktion hemmen konnte, und der von Born (2) beschriebene Abfall des ATP-Gehaltes der Thrombozyten während der Retraktion sprechen für eine Abhängigkeit der Retraktionsfähigkeit der Plättchen von ihren energieliefernden Reaktionen. Fantl und Ward sowie Born fanden niedrigere ATP-Werte als wir. Die Unterschiede dürften methodisch bedingt sein — z. B. bei Fantl durch Iontophorese bei pH 3,5. Im sauren Milieu findet eine hydrolytische Spaltung des ATP statt. Soweit bekannt, ist bei allen intakten Zellen das Verhältnis ATP/ADP > 2,5. Ein Überwiegen von ADP spricht für eine erhebliche Schädigung der Zellen bei der Aufbereitung.

Tab. 5: Anteil der Enzymproteine in Prozent am Gesamtprotein verschiedener Zellarten

Enzyme	Erythrozyten (Mensch)	Thrombozyten (Mensch)	Skelettmuskel (Ratte und Kaninchen)
Aldolase	0,011	0,20	2,20
TIM	0,0025	0,016	0,05
PGADH	0,050	0,250	5,10
GDH	0	0,002	0,18
PGK	0,0026	0,002	—
Enolase	0,0005	0,013	0,007
PK	0,012	0,660	1,00
MDH	0,012	0,120	0,71
G-6-PDH	0,004	0,030	0,003
IDH	0	0,460	0,170
AeDH	0,016	0,003	0,400

Die von Zucker und Borelli vertretene Ansicht, daß Enzymbestimmungen an Thrombozyten nur nach mehrfacher Waschung exakt seien, da durch anhaftende Plasmaenzyme falsche Aktivitäten vorgetäuscht würden, können wir für den Kohlenhydratstoffwechsel auf Grund unserer Untersuchungen nicht teilen. Selbst unter der Annahme, daß 10^{11} Thrombozyten, die unter physiologischen Bedingungen in etwa 200 ml Plasma suspendiert sind, auch nach Abtrennung vom Suspensionsmilieu die Enzyme von 10 ml Plasma noch anhaften, würde der Anteil dieser Plasmaenzyme an den Thrombozytenenzymen nur wenige Prozent ausmachen und damit im Bereich der Streubreite liegen, wie Tabelle 6 zeigt. In Tabelle 6 sind nur die Enzyme aufgeführt, die in einem meßbaren Betrag im Plasma vorkommen. Dazu gehören vor allem Aldolase, MDH,

GPT, GOT und alkalische Phosphatase. Als nicht im Plasma nachweisbare Enzyme haben wir die G-6-PDH und IDH in die Tabelle aufgenommen.

Tab. 6: Enzymgehalt von 10 ml Plasma und von 10^{11} Thrombozyten in Bücher-Einheiten

Enzyme	Plasma	Thrombozyten	Plasma-/Thromb. Enzyme in Prozent
Aldolase	4,8	449	1,0
MDH	25,0	5340	0,5
GPT	4,0	42	9,5
GOT	3,0	89	3,5
alk. Phosphatase	0,06	50	< 0,1
G-6-PDH	0	380	0
IDH	0	181	0

Unsere Untersuchungen an 1- bis 3mal gewaschenen Thrombozyten (s. Tab. 3 und 4) zeigen dagegen einen deutlichen Verlust fast aller Enzyme, besonders der phosphatübertragenden Fermente PGK und PK sowie der GDH und IDH mit der Folge einer Störung des Zellstoffwechsels, der sich besonders im Verlust der energiereichen Phosphate ausdrückt. Dieser Enzymverlust ist wohl kaum durch eine Abwaschung von an der Zelloberfläche haftenden Plasmaadsorbaten bedingt, da 1. gerade die Enzyme PGK, PK und GDH nicht im Plasma nachzuweisen sind, und da 2. durch den Verlust von adsorbierten Plasmaenzymen keine Beeinträchtigung des Plättchenstoffwechsels eintritt. Unsere Beobachtungen sprechen gegen die Feststellung von Tullis, daß die Konservierbarkeit der Plättchen durch mehrfache Washungen verbessert werden kann. Lediglich die präformierten, vom weiteren Plättchenstoffwechsel unabhängigen Thrombozytenfaktoren 3 und 4 werden durch mehrfache Washungen und nachfolgende Konservierung nicht maßgeblich vermindert, während die vom Energiestoffwechsel abhängige Retraktion gegen diese Prozeduren sehr empfindlich ist (Gross, Waller, Löhr [2]).

