



'N ONDERSOEK NA BLOEDPLAATJIEFUNKSIE  
MET SPESIALE VERWYSING NA DIE  
INVLOED VAN WEEFSELEKSTRAKTE

DEUR

ANTHON DU PLESSIS HEYNS

Hierdie proefskrif word voorgelê  
ter vervulling van die vereistes  
vir die graad Doktor in die  
Geneeskunde (D.M.) in die Fakulteit  
Geneeskunde aan die Universiteit  
van die Oranje Vrystaat, Bloemfontein.

Promotor: Prof. F.P. Retief.

JANUARIE 1973

UOVS-SASOL-BIBLIOTEEK 0150504



111018128401220000019

73/146

Universiteit van d'e Oranje-Vrystaat  
No. 21 T616.15-Hey  
150504  
BIBLIOTEEK

DEZES BIEPLAARF AS ONDER  
GEEN OMSTANDIGHEIT UIT DIE  
BIBLIOTEEK VERWIJDER WORD NIE

## I N H O U D S O P G A A F

Bladsy

VOORWOORD	
AFKORTINGS	
HOOFSTUK EEN: INLEIDING	1
HOOFSTUK TWEE: ALGEMENE OORSIG VAN PLAATJIEFUNKSIE	3
HOOFSTUK DRIE: TEGNIEKE: METODEDES EN STANDAARDI= SERING	21
HOOFSTUK VIER: RESULTATE	41
HOOFSTUK VYF: BESPREKING	83
OPSOMMING	107
BYLAE: BYLAAG A	112
BYLAAG B	115
BYLAAG C	117
BYLAAG D	120
BYLAAG E	123
BIBLIOGRAFIE	125

## VOORWOORD

Met die samevatting van al die resultate van hierdie eksperimente het dit my weereens getref hoe totaal afhanklik ek gedurende die afgelope paar jaar van die hulp en samewerking van ander persone was.

Die samevoeging van die stukkies van die legkaart soos dit mettertyd stadig ontplooi het, berus hoofsaaklik op vrugbare samesprekings met, en idees van prof. F.P. Retief. Prof. G.M. Potgieter het voortdurend waardevolle raad en leiding oor die benadering tot chemiese aspekte van die werkstuk verskaf.

D. van den Berg, eerste mediese tegnoloog in die Hematologieafdeling, was tydens die hele verloop van die projek met veelvuldige tegniese en standaardiseringsprobleme gemoeid. Hierdie het hy met besondere loofwaardige vaardigheid en vindingrykheid te bowe gekom.

H. Hundt en D. Pansegrouw (Departement Farmakologie) was altyd beskikbaar om kennis en hulp met die oplos van wat heel dikwels as onoorkomelike probleme voorgekom het, te verskaf.

Mev. Marie Snyman en ander personeellede, was altyd as bereidwillige plaatjie-donors beskikbaar.

Aortas, en ander post mortem materiaal, is deur die Staatspatoloog, dr. J.A. Olivier, en sy besondere hulpvaardige

personeellede, sers. D.J. Victor en sers. J.P. Visser, beskikbaar gestel. Die vlotte verloop van die eksperimente kan toegeskryf word aan die deeglikheid waarmee die monsters gekeur en voorberei is.

Gedurende die afgelope paar maande het al die lede van die Hematologie-afdeling tot so 'n mate saamgewerk en my eie verantwoordelikhede sodanig vergemaklik, dat daar geen ontwrigting in dienslewering van die afdeling plaasgevind het nie.

Mev. Taljaard moes die tikwerk van 'n amper onleesbare finale kladwerkkopie in 'n kort tydsbestek afhandel.

Natuurlik verg so 'n volgehoue tydperk van stremming 'n besondere mate van tegemoetkoming, opoffering, begrip en aanmoediging van mens se huisgesin - sonder hulle was hierdie waarlik 'n onbegonne taak.

'n Gedeelte van hierdie werk is ondersteun deur 'n toekenning van die Suid-Afrikaanse Mediese Navorsingsraad aan prof. F.P. Retief.

## HOOFSTUK EEN

### INLEIDING

Die sleutelrol gespeel deur die bloedplaatjies in die patogenese van hemostase, intravaskulêre trombose en aterosklerose, word vandag algemeen aanvaar.

Op onbeskadigde bloedvatendoteel vorm trombi in vivo slegs onder buitengewone, en gewoonlik onfisiologiese omstandighede soos byvoorbeeld met direkte elektriese stimulasie. Sodra die vatwand egter beskadig word, dien ontblote kollageen en basaalmembraan as 'n nidus vir plaatjieklewing en -klomping, en selfs trombose.

Dit is ook welbekend dat aspekte van aterosklerotiese siekte, en veral koronêre trombose veel minder onder die Bantoerasse as Blankes van Suid-Afrika voorkom. Die verspreiding van aterosklerotiese siekte in die bloedvatstelsel volg ook 'n welomskrewe patroon. So is die aantasting veral opvallend in die aorta en die kleiner bloedvate soos die serebrale en koronêre arteries.

Op grond van hierdie feite het die volgende vrae opgeduik:

- a) Is daar 'n kwantitatiewe of kwalitatiewe verskil tussen die effek van die verskillende bloedvatlae op plaatjieklewing?

### AFKORTINGS

ADP	-	adenosiendifosfaat
AMP	-	adenosientrifosfaat
E	-	eenhede, ekstinksie
IMP	-	inosienmonofosfaat
l	-	liter
LDH	-	laktaat-dehidrogenase
$\mu$	-	mikron
$\mu$ l	-	mikroliter
M	-	molaar, molare
MK	-	miokinase
ml	-	milliliter
N	-	normaal
NADH	-	nikotienadeniendinukleotied; gereduseerde vorm.
OD	-	optiese digtheid
PAP	-	plaatjie-arm plasma
PGE <sub>1</sub>	-	prostaglandiene E <sub>1</sub>
Pi	-	anorganiese fosfaat
PK	-	pirovien-kinase
PRP	-	plaatjie-ryk plasma
S-AMP	-	sikliese adenosienmonofosfaat

- b) Verskil die plaatjiekloppingseffektiwiteit van bloedvatlae en kan dit 'n moontlike verklaring vir die anatomiese verspreiding van aterosklerose wees?
- c) Is daar 'n verskil tussen die klompingsaktiwiteit van Bantoe-bloedvatlae en dié van Blankes?

Die ondersoek wat hier aangebied word, het begin as 'n poging om 'n antwoord op hierdie vrae te probeer verkry. Gedurende 'n vroeë fase van die studie is daar egter sekere verrassende waarnemings gemaak wat op eie meriete opgevolg is en daartoe gelei het dat die klem van die ondersoek mettertyd verskuif het. Hoewel die bovermelde probleme nie opgelos is nie, is interessante lig op die onderwerp van plaatjie/vatwant interaksie gewerp en deure oopgemaak vir voortvloeiende navorsing in hierdie baie belangrike veld.

## HOOFSTUK TWEE

### ALGEMENE OORSIG VAN PLAATJIEFUNKSIE

	<u>Bladsy</u>
INLEIDING	3
DIE FISIOLOGIESE REAKSIES VAN PLAATJIES	5
I    VORMVERANDERING	5
II   PLAATJIEKLEWING	5
III  PLAATJIEKLOMPING	5
IV   DIE VRYLATINGSREAKSIE	8
ADENIEN-NUKLEOTIEDES EN PLAATJIES	9
I    BIOCHEMIESE ASPEKTE	9
II   ADP-AFBRAAK IN PLASMA	11
III  ROL VAN SIKLIESE AMP IN PLAATJIEFUNKSIE	12
IV   ADENOSIEN EN PLAATJIE-REAKSIE	13
ROL VAN PLAATJIES BY HEMOSTASE, TROMBOSE EN ATEROSKLEROSE	15
I    HEMOSTASE	15
II   TROMBOSE	16
III  PATOGENESE VAN ATEROSKLEROSE	18

ALGEMENE OORSIG VAN PLAATJIEFUNKSIEINLEIDING

Dat bloedplaatjies by hemostase betrokke is, is nou al vir amper 'n eeu lank bekend. Na 'n tydperk van intense belangstelling in die meganisme van bloedstolling self, aangevuur deur die ontdekking van verskeie nuwe stollingsfaktore, is die klem sedert die vyftigerjare besig om na die bloedplaatjies se funksie in hemostase en trombose te verskuif. Hierdie belangstelling spruit weer uit die gewaarwording dat plaatjies 'n sleutelrol speel veral in arteriële trombose.

Na jare van feitlik onbenullige toevoeging tot die kennis opgedoen deur die baanbrekerswerk van die era 1842 - 1875 (Robb-Smith 1967), het navorsing op dié gebied skielike impetus verkry na aanleiding van 'n paar belangrike ontdekkings, wat kortliks soos volg opgesom kan word:

- a) Plaatjies kleef nie aan die intakte endoteelselle wat die interne voering van bloedvate vorm nie. Na trauma, en gevolglike ontbloting van kollageen van die bloedvatwand, vorm kollageen die nidus waaraan plaatjies kleef. (Bouna-meaux 1959, Hugues 1960).
- b) Plaatjieklewing en -klomping in die teenwoordigheid van Hellem se "R faktor" (Hellem 1958, 1960) later as ADP deur Gaardner et al (1961) geïdentifiseer.

- c) Grette (1962) het aangetoon dat trombiengeïnduseerde plaatjieklomping deur middel van ADP geskied. Hierdie ADP, en ook ander stowwe, word op 'n eksplousiewe wyse uit die  $\alpha$ -granules en digte liggaampies van die plaatjiesitoplasma vrygelaat.
- d) Kollageen-geïnduseerde plaatjieklomping en die rol wat adenosindifosfaat (ADP) van die vrylatingsreaksie in die proses speel (Zucker en Borelli 1962, Hovig 1963 a).
- e) Born (1962) se beskrywing van kwantitatiewe meting van plaatjieklomping deur middel van optiese digtheidsmetodes.

Gedurende die afgelope paar jaar het verskeie uitstekende algemene oorsigte die lig gesien wat die geskiedenis (Robb-Smith 1967; Rebeck 1971), algemene morfologie, funksie, biochemiese reaksies en patologiese afwykinge van plaatjies, (Johnson 1971, Brinkhous en Shermer 1971, Vermylen et al 1971, Series Haematologica Vol. IV 1971, Packham en Mustard 1971, Hellem en Stormorken 1969, Turpie et al 1971, Marcus 1969, Marcus en Zucker 1969, Hirsh en Doery 1971) uiteengesit het, en in die volgende opsomming sal gewys word op slegs enkele belangrike aspekte wat op die inhoud van hierdie verhandeling pertinent betrekking het.

DIE FISILOGIESE REAKSIES VAN PLAATJIES

I VORMVERANDERING:

Onmiddellik nadat plaatjies aan ADP blootgestel word, ondergaan hulle 'n verandering van die normale diskoïede vorm na 'n sfeer met doringagtige uitsteeksels (MacMillan 1966, O'Brien 1966). Die volume van die plaatjie vermeerder met ongeveer 35% (Bull en Zucker 1965). Hierdie proses is, in teenstelling met klonping, nie van  $Ca^{2+}$  afhanklik nie en gaan met elektronmikroskopiese veranderinge gepaard (White 1968). In die aggregometer met gekoppelde registreerder word hierdie fase gesien as 'n vermeerdering in optiese digtheid en ook as verminderde ossilasie van die registreerder se pen.

II PLAATJIEKLEWING:

Binne 2 - 3 sekondes na plaatjies blootgestel word aan ontblote kollageen, kleef hulle aan die kollageen (Hugues 1960). Hierdie klewing is onafhanklik van  $Ca^{2+}$  (Hovig 1964, Spaet en Zucker 1964). In vivo kleef plaatjies aan basaalmembraan, kollageen en ook aan 'n nie-kollageenstof geleë onder die endoteel van die bloedvatwand (Baumgartner et al 1971).

III PLAATJIEKLOMPING:

Kollageen: Ná die stadium van plaatjieklewing aan kollageen, vind vrylating van ADP en ander stowwe plaas en klomp die plaatjies (Zucker en Borelli 1962, Hovig 1963 a, Spaet en Zucker 1964). Die tersiêre struktuur van kollageen, en veral

die epsilon-aminosuur-groepe van lisien is skynbaar belangrik in hierdie klompingsinduksie (Wilner et al 1968).

Klompings teweeggebring deur kollageen word ook beïnvloed deur die kollageen self. So is daar biochemiese verskille tussen kollagene verkry van mensvel, kalfvel, rotvel en rotpees (Legrand en Huc 1971). Bankowski et al (1969) het ook daarop gewys dat die klompingsvermoë van ekstrakte van mensvel en aorta verminder met veroudering van die donor en dat dit verband hou met vermeerdering van koolhidraatinhoud van die ekstrak.

ADP: In 1960 het Hellem 'n stof in rooibloedselle ontdek wat hittestabiel is en die vermoë besit om plaatjies te klomp en te omskep na 'n vorm wat aan vreemde oppervlaktes kan kleef. Gaardner et al (1961) het hierdie R-faktor van Hellem as ADP geïdentifiseer. Hierdie funksie van ADP is herhaaldelik in vivo sowel as in vitro bevestig. Macmillan (1966) het daarop gewys dat die patroon van ADP-geïnduseerde klompings nou saamhang met die ADP-konsentrasie. Indien relatief groot hoeveelhede ADP ( $5 \mu\text{M}$ ) by plaatjieryk-plasma (PRP) gevoeg word, ontstaan 'n bifasiese aggre gasiegolf wat egter ononderskeibaar saamvloei. Hierdie twee klompingsfases kan in omtrent 70% van PRP geskei word deur konsentrasies van  $0,2 - 0,5 \mu\text{M}$  ADP te gebruik. Die sekondêre golf van klompings is 'n direkte effek van endogene ADP vrygestel tydens die vrylatingsreaksie. Met lae konsentrasies

ADP ( $10^{-7}M$ ) is die klompings omkeerbaar en hierdie spontane disaggregasie word toegeskryf aan die vernietiging van ADP deur ensieme aanwesig in die plasma (O'Brien 1962, Born 1964, Constantine 1965) alhoewel die stelling deur sommige outoriteite in twyfel getrek word (Packham et al 1969, Rozenberg en Holmsen 1968).

Dit skyn asof die klompings geïnduseer deur belangrike biologiese stowwe soos adrenalien, nor-adrenalien, trombin en serotonien ook deels deur middel van ADP-vrylating geskied (Clayton et al 1963, O'Brien 1964, Käser-Glanzmann et al 1962, Haslam 1964, Grette 1962).

Die genoemde sentrale rol gespeel deur kollageen in die aanvanklike hemostatiese reaksie word ook ten dele deur ADP-vrylating gemedieer (Hovig 1963 a, Spaet en Zucker 1964) maar Hugues (1971) wys daarop dat spesifieke ADP-antagoniste, soos adenosien en prostaglandien  $E_1$ , swak inhibiteurs van kollageenklompings is en hy kom tot die gevolgtrekking dat ander faktore behalwe ADP by kollageen-geïnduseerde klompings betrokke is.

Trombin: Daar is nou duidelike bewys dat trombin-geïnduseerde klompings ook deur middel van vrylating van endogene ADP geskied. Hierdie klompings word deur adenosien en veral deur 'n ADP-vernietigende ensiemsisteem (Haslam 1964, Ireland 1967) geïnhibeer.

Adrenalien: Adrenalien lok gewoonlik 'n duidelike dubbele klompingsgrafiek by plaatjies uit (O'Brien 1963) en dit word algemeen aanvaar dat die sekondêre golf toegeskryf kan word aan endogene ADP. Dit is moontlik dat selfs die eerste golf ook deur ADP gemedieer word (Haslam 1967). Adrenalien potensieer kollageen en trombien se klompings effek (Thomas 1967, 1968).

#### IV DIE VRYLATINGSREAKSIE:

Alhoewel Grette (1962) die term vrylatingsreaksie aangewend het om die plaatjiereaksie na blootstelling aan trombien te beskryf, het dit sedertdien duidelik geword dat verskeie ander stowwe soortgelyke reaksies kan uitlok.

Die term dui op die loslating van stowwe uit die  $\alpha$ -granules en digte liggaampies geleë in die plaatjiesitoplasma. Die vrylating is eksplosief en vind binne sekondes plaas met verbranding van energie van glikoliese sowel as oksidatiewe fosforilasie verkry. Die selmembraan bly ongeskonde en na vrylating behou die plaatjie sy funksionele integriteit.

Die morfologiese veranderinge geassosieerd met vrylating toon duidelik dat die granule-inhoud verdwyn sonder 'n skeuring van die selmembraan (Parmeggianni 1961, Hovig 1962, Castaldi et al 1962). Na vrylating is daar sentralisering van die granules, pseudopodvorming en word die leë granules skynbaar omring deur mikrotubules. (Mills et al 1968, White 1968, Rodman et al 1962).

Verskeie induseerders van loslating is beskryf, o.a. trombien, kollageen (Hovig 1963), gammaglobulien (Ishizaka en Ishizaka 1962), virusse (Jerushalmy et al 1962), endotoksien (Des Prez et al 1961), serotonien (Haslam 1967), adrenalien en ADP (Macmillan 1966, Mills et al 1968). Vir 'n omvattende lys van induseerders en bespreking van die onderwerp lees Holmsen et al (1969).

Holmsen et al (1969) onderskei tussen vrylatingereaksies I en II. Vrylating I is dan vrylating van digte liggaampie-inhoud en vrylating II van  $\alpha$ -granule inhoud. Sterk induseerders (trombien, kollageen) veroorsaak vrylating I en II en swak induseerders (ADP, adrenalien) slegs vrylating I. Gedurende vrylating I word ATP, ADP, serotonien,  $Ca^{2+}$ , PF3 en PF4 vrygelaat en gedurende vrylating II fibrinogeen en lisosimale ensieme.

Die rol van die vrygestelde ADP is om die klompingsreaksie voort te sit. Serotonien mag as vasokonstriktor hemostase beïnvloed. Fibrinogeen en  $Ca^{2+}$  in hoë plaaslike konsentrasies beïnvloed die fermheid van die stolsel en die lisosomale ensieme mag betrokke wees by stolsel-liese.

#### ADENIEN-NUKLEOTIEDES EN PLAATJIES

##### I BIOCHEMIESE ASPEKTE:

(Vir 'n omvattende oorsig lees Holmsen en Day 1971)

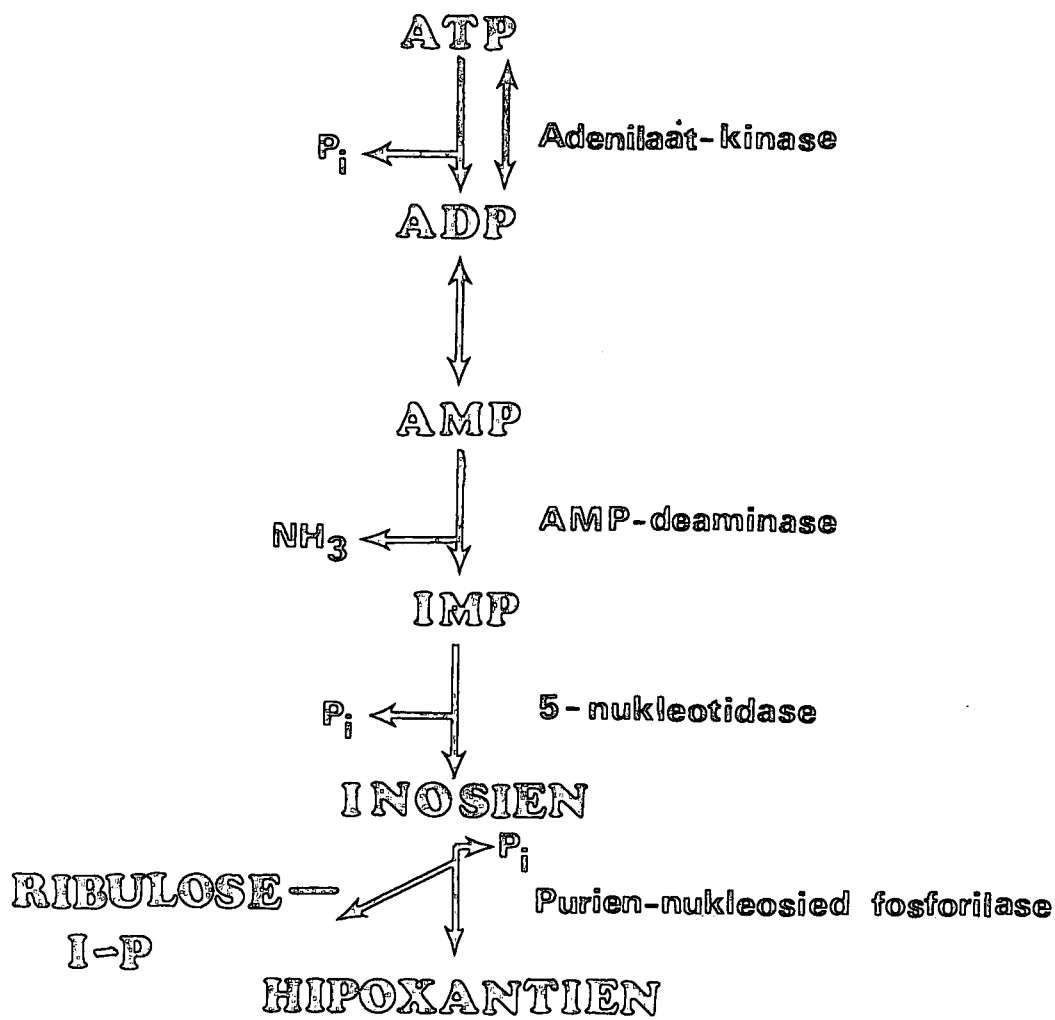


Fig. II - 1: Intrasellulêre afbraak van metaboliese aktiewe ATP gedurende die vrylatings= reaksie (na Holmsen en Day, 1971). Hierdie metaboliese poel dien as energiebron vir plaatjereaksies.

Uit die voorafgaande is dit duidelik dat ADP in die klewingsklompingsreaksie 'n sleutelrol speel. Die hoeveelheid ADP (eksogeen sowel as endogeen) beskikbaar, en die tempo van ADP-afbraak sal dus faktore wees wat 'n beslissende rol speel by die bepaling van die plaatjietrombus-grootte.

Die loslatingsreaksie word gebruik om die plaatjie-adenien-nukleotiedes in twee onafhanklike metaboliese poele te verdeel. Die kleiner poel (33% van die totaal) vorm deel van die sellulêre energieverkaffende metaboliese poel en word nie vrygestel gedurende die vrylatingsreaksies nie. Die groter poel (66% van die totaal) word gestoor in die spesifieke digte granules, is nie beskikbaar vir energie metabolisme nie, en word eksploesief vrygestel gedurende vrylatingsreaksie I. Dat die inhoud van die granules voldoende is om plaatjieklomping te kan induseer, blyk duidelik uit die feit dat  $1 \times 10^{11}$  plaatjies  $4 \mu\text{M}$  ADP bevat (Holmsen en Day 1971).

Gedurende klomping is daar intrasellulêre afbraak van metaboliese aktiewe ATP na IMP en hipoxantien (Ireland 1967, Holmsen et al 1969) en hierdie afbraak word as bron van energie vir die vrylatingsreaksie beskou.

Volgens Holmsen en Day (1971) is die metaboliese afbraak waarskynlik soos in fig. II - 1 voorgestel. Dit is belangrik om daarop te let dat die AMP-deaminase AMP verwyder en dus die

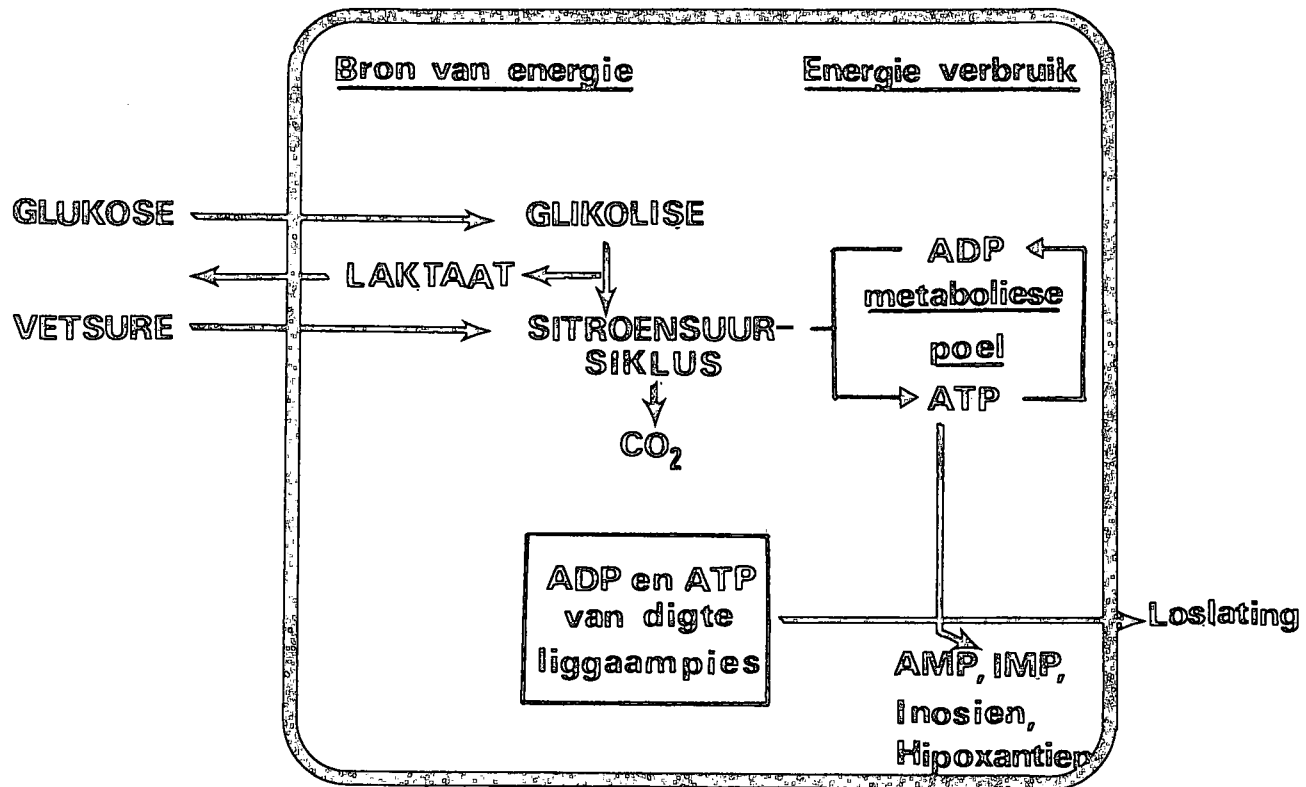


Fig. II - 2 : Plaatjie energie-metabolisme

Plaatjie-energie word hoofsaaklik deur die metabolisme van glukose en vetsure verskaf. Die plaatjies se energie reserve word deur die metaboliese adenien-nukleotied-poel verskaf. Hierdie energie word vir die instandhouding van die plaatjie se selmembraan, plaatjieklomping en die vrylatingsreaksie gebruik. Die granule-nukleotied-poel word met die vrylatingsreaksie ekstrasellulêr beskikbaar gestel (Skets gewysig ná Doery et al 1970).

adenilaat-kinase-ekwilibrium so verskuif dat enige ADP gevorm na ATP omskep, en dan weer afgebreek word. Sodoende word albei die hoë energie fosfaatbindinge van ATP vir energiever-skaffing beskikbaar gestel.

Indien ekstrasellulêre ADP-afbraak ondersoek word, is dit belangrik om in gedagte te hou dat daar adenilaat-kinase-kontaminasie mag wees. Gehemoliseerde rooibloedselle, in besonder, maar ook plaatjies, is 'n ryk bron van adenilaat-kinase. Die ingewikkelde verhoudinge tussen energie en loslatingsnukleotiedpoele word skematies in fig. II - 2 voorgestel.

#### II ADP-AFBRAAK IN PLASMA:

Na aanleiding van verskeie ondersoeke (Jørgensen 1956, Rozenberg en Holmsen 1968, Mills 1966, Ireland en Mills 1964, Ireland en Mills 1966, Holmsen 1965, Holmsen 1967, Holmsen 1968) kan die metabolisme van ATP en ADP in plasma soos in fig. II - 3 opgesom word. Dit is van belang om daarop te let dat wanneer ADP na ATP omskep word (deur bv. rooisel-adenilaat-kinase) die verwydering van ADP veel vinniger geskied as deur ADP-ase na AMP.

In biologiese konsentrasies het slegs ADP en adenosien betekenisvolle direkte effekte op plaatjie-funksie; ATP en AMP is slegs van belang as potensiële verskaffers van ADP en adenosien. Al die ensieme in hierdie kataboliese baan (met uitsondering

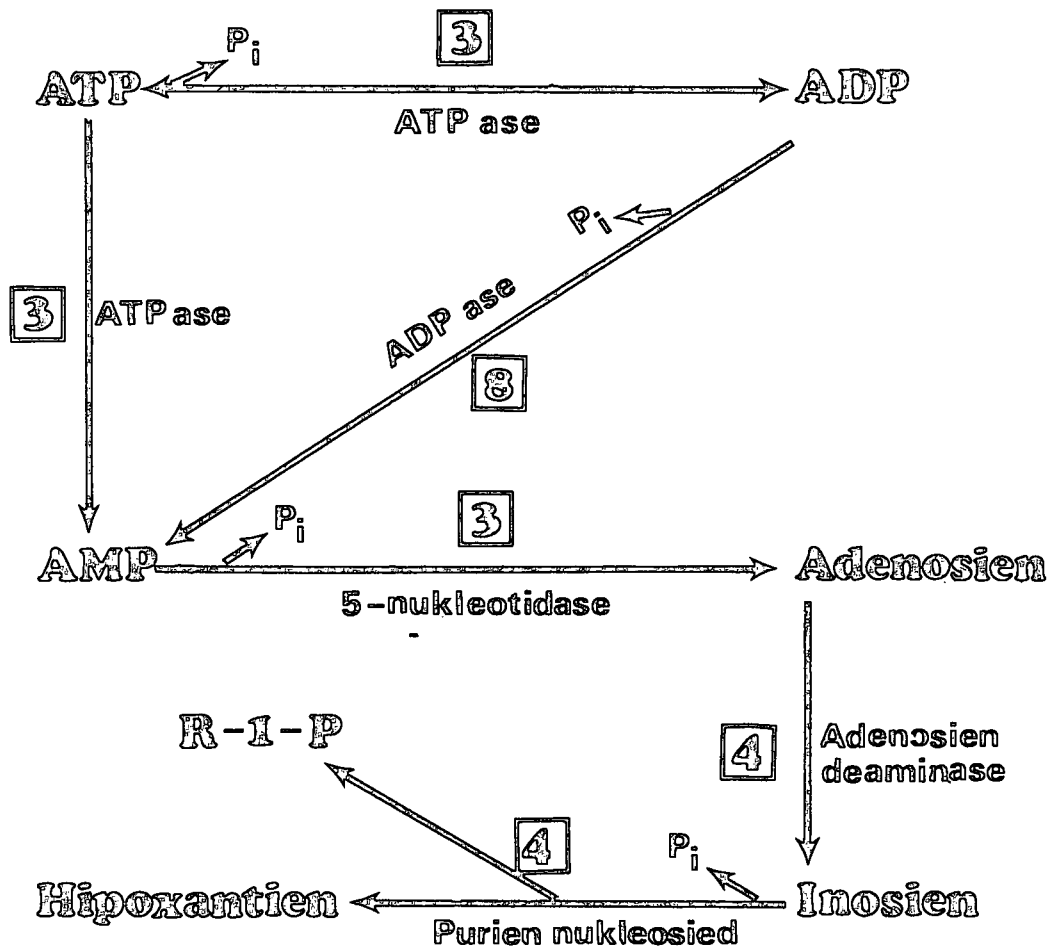


Fig. II - 3 : Die metabolisme van ADP en ATP in plasma. Syfers aangegee, is die halfleeftyd (in minute) van die gemetaboliseerde stof. Let daarop dat ADP langs twee weë afgebreek kan word en dat dié baan via ATP vinniger is. (R - 1 - P = Ribulose - 1 - fosfaat)

van die purien-nukleosied-fosforilase) is belangrik in dié sin dat hulle die vlak van óf ADP óf adenosien beheer. Dat daar waarskynlik alternatiewe ADP-afbraakbane is, blyk uit die observasie van Brashear en Ross (1969) dat ADP, direk in die pulmonale arterie van honde gespuit, verskeie duisend maal vinniger verdwyn as wat deur plasma-ensiem-kinetika verklaar kan word.

### III ROL VAN SIKLIESE AMP (S-AMP) IN PLAATJIEFUNKSIE:

(Vir 'n omvattende oorsig in sake plaatjiefunksie en s-AMP lees Salzman (1971), en vir 'n algemene oorsig van s-AMP lees Rasmussen (1970)).

Die vlak <sup>van</sup> intrasellulêre s-AMP word deur die balans tussen adeniël-siklase en sikliese fosfo-diesterase-aktiwiteit bepaal. (Fig. II - 4).

Die s-AMP aktiveer dan 'n fosfokinase wat 'n ensiem, spesifiek vir die betrokke sel, deur middel van ATP-katabolisme fosforileer. Hierdie gefosforileerde ensiem kataliseer dan die vrylating van 'n hormoon, glikogeen-afbraak of 'n ander soortgelyke proses in 'n sel.

In meeste selle gaan hoë s-AMP-vlakke dus met vrystelling van gebergde selinhoud gepaard, en vandaar die benaming, "tweede boodskapper".