Stefanini und Dameshek berichteten außerdem über eine Verkürzung der in-vivo-Lebensdauer von transfundierten Blutplättchen durch vorherige Washungen.

Zusammenfassung

Es wurden in ungewaschenen und mehrfach gewaschenen Thrombozyten quantitativ folgende Fermente der Glykolyse, des Pentosephosphat- und Zitronensäurezyklus, der Atmungskette, der Phosphatspaltung und der Transaminierungen bestimmt:

Hexokinase, Diphosphofruktosealdolase, Trioseisomerase, L- α -Glycerophosphatdehydrogenase, Phosphoglyceraldehydhydrogenase, 3-Phosphoglycerat-1-Kinase, Enolase, Pyruvatkinase, Milchsäuredehydrogenase, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, TPNH-Oxydase, Isozitroneisäuredehydrogenase, Succinodehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase, globale Atmungskettenbestimmung, Myokinase, Mg⁺⁺-aktivierte ATPase, Ca⁺⁺-aktivierte ATPase, alkalische Phosphatase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase.

Außerdem wurden an ungewaschenen und mehrfach gewaschenen Blutplättchen Gesamtstoffwechsellmessungen sowie Bestimmungen von Intermediär- und Endprodukten des Stoffwechsels vorgenommen, wie Glukoseverbrauch, Milchsäurebildung, Pyruvatbildung, CO₂-Bildung, O₂-Verbrauch, zusätzlich Bestimmungen der energiereichen Phosphate ATP, ADP und AMP.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Die Blutplättchen enthalten die vollständigen Stoffwechselketten der Glykolyse, des Pentosephosphat- und Zitronensäurezyklus, die Atmungskette, 3 ATP-spaltende Fermente und Transaminasen.

2. Der Gehalt an glykolytischen Enzymen übersteigt bei weitem den Gehalt an Enzymen des oxydativen Kohlenhydratabbaues.

3. Die begrenzende Reaktion der Glykolyse in den Thrombozyten ist die Hexokinase-Reaktion.

4. Der Stoffwechsel der Blutplättchen im Vergleich zu anderen Zellelementen ist groß.

5. Auch unter aeroben Bedingungen wird über die Hälfte der abgebauten Glukose zu Pyruvat und Laktat glykolytisiert; nur etwa $\frac{1}{5}$ der Glukose wird zu CO₂ und H₂O verbrannt. $\frac{1}{4}$ der abgebauten Glukose wurde in den Stoffwechselendprodukten nicht wiedergefunden; es wird angenommen, daß sie zu Glykogen, Aminosäuren und Lipiden metabolisiert wird.

6. Der respiratorische Quotient (R.Q.) der Thrombozyten beträgt 1,1, was für einen vorwiegenden Kohlenhydratstoffwechsel spricht.

7. Der ATP-Gehalt der Blutplättchen ist auffallend hoch und liegt etwa 150mal höher als der ATP-Gehalt der Erythrozyten, bezogen auf das Gesamtprotein der Zellen. Das Verhältnis von ATP : AMP : ADP betrug bei unseren Messungen 3,1 : 2,3 : 1 und liegt damit in der Größenordnung anderer Organe. Dieser Befund spricht dafür, daß bei unseren Versuchsbedingungen die Plättchen nicht geschädigt wurden.

8. Unter dem Einfluß von 1 bis 3 Thrombozytenwaschungen kommt es zu einem weitgehenden Verlust der meisten für den Energiehaushalt wichtigen Enzyme, besonders der phosphatgruppenübertragenden Fermente 3-Phospho-

glycerat-1-Kinase und Pyruvatkinase mit der Folge eines starken ATP-Verlustes der Plättchen. Der Zellstoffwechsel wird durch Plättchenwaschungen deutlich beeinträchtigt.

9. Enzym- und Stoffwechseluntersuchungen sollten wegen ihrer Beeinträchtigung durch Thrombozytenwaschungen möglichst an vom Plasma abgetrennten, ungewaschenen Blutplättchen durchgeführt werden. Vergleichende Untersuchungen an Plasmaenzymen zeigten, daß die Meßfehler durch anhaftende Plasmafermente unbedeutend sind und nur etwa 1 bis 10% ausmachen.

10. Eine direkte Abhängigkeit der Retraktionsfähigkeit der Blutplättchen von ihrem Energiestoffwechsel konnte durch Hemmversuche der ATP-liefernden Reaktionen der Glykolyse wahrscheinlich gemacht werden. Bei normaler oder erhöhter Thrombozytenzahl führen 1 bis 3 Waschungen zu einer eben noch erkennbaren Störung der Retraktion, die bei suboptimaler Thrombozytenkonzentration deutlicher wird.

11. Vergleichende Untersuchungen über die Enzymverteilungsmuster und die Berechnung der Anteile der einzelnen Enzymproteine am Gesamtprotein der Zellen weisen auf Ähnlichkeiten zwischen dem Stoffwechsel von Skelettmuskulatur und Thrombozyten hin. Beiden Zellelementen ist die Fähigkeit zu mechanischer Arbeit gemeinsam.

Summary

The following enzymes which are involved in glycolysis, pentose-phosphate cycle and citric acid cycle, cellular respiration, phosphate splitting and transaminizing were quantitatively determined in platelets before and after several washings:

Hexokinase, Diphosphofruktose-aldolase, Triose-isomerase, L- α -Glycerophosphate-dehydrogenase, Phosphoglycerolaldehyde-dehydrogenase, 3-Phosphoglycerate-1-kinase, Enolase, Pyruvate-kinase, Lactic acid dehydrogenase, Glucose-6-phospho-dehydrogenase, 6-Phosphogluconate-dehydrogenase, TPNH-oxidase, Isocitric acid dehydrogenase, Succino-dehydrogenase, Malic acid dehydrogenase, globale respiration enzymes, Myokinase, Mg^{++} activated ATPase, Ca^{++} activated ATPase, alkaline phosphatase, Glutamic-oxalacetic-transaminase, glutamic-pyruvic-transaminase.

The total metabolism, the intermediary, and final products of metabolism were determined in washed and non washed platelets in regards to consumption of glucose, O_2 , the formation of lactic acid, pyruvic acid, CO_2 and the energy rich phosphates ATP, ADP and AMP.

The results were as follows:

1. The platelets contained all the enzymes necessary for glycolysis, pentose-phosphate cycle and citric acid cycle, for cellular respiration, for splitting of ATP and transaminases.

2. The amount of glycolytic enzymes was higher than the amount of enzymes involved in the oxidative carbohydrate metabolism.

3. The hexokinase-reaction was the limiting reaction for the glycolysis in platelets.

4. The metabolism of platelets was high as compared with the metabolism of other cells.

5. More than the half of the metabolized glucose was glycolyzed to pyruvic and lactic acid even under aerobic conditions. About one fifth of the glucose was metabolized to CO₂ and water. One fourth of the metabolized glucose was not found as final products of the metabolism. It is suggested that it is metabolized to glycogen, amino acids and lipids.

6. The respiratory quotient of platelets was 1.1, which is a sign of predominating carbohydrate metabolism.

7. The content of ATP in platelets was surprisingly high, and was 150 times higher than the ATP-content of red cells, calculated on the basis of total protein of the cells. The ratio of ATP : AMP : ADP was 3.1 : 2.3 : 1, and is of the same order as that in other organs. This means that the platelets were not deteriorated under the conditions of our experiments.

8. Washing of platelets 1 to 3 times induced a considerable loss of the most important enzymes concerned with energy metabolism, especially of 3 phosphoglycerate-1-kinase and pyruvic-kinase, and with a loss of ATP. The metabolism was also diminished after washings of the cells.

9. Determinations of both enzymes and metabolism should be performed on unwashed platelets separated from plasma. A comparison with the enzymes in the plasma showed that the fault of the determination induced by the enzymes of the plasma was of low order and was not more than 1 to 10%.

10. A correlation between the ability to retract and the energetic metabolism of the platelets was suggested by experiments with inhibition of the ATP-supplying reactions of glycolysis. One to three washings induced a disturbance of clot retraction with normal or high number of platelets, this inhibition was more pronounced with suboptimal platelet concentrations.

11. A comparison of the distribution of enzymes and the calculation of the proportion of the individual enzyme proteins of the total proteins of the cells suggests similarities between the metabolism of skeletal muscles and platelets. Both types of cells have the ability to perform mechanical labour.