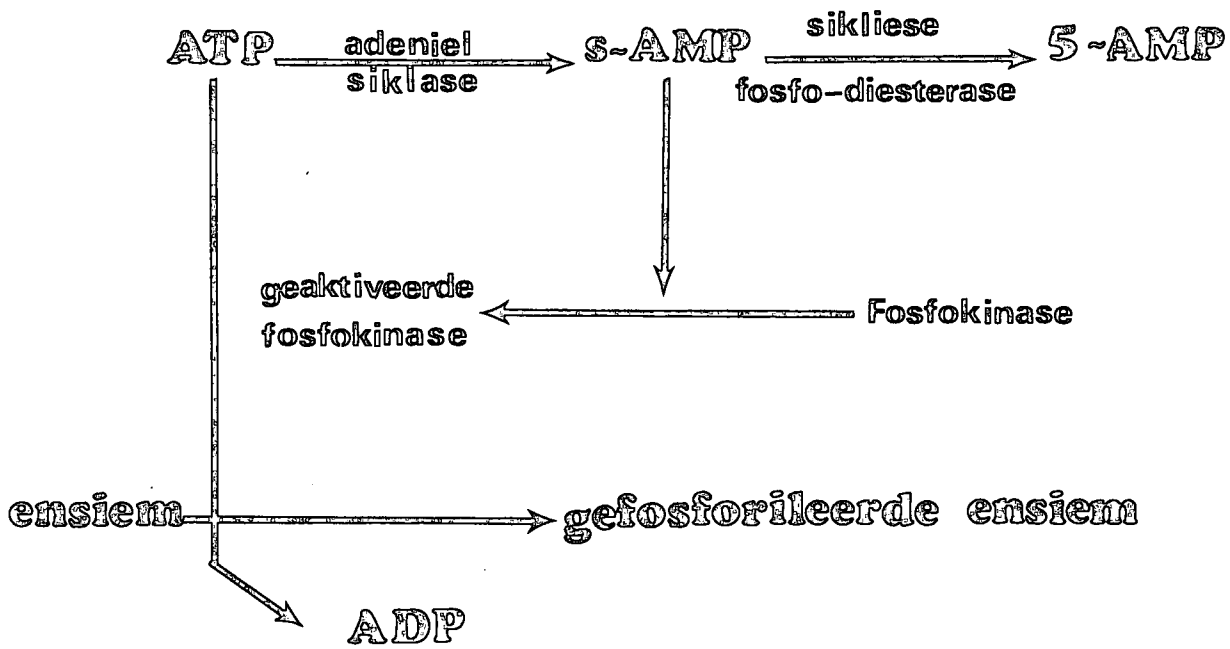


Fig. II - 4 Sikliese - AMP: metabolisme en aktivering van 'n hipotetiese ensiem.

In bloedplaatjies ( en ook in neutrofiele) hou hierdie reël egter nie. Stowwe wat die s-AMP-vlak in plaatjies verhoog, inhibeer plaatjiefunksie. Hierdie inhibisie kan egter oorkom word deur die induseerder se konsentrasie genoegsaam te verhoog. Dit skyn dus asof daar maar min verband mag wees tussen s-AMP-vlakke as sulks en plaatjie-aktiwiteit. Die ware omset van s-AMP mag dalk dié belangrikste faktor wees.

Alhoewel hierdie sikliese nukleotied se presiese werking nog nie helder is nie, werp dit alreeds aansienlike lig op die werkingsetels van inhibitore van plaatjie-funksie. Hierop sal later verder uitgebrei word.

#### IV ADENOSIEN EN PLAATJIE-REAKSIES:

Die inhibitoriese effek van AMP en ATP op plaatjieklomping is slegs te wyte aan die afbraak van hierdie stowwe na adenosien (Rozenberg en Holmsen 1968, Salzman et al 1966). Inhibisie hou nie verband met die opname van adenosien deur die plaatjie nie (Markwardt et al 1967).

Die ander metaboliese afbraakprodukte van ADP en ATP het geen soortgelyke effek nie, behalwe dat dit moontlik is dat AMP as gevolg van sy strukturele ooreenkoms met ADP in sy eie reg ook klompingsinhibisie kan veroorsaak (Packham et al 1972).

Onlangs is getoon dat adenosien-inhibisie gekoppel kan word aan verhoogde intrasellulêre s-AMP-vlakke. Adenosien, soos ook Prostaglandine E<sub>1</sub> en isoprenalien, stimuleer adenilaat-siklase-sintese met 'n gevolglike verhoging in s-AMP-vlakke (Mills en Smith 1971, Mills 1972).

Hoe s-AMP aggregasie inhibeer, is nog nie verklaar nie, maar dit mag op die basis van ATP-kompetisie berus.

Die patroon van adenosien-inhibisie, soos in die klompingsmeter gesien, is van belang. Adenosien en PRP, vooraf gemeng, toon 'n toenemende inhibisie van ADP-geïnduseerde klompings met toenemende verlenging van die inkubasie-tydperk. Maksimale inhibisie word gesien na omtrent 10 minute, daarna verminder die effek weer (Born en Cross 1963, Born 1964).

Spontane plaatjie-deaggregasie gesien met lae ADP konsentrasies, word algemeen verklaar op die basis van ADP afbraak deur plasma-ensiemstelsels en die opeenhoping van adenosien (Born en Cross 1963, Packham, Still et al 1967, O'Brien 1964), maar eksperimente met gewasde plaatjies sonder plasma werp twyfel op die teorie (Packham et al 1969).

#### Ander Plaatjieklopingsinhibitore:

Aangesien hierdie belangrike groep van stowwe nie direkte betrekking het op hierdie werkstuk nie, word verwys na onlangse algemene oorsigsartikels (Mills 1972, Packham en Mustard 1971, Mustard en Packham 1970 a).

ROL VAN PLAATJIES BY HEMOSTASE,  
TROMBOSE EN ATEROSKLEROSE

I HEMOSTASE word teweeggebring deur die interaksie van verskeie faktore, naamlik bloedstolling, bloedvat- en neurohumorale faktore, en plaatjies. Na die voorafgaande bespreking is dit nou slegs nodig om hierdie onderlinge verwantskap en die kronologiese verloop van die reaksies aan te toon.

Hemostase word basies teweeggebring deur die vorming van 'n digte plaatjie-aggregaat in die gebied van 'n breuk in die bloedvatepiteellaag (Jones 1851, Zucker 1947).

Gerieflikheidshalwe is hierdie proses in die volgende fases kronologies verdeelbaar:

- a) Die feitlik onmiddellike klewing van plaatjies aan ontblote kollageen en subendoteliale basaalmembraan van die bloedvatwand (Hugues 1960).
- b) Kollageen-kontak induseer die loslating van ADP uit die plaatjiegranules (Zucker en Borelli 1962, Hovig 1963 a, Spaet en Zucker 1964).
- c) Hierdie endogene ADP veroorsaak 'n sekondêre klompingsvraag met vergroting van die aggregaat (Gaardner et al 1961, Born 1962). Hierdie aggregasie is nog omkeerbaar

indien slegs klein hoeveelhede ADP vrygestel word (O'Brien 1962, Born en Cross 1964, Constantine 1965).

- d) Vrygelate endogene serotonien beïnvloed die vaskulêre fase van hemostase (Grette 1962, Buckingham en Maynert 1964, Spaet en Zucker 1964, Holmsen 1965, Markwardt et al 1965, Mills et al 1968) en plaatjie faktor 3 beskikbaar gestel op die plaatjie-oppervlakte (Spaet en Cintron 1963, Mustard et al 1964, Hardisty en Hutton 1967, Walsh 1972), versnel die intrinsieke stollingsmeganisme en trombiengenerasie. Hierdie trombien induseer dan onomkeerbare klomping en verdere vrylatingsreaksie (Grette 1962).
- e) Die plaatjie-aggregaat word verstewig en gekonsolideer deur die fibrien ontleen van intrinsieke bloedstolling.
- f) Laastens word die stolsel vir bloed ondeurlaatbaar gemaak deur stolselinkrimping gepotensieer deur die plaatjieproteïen, trombastenien (Bettex-Galland en Lüscher 1959, Nachman et al 1967, Born 1958, Bettex-Galland et al 1969).

## II TROMBOSE:

Intravaskulêre trombose is 'n term wat verskeie patologiese prosesse behels en moet as heeltemal losstaande van hemostase beskou word.

Die morfologiese kenmerke van 'n trombus word bepaal deur faktore wat bloedvloei, bloedvatendoteel, plaatjies en die stollingsmeganisme insluit. Die trombus bestaan uit twee dele: 'n bleek gedeelte geheg aan die vatwand en met plaatjies, fibrien en leukosiete as vernaamste bestanddele; en 'n rooi losdrywende stert wat saamgestel is uit fibrien en rooibloodselle (Bizzozero 1882).

Die verhoudings van die komponente wissel van trombus tot trombus (Wessler et al 1959, Poole en French 1961, Wessler 1962, Wessler 1963) en arteriële trombi bevat baie meer plaatjies as veneuse trombi.

Die vroeë fases van trombusvorming stem in breë trekke ooreen met dié van hemostase. Die bloedvatwand-besering en kollageenontbloting in trombose is natuurlik net baie minder definitief omskryf. Eksperimentele trombusinduksie behels gewoonlik bloedvatendoteel-beskadiging (Jones 1851, Eberth en Schimmelbusch 1886, Bizzozero 1882), maar Honour en Mitchell (1964) het daarop gewys dat bo en behalwe die besering 'n klompingsinduseerder nodig is om plaatjietrombi te vorm. Hulle het dan ook voorgestel dat die arteriële wand stowwe met 'n ADP-tipe funksie mag bevat wat lei tot plaatjieklewing en -klompings op die beskadigde endoteel.

Interessant is dat trombi kan vorm sonder sigbare endoteelletsels (Lüscher 1967).

### III PATOGENESE VAN ATEROSKLEROSE:

Die rol van plaatjies in die patogenese van aterosklerose kan gerieflikheidshalwe uit twee oogpunte beskou word:

Eerstens, die beskadiging van die bloedvatwand deur plaatjie-inhoud, en tweedens, die rol wat georganiseerde plaatjie-ryke trombi in die etiologie van ateromatose speel.

Natuurlik hou plaatjieklomping en ook die induksie van die loslatingsreaksie nou verband met hierdie aspekte, maar dié is reeds bespreek.

#### Vroeë aterosklerose en plaatjies:

Dit word algemeen aanvaar dat intimale verdikking as gevolg van edeem en vermeerderde lokale mukopolisakkariedes en lipied die vroegste tekens van aterosklerose is (Berenson et al 1963, Geer et al 1961). Hierdie letsels, en die ligging daarvan veral om die sytak-openinge van die aorta, steun die teorie en mag verband hou met plaaslike trauma en die gevolglike groter deurlaatbaarheid van plasma-inhoud (Packham, Rowsell et al 1967).

Alhoewel daar nie voldoende bewys is dat die vrylatingsreaksie van plaatjies verantwoordelik is vir hierdie inisiële besering nie, is daar tog definitiewe eksperimentele rede om te glo dat

die plaatjies wel betrokke mag wees. In serum-siekte is getoon dat leukosiete en plaatjies fokale aorta besering kan veroorsaak (Kniker en Cochrane 1968). Dit is ook bekend dat ADP-geklompte plaatjies vaskulitis kan veroorsaak (Jørgensen et al 1967, 1970). Verder is daar histologiese bewys dat plaatjie-ryk trombi direk in die bloedvatwand ingelyf, die evolusie van die vroeë plaket kan bevorder (Dahme 1965, Mustard 1963). Trombositopenie verleen ook beskerming teen eksperimentele induksie van ateroom in konyne (Cohen en McCombs 1968).

Op die keper beskou, sou dit tog meer realisties wees om te glo dat verskeie faktore soos bloedvloei, fokale intimale besering, diffusie van plasma komponente (en veral die lipiedes) deur die oppervlakkige lae van die bloedvatwand en miskien veral die vermoë van die aorta om van hierdie stowwe ontslae te raak, deurslaggewend mag wees in die evolusie van vroeë aterosklerotiese letsels.

#### Latere stadia van aterosklerose:

Duguid (1948) het weer opflikkering van belangstelling aangewakker in 'n ou teorie (von Rokitansky 1897, Högerstedt 1897) dat murale trombi 'n rol speel by die patogenese van aterosklerose. Daar is ook meer onlangse gegewens wat hierdie teorie steun (More en Haust 1961, Chandler en Hand 1961).

Die arteriële trombus begin waarskynlik as 'n plaatjie-aggre= gaat wat gewoonlik eindig as 'n georganiseerde fibrienstolsel wat dan intimale verdikking tot gevolg het (Jørgenson et al 1967).

Aterosklerotiese letsels bevat dan ook antigeniese materiaal wat met anti-plaatjie-antiliggaam reageer (Woolf en Carstans 1967).

Dit skyn dus asof herhaalde episodes van murale plaatjie-trombose kan lei tot intimale verdikking en gevolglike steuring in die normale voeding van die intima; nekrose en cholesterol-spleet vorming (Mustard 1968). Hierdie wanvoeding van die intima-laag lei tot plaaslike endoteel-nekrose en blootstelling van onderliggende kollageen en basaalmembraan. Die bese kring= loop word nou deur plaaslike plaatjieklewing en -klomping met oorliggende trombose voltooi.

Dit skyn dus dat plaatjies vanaf die vroegste stadium van intimale verdikking tot die finale fase van intravaskulêre trombose op 'n ateromateuse plaket 'n belangrike rol in die patogenese van die letsels mag speel.

## HOOFSTUK DRIE

### TEGNIEKE: METODES EN STANDAARDISERING

	<u>Bladsy</u>	
I	VOORBEREIDING VAN PLAATJIERYK-PLASMA VIR KLOMPINGSPROEWE	21
II	PLAATJIEKLOMPING: METING EN REGISTRASIE	23
III	VOORBEREIDING VAN KLOMPINGSINDUSEERDERS EN BLOEDVATLAE	25
	i) ADP	25
	ii) Trombien	25
	iii) Adrenalien	25
	iv) Achilles-tendon en Bloedvatlae	25
IV	PROTEIENBEPALING MET DIE FOLIN FENOL-REAGENS	28
V	SKEIDING VAN ADENIEN-SAMESTELLINGS	28
	a) Papier-kromatografie	28
	b) Hoë-spanning papier-elektroforese	30
	c) Koolstof-Celite kolom-adsorpsie	31
VI	HERKENNING, HERWINNING EN KWANTITATIEWE BEPALING VAN PURIEN-METABOLIETE	35
VII	ENSIEMATIESE BEPALING VAN ADP EN AMP	36

TEGNIKE: METODES EN STANDAARDISERING

In hierdie hoofstuk sal basiese tegnieke wat algemeen gebruik is, uiteengesit word met klem op dié deel van die tegniek wat nie van proef tot proef gewissel het nie. Meer spesifieke proewe en aanpassings sal dan in die hoofstuk wat handel oor eksperimentele resultate, beskryf word.

I VOORBEREIDING VAN PLAATJIERYK-PLASMA VIR KLOMPINGSPROEWE:

Apparaat en materiale:

1. Plastiese wegdoenbare spuite, 20 ml, 50 ml, met no. 19 grootte naalde.
2. Plastiese buise.
3. Verkoelde sentrifuus: M.S.E. Mistral 2L
4. Coulter Model FN partikelteller.
5. Sitraat-oplossing vir antistol: 3,13 g trinatium sitraat in 100 ml water. Die pH van die oplossing is omtrent 7,4.

Metode:

In alle eksperimente is slegs van menslike plasma en plaatjies gebruik gemaak.

Dieselfde normale donor is vir feitlik al die klompingseksperimente gebruik. Eksperimente waarin klompingsreaksies met mekaar vergelyk is, is op dieselfde monster plasma gedoen om sodoende die geringe daaglikse wisseling in plaatjie-reaksies van selfs dieselfde gesonde persoon uit te skakel.

Die skenker het, soos versoek, geen geneesmiddels wat plaatjie=funksie moontlik kon beïnvloed gedurende die twee-week tydperk wat die proef voorafgegaan het, geneem nie.

Met die plastiese spuit is die bloed vanuit 'n voorarm vene getrek. Daar is versigtig te werk gegaan om die vorming van lugblasies en skuim in die bloed te voorkom.

Nege dele bloed is met een deel natrium-sitraat oplossing in 'n plastiese buis gemeng.

Plaatjie-ryk-plasma (PRP) is dadelik voorberei deur die monster in die verkoelde sentrifuus by 4°C teen 160 g vir tien minute af te swaai.

Plaatjie-arm-plasma (PAP) is verkry deur die bloed by 4°C teen 2 500 g vir 20 minute af te swaai.

'n Plaatjietelling van die PRP is met behulp van die Coulter model FN bepaal. Die PRP is dan met 'n geskikte volume van PAP verdun om 'n plaatjietelling van 300 000/ $\mu$ l te gee.

Korrek verstelde PRP het 'n redelik konstante optiese digtheid soos in die klompingsmeter gelees en hierdie is gebruik om die akkurate voorbereiding van PRP te kontroleer.

PRP is in 'n bad met smeltende ys gehou tot vyf minute voor gebruik wanneer dit tot 37°C in 'n waterbad verhit is.

## II PLAATJIEKLOMPING: METING EN REGISTRASIE:

Plaatjieklopping is turbidimetries met 'n kommersiële nefelometer gemeet. Die metode berus in beginsel op dié van Born en Cross (1963).

### Apparaat en materiale:

1. EEL model 169 klompingsmeter. Die kuvet word in 'n brons blok teen 'n konstante temperatuur van 37°C gehou. Die metaalstafie-roerder is teen 1 000 o.p.m. ingestel.
2. Wegdoenbare LKB 7486 2 ml polistirien kuvette met 'n ligbaan van 1 cm is slegs eenmaal stuks gebruik.
3. Registreerder: aan die klompingsmeter gekoppel om outomaties veranderinge in optiese digtheid te registreer. Twee apparate is gebruik:
  - a) Phillips PM 1800 liniêre registreerder met 'n papierwydte van 25 cm.
  - b) Vitatron UR 401 liniêre/logaritmiëse registreerder met 'n papierwydte van 20 cm.

In albei gevalle is 'n papierspoed van 2 cm/min. gerieflik gevind.

4. Waterbad: 37°C temperatuur.
5. Gesilikoniseerde pipette: 1,0 ml.
6. Glaspipette: 0,1 ml.

Metode:

Die klompingsmeter is 30 minute voor gebruik aangeskakel om die kuvethouer by 'n konstante temperatuur van 37°C te kry.

PAP van die ooreenstemmende PRP wat in die klompingsproef gebruik is, is in 'n kuvet geplaas en die aggregometer op 0% optiese digtheid ingestel.

0,9 ml PRP, vir vyf minute in die waterbad tot 37°C verhit, is dan met 'n gesilikoniseerde pipet in die kuvethouer geplaas en vir 'n minuut teen 1 000 o.p.m. geroer om seker te maak dat spontane plaatjieklomping nie plaasvind nie.

0,1 ml van die klompingsinduseerder is dan met 'n pipet in die PRP geblaas.

Die plaatjie-reaksie is dan op die registreerder gevolg.

Die maksimum verandering in optiese digtheid by die toetsmonster geïnduseer, is vergelyk met die verskil in optiese digtheid tussen PRP en PAP en as 'n persentasie uitgedruk. Die resultaat is as "persentasie klompings" gerapporteer.

### III VOORBEREIDING VAN KLOMPINGSINDUSEERDERS EN BLOEDVATLAE:

#### Apparaat:

1. Weefsel-homogeniseerder: Edmund Bühler.
2. Verkoelde sentrifuus: M.S.E. Mistral 2L.
3. Stamper en vysel.
4. Skêr, lanset.

i) Adenosien - 5<sup>1</sup> - difosfaat:

Trinatrium-sout (Miles Seravac, Kaapstad). Toepaslik verdun in normale soutoplossing.

ii) Trombien:

"Topical Thrombin" van beesoorsprong, 5 000 NIH eenhede per ampule (Parke-Davis). Toepaslik verdun in normale soutoplossing.

iii) Adrenalien:

1-epinefrien (Sigma) ook in normale soutoplossing verdun.

iv) Achilles-tendon en Bloedvatlae:

Redelik vars menslike weefsel is by nadoodse ondersoeke op persone wat 'n gewelddadige dood gesterf het, verkry. Hierdie persone was van verskillende rassegroepe, ouderdomme en geslagte en was voor dood skynbaar in 'n goeie algemene gesondheidstoestand.

a) Achilles-tendon

'n Ekstrak van hierdie weefsel is grotendeels soos deur Hovig (1963) beskryf, voorberei.

Achilles-tendon is skoongemaak en alle vet- en spierweefsel weggesny. Die tendon is deeglik in normale soutoplossing gewas totdat daar makroskopies geen bloed aanwesig was nie.

Die weefsel is met 'n skêr stukkend gesny en in 'n Edmund Bühler homogeniseerder by 4°C in 'n klein volume 0,9% NaCl fyngemaal.

Die suspensie is vir 20 minute teen 4 000 g afgeswaai. Die effens opaalglansende supernatante vloeistof is vir klompingsinduksie gebruik.

Die suspensie behou sy klompingseffektiwiteit vir omtrent vier dae indien dit by 4°C gehou word en daarna verminder dit stadig met die verloop van tyd

b) Vena cava

Hierdie dun bloedvatwand is in normale soutoplossing van alle bloed skoon gewas. Die omliggende vet- en bindweefsel is sover moontlik met 'n skêr weggesny.

Die hele vena is toe, soos in die geval van die Achilles tendon, stukkend gesny, gehomogeniseer, afgeswaai en die supernatant vir klompingsproewe gebruik. As gevolg van die dun vatwand kon die intima en ander lae nie vanmekaar geskei word nie.

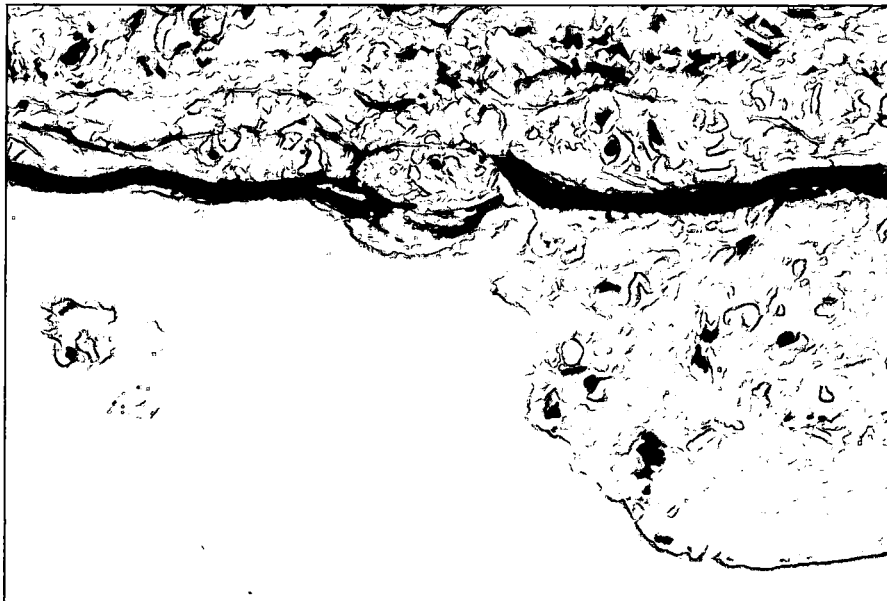


Fig. III - 1: Foto van 'n histologiese snit van 'n aorta. Aan die linker= kant is die intima met 'n lanset afgeskraap.

c) Aorta lae

Slegs vars aortaweefsel, sonder enige sigbare rooierige verkleuring van die intima, waarskynlik deur gehemoliseerde rooiselle veroorsaak, is gebruik.

Met 'n skerp lanset is die mees oppervlakkige laag van die intima afgekrap.

Die weefsel is fyngemaal in 'n porselein stamper en vysel in 'n klein volume normale soutoplossing. Die suspensie is teen 4 000 g vir 20 minute afgeswaai en die supernatante vloeistof vir klompings- en ander proewe gebruik.

Histologiese ondersoek van so 'n aorta (Fig. III - 1) toon dat, indien versigtig uitgevoer, slegs dié laag oppervlakkig tot die interne elastiese membraan afgekrap word.

'n Ekstrak van aorta-media is voorberei deur eers die intima weg te krap soos hierbo beskryf. Die volgende laag is dan met die lanset afgekrap. Hierdie laag is meer veselagtig en is in die homogeeniseerder fyngemaal in soutoplossing, afgeswaai en die supernatant gebruik.

d) Karotus-arterie

Suspensies, soos beskryf vir die aorta, is van die intima en media voorberei.

IV PROTEÏENBEPALING MET DIE FOLIN FENOL-REAGENS

Hierdie bepaling is presies soos deur Lowry et al (1951) beskryf, uitgevoer.

In beginsel berus die finale kleur van die reaksie op i) die biuretreaksie van proteïen met koper-ione in alkalie en ii) die reduksie van die Folin-Ciocaltea reagens deur die tirosien en triptofaan van die proteïen.

'n Oplossing van gekristalliseerde bees-albumien (Armour Pharmaceuticals) is gebruik om 'n standaardkurwe te trek en die proteïeninhoud van die toetsmengsels is hiervan afgelees.

Geen probleme is met oplosbaarheid van die proteïen van Achilles-tendon en aorta-lae in die verdunde alkalie ondervind nie.

V SKEIDING VAN ADENIEN-SAMESTELLINGS:a) Papier-kromatografieApparaat en materiale:

- i) Shandon 500 Chromatank.
- ii) Mikropipette - Shandon konstriksie-tipe.
- iii) Gekalibreerde Hamilton mikroliter-spuite.

- iv) Whatman no. 1 kromatografiepapier.
- v) Haardroër.

Reagense:

'n Kromatografie-oplossisteesem van Butan -1-ol - aseton - asynsuur - 5% (v/v) aq ammonia (SG 0,88) - water in volume verhoudings van 9 : 3 : 2 : 2 : 4 (Randerath en Struck 1961) is gebruik.

Metode:

Die papier is nie voor gebruik met suur gewas nie, aangesien dit diffuse kolle tot gevolg het (Markham 1957).

Monsters, bevat in 20 - 50  $\mu$ l vloeistof, is met 'n mikropipet of 'n mikroliter-spuit aangewend. 'n Haardroër-waaier met koue lug is gebruik om klein volumes opeenvolgend aangewend eers droog te blaas en sodoende is die applikasie-punt van die monster so klein moontlik (minder as 5 mm in deursnee) gehou.

Konvensionele afwaartse papier-kromatografie-tegnieke is by kamertemperatuur in die Shandon-tenk uitgevoer.

Nadat die kromatografiese skeiding voltooi is, is die papier met 'n koue lugstroom van die haardroër drooggemaak.

b) Hoë-spanning papier-elektroforese:Apparaat en materiale:

- i) Camag hoëspanning elektroforese-apparaat.
- ii) MGW Lauda konstante temperatuur waterbad met 'n ingeboude pomp wat die water kan sirkuleer.
- iii) Mikropipette: Shandon konstriksie-tipe.
- iv) Gekalibreerde Hamilton mikroliter-spuite.
- v) pH meter: Pye Unicam.
- vi) Haardroër.
- vii) Papier vir elektroforese: MN 261 (Macherey, Nagel en Kie., verskaf deur Labotec, Johannesburg).
- viii) Buffers vir skeiding van nukleotiedes:
  - (a) 1,5 M mieresuur - 2,0 M asynsuur, pH 1,9, in 'n 1 : 1 v/v verhouding (Efron 1960).
  - (b) ~~Sørensen~~ se sitroensuur-buffer, pH 5,0:
    - 1) 0,1 M dinatrium sitraat opgelos in 200 ml 1,0 N NaOH en dan verdun in water tot 1 000 ml.
    - 2) 0,1 N HCl.

Die buffer word voorberei deur x ml van oplossing 1) by (100 - x) ml van oplossing 2) te voeg. (Documenta Geigy 1962).

'n Sitroensuur - buffer met pH 5,0 is deur Markham (1957) voorgestel om nukleotiedes te skei.

Metode:

Die oplossing met 'n volume van hoogstens 30  $\mu$ l wat die adenien-samestellings bevat, is met 'n mikroliter-spuit of 'n mikropipet op die elektroforese-papier appliseer. Applikasie is gedoen op die met-buffer-klamgemaakte elektroforese papier. Die kolle was omtrent 1 - 1,5 cm in deursnee. Applikasie-punte is minstens 6 cm van mekaar op die papier aangewend.

Met albei buffer-sisteme is die elektroforese by 2 - 4°C uitgevoer. Met die sitroensuur-buffer is gevind dat daar vinnige temperatuurstyging voorkom indien ysblokkies nie in die waterbad gegooi word om die verkoeler sodoende te help om die konstante lae temperatuur te behou nie.

Met mieresuur-asynsuur buffer is elektroforese met 'n spanning van 4 000 Volt en 40 milli-amp vir 30 minute lank uitgevoer.

Met die sitroensuur-buffer is 'n spanning van 3 000 Volt en 70 - 80 milli-amp vir 60 minute lank gehandhaaf.

Geen elektro-endosmotiese vloei vind onder hierdie omstandighede plaas nie.

c) Koolstof-Celite kolom-adsorpsie:

Die metode van Ireland en Mills (1966) is effens gewysig en by plaaslike toestande aangepas.

Apparaat:

- i) Glaskolomme, vernou aan die een kant, 33 cm lank en met 'n binne-deursnitmaat van 7 mm. 5 ml gegraduateerde pipette is vir die doel gebruik en is gesilikoniseer. Die kolom is vir 12 - 18 uur in kroonsuur geweek, met water gewas, gedroog en dan met 'n silikonvloei-stof bedek. Die oplossing is na 'n paar minute afgegooi, die kolom droogmaak en met water gewas. Die silikonvloei-stof wat gebruik is, is 'n 2% (v/v) oplossing van dichlorodimetielsilaan in koolstoftetrachloried ("Repelcote", Hopkin en Williams Bpk.)
  
- ii) Kolom-mantel: 'n deursigtige plastiek-mantel met 'n in-vloei- en uitvloeipyp waardeur water gesirkuleer word, is vervaardig. Sestien kolomme kan vertikaal hierin geplaas word sodat die boonste opening bó die mantel is en die vernoude kolompunt net onder die mantel is. Op die wyse kan die temperatuur waarby kolom-kromatografie plaasvind, konstant gehou word.
  
- iii) MGW Lauda konstante temperatuur waterbad met 'n ingeboude pomp wat die water kan sirkuleer.
  
- iv) Büchli draaiende verdamper met 'n waterbad by 37°C.

Reagense en materiale:

Reagense van analitiese graad is gebruik.

- i) Celite 545 (Johns-Manville Bpk., London).
- ii) Darco G-60 geaktiveerde koolstof (Atlas Chemical Corporation) - verskaf deur Chemical Formulators and Consultants, Bloemfontein.
- iii) Absorberende watte.
- iv) Trichloorasynsuur 10% (gewig/volume).
- v) Elueer-oplossing: etanol - water - 0,57% (v/v) aq. ammonia (SG 0,88) in 'n volume verhouding van 30 : 19 : 1.
- vi) Water: gedistilleerd en gedioniseerd.
- vii) Verdampingsflesse: Quickfit ronde-bodem tipe, 25 ml en 50 ml. Gesilikoniseer met "Repelcote".
- viii) 10 ml proefbuise, skoongemaak en gesilikoniseer.

Metode:

Die glaskolomme se vernoude punt is met 'n klein stukkie watterte geprop.

'n Celite-bed, 5 - 7mm hoog, is met water bo-op die watterlaag gespoel en gepak.

'n Watersuspensie van 20 mg koolstof en 40 mg Celite is daarna bo-op die Celite-laag gewas en gepak. Hierdie adsorberende laag is omtrent 6 mm hoog.

Die kolom is dan met 10 ml 10% trichloor-asynsuur, 10 ml water, 10 ml elueer-oplossing en dan weer 10 ml water, in hierdie volgorde, deurgewas. Die kolom is nou gereed vir gebruik.

Dit is belangrik om daarop te let dat ander vorms van geaktiveerde koolstof soos Merck 2186 en Norit A probeer is, maar ongeskik gevind is vir hierdie spesifieke doel.

Kolom-kromatografie is by 4°C uitgevoer deur water met dié temperatuur deur die kolom-mantel te sirkuleer.

'n Bekende volume van 'n trichloorasynsuur-ekstrak met adenien-samestellings is in die kolom geplaas en dadelik met 5 ml yskoue water deurgewas. Hierdie afval-volume is weggegooi.

Die adenien-stowwe is met 10 ml yskoue elueer-oplossing uit die koolstof gespoel en in die gesilikoniseerde proefbuis versamel.

Die eluaat is in 'n 25 ml verdampingsfles oorgegooi en met die draaiende verdamper heeltemal droog verdamp. Die flessie is gedurende verdamping in 'n waterbad met konstante water-temperatuur van 37°C gedraai.

Hierdie gedroogde eluaat is in 'n vrieskas by -20°C gehou tot dat die adenien-samestellings kromatografies of elektroforeties

geskei is. Die bergingstydperk het nooit 24 uur oorskry nie.

Die droë residu is in 30  $\mu$ l water opgelos deur die gesilikoni= seerde verdampingsfles met die hand so te draai dat die druppel water verskeie kere oor die hele glasoppervlakte beweeg.

VI HERKENNING, HERWINNING EN KWANTITATIEWE BEPALING VAN PURIEN-METABOLIE

Beginsel:

Alle nukleotides kan deur middel van hulle ultra-violet absorpsie herken word (Holiday en Johnson 1949). Die sensitiviteit van UV-fluoresensie op kromatografiepapier is sodanig dat 5  $\mu$ g van 'n adenien-samestelling herken kan word (Markham 1957).

Apparaat:

- i) Camag Ultra-violet lamp, golflengte 254 mm; in 'n donker leeskie.
- ii) Labotec gewrigsaksie skudapparaat.
- iii) Sentrifuis.
- iv) Beckman DB-G spektrofotometer met 'n gekoppelde Vitatron UR 410 liniêre/logaritmiese registreerder.
- v) pH-meter: Pye Unicam met mikro-elektrode.

Metode:

Die papier wat gebruik is vir die kromatografiese en elektroforetiese skeiding van die adenien-samestellings is onder die ultra-violetlig geplaas en die fluoresserende areas liggies

met 'n potlood gemerk. Hierdie kolle is met 'n lanset uitgesny, die papier stukkend geknip en die adenien-samestellings dan in 3 ml gedeïoniseerde en gedistilleerde water ge-elueer deur vir 60 minute lank te skud.

Die stukkies papier is teen 6 000 g vir 15 minute afgeswaai.

Die supernatant se absorpsie-spektrum in die ultra-violetliggebied, maksimale ekstinksie en ekstinksie by 260 nm is dan met die spektrofotometer en registreerder bepaal. Verdere besonderhede volg wanneer spesifieke proewe en resultate beskryf word.

Data verkry uit Burton (1969) is gebruik om die stowwe se identiteit te bevestig en kwantitatief te bepaal.

#### VII ENSIEMATIESE BEPALING VAN ADP EN AMP

Die metode van Adam (1963) is gevolg en daar is van C.F. Boehringer se ensiemkitsstel no. 15980 gebruik gemaak.

##### Beginnel:

ADP word met fosfo-enolpirovaat en pirovaat-kinase (PK) gefosforiliseer. Die pirovaat gevorm, word dan met NADH en laktaat-dehidrogenase (LDH) gereduseer.

AMP word met ATP en miokinase (MK) gefosforiliseer en die twee

ADP ekwivalente word op dieselfde wyse as hierbo beskryf, bepaal.

Reagense:

- i) 0,5 M tri-etanolamien - HCl; 2,0 M  $K_2CO_3$  in water opgelos.
- ii) 10 mM fosfo-enolpirovaat; 1,3 M KCl; 0,4 M  $MgSO_4$  in water opgelos.
- iii) 2,5 mM NADH.
- iv) 1 mg LDH/ml.
- v) 1 mg PK/ml.
- vi) 2 mg MK/ml.
- vii) 1,0 N Perchloorsuur.
- viii) Tri-etanolamien buffer; 0,1 M; pH 7,5 (1,82 g tri-etanolamien-HCl en 0,25 g natriumkarbonaat in 100 ml water).
- ix) ATP-oplossing: 1 mM in tri-etanolamien buffer met pH 7,5.
- x) AMP-oplossing:  $10^{-2}$  M in tri-etanolamien buffer met pH 7,5.