Résumé

Les enzymes suivants ont été dosés quantitativement dans les thrombocytes non lavés et plusieurs fois lavés: enzymes de la glycolyse, du cycle pentose-phosphate et acide citrique, de l'oxydation, de la scission des phosphates et de la transamination: Hexokinase, Diphosphofructose aldolase, Triose isomérase, L- α -glycérophosphate déhydrogénase, Phosphoglycéraldéhyde déhydrogénase, 3-Phosphoglycérate-1-kinase, Enolase, Pyruvate-kinase, Déhydrogénase de l'acide lactique, Glucose-6-phosphate déhydrogénase, 6-Phosphogluconate déhydrogénase, TPNH-oxydase, Déhydrogénase isocitrique, Succinodéhydrogénase, Déhydrogénase de l'acide malique, dosage global des ferments respiratoires, Myokinase, Mg^{++} ATPase, Ca^{++} ATPase, Phosphatase alcaline, Transaminase glutamique-oxalacétique, Transaminase glutamique-pyruvique.

Des mesures du métabolisme total et la détermination de produits intermédiaires et finaux du métabolisme ont été effectuées. Il s'agit de l'utilisation du glucose, de la formation de l'acide lactique, de l'acide pyruvique, du CO_2 , de l'utilisation de O_2 , et enfin du système riche en énergie ATP, ADP et AMP.

Les résultats suivants ont été obtenus:

1) Les thrombocytes contiennent les systèmes enzymatiques complets de la glycolyse, du cycle pentose-phosphate, de l'acide citrique, de la chaîne respiratoire, les ATP-ases et transaminases.

2) Le contenu en enzymes glycolytique dépasse de beaucoup le taux des enzymes d'oxydation des hydrates de carbone.

3) La réaction limitante de la glycolyse dans les thrombocytes est celle de l'hexokinase.

4) Le métabolisme des thrombocytes comparé à celui d'autres éléments cellulaires est important.

5) Même sous conditions aérobiques la moitié du glucose est métabolisée en pyruvate et lactate, seul environ 1/5 du glucose est transformé en CO_2 et H_2O . 1/4 du glucose n'est plus retrouvé, on suppose qu'il est métabolisé, en glycogène, acides aminés et lipides.

6) Le quotient respiratoire des thrombocytes est de 1.1, il indique une prédominance du métabolisme des hydrates de carbone.

7) Le taux d'ATP des thrombocytes est particulièrement élevé, environ 150 fois plus élevé que celui des érythrocytes, rapporté aux protéines totales de la cellule. Le rapport ATP — ADP — AMP est de 3,1 : 2,3 : 1 il est du même ordre de grandeur que pour les autres organes. Ce résultat est une preuve que nos thrombocytes n'ont pas été endommagés.

8) Le lavage des thrombocytes (1—3 fois) entraîne une perte d'enzymes particulièrement des phosphattransféras, 3-phosphoglycérate-1-kinase et pyru-

vate kinase avec comme conséquence une forte perte d'ATP. Le métabolisme des thrombocytes est nettement diminué par le lavage.

9) Les déterminations d'enzymes et du métabolisme doivent être faites, à cause de l'action néfaste du lavage, sur des thrombocytes simplement séparés du plasma et non lavés. Les erreurs dues aux enzymes plasmatiques adsorbés sur les thrombocytes sont comprises entre 1 et 10% et de ce fait négligeables.

10) Une interdépendance directe entre la capacité de rétraction et le métabolisme énergétique est suggérée par les essais d'inhibition des réaction glycolytiques productrices d'ATP. Aux concentrations thrombocytaires normales ou élevées, 1 à 3 lavages conduisent déjà à un trouble de la rétraction qui devient plus distinct aux concentrations plus basses que la normale.

11) Une étude de la répartition et de la proportion des enzymes montre une certaine similitude entre le métabolisme des thrombocytes et de la musculature du squelette. Les deux éléments cellulaires ont en commun la capacité d'effectuer un travail mécanique.