Apparaat:

- i) Beckman DB-G spektrofotometer; kuvethouer teen konstante temperatuur van  $25^{\circ}C$ . Golf lengte: 340 mm; 1 cm ligpad. Finale kuvet-volume 1 ml.
- ii) Vitatron UR 401 liniêre/logaritmiëse registreerder gekoppel aan die spektrofotometer. Skaal van die registreerder ingestel sodat volskaal defleksie 1,0 ekstinksie-eenhede is. 'n Kaartspoed van 1 cm/min is gebruik.
- iii) MGW Lauda konstante temperatuur waterbad met 'n pomp om water deur die spektrofotometer te sirkuleer.

- iv) Sentrifuus.
- v) pH-meter: Pye Unicam met mikro-elektrode.
- vi) Vorteks-tipe menger.

Metode:

a) Proteïenpresipitasie:

'n Gelyke volume van die ensiembevattende proteïenmengsel is in yskoue 1,0 N perchloorsuur geplaas, goed gemeng en teen 4 000 g vir 10 minute afgeswaai.

Die supernatant is van die presipitaat geskei, geneutraliseer met die  $K_2CO_3$ -oplossing tot 'n pH van 7,0 en vir 10 minute by 4°C gelaat.

Die oplossing is gefiltreer en die filtraat stadig verwarm in 'n 25°C waterbad.

b) Spektrofotometriese bepaling:

Lesings is teen lug geneem.

As 'n blanko is die ensiematiese bepaling met 0,05 ml van die ATP-oplossing in 0,95 ml tri-etanolanien buffer, pH 7,5, gedoen. Die optiese digtheid waardes is van die ooreenstemmende lesings van die toetsbepaling afgetrek.

Toets:

Pipeteer in die kuvet:

1.	Filtraat	1,0 ml.
2.	Fosfo-enolpirovaat	0,10 ml.
3.	NADH	0,10 ml.
4.	LDH	0,01 ml.

Meng en laat reaksie voltooi word.

Lees OD ( $E_1$ )

5.	PK	0,01 ml.
----	----	----------

Meng en laat reaksie voltooi word.

Lees OD ( $E_2$ ).

6.	MK	0,01 ml.
----	----	----------

Volg reaksie tot die eindpunt.

Lees OD ( $E_3$ ).

Om die hele stelsel te toets word 0,01 ml AMP-oplossing nou bygevoeg. 'n Hernude reaksie moet onmiddellik volg.

c) Berekening van ADP en AMP waardes:

Ekstinksie koëffisieënt van NADH by 25°C.

$$\epsilon_{340} = 6,22 \text{ (cm}^2/\mu\text{M)}$$

$$\mu\text{M ADP in ekstrak} = \frac{\Delta E_{\text{ADP}} \times V_A \times V_E}{\epsilon \times d \times V_p}$$

$$\text{en } \mu\text{M AMP in ekstrak} = \frac{\Delta E_{\text{AMP}} \times V_A \times V_E}{2 \times \epsilon \times d \times V_p}$$

$$\text{waar } \Delta E_{\text{ADP}} = E_1 - E_2$$

$$\Delta E_{\text{AMP}} = E_2 - E_3$$

$$V_A = \text{volume van toetsmengsel in kuvet (ml).}$$

$$V_E = \text{totale volume van ekstrak (ml).}$$

$$V_p = \text{volume van ekstrak in kuvet (ml).}$$

$$\epsilon = \text{ekstinksie koëffisiënt (cm}^2/\mu\text{ mol).}$$

$$d = \text{ligbaan van die kuvet.}$$

## HOOFSTUK VIER

### RESULTATE

	<u>Bladysy</u>
I HERHAALBAARHEID EN STANDAARDISERING VAN KLOMPINGSPROEWE	41
1. Effek van tydsverloop en hantering op plaatjieklomping.	41
2. Herhaalbaarheid van plaatjieklomping met 'n spesifieke konsentrasie van 'n Indu= seerder en dieselfde PRP-monster.	43
3. Herhaalbaarheid van plaatjieklomping met 'n spesifieke konsentrasie van 'n indu= seerder en verskillende PRP-monsters van dieselfde donor.	44
4. ADP konsentrasie en plaatjieklomping.	46
5. Kollageen-konsentrasie en plaatjieklomping	48
II KLOMPINGSEKSPERIMENTE MET BLOEDVATLAE EN ACHILLES-TENDON	50
1. Klompingseffektiwiteit van bloedvatlae en Achilles-tendon.	50
2. Die effek van kollagenase op klompingsakti= witeit van weefselekstrakte.	52
III DIE INVLOED VAN DIE INTIMA-EKSTRAK OP KOLLAGEEN- GEÏNDUSEERDE KLOMPING	54
IV DIE INVLOED VAN DIE INTIMA-EKSTRAK OP ADP-GEÏNDU= SEERDE KLOMPING:	56
V ADENIEN-SAMESTELLING INHOUD VAN DIE INTIMA	58
1. Pre-inkubasie van adenosien en ADP en die effek op plaatjieklomping.	58
2. Pre-inkubasie van kollageen met adenosien en die effek op plaatjieklomping.	59
3. Papierkromatografie van Intima-ekstrak.	59

	<u>Bladsy</u>
VI DIE EFFEK VAN INTIMA OP ADP	62
VII INTIMA-EKSTRAK EN PLAATJIEKLOMPING	64
1. Kollageengeïnduseerde klompings.	64
2. Adrenalien-geïnduseerde klompings.	66
3. Trombien-geïnduseerde klompings.	67
VIII AFBRAAK VAN ADP	70
1. Semi-kwantitatiewe skeiding met papierkromatografie.	71
2. Koolstof-adsorpsie van adenien-samestellings.	73

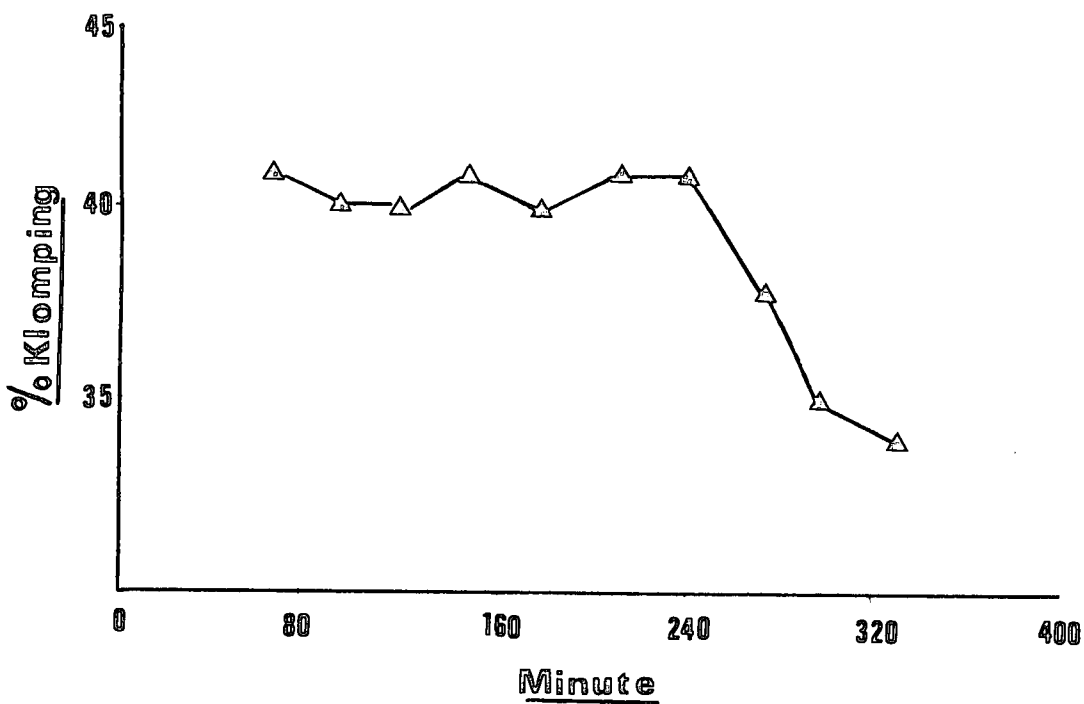


Fig. IV - 1: Effek van tydsverloop op plaatjeklompings=effektiwiteit.  
 PRP is voorberei en hanteer soos in die teks beskryf en met 30 minute tussenposes met 5  $\mu$ M ADP (finale konsentrasie) ge-aggregeer. Na 240 minute verminder plaatjeklompings betekenissvol.

RESULTATEI HERHAALBAARHEID EN STANDAARDISERING VAN KLOMPINGSPROEWE:1. Effek van tydsverloop en hantering op plaatjeklompings:Doel:

Aangesien groepe klompingseksperimente, waarvan die resultate met mekaar vergelyk word, op dieselfde monster PRP uitgevoer is, is dit van belang om te weet hoe lank hierdie plaatjies hulle vermoë om herhaalbaar op klompingsinduksie te reageer, behou.

Metode:

In eksperimente waar die standaard metodes toegepas is, is 0,1 ml van 'n oplossing, met 'n finale konsentrasie van  $5 \mu\text{M}$  ADP in PRP, met tussenposes van 30 minute by 0,9 ml monsters van dieselfde PRP-preparaat gevoeg en die persentasie klompingsinduseer, gemeet.

Resultate:

Van fig. IV - 1 is dit duidelik dat die plaatjies tot 240 minute ná versameling nog op 'n herhaalbare wyse op die ADP reageer. Daarná verminder die klompingspersentasie gaandeweg progressief met die verloop van tyd.

Op grond van hierdie en soortgelyke proewe is besluit om alle eksperimente op PRP binne drie uur na die versameling van die bloedmonster uit te voer.

As verdere kontrole is die klompingsrespons van die plaatjies dan nog ook aan die einde van 'n proefreeks weer getoets en vergelyk met resultate van 'n soortgelyke ADP-konsentrasie as wat kort na bloedversameling gebruik is.

Die resultate van 'n proefreeks is slegs aanvaar wanneer daar geen betekenisvolle afname in klompingsaktiwiteit gedurende die proeftydperk aangedui is nie.

	ADP	Kollageen	Trombien	Adrenalien
Eksperiment	% klomping	% klomping	% klomping	% klomping
1	34	64	51	49
2	34	64	50	46
3	35	63	49	48
4	35	64	50	48
5	34	64	50	50
6	34	64	51	49
7	33	65	49	49
8	34	66	52	49
9	34	64	49	48
10	33	63	50	48
11	34	64	50	49
12	34	64	49	49
Gemiddelde persentasie klomping	34,0	64,1	50,1	48,5
Standaard afwyking	$\pm 0,6$	$\pm 0,8$	$\pm 0,9$	$\pm 1,03$
Koëffisiënt van variasie	1,76	1,25	1,80	2,12

**Fig. IV - 2** : Herhaalbaarheid van plaatjieklopingsproewe met verskeie induseerders (konsentrasies soos in die teks aangegee). Proewe met 'n spesifieke induseerder is op dieselfde monster PRP uitgevoer.

2. Herhaalbaarheid van plaatjeklompinq met 'n spesifieke konsentrasie van 'n Induseerder en dieselfde PRP-monster:

Doel:

Aangesien die beoordeling van baie van die eksperimente met PRP se resultate berus op wisseling in persentasie klompinq geïnduseer, is die herhaalbaarheid van plaatjeklompinq met die verskillende induseerders nagegaan.

Metode:

Dieselfde konsentrasie van 'n klompingsinduseerder is herhaaldelik by 0,9 ml monsters van dieselfde PRP-bron gevoeg en die persentasie klompinq induseer, is gemeet.

- i) ADP: Finale konsentrasie: 5  $\mu$ M.
- ii) Kollageen: Finale konsentrasie: Proteïëinhoud 10 mg/100 ml.
- iii) Adrenalien: Finale konsentrasie: 5  $\mu$ M.
- iv) Trombien: Finale konsentrasie: 0,1 eenheid/ml.

Resultate:

Die resultate word in fig. IV - 2 weergegee. Dit is duidelik dat dieselfde konsentrasie van induseerder 'n baie voorspelbare klompinqseffek op dieselfde PRP-monster het.

Datum	% klompings
24.11.71	42
25.11.71	46
26.11.71	32
29.11.71	31
1.12.71	40
3.12.71	35
Gemiddeld	37,6
Standaard afwyking	5,9
Koëffisiënt van variasie	15,7

Fig. IV - 3 : Klompingseksperimente, met 5  $\mu$ M ADP as induseerder, op dieselfde donor se PRP, maar verskillende datums, soos aangedui, uitgevoer.

3. Herhaalbaarheid van plaatjieklopping met 'n spesifieke konsentrasie van 'n induseerder en verskillende PRP-monsters van dieselfde donor:

Doel:

In proewe waar resultate met mekaar vergelyk word, is dit belangrik om te weet of persentasie klopping met 'n induseerder-konsentrasie op een PRP-monster uitgelok met dié van PRP-monsters wat op ander geleenthede getrek is, vergelyk kan word.

Metode:

0,1 ml ADP met 'n finale konsentrasie van  $5 \mu\text{M}$  in PRP is by 0,9 ml PRP, op standaardwyse voorberei en hanteer, gevoeg en die persentasie klopping induseer, is gemeet.

Hierdie proef is op verskeie verskillende geleenthede op plasma van dieselfde donor herhaal.

Resultate:

Die resultate word in fig. IV - 3 weergegee. Daar is 'n betekenisvolle wisseling in klompingsreaktiwiteit anders as wat die geval was in die vorige eksperiment waar proewe op dieselfde PRP monster uitgevoer is (Proef I(2)).

Kommentaar:

Daar is verskeie faktore bekend wat die klompingsproewe se resultate van dag tot dag kan beïnvloed: 'n hoë leukosiet=

telling verminder aggregasie (Harrison et al 1966); 'n pH 8 is optimaal en dié faktor word deur die  $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$  plasma buffersisteem beïnvloed (Skoza et al 1967) en hoër konsentrasies sitraat verminder ADP geïnduseerde klomping as gevolg van die invloed op  $\text{Ca}^{2+}$  ione (Born en Cross 1964). Al hierdie faktore mag die wisseling wat hier gevind is, gedeeltelik verklaar.

In al die proewe wat hierna beskryf word, is groepe resultate van klompingseksperimente wat direk met mekaar vergelyk is, op dieselfde FRP-monster uitgevoer.

Meeste van hierdie proewe is op dieselfde persoon se plaatjies gedoen. Al die proewe is verskeie maal herhaal om seker te maak dat die resultate nie 'n frats is nie.

Al die proewe is ook met ander skenkers se plaatjies herhaal om sodoende die moontlikheid van 'n spesifieke reaksie eie aan die gereelde donor se plaatjies, uit te skakel.

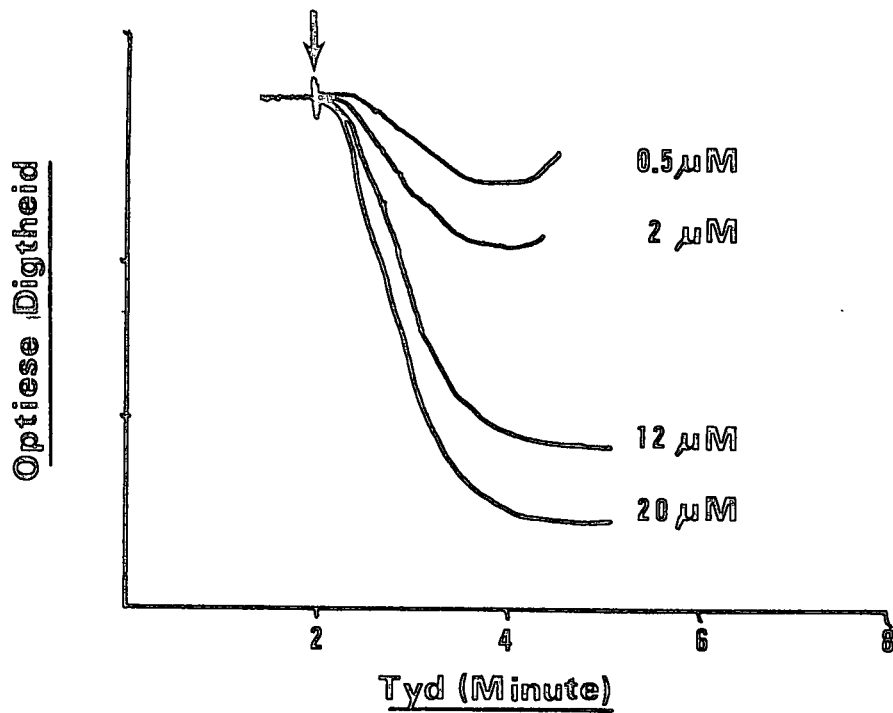


Fig. IV - 4 : Plaatjie-aggregasie kurwes met wisselende ADP-konsentrasie en konstante plaatjietellings. Die pyltjie dui die tydstop van ADP toevoeging aan.

#### 4. ADP konsentrasie en plaatjieklomping:

##### Doel:

Om die verhouding tussen ADP-konsentrasie en persentasie klompings induseer, te bepaal.

##### Metode:

Verskillende konsentrasies van ADP, wat wissel van 'n finale konsentrasie van 0,5 tot 20  $\mu\text{M}$  is by PRP met 'n konstante plaatjietelling gevoeg en die reaksie soos dit in die klompingsmeter plaasvind, is geregistreer.

##### Resultate:

Fig. IV - 4 toon voorbeelde van so 'n familie kurwes aan. Dit blyk dat twee aspekte van die kurwe deur die ADP-konsentrasie beïnvloed word. Eerstens, is daar 'n progressiewe groter vermeerdering in die maksimale verandering in optiese digtheid soos die ADP-konsentrasie verhoog word. Hierdie aspek kan gemeet en uitgedruk word as die persentasie klomping deur 'n spesifieke konsentrasie van ADP geïnduseer. Tweedens is daar 'n vermeerdering in die hoek van die helling van die kurwe soos die ADP-konsentrasie styg. Hierdie weerspieël die spoed van die klompingsreaksie en kan gemeet en uitgedruk word as verandering in OD wat per minuut plaasvind.

Albei hierdie fasette, naamlik die persentasie klomping geïnduseer, en die klompingsreaksiespoed kan gebruik word om plaatjie-aggregasie kwantitatief uit te druk.

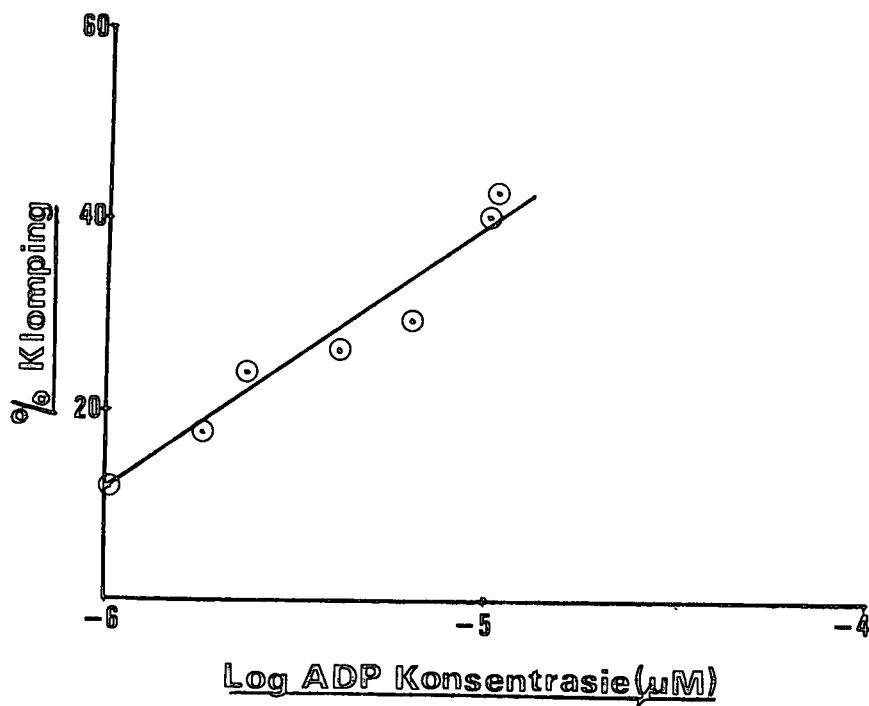


Fig. IV - 5: Verhouding tussen ADP konsentrasie en persentasie plaatjieklomping.

In alle eksperimente hier uitgevoer, is die persentasie klomping arbitrêr as parameter verkies aangesien dit makliker is om te meet.

Soos in fig. IV - 5 aangetoon, is daar 'n direkte verhouding tussen die persentasie klomping induseer en die logaritme van die molare ADP-konsentrasie.

Die resultate stem ooreen met die van Born en Cross (1963) en is beskou as aanduidend dat die effens gewysigde plaaslike klompingstegnieke en hantering van bloedplaatjies nie laasgenoemde se funksie en reaktiwiteit nadelig beïnvloed nie.

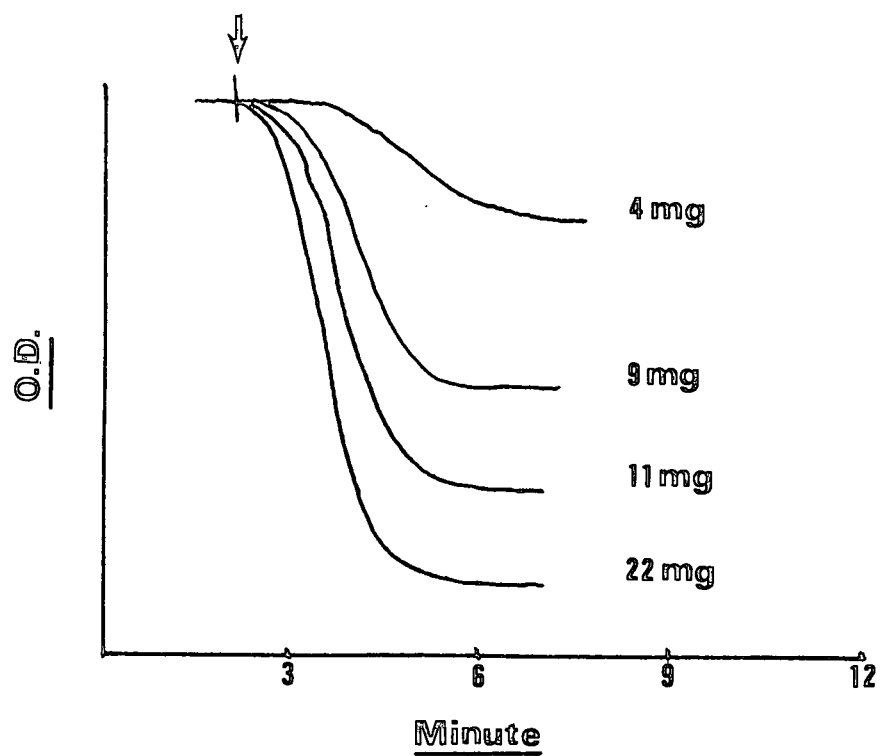


Fig. IV - 6 : Plaatjie-aggregasie kurwes met wisselende kollageen-konsentrasies en konstante plaatjietelling.

## 5. Kollageen-konsentrasie en Plaatjieklomping:

### Doel:

Om die verhouding tussen kollageen-konsentrasie en klomping induseer, te bepaal.

Die proteïeninhoud van kollageenekstrakte soos met die Folin-Ciocaltea reagens bepaal, is gebruik as 'n indeks van die konsentrasie van die kollageen.

### Metode:

Verskillende hoeveelhede kollageen, uitgedruk as finale konsentrasies proteïen per 100 ml, is by PRP met 'n plaatjietelling van 300 000/ $\mu$ l gevoeg en die reaksie in die klompingsmeter, soos weerspieël op die registreerder, gevolg.

### Resultate:

Fig. IV - 6 toon so 'n familie kurwes aan.

Van hierdie stel kurwes kan weer 'n paar gevolgtrekkings gemaak word. Daar is, eerstens, 'n verhouding tussen die kollageen-konsentrasie en die maksimale vermindering in optiese digtheid. Dit sal weerspieël word deur vermindering in die persentasie aggregasie geïnduseer.

Dit is ook duidelik dat die kurwe na die toevoeging van kollageen in 'n latente fase en 'n klompingsfase verdeel kan word.

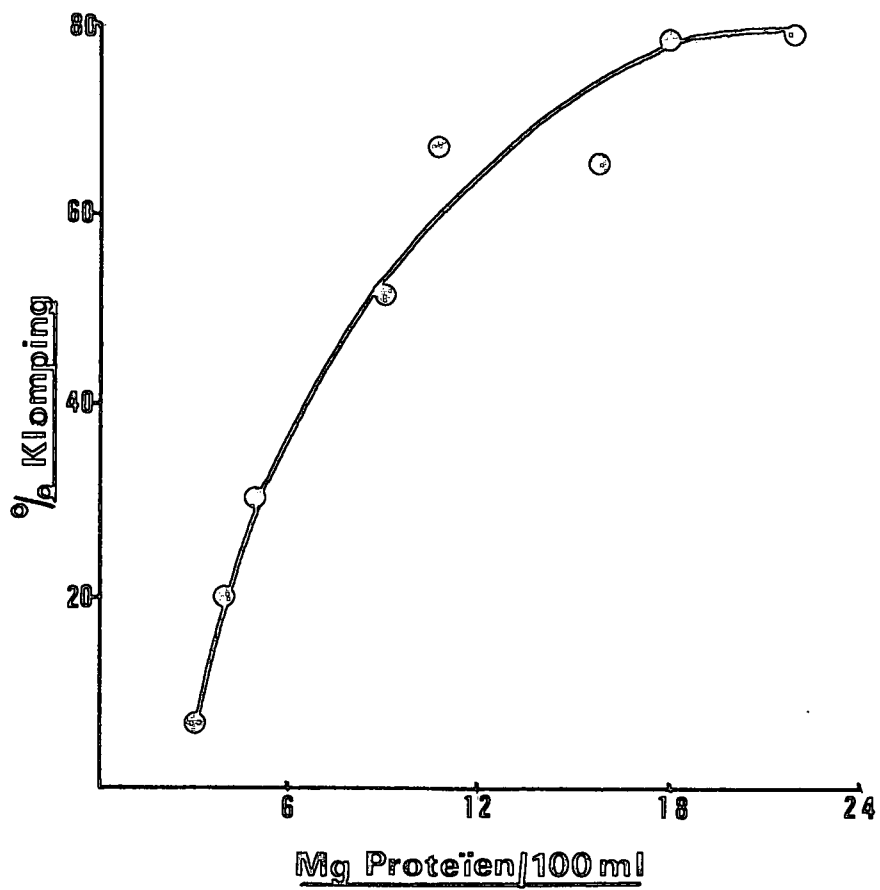


Fig. IV - 7 ; Verhouding tussen collageen-konsentrasie (uitgedruk as finale konsentrasies proteïen/100 ml) en persentasie klomping.

Die latente fase verleng progressief met laer kollageen-konsentrasies.

Daar is ook soos in die geval van ADP, 'n verhouding tussen die hoek van die helling van die klompingsfase en die hoeveelheid kollageen by die PRP gevoeg. Die spoed van die klompingsreaksie versnel met hoër kollageen-konsentrasies.

Aangesien die maksimale verandering in optiese digtheid uitgedruk as persentasie klomping, die akkuraatste en gemaklikste bepaal kan word, is besluit om hierdie parameter te gebruik om klompingsinduksie kwantitatief te meet.

Fig. IV - 7 dui die verhouding tussen proteïeninhoud van die kollageen-ekstrak en die persentasie klomping geïnduseer aan.

Sodra die proteïeninhoud minder as 'n kritieke konsentrasie raak (omtrent 10 mg/100 ml) veroorsaak klein veranderinge in kollageen-konsentrasie relatief groot veranderinge in persentasie-klomping.

Die resultate stem goed ooreen met dié van Wilner et al (1968) waar kollageen-konsentrasies as µg kollageen en nié as proteïeninhoud uitgedruk is.

## II KLOMPINGSEKSPERIMENTE MET BLOEDVATLAE EN ACHILLES-TENDON

### 1. Klompingseffektiwiteit van bloedvatlae en Achilles-tendon:

#### Doel:

Die eksperiment is beplan om te bepaal of verskillende lae van die bloedvatwand plaatjieklomping kwantitatief of kwalitatief kan beïnvloed. 'n Ekstrak van Achilles-tendon is as basiese standaard gebruik waarteen die effektiwiteit van ander weefselestrakte gemeet kon word. Weereens is proteïeninhoud as 'n indeks van weefsel-ekstrak-konsentrasie gebruik.

#### Metode:

Ekstrakte van Achilles-tendon, karotus arterie-media, aorta-media, vena cava en aorta-intima is soos reeds beskryf, voorberei.

Die suspensies se proteïeninhoud is bepaal en al die weefsel-ekstrakte tot 'n vergelykbare konsentrasie verstel deur met toepaslike volumes normale soutoplossing te verdun sodat hulle 'n gelykwaardige proteïenkonsentrasie bevat.

0,1 ml volumes van hierdie suspensies is by 0,9 ml PRP met 'n plaatjietelling van 300 000/ $\mu$ l in die klompingsmeter gevoeg en die klompingsreaksie gevolg en geregistreer.

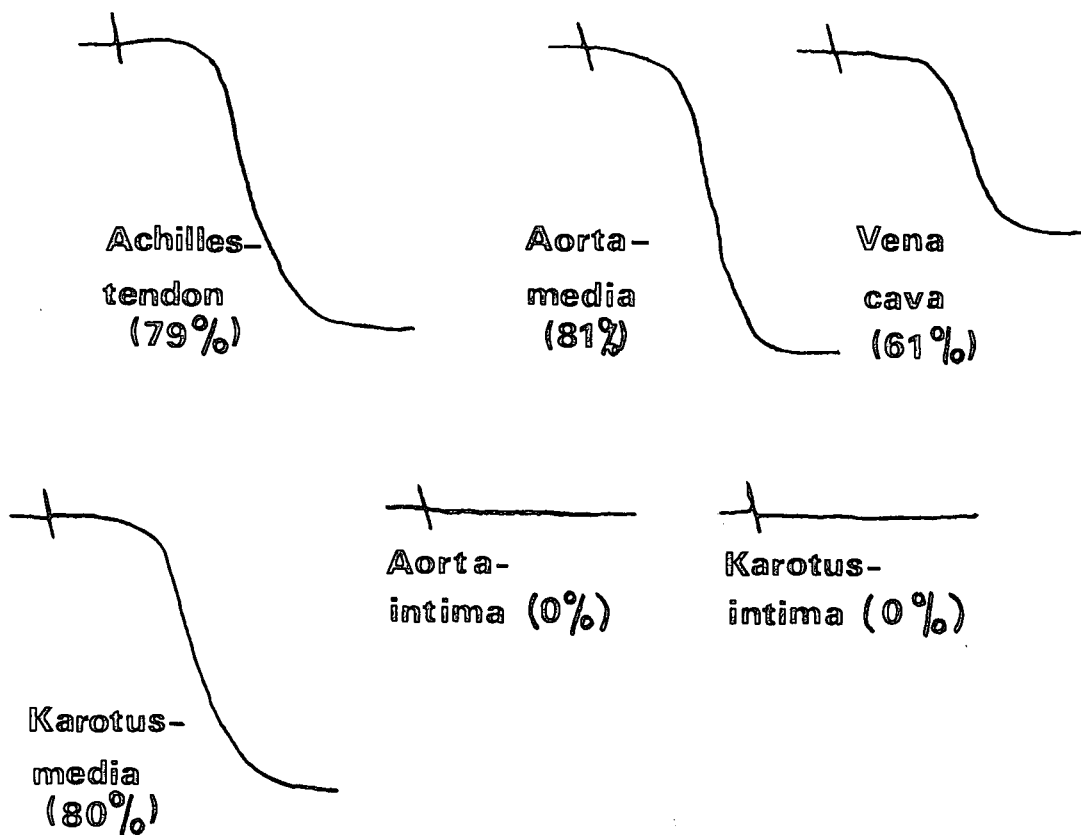


Fig. IV - 8 : Plaatjieklopping deur verskillende weefsel-  
ekstrakte geïnduseer

Al die weefsel-ekstrakte is tot 'n finale proteïeninhoud van 15 mg/100 ml verstel. Die syfers in hakies dui op persentasie klopping. Hierdie resultate is verteenwoordigend van herhaalde proewe uitgevoer met weefselekstrakte van verskillende oorsprong op PRP-monsters van verskeie donors.

Resultate:

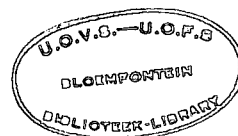
Soos aangedui in Fig IV - 8, wat die resultate van 'n verteenwoordigende proef weerspieël, is daar geen verskil in klompingsaktiwiteit van Achilles-tendon, aorta-media en karotus-media nie. Die klompingsinduksie van die mediale laag van die bloedvatwand is net soos in die geval van die Achilles-tendon eweredig aan sy proteïen-inhoud.

Die aorta-intima en karotus-intima beskik oor geen klompingsaktiwiteit nie.

Die vena cava toon minder aktiwiteit as die bloedvat-media en Achilles-tendon van gelykwaardige proteïeninhoud. Hierdie is waarskynlik te wyte aan die feit dat die hele bloedvatwand gehomogeniseer is. Die proteïen-inhoud van die vena cava weerspieël dus 'n mengsel van intima, media en adventitia en is dus nie eweredig aan sy klompings-effektiwiteit soos in die geval van arterie-media nie.

52/.....

150504



2. Die effek van kollagenase op klompingsaktiwiteit van weefselekstrakte:

Doel:

Dit is bekend (Hovig 1963) dat die klompingsaktiwiteit van 'n tendon-ekstrak aan die kollageen-inhoud van die suspensie te wyte is.

Hierdie kan bewys word deur die proteolitiese ensiem, kollagenase, met 'n spesifieke effek net op kollageen, se uitwerking op die klompingsaktiwiteit van 'n induseerder te toets (Hovig 1963, Wilner et al 1968).

Die huidige proef is beplan om te bepaal of die klompingsaktiwiteit van die bloedvatmedia aan die kollageeninhoud van die ekstrak toegeskryf kan word.

Metode:

Weefselekstrakte van aorta-media en Achilles-tendon is op standaardwyse voorberei, behalwe dat die normale soutoplossing vir ekstraksie gebruik, ook 0,0025 M  $\text{CaCl}_2$  bevat het.

By 2,5 ml van die weefselekstrakte is 'n oormaat \*kollagenase (1 mg) gevoeg en die mengsel vir 15 uur by  $37^\circ\text{C}$  in 'n waterbad geïnkubeer.

---

\* Kollagenase: (Miles Seravac, Kaapstad); 1 000 Mandl eenhede/mg.

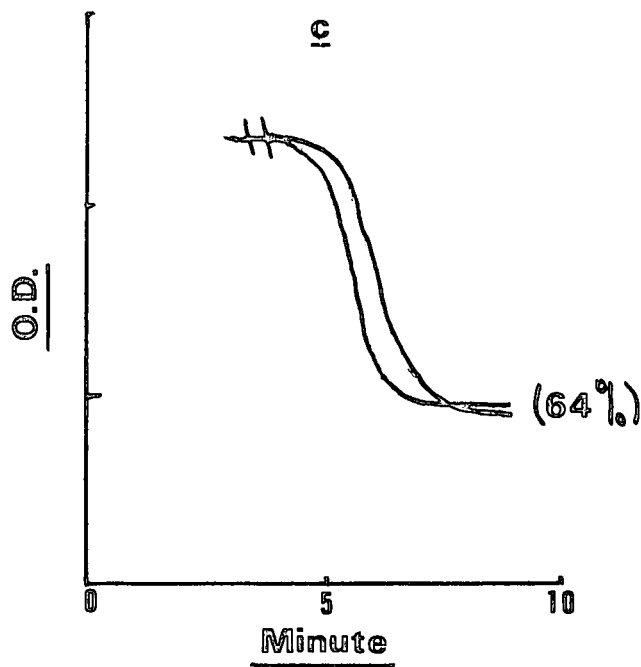
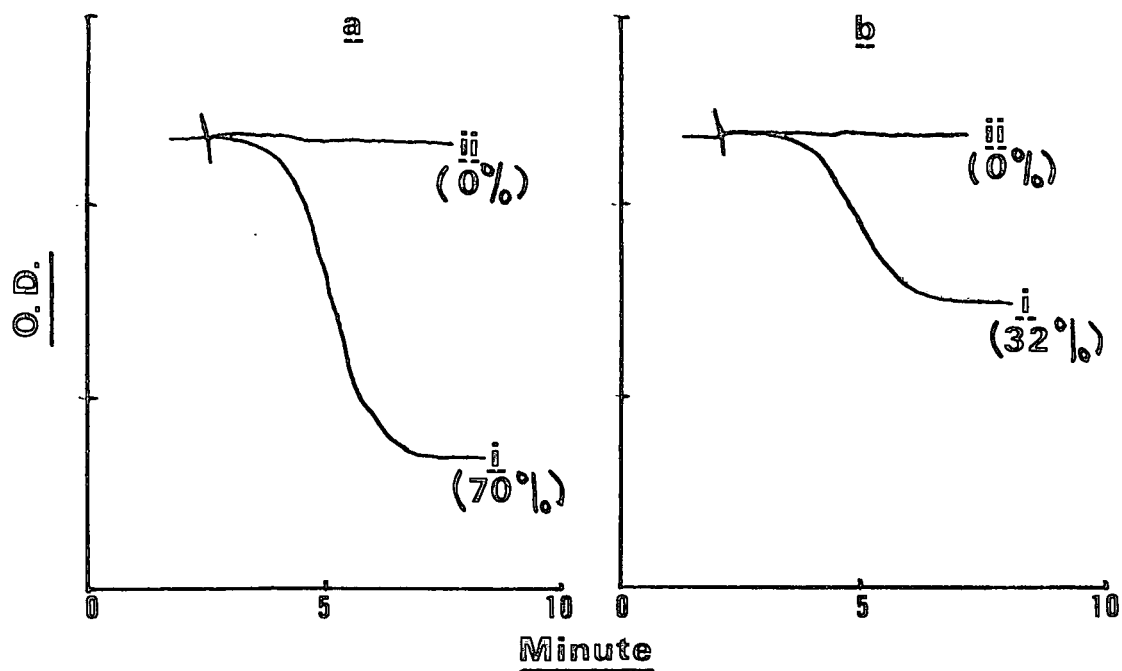


Fig. IV - 9: Verteenwoordigende klompingsproewe met kontroles en weefselekstrakte wat vir 15 uur by  $37^{\circ}\text{C}$  met kollagenase geïnkubeer is. Grafiek a) is die aorta-media sonder i) en met ii) kollagenase. Grafiek b) is Achilles-tendon sonder i) en met ii) kollagenase. In grafiek c) is plaatjies geklomp met 'n kollageen-ekstrak i); in ii) is eers kollagenase en daarna kollageen-ekstrak bygevoeg.

Weefselekstrakte sonder kollagenase en ook slegs kollagenase is op dieselfde wyse hanteer om as kontroles te dien.

Al hierdie ekstrakte se klompingsvermoë is op standaardwyse op PRP getoets.

Om die moontlikheid van 'n kollagenase-effek op plaatjies te ondersoek, is éérs kollagenase (in dieselfde konsentrasie as hierbo) en daarná kollageen by PRP gevoeg en klompings gemeet.

#### Resultate:

Die resultate word in fig. IV - 9 weergegee.

Die klompingsaktiwiteit van aorta-media sowel as Achilles-tendon ekstrakte word totaal na inkubasie met kollagenase opgehef.

Inkubasie by 37°C sonder kollagenase beïnvloed nie die aktiwiteit van die ekstrakte nie.

Kollagenase induseer self nie klompings nie. Opeenvolgende toevoeging van eers kollagenase en dan Achilles-tendon-ekstrakte verminder nie die klompings-effektiwiteit van die ekstrakte nie.

Die klompingsaktiwiteit van die bloedvatmedia berus dus op die kollageeninhoud van die ekstrakte.

### III DIE INVLOED VAN DIE INTIMA-EKSTRAK OP KOLLAGEEN- GEÏNDUSEERDE KLOMPING:

#### Doel:

Dit is van die voorafgaande eksperiment duidelik dat die aorta-intima nie oor klompingsvermoë beskik nie. Aangesien plaatjiekompings in vivo deur subendoteliale weefsel en kollageen geïnduseer word, sou dit belangrik wees indien intima die kollageense klompingsaktiwiteit sou kon beïnvloed.

Die volgende proef is beplan om hierdie vraag te probeer beantwoord.

#### Metode:

'n Kollageen-ekstrak, berei van Achilles-tendon, se proteïëinhoud is bepaal en verskeie verdunnings van die ekstrak se klompingsvermoë is getoets deur 0,1 ml van die kollageen suspensie by 0,9 ml PRP, verstel tot 'n plaatjietelling van 300 000/ $\mu$ l, te voeg.

Intima-ekstrak is voorberei en die proteïëinhoud ook bepaal. Verdunnings van hierdie suspensie is in normale soutoplossing gemaak om konsentrasies van 250 mg/100 ml en 600 mg/100 ml te verkry.

Gelyke hoeveelhede van 'n kollageen- en 'n intima-suspensie

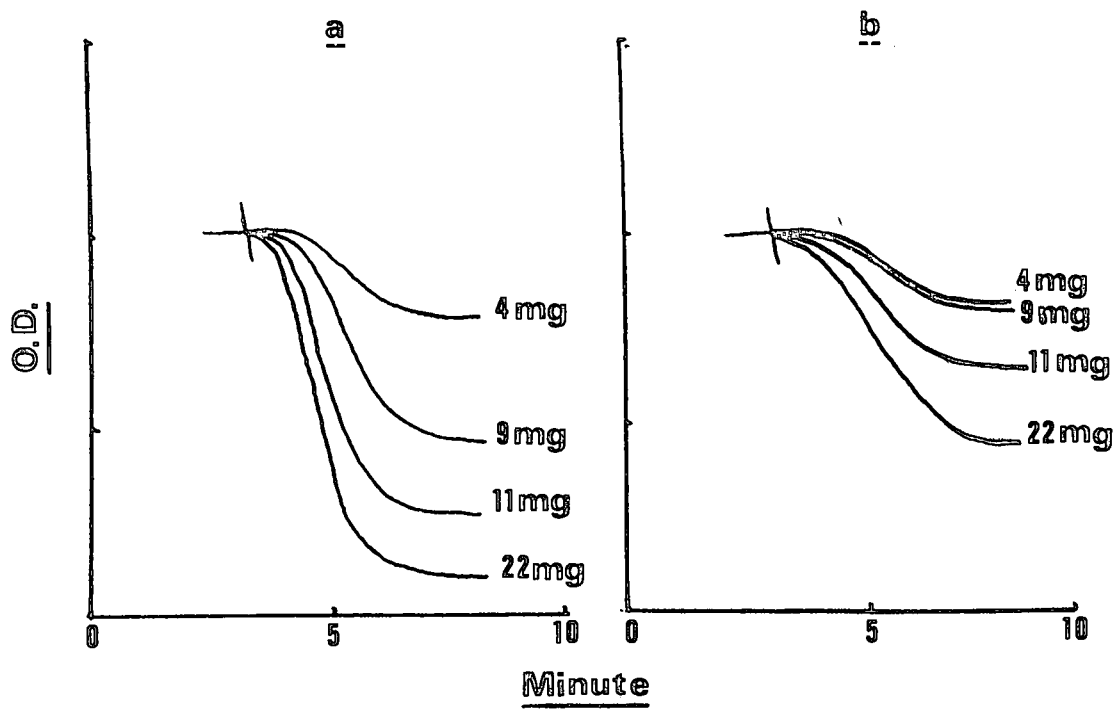


Fig. IV - 10: Vergelykende plaatjieklopingskurwes soos geïnduseer deur a) verskeie konsentrasies kollageen en b) gelykwaardige konsentrasies van kollageen vooraf met 'n intima-suspensie (proteïeninhoud 125 mg/ 100 ml) gemeng.

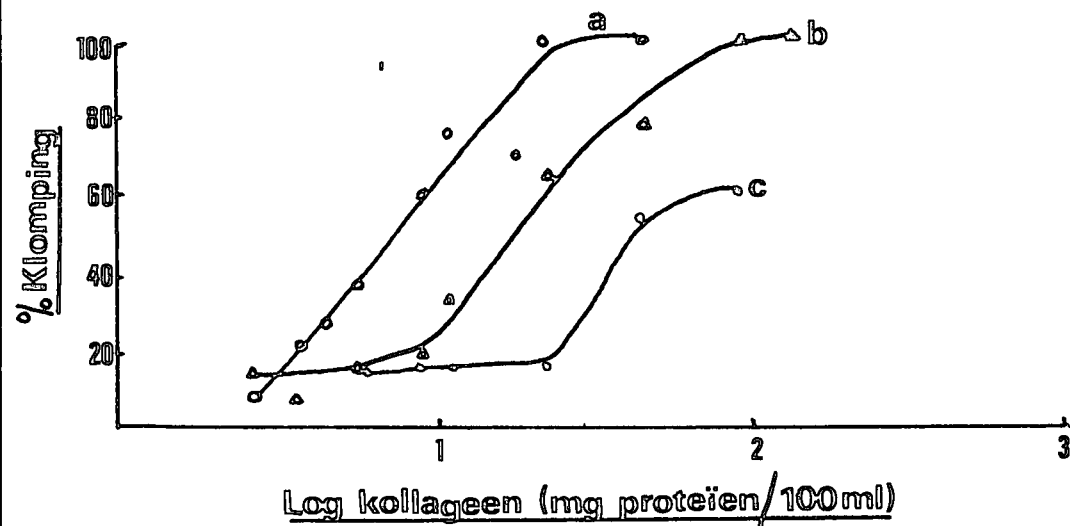


Fig. IV - 11: Sigmoide kurwes wat a) kollageen geïnduseerde klomping, en inhibisie deur intima-ekstrak van proteïeninhoud b) 125 mg/100 ml en c) 300 mg/100 ml aantoon.

is by kamertemperatuur vir vyf minute lank geïnkubeer. Die mengsel se klompingsvermoë is dan op die standaardmetode getoets.

Resultate:

Die resultate word in fig. IV - 10 en Fig. IV - 11 weergegee.

Dit is duidelik dat die klompingsvermoë van gelykwaardige kollageen suspensies verminder is indien die kollageen vooraf geïnkubeer is met intima-ekstrak. Hoe hoër die proteïeninhoud van die intima-suspensie hoe meer uitgesproke is die inhibisie van klompings.

Die inhibitor-effek kan egter oorbrug word deur die hoeveelheid kollageen bygevoeg genoegsaam te vermeerder.

Dit is belangrik om daarop te let dat die kollageen-effek nie volkome inhibeer kan word nie, maar slegs tot 'n maksimum van 80% (Fig. IV - 11).

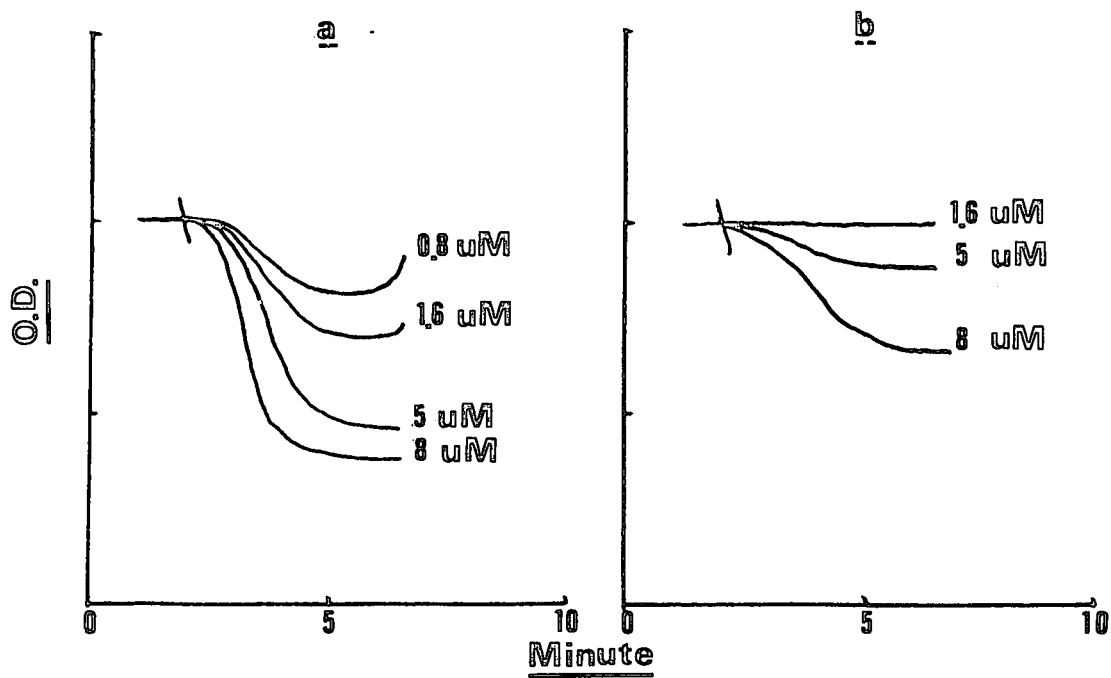


Fig. IV - 12 : Vergelykende plaatjiekloppingskurwes soos geïnduseer deur a) ADP en b) ADP preïnkubeer met 'n intima-suspensie. Die finale ADP konsentrasie word teenoor die ooreenstemmende kurwe aangegee.

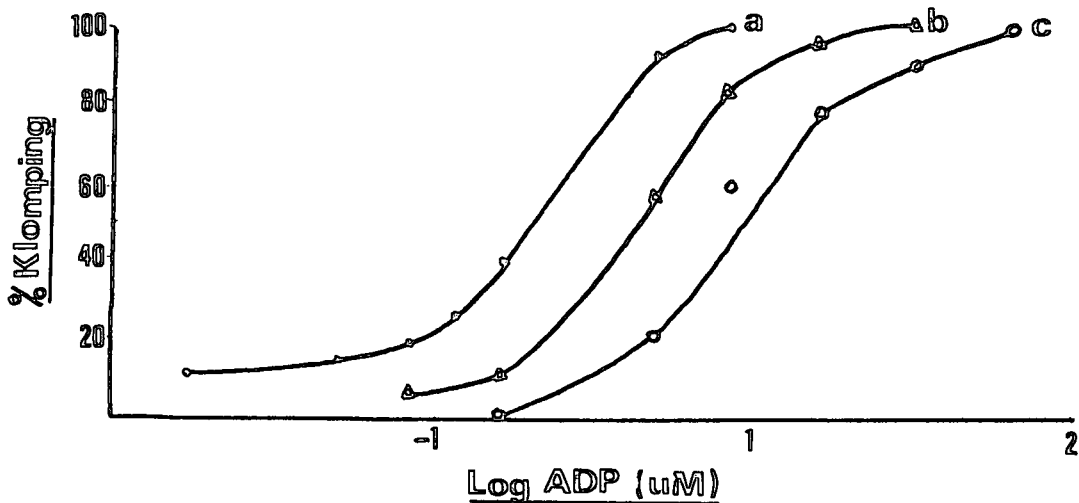


Fig. IV - 13 : Sigmoide kurwes van a) ADP-geïnduseerde klomping en inhibisie deur preïnkubasie van ADP met intima suspensie met 'n proteïeninhoud van b) 45 mg/100 ml en c) 90 mg/100 ml.

IV DIE INVLOED VAN DIE INTIMA-EKSTRAK OP ADP-  
GEÏNDUSEERDE KLOMPING:

Doel:

Aangesien kollageen-geïnduseerde plaatjieklomping grotendeels deur middel van endogene ADP uit die plaatjie-granules geskied, is die effek van die intima-ekstrak op ADP ondersoek.

Metode:

Verskillende molare konsentrasies ADP, in 0,1 ml volumes, is by PRP in die klompingsmeter gevoeg en die persentasie klomping induseer, bepaal.

'n Intima-suspensie van hoë proteïeninhoud is voorberei en met normale soutoplossing verdun om suspensies met 'n proteïeninhoud van 90 mg/100 ml en 180 mg/100 ml te verkry.

Gelyke hoeveelhede van ADP en intima-suspensie is vir 10 minute by kamertemperatuur geïnkubeer.

Hierdie mengsel se klompingsvermoë is dan op die standaardwyse getoets en die persentasie klomping induseer, bereken.

Resultate:

Die resultate word in Fig. IV - 12 en Fig. IV - 13 weerspieël.

Net soos in die geval van kollageen, is daar 'n duidelike ver-

minderung in die klompingseffektiwiteit van ADP indien die stof vooraf met intima geïnkubeer word.

Anders as in die geval van kollageen is daar egter volkome (100%) inhibisie van aggregasie moontlik indien die proteïeninhoud van die intima hoog genoeg is.

Die inhibisie effek van die intima-suspensie kan oorbrug word deur slegs 'n voldoende konsentrasie van ADP te gebruik.

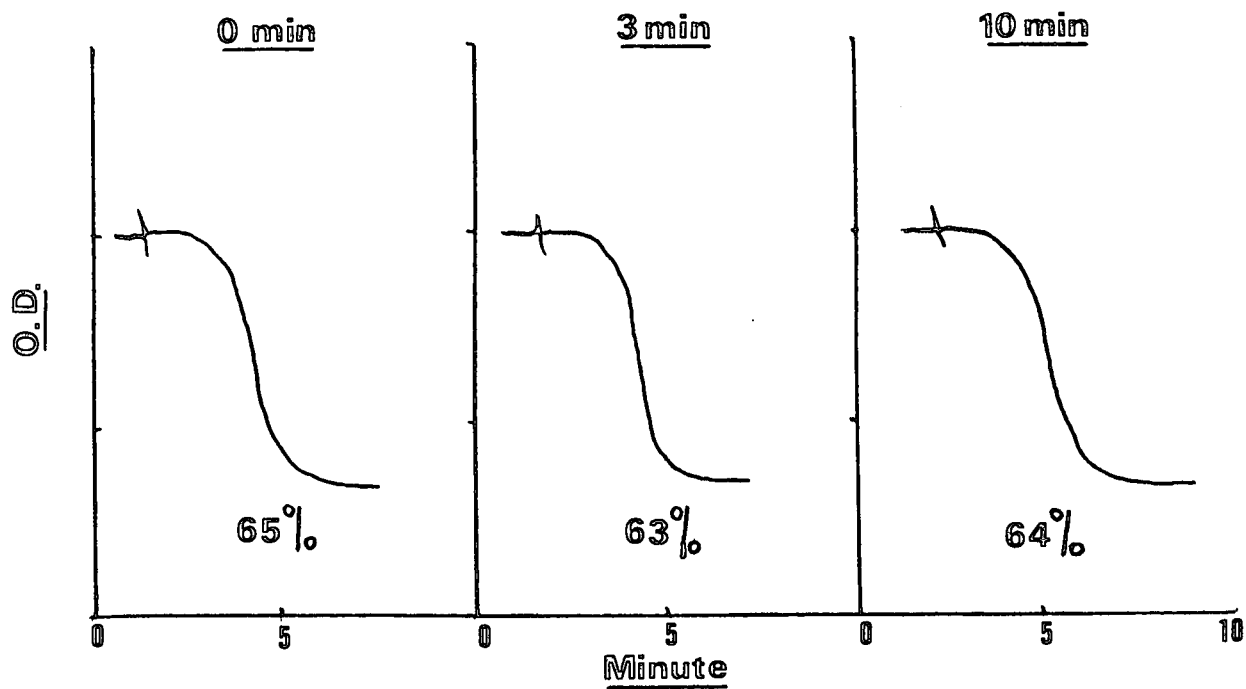


Fig. IV - 14 : Adenosien ( $15 \mu\text{M}$ ) en ADP ( $5 \mu\text{M}$ ) is vooraf gemeng en dan op die aangeduide tyd ná inkubasie by standaard PRP gevoeg. Geen verskil in die ADP se klompingsvermoë is aangetoon nie. Persentasie-klompings na een minuut pre-inkubasie was 66% (nie op die grafiek aangebring nie).

V. ADENIEN-SAMESTELLING INHOUD VAN DIE INTIMA:

Doel:

Daar is reeds vermeld dat adenosien die belangrikste biologiese inhibitor van plaatjieklopping is. Adenosien self klomp nie plaatjies nie. Dit is dus van belang om die patroon van inhibisie van adenosien en die intima-ekstrak met mekaar te vergelyk. Dit is ook belangrik om te weet of die intima-suspensie enigsins genoegsame adenosien bevat om plaatjieklopping so te beïnvloed dat dit die voorafgaande inhibisie sou kon verklaar.

Metodes en resultate:

1. Pre-inkubasie van adenosien en ADP en die effek op plaatjieklopping:

Plaatjie-ryk plasma, met 'n plaatjietelling van 300 000/ $\mu$ l, is <sup>soos</sup>gewoonlik voorberei.

Adenosien en ADP (in hoeveelhede om 'n finale konsentrasie van 15  $\mu$ M en 5  $\mu$ M respektiewelik te gee wanneer 0,1 ml van die mengsel by 0,9 ml PRP gevoeg word) is vir tydperke van een, drie en tien minute by kamertemperatuur saam geïnkubeer voor die mengsel se klompingsvermoë op die standaardwyse getoets is.

In fig. IV - 14 blyk dit duidelik dat pre-inkubasie van ADP met adenosien nie eersgenoemde se klompings-effektiwiteit beïnvloed nie.

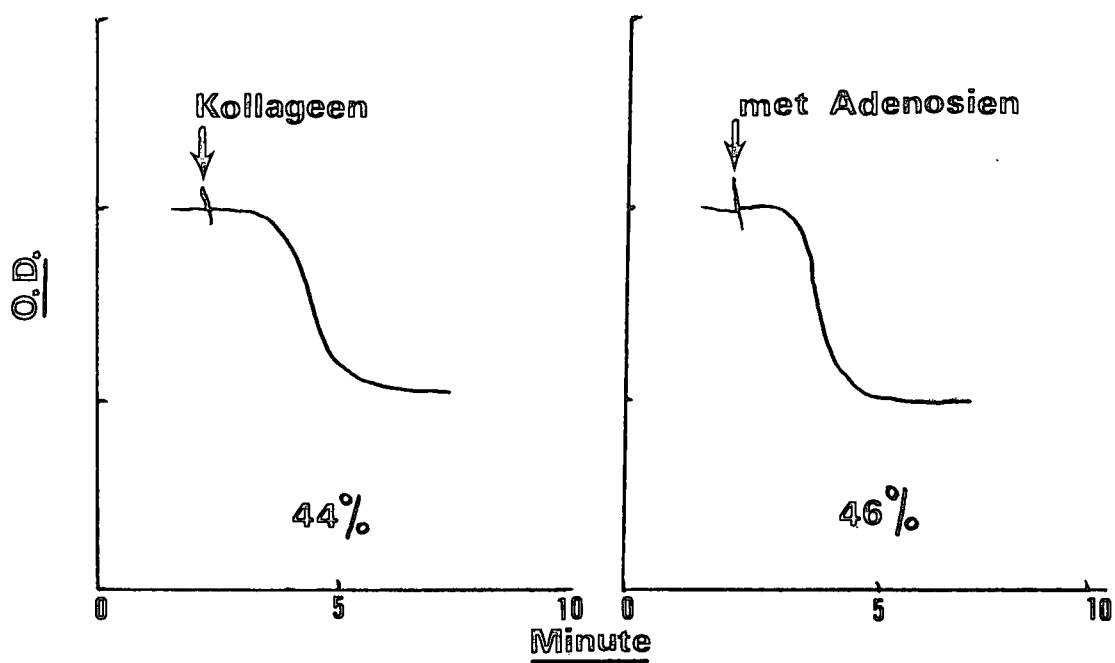


Fig. IV - 15: 'n Kollageen-suspensie en adenosien is vooraf gemeng en dan by PRP gevoeg. Soos deur die persentasie klompings induseer aangedui, is daar geen effek op die kollageen se klompingsvermoënie.

2. Pre-inkubasie van kollageen met adenosien en die effek op plaatjieklomping:

PRP met 'n plaatjietelling van 300 000/ $\mu$ l is op die standaardwyse voorberei.

'n Kollageen-ekstrak, van Achilles-tendon verkry, is vooraf vir 10 minute met adenosien (in 'n finale konsentrasie van 15  $\mu$ M na 0,1 ml van die mengsel by 0,9 ml PRP gevoeg is) by kamertemperatuur geïnkubeer. Die mengsel se klompings-effektiwiteit is dan soos gewoonlik bepaal.

Soos in Fig IV - 15 aangedui, is die klompingsvermoë van die kollageen nie deur pre-inkubasie met adenosien affekter nie.

3. Papierkromatografie van Intima-ekstrak:

Adenien-samestellings fluoresseer by 254 nm onder 'n kort-golf U-V lig en soos reeds op gewys (bls. 35), word hierdie eienskap algemeen gebruik om hierdie stowwe te herken en op kromatografie-papier te lokaliseer (Holiday en Johnson 1949). So min as 5  $\mu$ g van die stowwe kan op die wyse opgespoor word (Markham 1957).

'n Intima-suspensie is soos reeds beskryf, voorberei.

Etanol-water ekstrak van die suspensie:

'n 4 ml volume van die suspensie is by 10 ml 70% etanol in water gevoeg en die mengsel is vir 10 minute lank met 'n vorteks-tipe menger geskud.

Die mengsel is in 'n verkoelde sentrifuus by 4°C teen 12 000 g vir 30 minute lank afgeswaai om 'n presipitaat en 'n helder supernatant te verkry.

Die supernatant is in 'n draaiende verdamper by 37°C in 'n 25 ml gesilikoniseerde rondeboom Quickfit fles afgedamp.

Die residu is in 20  $\mu$ l van 'n 50% etanol-water oplossing opgelos deur die druppeltjie vloeistof verskeie kere oor die hele flesoppervlakte te rol. Die oplossing is op Whatman no. 1 kromatografie papier met 'n mikroliterspuit geappliseer. Elke paar mikroliters is eers met koue lug van 'n haardroër drooggeblaas voor die volgende aangewend is om die aplikasiepunt tot minder as 5 mm in deursnit te beperk.

'n Trichloorasynsuur ekstrak van nukleotiedes is ook as volg voorberei:

4 ml van 'n intima-suspensie is by 4 ml 10% trichloor-asynsuur gevoeg en vir 10 minute lank op 'n vorteks-menger gemeng.

Die proteïenpresipitaat is by 4°C teen 12 000 g vir 30 minute afgeswaai.

Die trichloorasynsuur in die supernatant is verwyder deur met verskeie volumes eter te ekstraer totdat die supernatant se pH 7,0 was. Die supernatant is daarna met 'n draaiende verdamper by 37°C ingedamp.

Die residu is, soos in die geval van die etanol-ekstrak, heropgelos en op Whatman no. 1 kromatografiepapier ge-appliseer.

Konvensionele afdalende papierkromatografie van hierdie twee ekstrakte is soos beskryf in Hoofstuk III - bls. 28 uitgevoer.

Die oplosfront is toegelaat om vir 6 uur by kamertemperatuur te beweeg. Geeneen van die twee ekstraksies het enige kolle wat by 254 nm onder 'n U-V-lamp fluoresseer getoon nie.

Hierdie is as genoegsame bewys aanvaar dat daar nie genoeg adenosien of ander adenien-samestellings in die intima-ekstrak aanwesig is om plaatjieklopping kwalitatief of kwantitatief te beïnvloed nie.

VI DIE EFFEK VAN INTIMA OP ADP:Doel:

In 'n eksperiment soos hierbo beskryf waar 'n poging aangewend is om adenien-samestellings uit die intima te ekstraer het dit ter sprake gekom of die metode sensitief en spesifiek genoeg is om aan sy doel te beantwoord. Daar is toe besluit om 'n klein hoeveelheid ADP by 'n intima-suspensie te voeg en om dan dié ADP weer met ekstraksie en papier-kromatografie te probeer verhaal.

Resultate:

4 ml van 'n intima-suspensie is, soos reeds beskryf, voorberei en 'n 50  $\mu$ l volume van ADP met 'n finale konsentrasie van 30  $\mu$ M bygevoeg. Na 'n tien minute periode van inkubasie by kamer=temperatuur is 4 ml van die suspensie by 10 ml 70% etanol in water gevoeg en die nukleotied ekstraer deur te skud en af te swaai soos hierbo beskryf.

Die supernatant is by 37<sup>o</sup>C afgedamp en nadat die residu in 20  $\mu$ l 50% etanol-water opgelos is, is afdalende papier-kromatografie op presies dieselfde wyse as reeds beskryf, uitgevoer.

Standaard-oplossings van ADP, ATP, AMP, adenosien, inosien en hipoxantien is op dieselfde papier geappliseer en kromatografies saam en afsonderlik geskei. Die UV-onderzoek van die intima-ADP-mengsel het wel 'n fluoresserende kol aangetoon, maar die

Adenosien	}	○		○	}	0.54
Hipoxantien						0.54
Inosien						0.47
AMP		○				0.32
ADP		○				0.18
ATP		○				0.12
Oorsprong						
		Standaard	Intima	Intima + ADP		Rf- waardes

Fig. IV - 16 : Etanol-water ekstraksie van 'n intima suspensie en intima inkubeer met ADP en papier-kromatografie skeiding van die afgedampte oplossings. Adenosien en hipoxantien het met die oplosmiddel wat gebruik is dieselfde Rf waardes.

stof het dieselfde Rf-waarde as hipoxantien of adenosien gehad en nie dié van ADP nie.

Aangesien 'n kontrole ADP-oplossing nie deur hierdie eksperimentele toestande geaffekteer is nie, was dit duidelik dat die afbraak van die ADP na adenosien of hipoxantien deur die intima-suspensie veroorsaak is. (Fig. IV - 16).

Dit is nie moontlik om adenosien en hipoxantien met hierdie oplosmiddel kromatografies te skei nie. Daar is met behulp van die absorpsie-spektrum van 'n eluaat van die fluoresserende kol gepoog om tussen adenosien en hipoxantien te onderskei, maar dit was duidelik dat 'n ander skeidingsmetode gebruik sou moes word om die probleem op te los.

VII INTIMA-EKSTRAK EN PLAATJIEKLOMPING:Doel:

Die volgende reeks eksperimente is beplan om te probeer vas=stel of die inhibitor van kollageen-geïnduseerde plaatjie=klompings wat in die intima aanwesig is, se werking moontlik op die basis van ADP-afbraak geskied.

Metodes en resultate:1. Die intima-ekstrak en kollageen-geïnduseerde klompings:

'n Gekonsentreerde intima-ekstrak verkry van normale aortas, is op standaard wyse voorberei en die proteïeninhoud tot 2 000 mg/100 ml verstel deur met 'n toepaslike volume normale soutoplossing te verdun.

'n Achilles-tendon ekstrak, met 'n proteïeninhoud van 1600 mg/100 ml is voorberei. Proewe het getoon dat verdunning van die suspensie tot 'n finale proteïenkonsentrasie van 80 mg/100 ml 'n geskikte persentasie plaatjie=klompings op die toets PRP-monster vir die proefdoeleindes induseer.

Klompingsproewe is met standaard PRP in die klompingsmeter by 37°C uitgevoer en die plaatjiereaksies outomaties geregistreer.

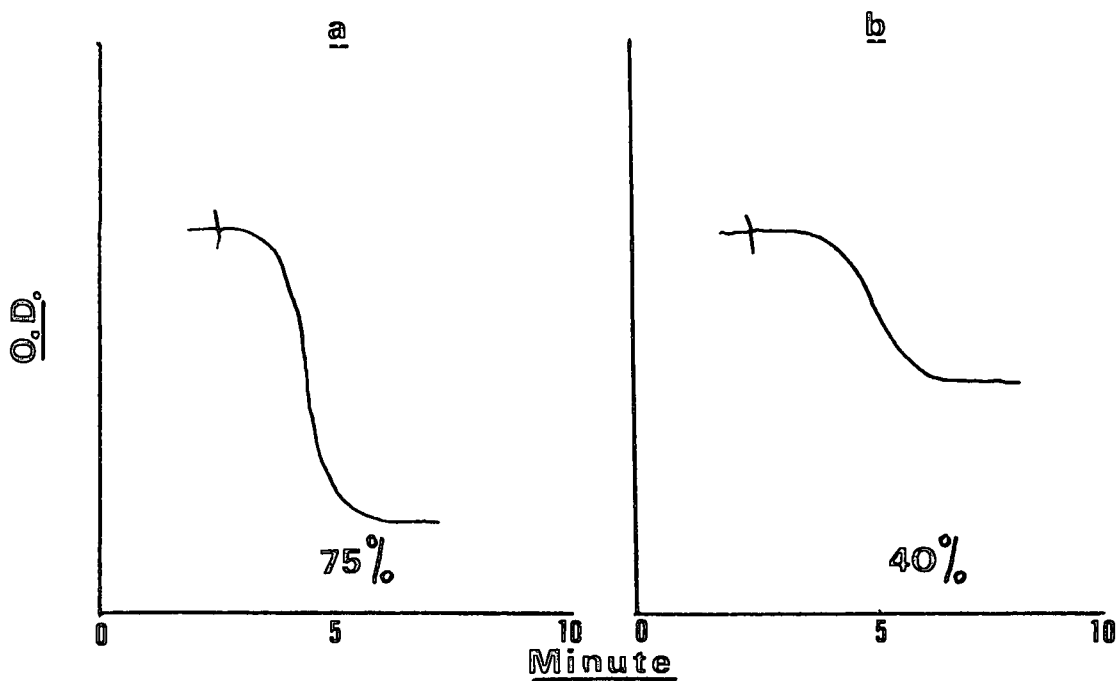


Fig. IV - 17 : a) Klompingsinduseer met kollageen (proteïeninhoud 80 mg/100 ml).  
 b) Gelykwaardige kollageen ná vier minute pre-inkubasie met intima-suspensie.