Literatur

- Adam, H.: Enzymatische Bestimmung von ADP und AMP (Inaugural-Dissertation Marburg 1955).
- Baranowski, T.: Crystalline Glycerophosphate Dehydrogenase from Rabbit Muscle. *J. biol. Chem.* 180, 535 (1949).
- Beisenherz, G.: Triosephosphate Isomerase from Calf Muscle *Methods in Enzymology*, Vol. I, p. 387, (New York, 1955).
- Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G.: Diphosphofruuctose-Aldolase, Phosphoclyceraldehyd-Dehydrogenase etc. aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* 86, 555 (1953).
- Bestetti, A., Crosti, P. F.: Indagini inache sulle piastrine. *Atti Soc. Lomb. Sci. Med. Biol.* 10, 282, 284 (1955).
- Biochemica: C. F. Boehringer u. Söhne, Mannheim 1958: Glucose-Oxydase.
- Bock, H. E., Karges, O., Löhr, G. W., Waller, H. D.: Fermenteigenschaften von roten Blutzellen bei Lebererkrankungen. *Klin. Wschr.* 1958, 56.
- Bock, H. E., Waller, H. D., Löhr, G. W. und Karges, O.: Besonderheiten im Fermentgehalt von Megalozyten. *Klin. Wschr.* 1958, 151.
- Born, G. V. R. (1): Adenosintriphosphate (ATP) in blood platelets. *Biochem. J.* 62, 33 (1956).
- Born, G. V. R. (2): The breakdown of adenosinetriphosphate in blood platelets during clotting. *J. Physiol.* 133, 61 (1955).
- Bounameaux, G.: Sur le mécanisme de la rétraction du caillot et de la métamorphose visqueuse des plaquettes. *Rev. hémat.* 12, 16 (1956).
- Bücher, Th.: Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. *Biochim. Biophys. Acta* 1, 292 (1947).
- Bücher, Th.: Enolase from Brewer's Yeast. *Methods in Enzymology* Vol. I, p. 427, (New York, 1955).
- Bücher, Th. und Baum, P.: Persönliche Mitteilung.
- Bücher, Th. und Klingenberg, M.: „Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation“. *Angewandte Chemie* 17/18, 552 (1958).
- Bücher, Th. und Schimassek, H.: Persönliche Mitteilung.

- Campbell, E. W., Small, W. J., Dameshek, W.: Metabolic activity of human blood platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 47, 835 (1956).
- Campbell, E., Small, W. J., Lo Pilato, E., Dameshek, W.: Glycolytic intermediates of human platelets, their purification and identification. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 94, 505 (1957).
- Czok, R.: Arteriovenöse Differenzen im Gehirn. (Inaugural-Dissertation Marburg 1956).
- Deutsch, E.: Blutgerinnungsfaktoren. Wien 1955.
- Fantl, P., Ward, H. A.: Nucleotides in human platelets. *Biochem. J.* 64, 747 (1956).
- Feissly, R., Lüdin, H.: Action de la cocaine sur les plaquettes sanguines. *Hel. Physiol. Arch.* 7, 9 (1949).
- Fonio, A., Henseler, F.: Eine klinisch verwertbare Kontrollmethode zur Beurteilung der Wirkung von Antikoagulantien auf das Fibringerinnsel. *Schw. Z. Path. Bakt.* 15, 598 (1952).
- Gerok, W., Gross, R.: Aminosäuren in normalen menschlichen Thrombozyten. *Thromb. Diath. haem.* 1959, im Druck.
- Green, R. W.: Effect of pH on platelets and identification of ribonucleoprotein from platelets. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 87, 412 (1954).
- Grignani, F. und Löhr, G. W.: in Vorbereitung.
- Gross, R.: Aktuelle Probleme des Thrombozytenersatzes. *Bibl. haemat.* 9, 92, Basel — New York 1959.
- Gross, R., Löhr, G. W., Waller, H. D. (1): Zur Biochemie der Thrombozyten. *Transact. 4th int. Congr. Biochem. (X. Symp.)*, Wien 1958.
- Gross, R., Waller, H. D., Löhr, G. W. (2): Physiologische und klinische Probleme der Thrombozytensubstitution. *Transact. 7th Congr. int. Soc. blood Transf.* 1959, 915.
- Gross, R., Schwick, G. (1): Über die Gerinnungsaktivität und intravenöse Anwendung lyophil getrockneter menschlicher Thrombozyten. *Klin. Wschr.* 35, 814 (1957).
- Gross, R., Schwick, G. (2): Methoden zur Bestimmung der Plättchenfaktoren 1—4, in Vorbereitung.
- Heckner, F.: Cytochemische Darstellung der Polysaccharide in den Zellen des Blutes und der blutbildenden Gewebe. *Act. haem.* 16, 1 (1956).
- Hohorst, H. J.: Enzymatische Bestimmung von L (+) Milchsäure. *Biochem. Z.* 328, 509 (1957).
- Horecker, B. L. und Smyrniotis, P. Z.: Phosphogluconic-acid-dehydrogenase from Yeast. *J. Biol. Chem.* 193, 371 (1951).
- Karmann, A., Wroblewski, F. and La Due, J. S.: Transaminase Activity in Human Blood. *J. clin. Invest.* 34, 126 (1955).
- Kirberger, E. und Martini, G. A.: Bestimmungsmethode und klinische Auswertung der Phosphataseaktivität im Blut. *Mittlg. Arch. f. klin. Medizin* 197, 268 (1950).
- Koppel, J. L., Olwin, J. H.: Dehydrogenase activity of human platelets. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 86, 641 (1954).
- Kornberg, A. und Horecker, B. L.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Methods in Enzymology* Vol. I. p. 323, (New York, 1955).
- Kubowitz, F. und Lüttgens, W.: Zusammensetzung, Spaltung und Reinigung der Carboxylase. *Biochem. Z.* 307, 170 (1941).
- Kubowitz, F. und Ott, P.: Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren. *Biochem. Z.* 314, 94 (1943).
- Löhr, G. W., Waller, H. D., Karges, O.: Quantitative Fermentbestimmungen in roten Blutzellen. *Klin. Wschr.* 1957, 871.
- Löhr, G. W. und Grignani, F.: in Vorbereitung.
- Lüscher, E. F. (1): Die physiologische Bedeutung der Thrombozyten. *Schweiz. med. Wschr.* 86, 345 (1956).
- Lüscher, E. F. (2): Thrombozytenfaktoren. *Transact. 4th int. Congr. Biochem.* Wien 1958.
- Lüscher, E. F. (3): Viscous metamorphosis of blood platelets and clot retraction. *Vox sanguin.* 1, 133 (1956).