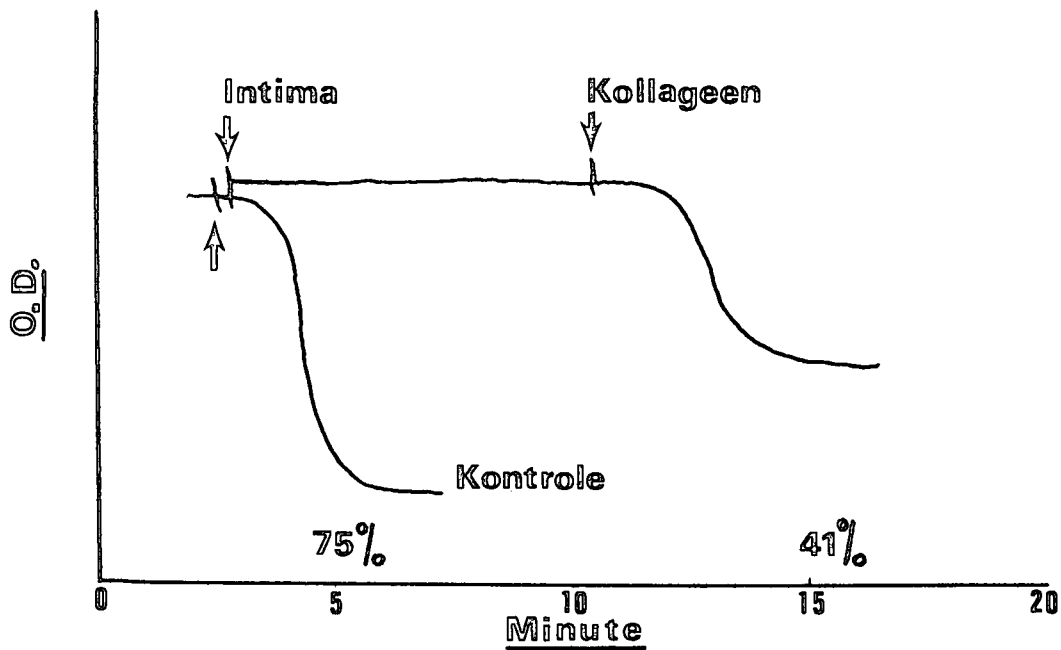


Fig. IV - 18 : Opeenvolgende toevoeging van intima en kollageen by PRP. Die kontrole-proef is uitgevoer met nét kollageen van gelykwaardige finale konsentrasie as klompingsinduseerder.

a) Pre-inkubasie van kollageen en intima:

Die kollageen-ekstrak van Achilles-tendon en die intima-suspensie is in gelyke volumes met mekaar gemeng en vir tien minute by kamertemperatuur gelaat voor 'n klompingseksperiment met 0,1 ml van die mengsel op 0,9 ml PRP uitgevoer is.

Die resultate word in Fig. IV - 17 weergegee. Die klompingseffektiwiteit van die kollageen ná inkubasie met 'n intima-suspensie (met 'n proteïeninhoud van 100 mg/100 ml), is betekenisvol ingekort.

b) Opeenvolgende toevoeging van intima en kollageen by PRP:

Die PRP is in die aggregometer geplaas, geroer, en nadat seker gemaak is dat geen spontane klompings plaasvind nie, is 0,05 ml intima suspensie (finale proteïenkonsentrasie van 100 mg/100 ml) by die plaatjies gevoeg. Die plaatjies is aanhoudend teen 1000 o.p.m. geroer. Sewe minute hierna is 'n 0,05 ml kollageen-suspensie (met gelykwaardige finale proteïeninhoud (80 mg/100 ml) as in die vorige eksperiment 1 a) ), by die PRP gevoeg en die reaksie op die registreerder gevolg.

Die resultaat (Fig. IV - 18), toon inhibisie van plaatjiekompings en hierdie inhibisie is van dieselfde orde as in die geval van die pre-inkubasie eksperiment

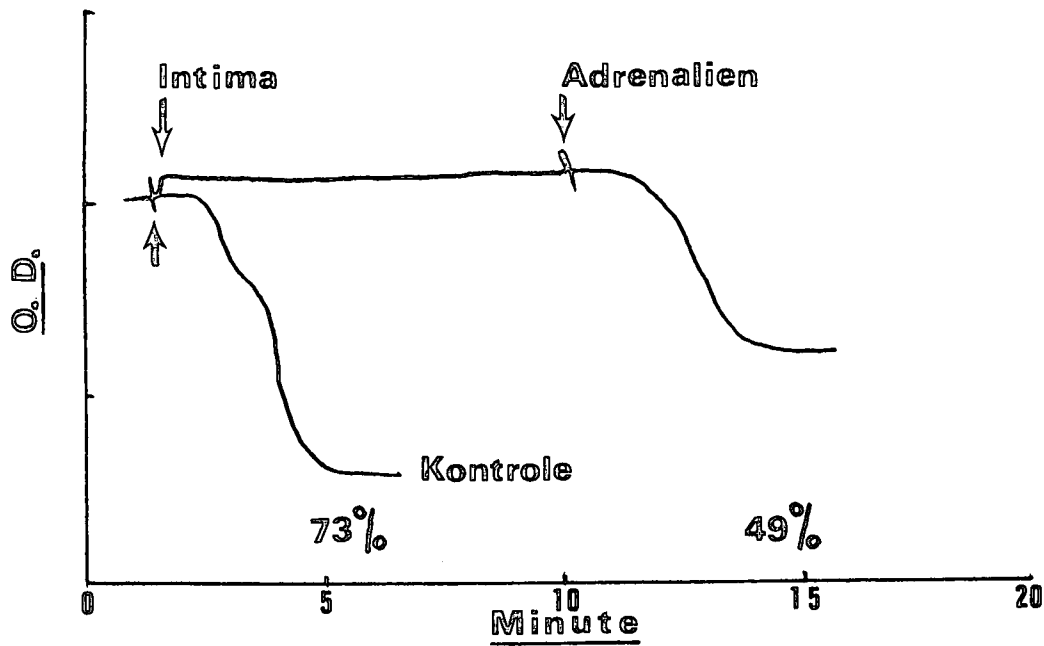


Fig. IV - 19 : Opeenvolgende toevoeging van intima en adrenalien ( $5 \mu\text{M}$ ) by PRP. Die kontroleproef is met adrenalien ( $5 \mu\text{M}$ ) as klompingsinduseerder.

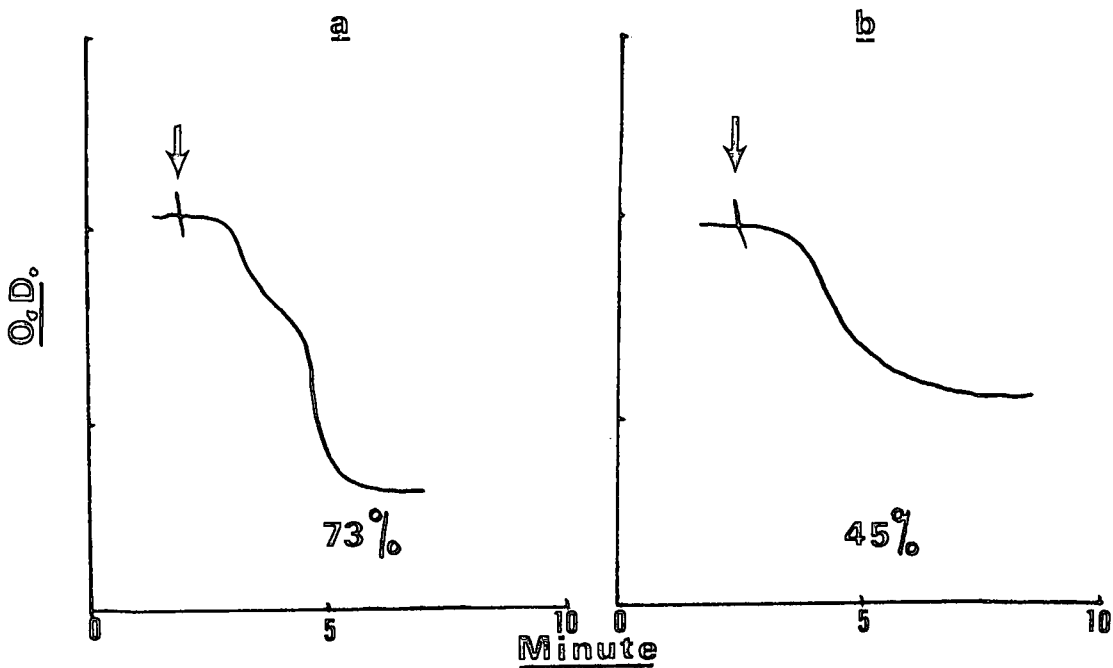


Fig. IV - 20 : a) Adrenalien-geïnduseerde klomping.  
 b) Klomping met 'n gelykwaardige finale adrenalien-konsentrasie ( $5 \mu\text{M}$ ) vooraf met 'n intima-suspensie gemeng.

2. Intima-ekstrak en adrenalien-geïnduseerde klompings:

Dit word aanvaar (O'Brien 1963, Haslam 1967) dat die tweede golf van plaatjiekompings soos deur adrenalien geïnduseer, die gevolg is van ADP verskaf deur die vrylatingsreaksie. Hierdie is dus 'n ideale model om vas te stel of die intima-ekstrak in staat is om plaatjiekompings deur endogene ADP veroorsaak, te inhibeer.

a) Opeenvolgende toevoeging van intima en adrenalien by PRP:

Die PRP is in die aggregometer geplaas, geroer en nadat vasgestel is dat spontane klompings nie plaasvind nie, is 0,05 ml van die intima-suspensie met 'n finale proteïenkonsentrasie van 100 mg/100 ml, by die plaatjies gevoeg. Die PRP is voortdurend geroer.

Nege minute later is adrenalien in 'n 0,05 ml-oplossing (finale kuvet-konsentrasie van  $5 \mu\text{M}$ ) in die kuvet gemeng en die reaksie gevolg. Die toetsresultaat is vergelyk met klompings veroorsaak deur 'n gelykwaardige hoeveelheid ( $5 \mu\text{M}$ ) adrenalien. Soos weergegee in fig. IV - 19 toon  $5 \mu\text{M}$  adrenalien 'n duidelike dubbele aggregasiegolf en 73% finale klompings effek.

Dié eksperiment waar éérs intima en toe adrenalien tot die PRP toegevoeg is, toon eerstens 'n opheffing van die sekondêre aggregasiegolf en tweedens 'n vermindering in totale plaatjie-aggregasie. Die persentasie klompings geïnduseer val van 73% tot 49%.

b) Adrenalien en intima vooraf gemeng:

Gelyke volumes van adrenalien en intima-suspensie met konsentrasies van so 'n aard dat na 0,1 ml van die mengsel by 0,9 ml PRP gevoeg, finale kuvet-konsentrasies van albei stowwe gelykwaardig aan dié van die vorige eksperiment sou bring, is vir 10 minute by kamertemperatuur gemeng.

Klompingsproewe met PRP is daarna uitgevoer.

Soos gesien in fig. IV - 20 is daar weereens opheffing van die sekondêre klompingsvraag en ook klompingsinhibisie vergelykbaar met die adrenalien-intima preïnkubasie proef (proef 2(a)).

3. Intima-ekstrak en trombien-geïnduseerde klompings:

Trombien se klompingsaktiwiteit berus ook grotendeels op die vrystelling van endogene ADP uit die plaatjiegranules (Haslam 1964, Ireland 1967). Soos met adrenalien (proef 2) kan trombien dan gebruik word om die effek van intima op ADP-geïnduseerde plaatjiekompings te bestudeer.

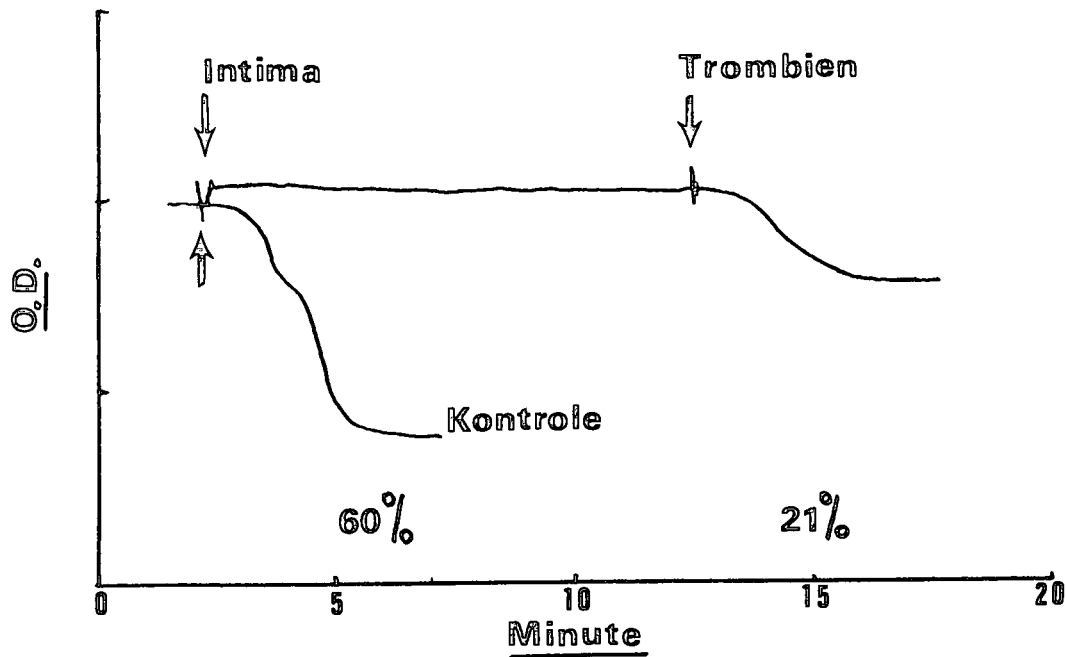


Fig. IV - 21 : Opeenvolgende toevoeging van 'n intima-suspensie en trombien (0,1 E/ml) by PRP. Die kontrole-proef is met trombien as klompingsinduseerder.

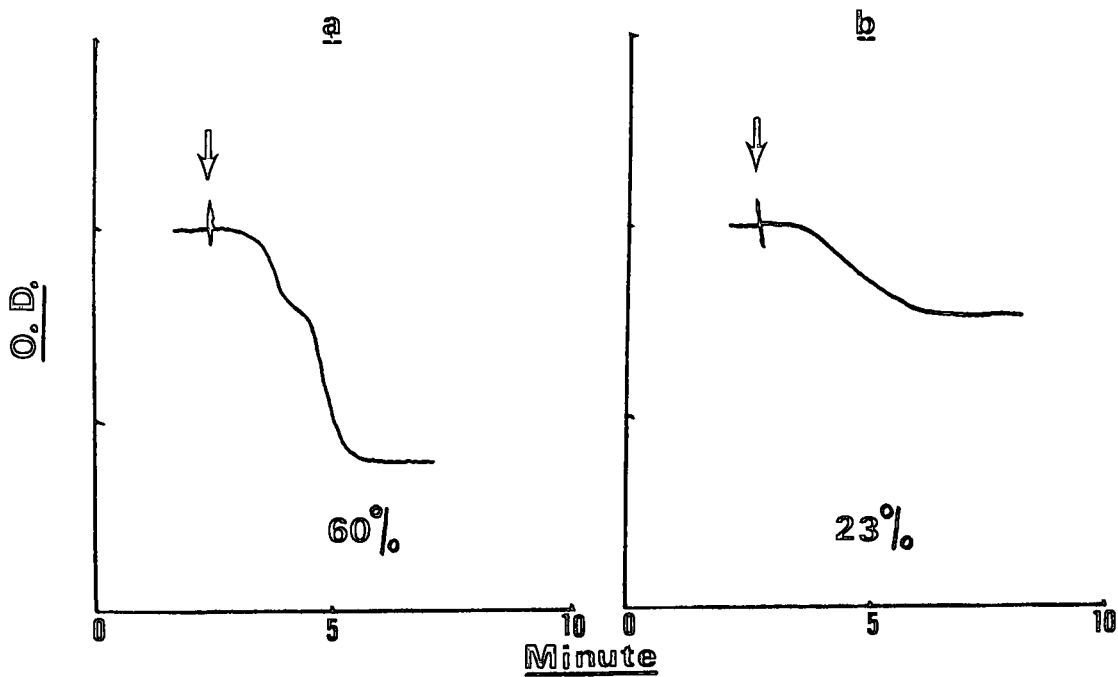


Fig. IV - 22 : a) Trombien (0,1 E/ml) geïnduseerde klompings. b) Effektiviteit van 'n soortgelyke finale trombien-konsentrasie vooraf met 'n intima-ekstrak gemeng.

a) Opeenvolgende toevoeging van intima en trombien by PRP:

Trombien (Parke-Davis, beesoorsprong) is sodanig met normale soutoplossing verdun dat 'n finale kuvet-konsentrasie van 0,1 E/ml verkry is na die toevoeging van 0,05 ml trombien by 0,9 ml PRP.

Die PRP in die aggregometer is geroer en daar is op gelet dat geen spontane klomping plaasvind nie. 0,05 ml van intima-suspensie (finale kuvet-konsentrasie van 100 mg proteïen/100 ml) is by die PRP gevoeg en voortdurend geroer. Sewe minute later is 0,05 ml van die trombienoplossing in die kuvet geplaas.

Soos in fig. IV - 21 weergee, veroorsaak intima-toevoeging vermindering van trombien-geïnduseerde klomping (van 60% tot 21%).

b) Trombien en intima vooraf gemeng:

Gelyke volumes van trombien-oplossing en die suspensie van intima is vir 10 minute by kamertemperatuur gemeng gelaat.

Die konsentrasies van die stowwe was sodanig dat die finale kuvet-konsentrasies van die trombien en intima-suspensie identies was aan dié in proef 3 a).

Die resultate van die proef is in fig. IV - 22 weer=  
gegee: Daar is weereens 'n betekenisvolle inhibisie  
van die klompingsvermoë van die trombien. Die orde  
van inhibisie is soortgelyk aan dié van die eksperi=  
ment waar intima en trombien opeenvolgend by PRP  
gevoeg is (proef 3 a).

VIII AFBRAAK VAN ADP:Doel:

Soos reeds in eksperiment VI aangedui, verdwyn ADP wanneer dit met 'n intima-suspensie geïnkubeer word, met die vorming van hipoxantien of adenosien as afbraakproduk. Aangesien hierdie eksperiment slegs die resultate van ADP-afbraak op 'n enkele tydstep bepaal en daar met die skeidingsmetode wat aangewend is, ook nie onderskei kan word tussen adenosien en hipoxantien nie, is besluit om hierdie ADP-afbraak verder te ondersoek.

Soos vermeld (bls. 11) word ADP deur 'n ensiemstelsel in plasma opeenvolgend na AMP, adenosien, inosien en hipoxantien gemetaboliseer. ADP mag ook, met behulp van adenilaat-kinase, via ATP na AMP verander en dan soos hierbo verder afgebreek word.

As 'n aanvang-hipotese is gepostuleer dat ADP-afbraak deur intima dieselfde baan volg as wat vir plasma bewys is. Hierdie veronderstelling het die beplanning van verdere eksperimente vergemaklik in dié sin dat vermeldde purien-metaboliete as standarde gebruik kon word by die identifisering van ADP-intima inkubasië-produkte.

Die eerste proef was beplan om op 'n relatiewe eenvoudige wyse te probeer vasstel of die ADP wel via bogenoemde metaboliese baan deur die intima afgebreek word.

1. Semi-kwantitatiewe skeiding van ADP-intima afbraakprodukte met behulp van papierkromatografie:

'n 0,1 ml van intima-suspensie (proteïeninhoud 150 mg/100 ml) is by PRP in die aggregometer gevoeg om te bevestig dat geen plaatjieklopping induseer word nie.

ADP met 'n finale konsentrasie van 150  $\mu$ M, opgelos in 0,1 ml normale soutoplossing, is toe by 10 ml van dieselfde intima-suspensie gevoeg. Die mengsel is voortdurend by kamertemperatuur met 'n gewrigsaksie tipe apparaat geskud.

Monsters van 1,0 ml is onmiddellik na toevoeging van die ADP, en daarna met tussenposes van twee minute, uit die inkubasie-mengsel onttrek en in 'n gesilikoniseerde rondeboom verdampingsfles geplaas. Die afbraak-reaksie in hierdie monsters is tot 'n einde gebring deur die fles onmiddellik na onttrekking vinnig in 'n aseton-soliede kooldsuurgas mengsel, met 'n temperatuur van  $-70^{\circ}\text{C}$ , te dompel.

Die bevrore mengsels is daarna op standaardwyse gevriesdroog. Die residu is in 50  $\mu$ l van 'n 50% etanol-wateroplossing opgelos deur die druppel vloeistof verskeie kere oor die hele oppervlakte van die gesilikoniseerde verdampingsfles te rol. Die hele 50  $\mu$ l-volume is daarna

met 'n kapillêre buisie opgesuig en op Whatman no. 1 kromatografie-papier geappliseer. Die aplikasiepunt is tot 'n grootte van minder as 5 mm in deursnit beperk deur elke druppeltjie met 'n koue stroom lug uit 'n haardroër droog te blaas voor die volgende druppel geappliseer is.

Standaard-oplossings van ATP, ADP, AMP, adenosien, inosien en hipoxantien is op presies dieselfde wyse as die toets gehanteer en ook op die kromatografie-papier aangewend. Monsters is minstens 5 cm ver van mekaar aangewend.

Konvensionele afwaartse kromatografie is vir ses uur lank by kamertemperatuur, met butan-1-ol - aseton - asynsuur - aq ammonia - water as oplossisteam, soos reeds beskryf (bls. 28), uitgevoer.

Die papier is met 'n stroom koue lug drooggemaak, fluoresserende kolle by 254 nm onder 'n U-V lamp geïdentifiseer en liggies met potlood gemerk.

Die intensiteit van fluoressensie is as +, ++ of +++ met die blote oog gegradeer.

Die Rf-waardes van die adenien-samestellings, as verwysingsstandaarde gebruik, en die resultate van die proef word

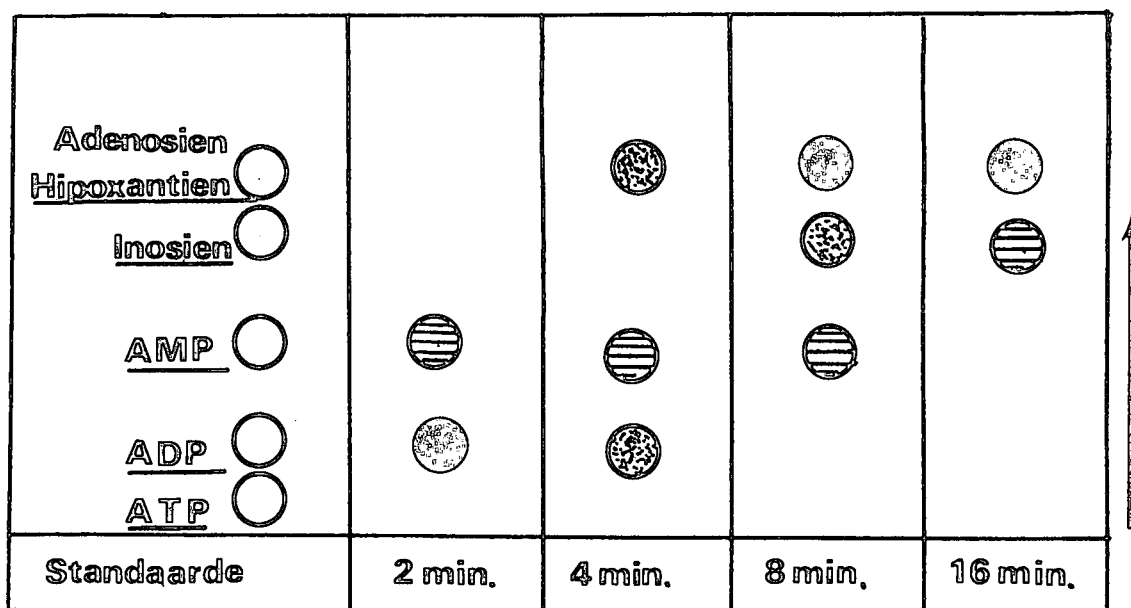


Fig. IV - 23 : Papier-kromatografiese skeiding van die inkubasie-produkte van 'n ADP intima-ekstrak mengsel. Intensiteit van fluoresserende kolle soos met die oog empiries beoordeel: + = gestippeld, ++ = gestreep, +++ = swart. Rf waardes is dié van standaard wat op soortgelyke wyse as die toetsmengsel hanteer is.

skematies in fig. IV - 23 weergegee. Van hierdie skei-  
dingseksperimente blyk dit dat daar 'n tydafhanklike af-  
braak van ADP in die intima-suspensie plaasvind. Die  
halfleeftyd van ADP onder die omstandighede is tussen 4  
en 8 minute. Die afbraakprodukte se Rf-waardes stem  
ooreen met dié van AMP, adenosien, inosien en hipoxantien.  
Geen ATP is op enige tydstip aangetoon nie.

Die volgorde waarin die metaboliëte na ADP-intima inku-  
basie verskyn, kan as gevolg van die onvermoë om adenosien  
en hipoxantien te skei, nie met absolute sekerheid bepaal  
word nie. Tog kom dit ooreen met die volgorde waarvolgens  
ADP deur plasma afgebreek word, naamlik  $ADP \rightarrow AMP \rightarrow$   
 $adenosien \rightarrow inosien \rightarrow hipoxantien$ .

## 2. Koolstof-adsorpsie van adenien-samestellings:

Die selektiewe adsorpsie van nukleotiedes, nukleosiedes  
en purienes aan koolstof kan gebruik word om dié same-  
stellings van ander ongewenste stowwe te skei (Hurlbert  
1957). Die metode is geskik vir die kwantitatiewe be-  
paling van adenien-samestellings.

### Doel:

Hierdie proef is beplan om die tydafhanklike afbraak van ADP  
deur die intima-suspensie meer noukeurig te omskryf as wat in  
eksperiment VIII (1) moontlik was.

Inkubasie is nou by  $37^{\circ}\text{C}$  uitgevoer. In die eksperiment VIII (1) is die ADP-intima inkubasie by kamertemperatuur uitgevoer om die ensiemreaksies sodanig te vertraag dat soveel intermediêre stowwe as moontlik herwin en herkenkon word.

Koolstof-adsorpsie en die eluering van die ADP-metaboliëte is gevolg deur skeiding van dié stowwe deur middel van hoë spanning elektroforese in twee afsonderlike buffer-sisteme. Op dié wyse kan al die afbraakprodukte van mekaar geskei en kwantitatief bepaal word.

A. Inkubasie van ADP en Intima:

'n Ekstrak van aorta-intima (70 mg nat gewig intima per 1 ml normale soutoplossing) is op die standaard wyse voorberei en getoets om te bevestig dat dit oor geen plaatjieklompingsaktiwiteit beskik nie.

25 ml van die intima-suspensie is in 'n gesilikoniseerde verdampingsfles geplaas en voortdurend met 'n gewrigsaksie-tipe skudapparaat in 'n  $37^{\circ}\text{C}$  waterbad geskud.

ADP, opgelos in 0,5 ml 0,9% NaCl, is in 'n finale konsentrasie van omtrent  $150\ \mu\text{M}$  by die intima-suspensie gevoeg.

Intima-ADP inkubasie tydperke was: 0, 5, 10, 30, 60, 120 en 240 minute.

Na inkubasie vir die vereiste tydperk is 'n monster van die mengsel onttrek en in drie verdeel:

- a) Twee 1,0 ml deelvolumes is by 4,5 ml yskoue 10% trichloorasynsuur (g/v) in afsonderlike 10 ml plastiekbuisies, geskik vir hoë spoed sentrifugasie, gevoeg. Die mengsel is deeglik met 'n vorteksmenger geroer en daarna by 2 - 4°C teen 18000 g vir 20 minute lank in 'n M.S.E. verkoelde sentrifuus met 'n hoë spoed aanhegtoestel afgeswaai.

Die twee supernatante oplossings is elk vir koolstof-adsorpsie herwinning van adenien-samestellings gebruik.

- b) 'n Derde deelvolumen van 2,5 ml is dadelik by 2,5 ml yskoue 1,0 N Perchloorsuur in 'n 10 ml sentrifuusbuis gevoeg. Die monster is vir die ensiematiese bepaling van ADP en AMP gebruik. Die metode is reeds volledig in Hoofstuk III beskryf.

Herwinning van ADP-metaboliete deur koolstofadsorpsie  
(Metode soos in Hoofstuk III beskryf).

'n Bekende volume (gewoonlik 5 ml of 4,5 ml) van die trichloorasynsuur-behandelde intima-ekstrak is deur 'n koolstof-celite kolom gewas en ge-elueer. Die eluaat is met indamping gekonsentreer, die residu in water opgelos.

Een monster van die twee wat na elke inkubasie-tyd=  
perk geneem is, is in die sitroensuurbuffer en die  
ander in die mieresuur-asynsuurbuffer met hoë spanning  
elektroforese geskei.

Kontroles bestaande uit intima-ekstrak, blanko-tri=  
chloorasynsuur, ADP en 'n adenien-samestelling-mengsel  
(ADP, AMP, ATP, adenosien, inosien en hipoxantien)  
is op 'n identiese wyse behandel en met elk van die  
buffer-stelsels geskei.

Herkenning en kwantitatiewe bepaling van die

Adenien-samestellings:

Na elektroforese is die papier met koue lug gedroog,  
fluoreserende kolle onder die U-V lamp geïdenti=  
fiseer en ge-elueer (Sien bls. 35 )

Elke eluaat is soos volg ondersoek:

- i) die pH is met 'n Pye Unicam pH-meter en  
mikro-elektrode bepaal.
- ii) die absorpsie-spektrum is met 'n Beckman DB-G  
spektrofotometer en 'n gekoppelde registreerder  
bepaal.
- iii) die oplossing is dan met 50  $\mu$ l van 'n 0,25 N  
NaOH-oplossing ge-alkaliniseer en die pH  
weereens gelees.

iv) die absorpsie-spektrum is weereens bepaal.

Standaard spektra van purines, pirimidines, nukleosiedes en nukleotiedes (Burton 1969) is vergelyk met bepalinge op bogenoemde eluate. Identiteit van hierdie stowwe is so bevestig en konsentrasies op die basis van molekulêre ekstinksie koëffisiënte bereken.

B. ADP met plasma geïnkubeer:

Bloed is van gesonde vrywilligers in "Vacutainer" (Becton-Dickenson) gehepariniseerde 10 ml glasbuis versamel. PAP is voorberei deur die bloed vir 15 minute lank by 4°C af te swaai. 30 ml van hierdie PAP is presies op dieselfde wyse as die intima-suspensie met ADP in finale konsentrasie van 100 - 200  $\mu\text{M}$  by 37°C geïnkubeer.

Soos in die voorafgaande eksperiment, is monsters na 0, 30, 60, 120 en 240 minute inkubasie-tydperke onttrek en adenien-samestellings ensiematies en met koolstof-adsorpsie kwantitatief bepaal.

C. Herwinning van adenien-samestellings uit die koolstof:

Twee oplossings is van elke adenien-samestelling berei, sodat dit respektiewelik omtrent 100 en 200  $\text{m}\mu\text{mol}$  per

<u>Samestelling</u>	<u>Hoeveelheid in kolom aangewend</u> (m/μ mol)	<u>Hoeveelheid herwin</u> (% van hoeveelheid aangewend)
ADP	192,5 96,2	92,4 82,5
AMP	245,1 122,6	89,6 81,4
Adenosien	105,5 52,7	77,0 63,8
Inosien	234 117	95,7 88,0
Hipoxantien	134 67	70 41

Fig. IV - 24: Herwinning van bekende hoeveelhede van adenien-samestellings na koolstofadsorbsie. Die hantering van die monsters word in die teks beskryf.

0,5 ml bevat het, behalve vir adenosien en hipoxantien waar laer konsentrasies weens swakker water-oplosbaarheid gebruik is. Absolute konsentrasie is met absorpsie-spektrofotometrie bepaal.

Hierdie 0,5 ml deelvolumes is by 5 ml yskoue 10% tri-chloorasynsuur gevoeg, goed gemeng en 5 ml van die mengsel deur die koolstof-celite kolom gewas. Die kolom is daarna op standaard wyse met water deurgespoel, die adenien-samestellings ge-elueer en droog verdamp.

Die residu is in 3 ml water opgelos en die konsentrasie weer spektrofotometries bepaal.

#### Resultate:

1. Herwinning van adenien-samestellings uit die koolstof:

Die resultate van die herwinningsproewe (bls. 77) word in fig. IV - 24 weergegee.

Die herwinning van al hierdie samestellings was minder waar kleiner hoeveelhede van die stowwe deur die kolom gewas en ge-elueer is. Hierdie resultate is in redelike ooreenstemming met die van Ireland en Mills (1966).

2. Hoëspanning elektroforese van ADP en verwante stowwe:

Baie min verlies of afbraak van ADP vind onder die omstandighede van die elektroforese by die betrokke pH

ELEKTROFORESE

	<u>Een-riqting</u>		<u>Twee-riqting</u>	
	E260	m $\mu$ mol ADP/ml	E260	m $\mu$ mol ADP/ml
a) Sitroensuurbuffer	0,761	148,4	0,750	146,3
b) Mieresuur-asynsuur buffer	0,760	148,2	0,740	145,2

Fig. IV - 25: 20  $\mu$ l ADP oplossings is aan een-riqting sowel as twee-riqting hoëspanning elektroforese in twee bufferstelsels onderwerp (Die metode is in die teks beskryf). Minder as 2% verlies van ADP vind onder hierdie omstandighede plaas. Resultate is die gemiddeld van twee bepalings en is gekorrigeer vir 'n 1 : 3 verdunning gedurende die elueer van die ADP.

0,5 ml bevat het, behalwe vir adenosien en hipoxantien waar laer konsentrasies weens swakker water-oplosbaarheid gebruik is. Absolute konsentrasie is met absorpsie-spektrofotometrie bepaal.

Hierdie 0,5 ml deelvolumes is by 5 ml yskoue 10% tri-chloorasynsuur gevoeg, goed gemeng en 5 ml van die mengsel deur die koolstof-celite kolom gewas. Die kolom is daarna op standaard wyse met water deurgespoel, die adenien-samestellings ge-elueer en droog verdamp.

Die residu is in 3 ml water opgelos en die konsentrasie weer spektrofotometries bepaal.

### Resultate:

1. Herwinning van adenien-samestellings uit die koolstof:  
Die resultate van die herwinningsproewe (bls. 77) word in fig. IV - 24 weergegee.

Die herwinning van al hierdie samestellings was minder waar kleiner hoeveelhede van die stowwe deur die kolom gewas en ge-elueer is. Hierdie resultate is in redelike ooreenstemming met die van Ireland en Mills (1966).

2. Hoëspanning elektroforese van ADP en verwante stowwe:  
Baie min verlies of afbraak van ADP vind onder die omstandighede van die elektroforese by die betrokke pH

ELEKTROFORESE

	<u>Een-riqting</u>		<u>Twee-riqting</u>	
	E260	m $\mu$ mol ADP/ml	E260	m $\mu$ mol ADP/ml
a) Sitroensuurbuffer	0,761	148,4	0,750	146,3
b) Mieresuur-asynsuur buffer	0,760	148,2	0,740	145,2

Fig. IV - 25: 20  $\mu$ l ADP oplossings is aan een-riqting sowel as twee-riqting hoëspanning elektroforese in twee bufferstelsels onderwerp (Die metode is in die teks beskryf). Minder as 2% verlies van ADP vind onder hierdie omstandighede plaas. Resultate is die gemiddeld van twee bepalinge en is gekorrigeer vir 'n 1 : 3 verdunning gedurende die elueer van die ADP.

van die twee buffersisteme plaas.

Dit kon demonstreeer word deur die ADP aan twee-rigting elektroforese te onderwerp (Ireland en Mills 1966). Tussen die twee prosedures is die papier nie drooggemaak nie, maar slegs deur  $90^{\circ}$  gedraai. Ondersoek van die papier onder U-V lig het geen streperigheid van die kolle getoon nie en absorpsie-spektrofotometrie het minder as 2% verlies ADP, soos met een-rigting elektroforese vergelyk, getoon (Fig. IV - 25).

### 3. Identifikasie van ADP en ADP-metaboliete:

Die beweging (in cm.) van die verwysingstowwe in die twee elektroforese buffer-stelsels, word in Fig. IV - 26 weergegee. Beweging is in verhouding tot die applikasie-punte bereken aangesien geen endosmotiese vloei plaasvind nie. Die twee sisteme is komplementêr en alle ADP afbraakprodukte kan op die wyse kwantitatief bepaal word.

Stowwe wat met behulp van U-V fluoressensie herken is, na skeiding met elektroforese, is soos reeds beskryf, met water elueer en die absorpsie-maksima by suur en alkaliese pH gemeet (lees hierbo vir metode en ook Bylaag E vir resultate). Data is met dié van Burton (1969) vergelyk en het die voorlopige identifikasie met elektroforese bevestig.

<u>STOF</u>	<u>BEWEGING (cms)</u>	
	<u>Sitroensuurbuffer</u>	<u>Mieresuur-asynsuur buffer</u>
ADP	+11,5	+5,5
ATP	+14,8	+5,5
Adenosien	-16,0	-10,0
AMP	+6,0	-1,0
Inosien	-1,0	-0,5
Hipoxantien	-1,0	-6,0

Fig. IV - 26: Beweging van adenien-samestellings in die twee buffersisteme met hoë spanning-elektroforese skeiding: + dui beweging ná die anode aan, en - beweging in die rigting van die katode. Die beweging het effens gewissel van papier tot papier en word slegs as 'n gids aangegee. Die samestelling van die buffer-sisteme en die metode van elektroforetiese skeiding word in Hoofstuk III beskryf.

4. Afbraakprodukte van ADP na inkubasie:

a) Met plasma

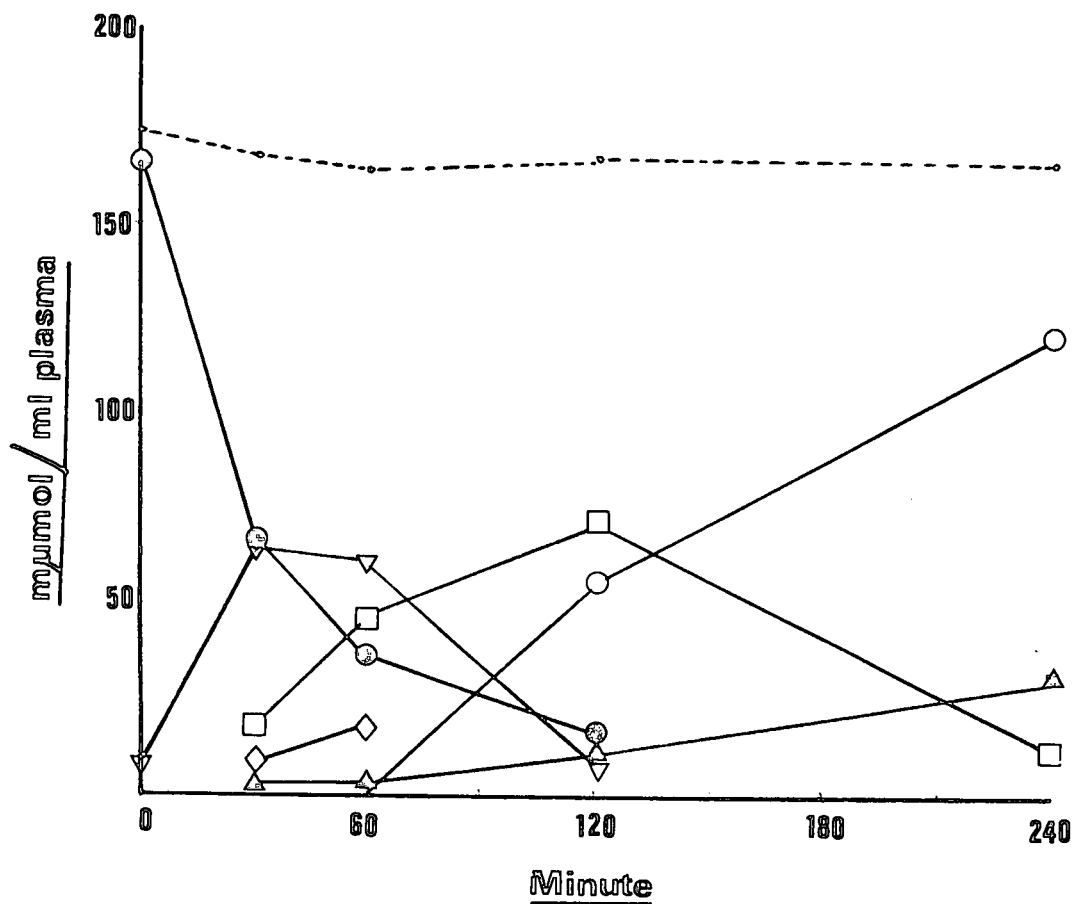
Die resultate van die koolstofadsorpsie, herwinning en kwantitatiewe bepaling van die adenien-samestellings, word in fig. IV - 27 voorgestel. 'n Duplikaat-eksperiment het vergelykbare resultate getoon (Bylaag C, bls.117).

Die halfleeftyd van ADP en vorming van AMP, in dieselfde proef, soos met die NADH-oksidase metode bepaal, word in fig. IV - 28 weergegee.

Met die inkubasie van ADP, in 'n aanvanklike konsentrasie van 117 - 187  $\mu\text{M}$ , in vyf verskillende normale plasma-monsters, is gevind dat die ADP ongeveer eksponensieel verdwyn met 'n half-lewe van 25,4 minute (standaard afwyking  $\pm$  1,2 minute) (fig. IV - 29).

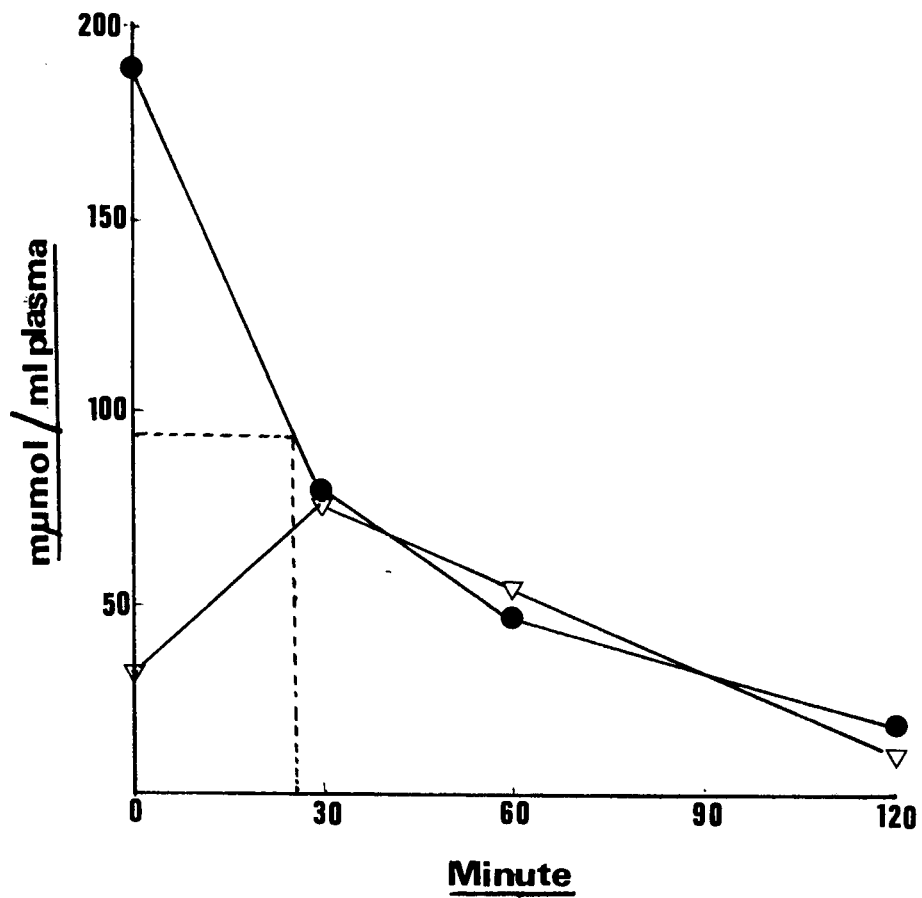
Soos gesien in Fig. IV - 27 styg die AMP-vlak redelik vinnig en bereik 'n maksimum by 30 minute, daal dan weer en slegs 'n klein hoeveelheid kan by 120 minute herwin word. Die maksimum AMP konsentrasie bereik, soos ook met die ensiematiese bepaling verkry, is 45% van dié van geïnkubeerde ADP.

Adenosien verskyn na 30 minute en die konsentrasie bereik 'n hoogtepunt by ongeveer 120 minute wanneer die vlak weer begin daal.



○ADP, ▽AMP, ◇ATP, □Adenosien, ○Inosien,  
 ▽Hipoxantien, ..... totaal.

Fig. IV - 27: Inkubasie van  $185 \mu\text{M}$  ADP in PAP by  $37^\circ\text{C}$ . By die tye aangedui, is monsters onttrek, koolstofadsorpsie uitgevoer, ADP afbraakprodukte herwin en soos in die teks beskryf, kwantitatief bepaal. Resultate is nie vir verlies van stowwe in koolstof gekorrigeer nie. Die halfleefyd van ADP is 26 minute.



●ADP; ▽AMP

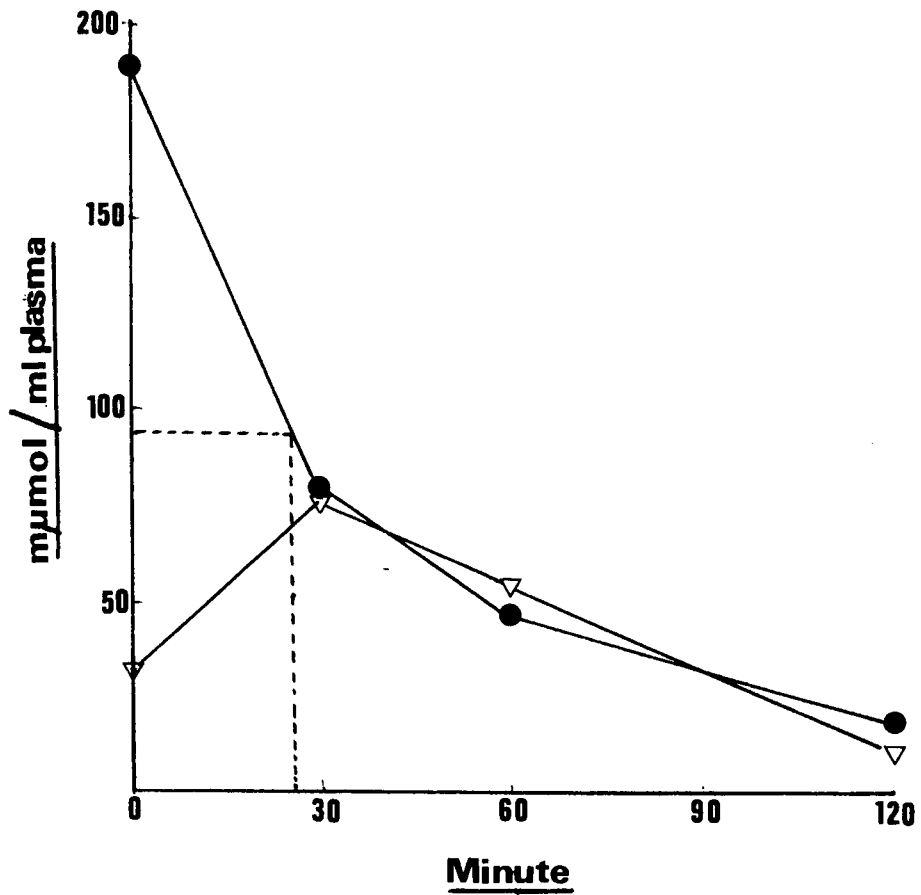
Fig. IV - 28: Ensiematiese bepaling van ADP en AMP in monsters van dieselfde PAP as in fig. IV - 27. Die halfleef=tyd van ADP toegevoeg is 25,5 minute.

<u>Plasma</u>	0 min.		30 min.		ADP (min)
	$\Delta E_{340}$ $E_1 - E_2$	m/ $\mu$ mol/ ml plasma	$\Delta E_{340}$ $E_1 - E_2$	m/ $\mu$ mol/ ml plasma	
1	0,30	147	0,14	68	25,5
2	0,24	117	0,08	39	23,5
3	0,31	151	0,13	63	27,0
4	0,28	136	0,09	44	25,5
5	0,38	187	0,22	108	25,5

Gemiddelde ADP halfleeftyd = 25,4 minute.

Standaard afwyking =  $\pm 1,2$  minute.

Fig. IV - 29: Halfleeftyd van verskillende konsentrasies in vyf verskillende monsters PAP verkry van normale donors. ADP is met die NADH-oksidasie metode bepaal.



●ADP; ▽AMP

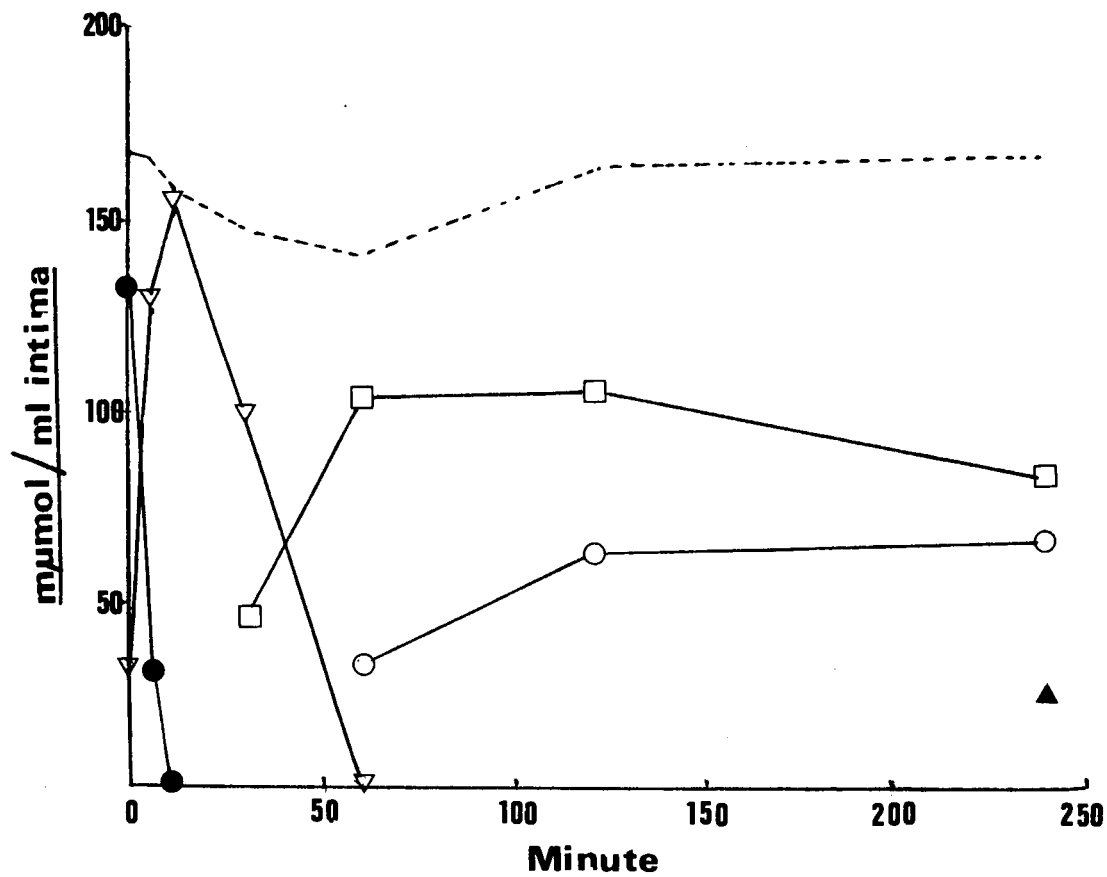
Fig. IV - 28: Ensiematiese bepaling van ADP en AMP in monsters van dieselfde PAP as in fig. IV - 27. Die halfleef=tyd van ADP toegevoeg is 25,5 minute.

<u>Plasma</u>	0 min.		30 min.		ADP (min)
	$\Delta E_{340}$ $E_1 - E_2$	m $\mu$ mol/ ml plasma	$\Delta E_{340}$ $E_1 - E_2$	m $\mu$ mol/ ml plasma	
1	0,30	147	0,14	68	25,5
2	0,24	117	0,08	39	23,5
3	0,31	151	0,13	63	27,0
4	0,28	136	0,09	44	25,5
5	0,38	187	0,22	108	25,5

Gemiddelde ADP halfleeftyd = 25,4 minute.

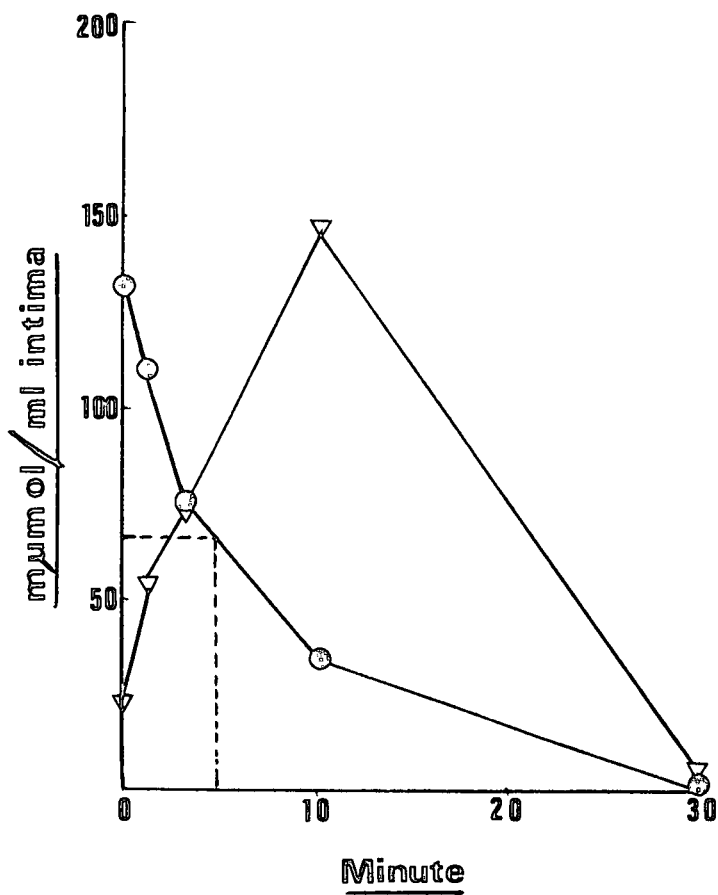
Standaard afwyking =  $\pm$ 1,2 minute.

Fig. IV - 29: Halfleeftyd van verskillende konsentrasies in vyf verskillende monsters PAP verkry van normale donors. ADP is met die NADH-oksidase metode bepaal.



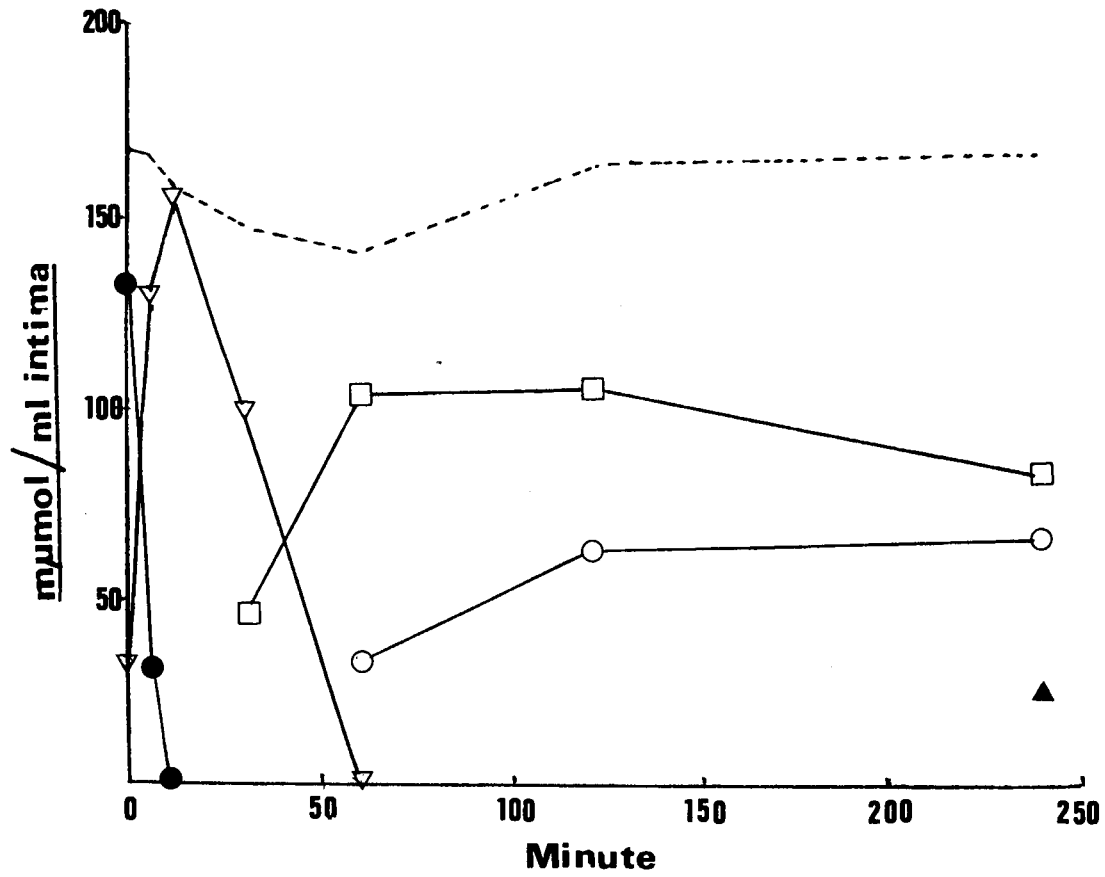
●ADP; ▽AMP; □Adenosien; ○Inosien; ▼Hipoxantien.

Fig. IV - 30: Inkubasie van  $190 \mu\text{M}$  ADP in 'n intima-ekstrak. Na inkubasie by  $37^\circ\text{C}$  is monsters op die aangeduide tydskiede van die mengsel onttrek en koolstofadsorpsie, herwinning en kwantitatiewe bepalinge van die verskillende afbraakprodukte, soos in die teks beskryf, uitgevoer. Resultate is nie vir herwinning van die betrokke stowwe uit koolstof gekorrigeer nie. ATP is nie gedurende die inkubasie-periode gevind nie. Hipoxantien is slegs na 240 minute inkubasie gevind. Die halfleeftyd van ADP is 3,2 minute.



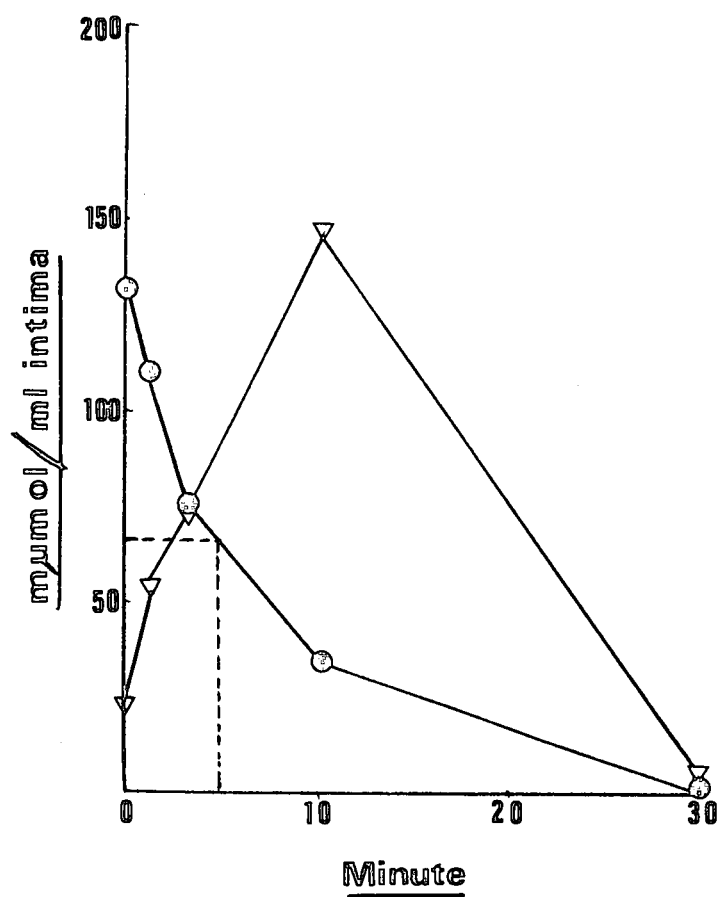
● ADP;    ▽ AMP.

Fig. IV - 31: NADH-oksidasie metode van ADP en AMP bepaling van monsters van 'n intima-ekstrak/ADP inkubasie-mengsel. Die halfleeftyd van ADP toegevoeg is 4,25 minute.



●ADP; ▽AMP; □Adenosien; ○Inosien; ▼Hipoxantien.

Fig. IV - 30: Inkubasie van  $190 \mu\text{M}$  ADP in 'n intima-ekstrak. Na inkubasie by  $37^\circ\text{C}$  is monsters op die aangeduide tydskiede van die mengsel onttrek en koolstofadsorpsie, herwinning en kwantitatiewe bepalings van die verskillende afbraakprodukte, soos in die teks beskryf, uitgevoer. Resultate is nie vir herwinning van die betrokke stowwe uit koolstof gekorrigeer nie. ATP is nie gedurende die inkubasie-periode gevind nie. Hipoxantien is slegs na 240 minute inkubasie gevind. Die halfleeftyd van ADP is 3,2 minute.



○ ADP;    ▽ AMP.

Fig. IV - 31: NADH-oksidasie metode van ADP en AMP bepaling van monsters van 'n intima-ekstrak/ADP inku=basie-mengsel. Die halfleeftyd van ADP toegevoeg is 4,25 minute.

Inosien kan na 60 minute herwin word en die vlak styg om 'n maksimum konsentrasie by 240 minute te bereik.

Die hipoxantien-vlak styg stadig vanaf 30 minute gedurende die hele verloop van inkubasie.

'n Klein hoeveelheid ATP is ook gedurende die eerste 60 minute van inkubasie waargeneem.

b) Met Intima

Die resultate van die koolstofadsorpsie, herwinning en kwantitatiewe bepaling van die adenien-samestellings word in fig. IV - 30 weergegee. 'n Duplikaat-proef met vergelykbare resultate word in Bylaag D, bls.120 weergegee.

Die halfleeftyd van ADP en vorming van AMP in dieselfde proef soos met die NADH-oksidasie metode bepaal, word in fig. IV - 31 voorgestel.

Met inkubasie van ADP in 'n aanvanklike konsentrasie van 100 - 150  $\mu$ M in ses intima-ekstrakte van normale aortas verdwyn die ADP vinnig eksponensiëel met 'n halfleeftyd van  $6,2 \pm 3,5$  min. S.D. (ses bepalings, kyk fig. IV - 32).

Soos gesien in fig. IV - 30 styg AMP-vlakke vinnig en na 10 minute inkubasie is feitlik al die ADP as AMP verhaalbaar.

INKUBASIE-TYDPERK

<u>Aorta no.</u>	0 minute		5 minute		10 minute		20 minute		$T_{\frac{1}{2}} \text{ ADP}$ (minute)
	$\Delta E_{340}$ ( $E_1 - E_2$ )	m/ $\mu$ mol ADP/ml plasma	$\Delta E_{340}$ ( $E_1 - E_2$ )	m/ $\mu$ mol ADP/ml plasma	$\Delta E_{340}$ ( $E_1 - E_2$ )	m/ $\mu$ mol ADP/ml plasma	$\Delta E_{340}$ ( $E_1 - E_2$ )	m/ $\mu$ mol ADP/ml plasma	
548/72	0,24	141	0,02	11					2,6
554/72	0,20	117	0,10	58					5,0
552/72	0,25	147	0,18	105	0,14	82	0,09	52	13,0
558/72	0,20	112	0,09	52					4,8
560/72	0,23	135	0,12	70	0,05	29			5,2
559/72	0,24	141	0,14	82	0,074	43			6,6

Gemiddelde ADP halfleeftyd = 6,2 min.

Standaard afwyking = +3,5

Fig. IV -32: Halfleeftyd van ADP geïnkubeer met ekstrakte van normale intimas. Deelvolumes onttrek na inkubasie-tydperk se ADP-inhoud is met die NADH-oksidasie metode bepaal.

Vanaf 10 minute inkubasie daal die AMP vlak weer en ' begin adenosien-waardes styg om 'n maksimum by ongeveer 30 minute te bereik. Hierdie adenosien-vlak bly min of meer konstant tot na 4 uur inkubasie.

Inosien is op 30 minute aanwesig en styg tot 'n maksimum by 120 minute.

Slegs 'n klein hoeveelheid hipoxantien kon gevind word, en dan ook net heel aan die einde van die inkubasie-tydperk.

Geen ATP kon op enige stadium van inkubasie aangetoon word nie.

## HOOFSTUK VYF

### BESPREKING

	<u>Bladsy</u>
I KLOMPINGSEKSPERIMENTE MET BLOEDVATLAE EN ACHILLES-TENDON.	83
II DIE INTIMA-SUSPENSIE EN ADP	87
III INTIMA-REAKSIES MET KOLLAGEEN	94
IV DIE INTIMA, ATEROSKLEROSE EN INTRAVASKULÊRE TROMBOSE	96
V DIE ROL VAN DIE INTIMA IN TROMBOSE	99

BESPREKINGI KLOMPINGSEKSPERIMENTE MET BLOEDVATLAE EN ACHILLES-TENDON:

Die proteïeninhoud van verskillende weefselekstrakte is as 'n indeks van die konsentrasie van die ekstrak gebruik. Dit is duidelik uit die resultate van die vergelykende studie dat in die geval van Achilles-tendon en bloedvat-media hierdie proteïeninhoud baie direk met die kollageeninhoud (soos in klompingsvermoë weerspieël) van die weefsel verband hou. Dus, al word dit algemeen aanvaar dat die hidroksie-prolien of prolienbepaling van weefsel 'n akkurate weergawe van die kollageeninhoud weerspieël, skyn dit asof die proteïeninhoud onder hierdie eksperimentele omstandighede goed met kollageeninhoud korreleer. Hierdie bevinding word dan ook gestaaf deur die resultate van die klompingsinduksie-proewe met ekstrakte van verskillende weefsellae. Die veselagtige, kollageen-ryke bloedvatmedia en Achilles-tendon beskik oor gelyke klompingsaktiwiteit indien verstel tot gelykwaardige proteïeninhoud. Die proewe met kollagenase dui ook daarop dat die klompingsaktiwiteit van die weefselekstrakte aan die kollageeninhoud toegeskryf kan word.

In die geval waar die hele vena cava fyngemaal word, is daar minder klompingsaktiwiteit as wat van die proteïeninhoud verwag sou word. Aangesien hierdie ekstrak uit 'n mengsel van intima, media en adventitia bestaan, weerspieël hierdie klompingsaktiwiteit nie net die kollageen-aktiwiteit van die ekstrak

nie, maar ook die invloed van ander stowwe wat teenwoordig is. Soos later gesien sal word, kan hierdie verminderde klompingsvermoë moontlik aan die intima se effek toegeskryf word. Hierdie aspekte is egter nie verder ondersoek nie.

Die resultate van die klompingsproewe met verskillende kollageenryke weefselektate (Achilles-tendon en bloedvat-media), dui geen kwalitatiewe verskil van klompingsaktiwiteit van kollageen tot kollageen aan indien die ekstrakte op dieselfde wyse voorberei word nie.

Legrand en Huc (1971) wys daarop dat kollageen se klompingsvermoë wissel en beïnvloed word deur die bron van oorsprong. So toon kollageen van verskillende diersoorte, verskillende organe, van diere van verskillende ouderdom en ook die suiwerheid van die kollageen-preparaat, veral met betrekking tot koolhidraatkontaminasie, almal wisselende effektiwiteit. Ons ondervinding met die ruwe ekstrakte stem nie hiermee ooreen nie. Dit mag in 'n mate te wyte wees aan die feit dat al die proewe op 'n beperkte aantal donors se PRP uitgevoer is, en ook dat daar nie 'n sistematiese ondersoek met 'n groot aantal verskillende weefsels ingestel is nie.

Daar is nietemin goeie bewys dat die fisies-chemiese struktuur van kollageen verband hou met funksie. Wilner et al (1968) het getoon dat klompingsaktiwiteit krities afhanklik is van die epsilon-amino-groepe van kollageen-lisien. Legrand en Huc

(1971) bied ook eksperimentele bewys dat askorbiensuur-gebrek in marmotjies die fisies-chemiese struktuur van kollageen genoegsaam verander om klompingsaktiwiteit te verminder.