- Maupin, B. (1): Les plaquettes sanguines de l'homme. Paris 1954.
- Maupin, B. (2): Activité respiratoire des plaquettes sanguines de l'homme. C. r. Soc. Biol. 148, 439 (1954).
- Maupin, B., Schneebeli, J., Ardry, R.: Recherches des acides nucléiques dans les plaquettes sanguines de l'homme. C. r. Soc. Biol. 148, 441 (1954).
- Morita, Hisao: Blood monography on platelets. Clinical Medicine Tokio 1958.
- Negelein, E.: Pyruvatkinase: zit. nach Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: Z. Naturforschg. 8b, 555 (1953).
- Perry, G. V.: Myosin Adenosintri-phosphatase. Methods in Enzymology Vol. II, p. 582, (New York, 1955).
- Racker, E.: zit. nach Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt und Pfeleiderer, G. Z. Naturforschg. 8b, 555 (1959).
- Rheingold, J. J., Wislocki, G. B.: Histochemical methods applied to hematology. Blood 3, 641 (1948).
- Schulz, H., Hiepler, E.: Über die Lokalisierung von gerinnungsphysiologischen Aktivitäten in submikroskopischen Strukturen der Thrombozyten. Klin. Wschr. 273 (1959).
- Stefanini, M., Dameshek, W.: The hemorrhagic disorders. New York, 1955.
- Storti, E. S., Peraginin, S., Soldati, M.: Cytochemical investigations of normal megakariocytes and platelets. Act. haem. 14, 176 (1953).
- Tullis, J. T.: The platelets of human blood: Their morphology, interactions and preservation, in: Blood cells and plasma Proteins, New York, 1953.
- Waller, H. D., Löhr, G. W., Tabatabai, M.: Hämolyse und Fehlen von Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in roten Blutzellen. Klin. Wschr. 1957, 1061.
- Waller, H. D., Löhr, G. W., Karges, O., Gross, R.: Fermenteigenschaften und Energiestoffwechsel der Thrombozyten. Transact. 7th int. Congr. Haematology Rome 1958.
- Warburg, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.
- Zucker, M. B., Borelli, J.: A survey of some platelets enzymes and functions: the platelets as the source of normal serum acid glycerophosphatase. Am. N. Y. Acad. Sci. 75, 203 (1958).

Den technischen Assistentinnen E. Staufenberg, S. Hasslinger, K. Klimmey danken wir für ihre fleißige und gewissenhafte Arbeit.