Die waarneming dat die aorta-intima oor geen klompingsaktiwiteit beskik nie, is egter belangwekkend. Sover uit 'n omvattende oorsig van die vakliteratuur vasgestel kan word, is hierdie kenmerk van die intima nog nie voorheen beskryf nie. Dit is opvallend, en ook verrassend, dat selfs die vergelykende ondersoek van die weefsel van die bloedvate vir klompings-effektiwiteit nog nie die aandag van navorsers getrek het nie.

'n Aspek wat tog deeglik die aandag getrek het, veral met elektron-mikroskoopstudies, is die bloedvatendoteel-plaatjie interaksie. Daar is heelwat teenstrydige beskouinge oor endoteel, maar tog lyk dit waarskynlik dat plaatjies selde, indien ooit, kleef aan die intakte endoteellaag (Johnson 1971 b). Dit is egter meer seker dat geringe endoteel-beskadiging plaatjieklewing bevorder. Branemark en Ekholm (1968) het aangetoon dat 'n breuk van slegs  $0,5 - 1,0 \mu$  in die endoteel plaatjieklewing sal uitlok. Baumgartner et al (1967) voel weer dat hulle elektron-mikroskoop-foto's wys dat die plaatjies nie aan endoteelselle kleef nie, maar wel aan die basaalmembraan en subendoteliale kollageen wanneer dit ontbloot word.

Plaatjies beskik oor 'n endoteelondersteunende funksie. Wojcik et al (1969) en Johnson et al (1966) het aangedui dat rooiselle

ontsnap uit die bloedvate van trombotopeniese pasiënte en wel as gevolg van verswakte endoteliale selle. Transfusies met vars plaatjies verhoed hierdie effek deur 'n proses wat plaatjieklewing en dan inkorporasie van die plaatjies in die bloedvatwand behels. Hierdie herstelfase sluit plaatjieklewing en slegs minimale plaatjieklomping in. Die belang van hierdie waarneming sal later weer verder bespreek word.

Daar bestaan egter geen twyfel oor die plaatjieklompingsreaksie wat op blootstelling van bloedvatwand-kollageen volg nie. Indien so 'n graad van trauma plaasvind, volg die hemostatiese kettingreaksie van plaatjieklewing, -klomping en bloedstolling met die vorming van 'n plaatjieprop, versterk deur fibrien. Dit skyn weereens asof 'n trombus van genoegsame grootte om bloedvloei-obstruksie te veroorsaak, nie in 'n area van normale bloedvat-endoteel kan vorm nie (Johnson 1971 b).

Daar is nog geen duidelikheid oor die chemiese struktuur van die basaalmembraan nie. Dit lyk egter asof die proteïeninhoud met dié van kollageen ooreenstem (Speidel en Lazarow 1963). Dit word dan ook algemeen aanvaar (en van die ultrastruktuur is dit nie verrassend nie) dat die basaalmembraan in staat is om plaatjieklewing en -klomping uit te lok.

Die oppervlakkige intimalaag wat in hierdie eksperimente afgegrap word, bevat minstens basaalmembraan en endoteelselle. Die oppervlakkige intima bevat ook kollageen en elastiese

vesels (Ham 1969). Aangesien al hierdie intima-komponente onder normale omstandighede ~~plaatjiek~~klomping kan veroorsaak, is dit tog buitengewoon verrassend dat die intima-ekstrak nie plaatjies klomp nie.

Die enigste logiese gevolgtrekking wat op hierdie waarneming gemaak kan word, is dat daar 'n stof of stowwe in die ekstrak aanwesig is wat die potensiële klompingsaktiwiteit van die intima se kollageen-elastien-basaalmembraan kompleks inhibeer.

## II DIE INTIMA-SUSPENSIE EN ADP:

Meeste van die biologies belangrike klompingsinduseerders se effektiwiteit berus deels op die loslating van endogene ADP uit die plaatjiegranules. Dit is dus dadelik duidelik dat ADP die spil is waarom die hele klompingsreaksie draai. Dit volg dat die beskikbaarheid van ADP in 'n groot mate die finale grootte van die plaatjie-aggregaat sal bepaal.

Wanneer klein hoeveelhede ADP in klompingsproewe gebruik word, vind daar na die klompingsfase spontane de-aggregasie van die plaatjies plaas. Aanvanklik is hierdie de-aggregasie gekoppel aan die afbraak van ADP deur plasma-ensieme, asook aan inhibisie deur die ADP-afbraakproduk adenosien (Born 1963, Salzmann et al 1966). Packham et al (1969) en Rozenberg en Holmsen (1968) werp egter twyfel op hierdie stelling op grond van plasma-vry klompingsproewe en ook deur te wys dat daar gedurende die fase van de-aggregasie nog voldoende ADP aanwesig is om klompings te kan induseer.

In die oorsig van plaatjiefunksies (bls. 11) is daarop gewys dat ADP redelik vinnig in plasma afgebreek word deur 'n komplekse ensiem-sisteem. Die halfleeftyd van ADP hang in 'n mate van die stof se konsentrasie af. So het 200  $\mu$ M ADP en 2 - 5  $\mu$ M ADP halfleeftyde van 25 en 8 minute respektiewelik (Ireland en Mills 1966). Dit is duidelik dat die kinetika van hierdie ADP-afbraak gewoonlik te stadig is en daarom min invloed op plaatjieklomping kan uitoefen. Dat plaatjieproewe wel in PRP uitgevoer kan word, dien as indirekte bewys vir hierdie stelling.

Hierdie is egter nie in alle dierespesies die geval nie. In rot-plasma word ADP twintig keer vinniger as by die mens gemetaboliseer en de-aggregasie na ADP-klomping is dan te wyte aan hierdie baie doeltreffende ADP-afbraak (Sinakos en Caen 1967).

Interessant is ook die feit dat ADP-geïnduseerde klomping op PRP van pasiënte met kroniese miëloïede leukemie, ingekort is en de-aggregasie met betreklik hoë ADP-konsentrasies plaasvind (Sultan et al 1969). Die plasma van hierdie persone kan ADP ook vinniger as 'n normale persoon metaboliseer. Miskien kan hierdie waarneming, soos deur Sultan voorgestel, aan die vrystelling van ensieme uit beskadigde leukosiete gekoppel word.

Nog 'n situasie waar ADP-afbraak fisiologies skynbaar van belang is, is by die inwoners van Bolivia en Peru wat meer as 4 000 m bo seespieël geleë is. Caen et al (1971) was geïnteresseerd daarin dat die mense, ten spyte van 'n hoë hematokrit en fibrinogeenvlak, 'n baie lae insidensie van trombotiese siekte het. Hy het gevind dat die ADP-konsentrasie wat gewoonlik in Europeane onomkeerbare aggregasie veroorsaak, hier vinnige de-aggregasie wys. Kollageen-geïnduseerde plaatjieklomping in Boliviërs toon die patroon tipies van kollageenklomping na aspirien-inname. Hierdie persone se ADP-afbraak deur plasma is gewoonlik versnel. Dit lyk tog dus of ADP-afbraak deur plasma soms van belang kan wees indien die afbraak vinnig genoeg geskied. Wanneer plaatjieklomping reeds plaasgevind het, lyk dit waarskynlik dat ADP-afbraak nie meer de-aggregasie kan veroorsaak nie.

Met hierdie feite en gegewens voor oë kan die intima-ADP interaksie beskou word.

Die proewe waar ADP met intima geïnkubeer is (bls. 77) wys dat ADP op 'n tydafhanklike basis afgebreek word. Die metaboliete stem ooreen met dié wat ontstaan wanneer ADP in plasma geïnkubeer word, nl. ATP, AMP, adenosien, inosien en hipoxantien (wat ook in dié volgorde verskyn). Die resultate van die intima-ADP inkubasie eksperimente (bls. 56) kan nou verklaar word. Wanneer ADP en intima preïnkubeer word, word die ADP vernietig en hierdie afbraak word weerspieël as verminderde

klompingseffektiwiteit. Wanneer die verhouding intima tot ADP hoog genoeg is, sal al die ADP gemetaboliseer word en sal daar geen klompingseffektiwiteit van die mengsel demonstreer kan word nie. Andersom, wanneer die intima tot ADP verhouding laag genoeg is, sal daar aan die einde van die inkubasietydperk nog genoeg ADP oorbly om plaatjies effektief te klomp.

Die sigmoïede kurwes (bls.56) moet in hierdie lig interpreteer word. Die persentasie klomping geïnduseer, weerspieël dus die oorblywende ADP na inkubasie. Die intima-effek kan dus logies deur verhoging van die ADP oorbrug word en in teenstelling kan die ADP-effek totaal verwyder word deur slegs die intima-konsentrasie in verhouding tot die ADP-konsentrasie hoog genoeg te maak.

Daar is reeds vermeld dat die halfleeftyd van  $200 \mu\text{M}$  ADP in plasma ongeveer 25 minute is. Van die resultate van intima-ADP inkubasieproewe skyn dit op eerste oogopslag asof die intima-ekstrak in staat is om ADP veel vinniger as plasma te metaboliseer. So het  $200 \mu\text{M}$  ADP in 'n intima-suspensie (70 mg intima, nat gewig/ml normale soutoplossing) 'n halfleeftyd van 4 minute (bls.81). Ongelukkig is dit egter nie moontlik om die plasma en intima ensiensisteme op hierdie basis kwantitatief te vergelyk nie. Dit skyn of dit eers moontlik sal word ná die betrokke ADP-ases gesuiwerd voorberei kan word.

Die patroon van ADP-afbraak soos dit in die intima-ekstrak geskied, verskil egter van dié van plasma. AMP word gevorm en bereik relatief baie hoër vlakke (bls. 81) in die geval van die intima. Hipoxantien word ook eers laat gevorm en in klein hoeveelhede in vergelyking met die plasma-sisteem. Die gevolg is (en dit mag van belang wees in plaatjieklompingsinhibisie) dat daar voortdurend relatief hoë adenosienvlakke gedurende hierdie intimale ADP-metabolisme aanwesig is.

Daar is toe met behulp van die ADP-vrylatingsproewe probeer om aan te toon of die kinetika van ADP-afbraak deur intima van so 'n aard is dat dit plaatjieklomping kan beïnvloed. In hierdie eksperimente (bls. 64) is die effek van die intima op die plaatjieklompingsaktiwiteit van kollageen, adrenalien en trombin getoets.

Adrenalien lok in PRP gewoonlik 'n dubbele aggregasiegolf uit (O'Brien 1963) en dit word algemeen aanvaar dat die sekondêre klompingsvraag as gevolg van endogene ADP-loslating is. Hierdie dien dan as ideale model om die intima-effek op ADP te toets.

Dit is duidelik dat die adrenaliengeïnduseerde klomping in dié eksperiment (bls. 66) waar éers intima en daarná adrenalien by PRP in die aggregometer gevoeg word, inhibeer word. Daar is 'n vermindering in totale persentasie klomping uitgelok en daar is 'n opheffing van die sekondêre klompingsvraag.

Die vraag ontstaan of hierdie inhibisie die effek van intima op die plaatjiemembraan voorstel, of die gevolg is van afbraak van endogene ADP, vanaf die vrylatingsreaksie. Op grond van die vergelyking van die graad van klompingsinhibisie veroorsaak deur adrenalien en intima, voorafgemeng, en die proef waar die intima en adrenalien opeenvolgend by PRP gevoeg is (bls.66 ) en aangetoon is dat die inhibisie kwantitatief van dieselfde orde is, skyn dit asof ADP-afbraak die waarskynlike rede vir klompingsinhibisie is.

'n Soortgelyke proef is met trombien as klompingsinduseerder uitgevoer (bls.67 ). Die resultate was dieselfde: toevoeging van voorafgemengde intima en trombien tot PRP lok inhibisie van dieselfde orde uit as wanneer intima en trombien opeenvolgend by PRP gevoeg is. Daar is genoegsame bewys dat trombien-geïnduseerde klompings op ADP vrystelling uit die plaatjies berus (Haslam 1964 en 1967, Ireland 1967). Daar is ook aangetoon dat trombien 'n effek op die plaatjiemembraan het en die sel sodoende meer sensitief vir ADP-klompings maak (Doery en Hirsh 1970).

'n Soortgelyke proef is met kollageen as induseerder uitgevoer (bls.65 ). Weereens is die orde van inhibisie dieselfde in die geval van voorafgemengde intima en kollageen as in die opeenvolgende toevoeging van intima en kollageen tot PRP. Die oppervlakkige proteïeninhoud en -struktuur van die plaatjiemembraan is van die uiterste belang in die uitlokking van plaatjiekompings deur verskillende induseerders.

Trombien reageer op twee proteïene in plaatjies (Davey en Lüscher 1967, Lopaciuk en Solum 1969, Ganguly 1969), naamlik fibrinogeen en faktor XIII van die stollingsmeganisme (Kiesselbach en Wagner 1966, Ganguly 1971). Hierdie faktor XIII is waarskynlik dieselfde proteïen as die deur Baenziger et al (1971) ondersoek. Laasgenoemde groep werkers het geïsoleerde plaatjiemembrane vóór en ná blootstelling aan trombien ondersoek en gevind dat 'n belangrike proteïen-fraksie (molekulêre massa - 190 000) verdwyn en 'n ander proteïen (molekulêre massa - 107 000) verskyn. Daar is dus klaarblyklik 'n spesifieke proteïen-molekulêre samestelling-vorm wat as werksetel vir trombien op die plaatjiemembraan dien.

'n Soortgelyke ondersoek het aangetoon dat daar ook 'n kollageen-reseptor op die membraan-oppervlakte aanwesig is. Hierdie reseptor is weer geassosieerd met glikosiel-transferases wat die oordrag van suiker of amino-suiker residu's na kollageen kataboliseer (Jamieson et al 1971, Bosmann 1971) en verskil klaarblyklik van die trombien-reseptore.

Dit is dan onwaarskynlik dat die intima stowwe bevat wat al hierdie biologies en chemies verskillende membraan-reseptore tot so 'n mate sal verander dat klompig inhibeer word. Indien die ADP-afbraak-effek van intima (wat ongetwyfeld as funksioneer) dan nog as 'n toevallige bevinding bygereken word, sou dit 'n baie toevallige sameloop van omstandighede beteken.

Daar is dus min twyfel dat die intima-ekstrak se klompings=inhibisie op afbraak van ADP berus. Hierdie afbraak verskil van 'n soortgelyke plasma-sisteem in dié sin dat die ADP vinnig genoeg deur die intima-ekstrak gemetaboliseer word om die ADP se klompings-effek, na vrystelling uit die granules, te beperk of te voorkom.

### III INTIMA-REAKSIES MET KOLLAGEEN:

Die wyse waarop kollageen-klompings deur intima inhibeer word, is reeds bespreek.

Daar is egter nog 'n opvallende verskil tussen die patroon van kollageen-inhibisie en die van ADP-klompings-inhibisie, in dié eksperimente waar intima en die klompings-induseerders vooraf gemeng is (bls.55 ). Die intima-ekstrak kan nie die kollageen-geïnduseerde klompings volkome inhibeer nie. Met 'n baie hoë konsentrasie intima en 'n klein hoeveelheid kollageen is daar nog nie meer as omtrent 'n 80% vermindering in die kollageen-effek nie.

Dit skyn dus asof die kollageen-klompingsproses in minstens drie fases verdeel kan word:

- i) Die latente fase ná toevoeging van die kollageen, en voor die fase van ware plaatjiekompings (Wilner et al 1969).

- ii) Die klompingsfase self kan nou moontlik op grond van hierdie proewe in twee ineenlopende fases onderverdeel word.
- a) Die grootste komponent wat ongeveer 80% van die optiese digtheid verandering gedurende maksimale klompings betrek, berus op endogene ADP-gemedieerde klompings en kan deur die intima-ekstrak inhibeer word. Dat daar inderdaad 'n ADP-fase is, is reeds in 1962 deur Zucker en Borelli aangetoon.
- b) Die ander en kleiner komponent wat vir ongeveer 20% van die optiese digtheid verandering verantwoordelik is, is skynbaar nie van ADP afhanklik nie. Die fase berus op 'n ander meganisme wat moontlik 'n eienskap van die kollageen self is. 'n Gedeelte van hierdie fase is waarskynlik ook te wyte aan plaatjieklewing aan kollageen, maar daar is nie gepoog om tussen klewing en klompings te onderskei nie.

Daar is ook ander bewyse dat kollageen plaatjies nie slegs op die basis van ADP-loslating aggregeer nie. Gewasde plaatjies, weerstandig teen ADP-klompings, kan nog deur kollageen aggregeer word (Doery en Hirsh 1970). Hugues (1971) het ook daarop gewys dat spesifieke ADP-antagoniste soos dichloro-adenosien en veral prostaglandiene  $E_1$  nie besondere effektiewe inhibiteurs van kollageen-geïnduseerde klompings is nie.

Dit is natuurlik moontlik dat hierdie 'n kunsmatige skeiding is en dat albei die fases van die klompingsreaksie op ADP berus. ADP-loslating geskied egter op 'n kwantitatiewe progressiewe wyse soos meer en meer plaatjies aan die aggregaat deelneem. Indien 'n ensiemsisteem dus sou werk op die basis van ADP-afbraak vóórdat hierdie ADP klompings kan veroorsaak, skyn dit waarskynlik te wees dat dié betrokke ensiemsisteem ADP-klompings óf totaal óf glad nie sou inhibeer. Dit lyk dus hoogs waarskynlik dat kollageen self ook direk verantwoordelik is vir plaatjiekompings.

Dit mag dan juis hierdie kollageen-fase wees wat deur faktore eie aan die kollageen (soos die orgaan-oorsprong (Legrand en Pignaud 1971) en ouderdom van die dier (Bankowski et al 1969) ) beïnvloed word. Moontlik sou 'n antwoord op die aspek verskaf kan word deur soortgelyke eksperimente as hier beskryf met suiwer kollageen-preparate uit te voer.

#### IV DIE INTIMA, ATEROSKLEROSE EN INTRAVASKULÊRE TROMBOSE:

Nadat daar eksperimenteel aangedui is dat die intima van bloedvate oor ensiemaktiwiteit beskik wat duidelike ADP-afbraak effek het, ontstaan die vraag of hierdie aktiwiteit enigsins aan intravaskulêre trombose gekoppel kan word.

Daar is 'n verband tussen hemostase en trombose. Miskien kan trombose as 'n skadelike variant van hemostase beskou word, met dié primêre verskil dat trombose die gedeeltelike of totale obstruksie van normale bloedvloei tot gevolg het.

Fisiologies gesproke is daar nie verskil tussen die plaatjie=reaksies wat volg na 'n traumatiese transseksie van 'n bloedvat en die ná 'n bloedvatwandbesering aan die binnekant van die vat, soos byvoorbeeld trauma van 'n ateromateuse plakette. In albei gevalle volg die plaatjiereaksies 'n definitiewe patroon van plaatjieklewing aan ontblote kollageen, plaatjieklomping wat lei tot 'n groot plaatjie-aggregaat of trombus en fibrienvorming met stabilisering van die stolsel.

Dit lyk nie of plaatjies aan normale endoteelselle kleef nie en dit is duidelik dat uitgesproke endoteelbeskadiging aangerig moet word voordat plaatjieklomping plaasvind. Soos aangedui, glo die meeste vakkundiges op die gebied dat die onderliggende kollageen en basaalmembraan ontbloot moet word voor klewing sal plaasvind. Wanneer plaatjieklomping eers begin, is dit 'n eksplosiewe proses in dié sin dat die plaatjies wat aan die reaksie deelneem, genoeg ADP vrystel om ongeveer

sewe maal hulle eie getal ander plaatjies bykomstig te klomp (Mills et al 1968).

Dit skyn logies dat hierdie kringloop gebreek moet kan word, anders sou selfs geringe trauma massiewe intravaskulêre plaatjie-aggregasie uitlok.

Daar is maar min bekend oor die aksie van hierdie inhiberende faktore. Verskeie faktore mag 'n rol speel by die bepaling of die trombus groot of klein gaan wees, bv. die spoed waarteen bloed by die besering verbyvloei, of fibrien vinnig genoeg kan vorm om die plaatjie-aggregaat te stabiliseer, en ook die vlak van sirkulerende katechol-amines. Dit lyk tog of dit belangrik is om in gedagte te hou dat ADP-geïnduseerde klompings omkeerbaar is wanneer ADP-konsentrasie laag is. Trombien-geïnduseerde klompings daarenteen is onomkeerbaar en gaan dan natuurlik hand aan hand met fibrien-vorming en 'n meer permanente en stabiele trombus.

Daar is reeds aangetoon dat die stimulus vir volgehoue aggregasie nadat plaatjies aan kollageen blootgestel is, die vrystelling van endogene ADP is. Dat selfs 'n betreklik stadige ensiematiese afbraak van ADP soos in die plasma geskied, in staat is om ADP-geïnduseerde klompings te bekamp, is deur Stuart en Thomas (1967) aangetoon. 'n ADP-infusie in konyne veroorsaak 'n vinnige val in die plaatjietelling, maar binne twee minute ná die infuus gestaak is, is die plaatjietelling

weer normaal. Trombien, binne-aars gespuit, veroorsaak egter 'n volgehoue trombositopenie.

#### V DIE ROL VAN DIE INTIMA IN TROMBOSE:

Op grond van bekende gegewens en ook die nuwe feite wat die huidige eksperimente aan die lig gebring het, wil ons graag die volgende argument voorlê.

Dit moet aanvaar word dat plaatjieklewing en -klomping se primêre doel en belang die vorming van 'n prop is om 'n breuk in die bloedvatwand effektief te verseël. Dit is duidelik dat trombose maar net dieselfde hemostatiese proses is wat onder ander omstandighede plaasvind en dat die besondere patologiese belang van 'n trombus verband hou met obstruksie van normale bloedvloei en ook met spesifieke aspekte van emboliese verskynsels.

Daar is op die oomblik vier belangrike faktore bekend wat die grootte van die murale trombus sal bepaal:

- i) Endoteelbeskadiging met ontbloting van kollageen.
- ii) Endogene vrylating van ADP uit plaatjieggranules.
- iii) Aktivering van die bloedstollingsmeganisme, en fibrien se stabiliseringseffek op die plaatjietrombus.
- iv) Die beperkende rol van vinnige ADP-afbraak, met adenosien as inhiberende metaboliet, in plasma en ook deur die intima.

Enige kwantitatiewe of kwalitatiewe wisseling van hierdie faktore sal dus 'n betekenisvolle uitwerking op die finale grootte van die trombus uitoefen.

ADP-vrystelling ( ii) hierbo) is basies afhanklik van die plaatjies self, in dié sin dat dit berus op die aantal plaatjies wat aan die proses deelneem, op kwalitatiewe en kwantitatiewe ADP-plaatjie-inhoud en op vrylatingseienskappe eie aan die plaatjie self. Hierdie plaatjie-eienskappe mag dan van persoon tot persoon wissel en belangrik wees in die patogenese van trombose. Tans is daar egter geen wyse om hierdie aspek te meet nie.

Dieselfde geld ook vir die bloedstollingsmeganisme ( iii) hierbo). Dit is waarskynlik so dat 'n toestand van "hiperstolbaarheid", as 'n kliniese entiteit wel voorkom (Vermylen 1972). Hierdie entiteit kan egter tans moeilik beoordeel en gemeet word.

Indien ons egter aanvaar dat hierdie twee faktore in 'n spesifieke persoon op 'n spesifieke tydstip 'n onbekende maar moontlik tog konstante faktor is, sal die status van die ander twee genoemde faktore wat trombose kan beïnvloed ( i) en iv) hierbo) belangrik wees.

Hipoteties klink dit logies om ADP-afbraak in plasma ook onder die moontlik geneties-bepaalde faktore wat hemostase reguleer, te sorteer. Myns insiens mag hierdie aspek van belang wees

vir die variërende neiging tot trombose by verskillende rasse= groepe en siektetoestande.

Dit laat ons met twee faktore wat albei hul rol plaaslik in die bloedvatwand speel:

- a) die graad van traumatiese ontbloting van kollageen.
- b) die bloedvat-intima.

Met uitgesproke trauma van die bloedvat word sóveel kollageen blootgestel en die kontakfaktore van die intrinsieke stollings= meganisme so effektief geaktiveer, dat die intima as sulks sekerlik 'n minimale invloed op hierdie hemostatiese proses wat in werking gestel word, kan uitoefen.

Die saak verander egter sekerlik met minimale trauma, en veral met trauma van die endoteelvoering van die bloedvat. Daar is reeds op gewys dat endoteelbeskadiging gedurig plaasvind en dat hierdie beskadigde areas hoofsaaklik deur die proses van plaatjieklewing (en geringe plaatjieklomping) bedek word totdat selherstel weer die gaping oorbrug.

Waarom vorm 'n groot trombus nie op hierdie beskadigde gebied nie?

Dit skyn op grond van die eksperimentele resultate wat hier gebied is, baie waarskynlik dat die plaatjie-aggregaat se

grootte effektief deur die vinnige afbraak van ADP deur die intima beperk sal kan word. ADP van die vrylatingsreaksie oefen dan nie 'n effek uit nie en klomping is beperk tot ware kollageen-geïnduseerde aggregasie. Daar sal dus 'n natuurlike balans tussen die graad van kollageen-ontbloting en die grootte van die aggremaat wees. Die inhibisie-proewe het dan ook duidelik getoon dat indien genoegsame hoeveelhede kollageen verskaf word, die inhibisie-effek totaal oorbrug kan word.

Fisiologies-gesproke is die waarneming dat kollageenklomping nie totaal deur die intima geïnhibeer word nie, ook dan van belang. Met minimale intima-beskadiging is die inherente kollageen klewing-klomping verantwoordelik vir die instandhouding van die endoteel. Volkome inhibisie sou dan onaanvaarbaar wees aangesien dit hierdie beskermende funksie van plaatjies geheel en al in die wiele sou ry.

Die voortdurende trauma van die endoteel verander die deurlaatbaarheid van hierdie laag vir die plasma-inhoud. Hierdie deurlaatbaarheid is moontlik verantwoordelik vir die vroeë vetinfiltrasie by die intimaletsel van aterosklerose. Aangesien hierdie herhalende traumatiese letsel grotendeels anatomies bepaal is, vind dit in 'n groot mate voortdurend op dieselfde areas van die bloedvatwand plaas. Dit sal dan natuurlik belangrik wees indien hierdie vroeë aterosklerotiese letsel die hemostatiese en helingsproses, soos hierbo beskryf, kan beïnvloed.

Sou die intimale ADP-afbraak in die aanwesigheid van ateroskle= rose minder effektief wees, sal die beperkende effek op kolla= geen geïnduseerde klomping ook verminder word. Met ander woorde, nou sal dieselfde graad van minimale trauma wat voorheen slegs kollageen plaatjieklewing en -klomping uitgelok het, moontlik ook 'n mate van ADP-geïnduseerde klomping veroorsaak. Die plaatjietrombus wat nie groot genoeg is om bloedvloei-obstruk= sie te veroorsaak nie, kan mettertyd in die bloedvatwand inkorporeer word. Dit sal dan waarskynlik met verloop van tyd 'n ware ateromateuse plaket tot gevolg hê (Duguid 1948).

Die kringloop kan 'n stap verder gevoer word. Die plaket word nou aan trauma blootgestel. Endoteelbeskadiging en kol= lageenontbloting lok weereens plaatjie-reaksies uit. Met die verdere vermindering van die klompingseffek-inhibisie sal 'n steeds groter plaatjie-aggregaat op die ateromateuse plaket vorm. Die growwe oppervlak, verlies aan soepelheid met latere verkalking en verminderde bloedtoevoer na hierdie area, met gevolglik groter vatbaarheid vir trauma en vertraagde weefsel= herstel, sal dan verdere bydraende faktore tot plaaslike trom= bose wees.

Dit lyk dus moontlik dat insoverre dit plaatjie-klewing en moontlik self trombose aangaan, dieselfde graad van relatief onbenullige trauma op 'n normale en ateromateuse bloedvat heel verskillende uitwerkings mag hê.

In 'n klein reeks steekproewe is gepoog om aan te toon of daar 'n verskil is tussen die halfleeftyd van ADP met verskillende aorta-intima ekstrakte geïnkubeer. Soos aangetoon (bylaag A , bls.112) was daar geen patroon wat die normale van die atero=mateuse aortas onderskei het nie.

Die intimas is op slegs een grondslag met mekaar vergelyk; naamlik nat gewig. Daar was 'n aansienlike wisseling in halfleeftyd van ADP met die verskillende ekstrakte. Selfs normale intima het 'n onvoorspelbare effek getoon. Ateromateuse intima-waardes oorvleuel ook heeltemal met dié van normale intimas.

Daar kan egter besware geopper word teen die wyse waarop die intimas met mekaar vergelyk is. Die aortas is tot gebruik by 4°C in normale soutoplossing bewaar. Die hoeveelheid soutoplossing wat aan die intima kleef en dit binnedring, mag die nat gewig aansienlik beïnvloed. Hierdie potensieel wisselende faktor is in hierdie eksperimente nie gekontroleer nie.

Die probleem kan op twee ander maniere benader word.

- i) Dit skyn logies om gesonde areas van dieselfde aorta te vergelyk. Hierdie vergelyking kan op die basis van óf nat gewig van die intima óf gevriesdroogde intima-gewig berus. Vergelykende proewe op areas van dieselfde gesonde aorta sal dan aantoon watter van die bogenoemde twee gewigte die mees herhaalbare resultate toon.

- ii) Die tweede, en moontlik meer fisiologiese, benadering is om gelyke intima-oppervlakte met mekaar te vergelyk, afgesien van onderskeie gewigte.

Totdat hierdie proewe uitgevoer is, moet die vraag of aterosklerotiese intima ADP-afbraak kwantitatief beïnvloed, egter nog onbeantwoord bly.

Die plaatjie-aggregaat mag, benewens plaaslike obstruksie van bloedvloei, ook 'n ander belangrike klinies-patologiese betekenis hê. Jørgenson het in 1967 en 1968 in 'n reeks van belangwekkende eksperimente waar binne-aarse ADP-infusies in varke toegedien is, gemerk dat die val in die perifere plaatjietelling ook geassosieerd was met 'n intermitterende obstruksie van arteriële bloedvloei in die mikrosirkulasie. Twee tot drie uur ná die infusie het meer as 80% van die varke akute miokardiale infarksie ontwikkel. Die varke kon teen hierdie neue-effek beskerm word indien hulle vooraf trombositopenies, of hulle plaatjies nie-responsief teen ADP gemaak is. Jørgenson het dan ook voorgestel dat in pasiënte met skielike kliniese miokardiale infarksie-dood, sonder makroskopiese koronêre trombose, intravaskulêre plaatjie-aggregasie met 'n stroom van plaatjie embolieë plaaslike mikrosirkulatoriese versaking met miokardiale infarksie kon presipiteer. Dat hierdie wel 'n moontlikheid is, is ook duidelik gestel deur Gunning et al (1964) se pasiënte waar murale trombose in die karotus-arterie met plaatjie-embolisme en simptome van serebrale isgemie geassosieer was.

Hierdie trombo-emboliese komplikasies van aterosklerose is nie net tot die miokard beperk nie. Daar is 'n verband tussen aorta-letsels bó die oorsprong van die renale arterie en kortikale nierletsels (Moore 1964, Moore en Mersereau 1965). Weereens, met eksperimente waar ADP-infusies gebruik is, het hulle aangetoon dat plaatjie-embolieë fokale bloedvatletsels in glomerulêre kapillêre vate kan veroorsaak en dat hierdie 'n belangrike rol in die patogenese van nierletsels en hipertensie mag speel. Dit is dus duidelik dat plaatjie-aggregate op plaaslike bloedvatletsels belangwekkende emboliese gevolge mag hê (Mustard en Packham 1969, 1970).

OPSOMMING

Bloedplaatjies speel 'n sleutelrol by hemostase en intravas=  
kulêre, veral arteriële, stolling. Normaalweg kleef plaatjies  
nie aan die endoteelvoering van bloedvate nie, maar is belang=  
rik vir die instandhouding van hierdie sellag. Sodra die  
onderliggende basaalmembraan en kollageen ontbloot word, word  
'n reeks beskermingsreaksies ontketen:

Plaatjies kleef aan kollageen, met daaropvolgende eksplo=  
siewe vrylating van endogene adenosindifosfaat (ADP) uit  
plaatjiegranules. Dit lei tot die vorming van 'n losse  
plaatjieprop as primêre hemostatiese meganisme. Die  
gelyktydige aktivering van bloedstolling, versnel deur  
plaatjie-inhoud, lei tot onomkeerbare trombien-geïndu=  
seerde plaatjieklomping en fibrien-versterkte stolsel=  
konsolidasie.

Trombose kan gesien word as 'n skadelike variant van hemo=  
stase, gekenmerk deur 'n meer volledige verloop van hierdie  
proses en veral deur obstruksie van bloedvloei. Intravasku=  
lêre murale trombose op areas van bloedvatwandbesering en  
inkorporasie van die trombus in die arteriële intima-laag  
speel 'n belangrike rol by die vroeë sowel as laat stadia  
van die patogenese van aterosklerose. Die aterosklerotiese  
plaket met sy growwe, gebreekte en soms verkalkte oppervlak,  
dien dan as grondslag vir verdere trombose en ook plaatjie-

trombo-embolisme, wat as 'n belangrike komplikasie van hierdie ernstige degeneratiewe siektetoestand beskou word.

In die lig van die feit dat die plaatjie-kollageen interaksie van kardinale belang is by intravaskulêre trombose en selfs aterosklerose, is die invloed van arteriële bloedvatlae op plaatjieklomping verder ondersoek.

Ekstrakte berei van Achilles-tendon, aorta-media en aorta-intima is verstel tot gelykwaardige proteïeninhoud (as indeks van konsentrasie) en die klompingsdoeltreffendheid van die ekstrakte in 'n EEL-klompingsmeter, as verandering in optiese digtheid van plaatjieryk-plasma (PRP) bepaal. Geen kwantitatiewe verskille in die klompingsaktiwiteit van Achilles-tendon en aorta-media is aangetoon nie, terwyl die intima-ekstrak as klompingsinduseerder onaktief was. Met behulp van die ensiem kollagenase is bewys dat die media se klompingsaktiwiteit spesifiek kollageen-afhanklik was.

Dat arteriële intima nie oor klompingsaktiwiteit beskik het nie, was verrassend aangesien hierdie laag kollageen sowel as basaalmembraan bevat. Preïnkubasie van kollageen met intima, en ook ADP met intima, het hierdie induseerders se aggregasievermoë geïnhipeer. In intima was daar dus 'n inhibitor van plaatjieklomping aanwesig. Met voldoende konsentrasies van intima-ekstrak kon ADP-geïnduseerde klomping

totaal geïnhibeer word, terwyl dié van kollageen slegs tot maksimum 80% opgehef kon word. Die geaardheid van hierdie inhibitor is verder ondersoek.

Met papier kromatografiese analise van die intima-ekstrak kon geen adenosien, die belangrikste fisiologiese inhibitor van plaatjie-klomping, aangetoon word nie.

Proewe waar die intima-ekstrak en ADP saam geïnkubeer is en deelvolumes van die mengsel daarna papier-kromatografies en met hoë-spanning elektroforese, geskei is, het 'n tydafhanklike sekweniële afbraak van ADP na adenosienmonofosfaat (AMP), adenosien, inosien en hipoxantien, getoon. Dit is bekend dat ADP op vergelykbare wyse deur 'n plasma-ensiemstelsel afgebreek kan word. Die twee stelsels verskil skynbaar: In teenstelling met die plasma-stelsel het intima-geïnduseerde ADP afbraak gelei tot hoër AMP-vlakke en vertraagde vorming van hipoxantien. Inhibisie van ADP-geïnduseerde klomping was dan die gevolg van ADP afbraak deur intima en die vraag het ontstaan of inhibisie van kollageen-geïnduseerde klomping ook aan ADP-afbraak gekoppel kon word.

Opeenvolgende toevoeging van eers intima-ekstrak en daarna kollageen by PRP het inhibisie van soortgelyke orde teweeggebring as wanneer intima en kollageen voorafgemeng en dan by PRP gevoeg is. Adrenalin en trombin, induseerders met klompingsvermoë wat, soos kollageen, ook deels op vrylating

van plaatjie-ADP berus, het met intima 'n soortgelyke inhibisie-  
patroon gewys. Hierdie inhibisie verskil van <sup>die</sup> patroon waarop  
adenosien plaatjieklomping teenhou.

Die resultaat van hierdie proewe dui daarop dat die kinetika  
van ADP-afbraak deur die intima-ekstrak (in teenstelling met  
dié van plasma) van so 'n aard is dat dit in staat is om  
endogene ADP, vanaf die vrylatingsreaksie, te vernietig  
voordat hierdie ADP plaatjieklomping kan induseer.

Dat kollageen-geïnduseerde klomping tot 'n maksimum van on=  
geveer 80% geïnhibeer kan word, is 'n aanduiding dat hierdie  
klomping uit verskeie fases bestaan. Na 'n latente periode,  
die lengte waarvan verband hou met die kollageen-konsentrasie,  
vind die klompingsfase plaas. Hierdie fase berus grotendeels  
(ongeveer 80% van die totaal) op die effek van ADP losgelaat  
uit plaatjie-granules, en kan deur die intima-ekstrak opge=  
hef word. Die kleiner komponent van <sup>die</sup> klompingsfase (ongeveer  
20% van die totaal) kan nie deur ADP-afbraak inhibeer word  
nie en is dus waarskynlik aan 'n direkte kollageen-effek toe  
te skryf.

Die hipotese word gestel dat intima 'n belangrike rol mag speel  
by die bepaling van die uiteindelijke grootte van die plaatjie-  
aggregaat wat op 'n bloedvatbesering volg. Wanneer die be=  
sering omvangryk is met prominente kollageen-geïnduseerde

plaatjieklomping en kontak-aktivering van die stollingsmeganisme, sal bovermelde ADP-afbraak deur intima die hemostatiese reaksie waarskynlik min beïnvloed. By die geringe slytasie-trauma waaraan die bloedvatendoteel voortdurend blootgestel is, sal hemostase deur hierdie ADP-afbraak moontlik effektief tot klewing en minimale klomping beperk word. ADP-onafhanklike kollageen-geïnduseerde klomping sou dan genoegsaam kon wees om aan die benodigdhede van die helingsproses te voldoen sonder dat die bykomstige skadelike komplikasies van trombose en embolisme uitgelok word.

Dit sou belangwekkend wees indien vroeë ateroom met verminderde of vertraagde intimale ADP-afbraak geassosieerd is. Minimale trauma sal dan tot meer uitgesproke klomping, groter aggregate en moontlik trombose lei. Inkorporasie van hierdie plaatjietrombi in die arteriële wand sal dan die aterosklerotiese plaket en sy bekende patologiese implikasies tot gevolg hê.

In voorlopige steekproewe waar gesonde en ateromateuse intima-ekstrakte met ADP geïnkubeer is, kon 'n verskil in ADP-halfleeftyd nie aangetoon word nie. Die eksperimentele model behoort egter verder uitgebou en die probleem uitvoerig ondersoek te word.

BYLAE

	<u>Bladsy</u>
<u>BYLAAG A</u> : ADP-afbraak deur normale en ateroskle= rotiese intima-ekstrakte en ook blanke en nie-blanke intima-ekstrakte.	112
<u>BYLAAG B</u> : Besonderhede van weefsel-donors.	115
<u>BYLAAG C</u> : Afbraak van ADP na inkubasie met plasma.	117
<u>BYLAAG D</u> : Afbraak van ADP na inkubasie met intima= ekstrak.	120
<u>BYLAAG E</u> : Absorpsie-spektrum data van adenien= samestellings.	123

BYLAAG ADoel:

'n Intima-ekstrak van aorta beskik oor die vermoë om ADP vinnig te metaboliseer en op hierdie wyse plaatjieklomping kwantitatief te beïnvloed.

Dit is belangrik om te weet of aterosklerotiese bloedvatveranderinge hierdie kenmerk van die intima enigsins kan benadeel.

'n Proef is beplan om die intima-ekstrak van een aorta met die van 'n ander te vergelyk op die basis van die spoed van ADP-afbraak deur die verskillende ekstrakte.

Metode:Vorbereiding van intima-ekstraktea) Normale aorta:

Die intimalaag is op presies dieselfde wyse as reeds in Hoofstuk III beskryf, met 'n lanset verwyder. Die intima is geweeg en dan in 'n klein volume normale soutoplossing fyngehaal.

Die intima-ekstrak is dan met 'n toepaslike volume 0,9% NaCl verdun om 'n konsentrasie van 70 mg intima (nat gewig) per ml normale soutoplossing te verkry.

Aorta no.	Aorta: Ateroom-status	Inkubasie-tydperk								T <sub>1/2</sub> ADP (minute)
		0 minute		5 minute		10 minute		20 minute		
		$\Delta E_{340}$ (E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> )	m/ $\mu$ mol ADP/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$ (E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> )	m/ $\mu$ mol ADP/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$ (E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> )	m/ $\mu$ mol ADP/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$ (E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> )	m/ $\mu$ mol ADP/ ml ekstrak	
548/72	Normaal	0,24	141	0,02	11	-	-	-	-	2,6
554/72	Normaal	0,20	117	0,10	58	-	-	-	-	5,0
552/72	Normaal	0,25	147	0,18	105	0,14	82	0,09	52	13,0
558/72	Normaal	0,20	112	0,09	52	-	-	-	-	4,8
560/72	Normaal	0,23	135	0,12	70	0,05	29			5,2
554/72	Normaal	0,24	141	0,14	82	0,074	43			6,6
549/72	Vet infiltrasie	0,25	147	0,16	94	0,094	-	-	-	8,5
553/72	Vet infiltrasie	0,18	105	0,05	29	0,01		-	-	3,5
569/72	Erge aantasting	0,24	141	0,12	70	0,06	35	-	-	5,0
561/72	Erge aantasting	0,25	147	0,16	94	0,12	70	-	-	9,6
559/72	Erge aantasting	0,24	141	0,02	11	-	-	-	-	4,9

Fig. A - i: Halfleeftyd van ADP wanneer met intima-ekstrakte by 37°C geinkubeer. Normale en aterosklerotiese aortas is gebruik. ADP is met die NADH-oksidasie metode bepaal.

b) Aterosklerotiese aorta:

Die intimas van hierdie aortas is hoofsaaklik van dele van die bloedvat verwyder wat makroskopies aangetas was.

Aortas is in twee groepe verdeel:

- i) Vetterige infiltrasie van die oppervlakkige bloedvatlaag. Die intima-laag was dikwels verdik.
- ii) Erge aantasting met duidelike plakette, erge vetinfiltrasie en soms ulserasie en verkalking van die letsels.

By i) is geen probleme met die verwydering van die intima ondervind nie. By ii) was die intima plek-plek fibroties met 'n swak skeidingsvlak tussen intima en media. In hierdie gevalle is die oppervlakkigste lae oor die plakette verwyder en soos beskryf, behandel.

Bepaling van die halfleeftyd van ADP:

Die intima-ekstrak is in 'n gesilikoniseerde rondeboomfles geplaas en met 'n gewrigsaksie-tipe skudapparaat voortdurend in 'n waterbad by 37°C geskud.

'n 10  $\mu$ M ADP oplossing in normale soutoplossing is voorberei en 'n toepaslike volume hiervan by die intima-ekstrak gevoeg sodat 'n finale ADP-konsentrasie van 100 - 150  $\mu$ M verkry is.

<u>Aorta no.</u>	<u>Ras en geslag</u>	<u>T<math>\frac{1}{2}</math> ADP (minute)</u>
548/72	Nie-blank; man	2,6
554/72	Nie-blank; vrou	5,0
558/72	Nie-blank; man	4,8
554/72	Nie-blank; vrou	6,6
552/72	Blank; man	13,0
560/72	Blank; man	5,2
549/72	Blank; vrou	8,2
553/72	Blank; vrou	3,5
559/72	Blank; man	4,9

Fig. A - ii: Die halfleef tyd van ADP wanneer met intima-ekstrakte van aortas van verskillende rasse-groepe berei. Die werklike data van die NADH-oksidasie metode van ADP bepaling verskyn in fig. A - i teenoor die ooreenstemmende aorta-nommers.

Onmiddellik na die toegevoegde ADP deeglik gemeng is, en ook na 5, 10 en 20 minute inkubasie-periodes, is 2,5 ml deelvolumes van die mengsel onttrek en by 2,5 ml yskoue 1,0 N perchloorsuur gevoeg.

Die mengsel is goed met 'n vorteksmenger geskuud, afgeswaai teen 12000 g by 2 - 4°C in 'n verkoelde sentrifuus met 'n hoëspoed aanhegtingstoestel en die ADP inhoud met die ensiematiese NADH-oksidasie metode soos reeds volledig in Hoofstuk III beskryf, bepaal.

#### Resultate:

Die resultate word in fig. A - i weergegee. In hierdie klein reeks het die ADP halfleeftyd van die normale aorta-groep en die aterosklerotiese aorta-groep nie verskil nie.

Soos in die resultate van fig. A - ii gesien, het die ADP halfleeftyd van die blanke aorta-groep en die nie-blanke aorta-groep ook nie verskil nie.

BYLAAG BBESONDERHEDE VAN WEEFSEL-DONORS

<u>Post-mortem no.</u> (Staats= lykhuis)	Ras	Geslag	Ouderdom	Oorsaak van dood	Aorta
a) <u>Vergelykende proewe met weefsel-ekstrakte:</u>					
48/71	Msutu	Manlik	18	Ontwrigting nek= werwels	Normaal
53/71	Blank	Manlik	20	Koeëlwond	Normaal
115/71	Kleurling	Vroulik	36	Septisemie	Normaal
117/71	Msutu	Vroulik	43	Koronêre ostium besering	Ateroom +
118/71	Tswana	Manlik	23	Brandwonde	Normaal
112/71	Morolong	Manlik	18	Aneurisme (brein= basis)	Normaal
109/71	Blank	Manlik	19	Hoofbesering	Normaal
b) <u>Intima-ekstrak/inhibisie proewe:</u>					
110/71	Blank	Vroulik	36	Skedelbreuk	Normaal
122/71	Blank	Manlik	32	Koeëlwond	Normaal
123/71	Tswana	Manlik	30	Intraserebrale bloeding	Normaal
124/71	Morolong	Manlik	20	Wond in nek	Normaal
263/71	Blank	Vroulik	18	Skedelbreuk	Normaal
264/71	Tswana	Manlik	21	Hoofbesering	Normaal
266/71	Tswana	Manlik	45	Hoofbesering	Normaal
271/71	Kleurling	Manlik	49	Beenbreuke	Normaal
269/71	Blank	Manlik	59	Aorta-ruptuur	Ateroom +
63/72	Xhosa	Manlik	30	Steekwond hart	Normaal
64/72	Sotho	Manlik	47	Skedelbreuk	Normaal
68/72	Xhosa	Manlik	27	Wond nek	Normaal

<u>Post-mor- tem no.</u> (Staats= lykshuis)	Ras	Geslag	Ouderdom	Oorsaak van dood	Aorta
c) <u>Loslating-proewe:</u>					
92/72	Kleurling	Vroulik	48	Breinbesering	Normaal
93/72	Tswana	Manlik	25	Skedelbreuk	Normaal
94/72	Ndbele	Manlik	44	Bekkenbreuke	Normaal
97/72	Tswana	Manlik	24	Ribbe-breuke	Normaal
100/72	Blank	Vroulik	38	Vergiftiging	Normaal
102/72	Blank	Manlik	41	Beenbreuke	Ateroom +
d) <u>Intimale ADP-a<b>f</b>braak proewe:</u>					
245/72	Khosa	Manlik	18	Wond skedel	Normaal
257/72	Khosa	Manlik	29	Veelvuldige bese= ring	Normaal
261/72	Blank	Manlik	20	Skedelbreuk	Normaal
262/72	Sotho	Manlik	22	Natuurlike oorsa= ke	Normaal
263/72	Blank	Manlik	22	Skedelbreuk	Normaal
546/72	Sotho	Manlik	20	Meningitis	Ateroom +
544/72	Sotho	Manlik	18	Breinbesering	Normaal
548/72	Sotho	Manlik	35	Steekwond	Normaal
554/72	Sotho	Vroulik	46	Inwendige bloe= ding	Ateroom +
553/72	Blank	Manlik	25	Breinbesering	Ateroom +
552/72	Kleurling	Manlik	82	Beserings	Ateroom +
556/72	Sotho	Manlik	44	Narkose-dood	Ateroom +
561/72	Blank	Vroulik	65	Veelvuldige be= serings	Ateroom +++
559/72	Blank	Manlik	61	Breinbesering	Ateroom +++
560/72	Blank	Manlik	54	Veelvuldige be= serings	Ateroom +++
558/72	Sotho	Manlik	30	Steekwond	Normaal
565/72	Sotho	Manlik	38	Veelvuldige be= serings	Normaal
564/72	Blank	Manlik	34	Motorongeluk	Normaal

BYLAAG CAFBRAAK VAN ADP NA INKUBASIE MET PLASMA

Ware lesings en kwantitatiewe bepaling van adenien-samestellings met behulp van molekulêre ekstruksie koëffisiënte (fig. C - i). Hierdie resultate word in grafiekvorm op bls. 78 weergegee.

Ware lesings van 'n duplikaatproef soortgelyk aan die soos op bls. 77 beskryf (fig. C - ii). Die resultate stem ooreen met die van die ander eksperiment.

Buffer	Adenien- samestelling	Inkubasie- tydperk (minute)	E <sub>260</sub>	Molekulêre ekstinksie koëffisiënt	m/μ mol/ml plasma	m/μ mol/ml na korreksie vir verduinning	Kommentaar
Asynsuur- mieresuur	Adenosien	30	0,180	14,9	5,4	19,4	AMP=66,1 m/μmol/ml
	Hipoxantien	30	0,110	11,3	0,95	3,4	
	AMP + Inosien	30	0,380	Inosien 11,7	Geen		
	Adenosien	60	0,287	14,9	12,5	45,2	AMP=58,4 m/μmol/ml
	Hipoxantien	60	0,170	11,3	0,63	2,2	
	AMP + Inosien	60	0,348	Inosien 11,7	Geen		
	Adenosien	120	0,398	14,9	20,0	72,4	
	Hipoxantien	120	0,141	11,3	3,5	12,8	
	AMP + Inosien	120	0,323	Inosien 11,7	15,8	56,8	
	Adenosien	240	0,146	14,9	3,1	11,2	AMP=geen
	AMP + Inosien	240	0,492	Inosien 11,7	33,5	120,7	
	Papier blanko	-	0,10	-			
	Hipoxantien	240	0,204	11,3	9,2	33,2	
Sitroen= suur	ADP	0	0,805	15,4	45,8	165,1	
	AMP	0	0,132	15,3	2,1	7,3	
	ATP	30	0,135	15,4	2,3	8,2	
	ADP	30	0,396	15,4	19,2	69,1	
	AMP	30	0,388	15,3	18,8	67,8	
	ATP	60	0,177	15,4	5,0	18,0	
	ADP	60	0,253	15,4	9,9	35,7	
	AMP	60	0,359	15,3	16,9	60,9	
	ADP	120	0,164	15,4	4,2	15,1	
	AMP	120	0,138	15,3	2,5	9,0	
	Papier blanko	-	0,10				

Fig. C - i(a): Koolstofadsorpsie metode van ADP afbraakprodukte in plasma herwin en bepaal.

STOF	INKUBASIE-TYDPERK							
	0 minute		30 minute		60 minute		120 minute	
	$\Delta E_{340}$	m/u mol/ ml plasma	$\Delta E_{340}$	m/u mol/ ml plasma	$\Delta E_{340}$	m/u mol/ ml plasma	$\Delta E_{340}$	m/u mol/ ml plasma
(Met NADH-oksidasie metode bepaal)								
ADP	0,37	184	0,16	78	0,09	46	0,04	18
AMP	0,12	30	0,30	74	0,23	57	0,04	9

Fig. C - i (b): NADH-oksidasie metode van ADP en AMP bepalings. Plasma met ADP geïnkubeer is dieselfde as die van fig. C - i (a).

Buffer	Adenien-samestelling	Inkubasietydperk (minute)	E <sub>260</sub>	Molekulêre ekstinksie koëffisiënt	m/μ mol/ml plasma	m/μ mol/ml na korreksie vir verdunning	Kommentaar
Mieresuur-asynsuur	Adenosien	30	0,094	14,9	3,7	13,2	
	Hipoxantien	30	0,04	11,3	Geen		
	AMP + Inosien	30	0,352	Inosien 11,7	Geen		AMP=74,2 m/μmol/ml
	Adenosien	60	0,167	14,9	4,5	16,4	
	Hipoxantien	60	0,122	11,3	7,3	26,4	
	AMP + Inosien	60	0,326	Inosien 11,7	3,3	12,0	AMP=58,5 m/μmol/ml
	Adenosien	120	0,14	14,9	6,7	24,4	
	Hipoxantien	120	0,14	11,3	8,9	32,1	
	AMP + Inosien	120	0,265	Inosien 11,7	17,0	61,2	AMP=6,4 m/μmol/ml
	Adenosien	240	0,101	14,9	4,1	14,8	
	Hipoxantien	240	0,124	11,3	7,4	26,8	
	AMP + Inosien	240	0,257	Inosien 11,7	18,5	66,8	AMP=geen
	Papier blanko	-		0,04	-		
Sitroen=suur	ADP	0	0,626	15,4	38,0	137,0	
	AMP	0	0,135	15,3	6,2	22,5	
	ATP	30	0,094	15,4	3,5	12,8	
	ADP	30	0,275	15,4	15,2	55,0	
	AMP	30	0,358	15,3	20,8	75,0	
	ATP	60	0,108	15,4	4,4	16,0	
	ADP	60	0,157	15,4	7,6	27,5	
	AMP	60	0,288	15,3	16,2	58,5	
	ADP	120	0,044	15,4	Geen		
	AMP	120	0,067	15,3	1,7	6,4	
	Papier blanko			0,04			

Fig. C - ii (a): Inkubasie van ADP in plasma: koolstofadsorpsie metode is gebruik om afbraakprodukte te herwin.

STOF	INKUBASIE-TYDPERK					
	0 minute		30 minute		60 minute	
	$\Delta E_{340}$	m $\mu$ mol/ ml plasma	$\Delta E_{340}$	m $\mu$ mol/ ml plasma	$\Delta E_{340}$	m $\mu$ mol/ ml plasma
(Met NADH-oksidasie metode bepaal)						
ADP	0,37	180,0	0,12	58,0	0,08	40,1
AMP	0,09	21,6	0,23	57,6	0,14	33,6

Fig. C - ii (b): NADH-oksidasie metode van bepaling van ADP en AMP.  
Dieselfde plasma as in fig. C - ii (a).

BYLAAG DAFBRAAK VAN ADP NA INKUBASIE MET INTIMA-EKSTRAK

Ware lesings en bepalinge van adenien-samestellings kwantitatief met behulp van molekulêre ekstinksie koëffisiënte (fig. D-i) bereken. Hierdie resultate word in grafiekvorm op bls. 74 aangegee.

Ware lesings van 'n duplikaatproef soortgelyk aan die eksperiment op bls. 74 beskryf (fig. D - ii). Die resultate stem goed ooreen met die van die bovermelde proef.

Buffer	Adenien samestelling	Inkubasie tydperk (minute)	$E_{260}^-$	Molekulêre ekstinksie koëffisiënt	m/u mol/ml	m/u mol/ml na korreksie vir verdunning	Kommentaar
Asynsuur-mieresuur	Adenosien	30	0,36	14,9	14,1	46,5	
	Adenosien	60	0,62	14,9	31,5	103,9	
	Adenosien	120	0,62	14,9	31,5	103,9	
	Adenosien	240	0,515	14,9	24,5	80,9	
	Hipoxantien	240	0,220	11,3	6,2	20,5	
	Papier blanko	-	0,15	-	-	-	
	AMP + Inosien	240	0,372	Inosien 11,7	19,0	62,7	
	AMP + Inosien	120	0,345	Inosien 11,7	16,7	60,2	
	AMP + Inosien	60	0,272	Inosien 11,7	10,5	34,7	
	AMP + Inosien	30	0,574	Inosien 11,7	Geen	-	AMP=99,8 m/u mol/ml
	AMP + Inosien	10	0,834	Inosien 11,7	Geen	-	AMP=161,0 m/u mol/ml
	AMP + Inosien	5	0,715	Inosien 11,7	Geen	-	AMP=133,0 m/u mol/ml
	Sitroen=suur	ADP	0	0,74	15,4	40,3	133,0
AMP		0	0,28	15,3	10,5	34,6	
ADP		5	0,28	15,4	10,4	34,3	
AMP		5	0,73	15,3	39,9	131,7	
AMP		10	0,86	15,3	48,4	159,7	
AMP		30	0,58	15,3	30,1	99,3	
Papier blanko		-	0,12	-	-	-	

Fig. D - i(a): ADP met intima-ekstrak inkubeer. Afbraakprodukte met koolstofadsorpsie herwin.

STOF	INKUBASIE-TYDPERK									
	0 minute		1 minuut		3 minute		10 minute		30 minute	
	$\Delta E_{340}$	m/μ mol/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$	m/μ mol/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$	m/μ mol/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$	m/μ mol/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$	m/μ mol/ ml ekstrak
(met NADH- oksi= dasie metode bepaal)										
ADP	0,26	130	0,23	111	0,15	74	0,07	34	G E E N	
AMP	0,13	32	0,22	54	0,30	74	0,60	147	G E E N	

Fig. D - i (b): NADH-oksidasie metode van bepaling van ADP en AMP. Dieselfde intima-ekstrak as van fig. D - i (a) is gebruik.

Buffer	Adenien samestelling	Inkubasietydperk (minute)	E <sub>260</sub>	Molekulêre ekstinksie koëffisiënt	m/μ mol/ml	m/μ mol/ml ná korreksie vir verdunning	Kommentaar
Mieresuur-asynsuur	Adenosien	30	0,63	14,9	38,2	137,5	
	Adenosien	60	0,66	14,9	40,4	145,4	
	Adenosien	120	0,60	14,9	36,6	131,7	
	Adenosien	240	0,56	14,9	33,6	120,9	
	Hipoxantien	240	0,13	11,3	6,4	23,0	
	AMP + Inosien	240	0,155	Inosien 11,7	8,2	29,5	
	AMP + Inosien	120	0,235	Inosien 11,7	15,0	54,0	
	AMP + Inosien	60	0,162	Inosien 11,7	8,8	31,7	
	AMP + Inosien	30	0,19	Inosien 11,7	11,4	41,0	
	AMP + Inosien	10	0,686	Inosien 11,7	Geen		AMP=147,5 m/μmol/ml
	AMP + Inosien	5	0,648	Inosien 11,7	Geen		AMP=138,4 m/μmol/ml
	AMP + Inosien	0	0,291	Inosien 11,7	Geen		AMP=54,4 m/μmol/ml
		Papier blanko	-	0,06	-	-	-
Sitroen=suur	ADP	0	0,61	15,4	36,0	129,6	
	AMP	0	0,305	15,3	16,1	57,9	
	ADP	5	0,215	15,4	10,1	36,3	
	AMP	5	0,66	15,3	39,0	140,4	
	AMP	10	0,70	15,3	42,0	151,2	
	AMP	30	0,238	15,3	11,0	39,6	
	ADP	10	0,170	15,4	7,2	25,9	
		Papier blanko	-	0,06	-	-	-

Fig. D - ii(a): ADP met intima-ekstrak inkubeer. Afbraakprodukte met koolstofadsorpsie herwin.

STOF	INKUBASIE-TYDPERK							
	0 minute		5 minute		10 minute		30 minute	
(Bepaling met NADH-oksidasie metode)	$\Delta E_{340}$	m $\mu$ mol/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$	m $\mu$ mol/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$	m $\mu$ mol/ ml ekstrak	$\Delta E_{340}$	m $\mu$ mol/ ml ekstrak
ADP	0,24	122	0,08	39	,025	12	G E E N	
AMP	0,08	20	0,46	112	,60	147	G E E N	

Fig. D - ii (b): NADH-oksidasie metode van ADP en AMP bepaling.  
 Dieselfde intima-ekstrak as fig. D - ii(a) is gebruik.

BYLAAG EABSORPSIE-SPEKTRUM DATA VAN ADENIEN-SAMESTELLINGS

Nadat die adenien-samestellings met hoëspanning elektroforese geskei is, is hierdie primêre identifikasie met absorpsie spektrofotometrie bevestig.

Die data van die eluaat in water, voor en na die oplossing met 50  $\mu$ l 0,25N NaOH gealkaliniseer is, word in fig. E - i aangegee.

Data is met die van Burton (1969) vergelyk om identiteit te bevestig.

Adenien-samestelling	pH van eluaat	maksimum (nm) by suur pH van eluaat	pH na toevoeging van 50 $\mu$ l 0,25N NaOH by eluaat	maksimum by alkaliese pH
ATP	5,1	258-259	10,9	259-260
AMP	5,0	258-259	10,3	259-260
ADP	5,0	258-259	10,9	259-260
Adenosien	4,1	259-260	11,5	259-260
Inosien	4,1	248-249	11,4	253-254
Hipoxantien	4,1	249-250	11,3	259-260

Fig. E - i: Absorpsie-spektrum data van die adenien-samestellings na eluering uit elektroforese papier. Soos aangedui, het waardes van absorpsie-maksima gering gewissel, maar nog ooreengestem met die van Burton (1969).

## B I B L I O G R A F I E

1. ADAM, H. (1963) in "Methods of Enzymatic Analysis" bls. 573. Bergmeyer H-U (Red.) Academic Press, New York and London.
2. BAENZIEGER, N.L., BRODIE, G.N., MAJERUS, P.W. (1971). A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. Proc. of Nat. Acad. of Sciences 68, 240.
3. BANKOWSKI, E., NIEWIAROWSKI, S., ROGOWSKI, W. (1969). Decrease of platelet aggregating activity of soluble human collagen fractions during ageing. Thrombos. Diathes. haemorrh. 21, 441.
4. BAUMGARTNER, H.R., STEMERMAN, M.B., SPAET, T.H. (1971). Adhesion of blood platelets to subendothelial surface: distinct from adhesion to collagen. *Experientia* 27, 283.
5. BERENSON, G.S., DALFERES, E.R., ROBIN, R., STRONG, J.P. (1963) in "Evolution of the Atherosclerotic Plaque" bls. 139. Jones, R.J. (Red.). Univ. Chicago Press.
6. BETTEX-GALLAND, M., LÜSCHER, E.F. (1959). Extraction of an actomyocin-like protein from human thrombocytes. *Nature (Lond.)* 184, 276.
7. BETTEX-GALLAND, M., LÜSCHER, E.F., WEIBEL, E.R. (1969). Thrombasthenin, electron microscopical studies on its localization in human blood platelets and some properties of its subunits. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 22, 431.
8. BIZZOZERO, J. (1882). Über einen neuen Formbestandteil der Blutes und dessen Rolle bei der Trombose und der Blutgerinnung. *Virchows Arch.* 90, 261. (Aangehaal in Robb-Smith 1967).
9. BORN, G.V.R. (1958). Changes in the distribution of phosphorus in platelet-rich plasma during clotting. *Biochem. J.* 68, 695.
10. BORN, G.V.R. (1962). Quantitative investigations into aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 162, 67P.
11. BORN, G.V.R. (1964). Strong inhibition by 2-chloroadenosine of the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. *Nature (Lond.)* 202, 95.
12. BORN, G.V.R. (1965). Uptake of adenosine diphosphate by human blood platelets. *Nature (Lond.)* 206, 1121.

13. BORN, G.V.R., CROSS, M.J. (1963). The aggregation of blood platelets. *J. Physiol. (Lond.)* 168, 178.
14. BORN, G.V.R., CROSS, M.J. (1964). Effect of inorganic ions and of plasma proteins on the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. *J. Physiol. (Lond.)* 170, 397.
15. BORN, G.V.R., HUME, M. (1967). Effects of the numbers and sites of platelet aggregates on the optical density of plasma. *Nature (Lond.)* 215, 1027.
16. BOSMANN, B.B. (1971). Platelet adhesiveness and aggregation: the collagen: glycosyl, polypeptide: N-acetylgalactosaminyl and glycoprotein: galactosyl transferases of human platelets. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 43, 1118.
17. BOUNAMEAUX, Y. (1959). L'accolement des plaquettes aux fibres sous-endothéliales. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*. 153, 865.
18. BRANEMARK, P.I., EKHOLM, R. (1968). Adherence of blood cells to vascular endothelium. *Blut* 16, 274.
19. BRASHEAR, R.E., ROSS, J.C. (1969). Disappearance of adenosine diphosphate in vivo. *J. Lab. Clin. Med.* 73, 54.
20. BRINKHOUS, K.M., SHERMER, R.W. (Ed.) (1971). "The Platelet", Williams and Williams Co.
21. BUCKINGHAM, S., MAYNERT, E.W. (1964). The release of 5-hydroxytryptamine, potassium and aminoacids from platelets. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 143, 332.
22. BULL, B.S., ZUCKER, M.B. (1965). Changes in platelet volume produced by temperature, metabolic inhibitors and aggregating agents. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* 120, 296.
23. BURTON, K. (1969). in "Data for Biochemical Research" (2e uitgawe). Dawson R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. Jones K.M. (Red.) Oxford, Clarendon Press.
24. CAEN, J., SULTAN, Y., MICHEL, H. (1971). in "Round-the-Table Conference on Normal and Modified Platelet Aggregation" bls. 117. Vermylen, J. de Gaetano, G., Verstraete, M. (Red.) *Acta Medica Scandinavica*, suppl. 525.
25. CASTALDI, P.A., FIRKIN, B.C., BLACKWELL, P.M., CLIFFORD, K.I. (1962). An electron microscopic study of the changes in platelets during viscous metamorphosis. *Blood* 20, 566.
26. CHANDLER, A.B., HAND, R.A. (1961). Phagocytized platelets. A source of lipids in human thrombi and atherosclerotic plaques. *Science* 134, 946.

27. CLAYTON, S., BORN, G.V.R., CROSS, M.J. (1963). Inhibition of aggregation on blood platelets by nucleosides. *Nature (Lond.)* 200, 138.
28. COHEN, P., McCOMBS, H.L. (1968). Platelets and atherogenesis. 2. Amelioration of cholesterol atherosclerogenesis in rabbits with reduced platelet counts as the result of  $^{32}\text{P}$  administration. *J. atheroscler. Res.* 8, 389.
29. CONSTANTINE, J.W. (1965). Platelet aggregation and inactivation and inhibition of adenosine diphosphate. *Amer. J. Physiol.* 209, 409.
30. DAHME, E.G. (1965). Atherosclerosis and arteriosclerosis in domestic animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 127, 657.
31. DAVEY, M.G., LÜSCHER, E.F. (1967). Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets. *Nature (Lond.)* 216, 857.
32. DES PREZ, B.M., HOROWITZ, H.J., HOOK, E.W. (1961). Effects of bacterial endotoxins on rabbit platelets. *J. exp. Med.* 114, 857.
33. DOCUMENTA GEIGY: "SCIENTIFIC TABLES" (1962). Bls. 314. Konrad Dien (Red.). J.R. Geigy S.A., Basle, Switzerland.
34. DOERY, J.G., HIRSH, J. (1970). Ongepubliceerde waarnemings aangehaal in "Progress in Haematology Vol. VII". Bls. 204. Brown, E.B., Moore, C.V. (Red.). Heinemann Medical Books (1971).
35. DOERY, J.C.G., HIRSH, J., DE GRUCHY, G.C. (1970). Platelet metabolism and function. *Haematologica* 4, 405.
36. DUGUID, J.B. (1948). Thrombosis as a factor in the pathogenesis of aortic atherosclerosis. *J. Path. Bact.* 60, 57.
37. EBERTH, J.C., SCHIMMELBUSCH, C. (1886). Experimentelle Untersuchungen über Thrombose. *Arch. path. Anat. u. Physiol.* 103, 39. (Kwoteer deur Robb-Smith 1967).
38. EFRON, M. (1960). in "Chromatographic and Electrophoretic Techniques", Vol. I, bls. 158. Smith, I. (Red.). W. Heinemann Ltd. (Lond.)
39. GAARDNER, A., JONSEN, J., LALAND, S., HELLEM, A., OWREN, P.A. (1961). Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature (Lond.)* 192, 531.

40. GANGULY, P. (1969). Studies on human platelet proteins. II Effect of thrombin. *Blood* 33, 590.
41. GANGULY, P. (1971). Human platelet proteins. Series *Haematologica* 4, 135.
42. GEER, J.C., MCGILL, H.C., STRONG, J.P. (1961). The fine structure of human atherosclerotic lesions. *Amer. J. Path.* 38, 263.
43. GRETTE, K. (1962). Studies on the mechanism of thrombin-catalyzed hemostatic reactions in blood platelets. *Acta physiol. scand. suppl.* 195.
44. GUNNING, A.J., PICKERING, G.W., ROBB-SMITH, A.H.T., RUSSEL, R.R. (1964). Mural thrombosis of the internal carotid artery and subsequent embolism. *Quart. J. Med.* 33, 155.
45. HAM, A.W. (1969). *Histology* (6e uitgawe) bls. 589, 592. Lipincott.
46. HARDISTY, R.M., HUTTON, R.A. (1967). Bleeding tendency associated with "new" abnormality of platelet behaviour. *Lancet* 1, 983.
47. HARRISON, M.J.G., EMMANS, P.R., MITCHELL, J.R.A. (1966). The effect of white cells on platelet aggregation. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 16, 105.
48. HASLAM, R.J. (1964). Role of adenosine diphosphate in the aggregation of human blood platelets by thrombin and by fatty acids. *Nature (Lond.)*, 202, 765.
49. HASLAM, R.J. (1967) in "Physiology of Hemostasis and Thrombosis", bls. 88. Johnson S.A., Seegers, W.H. (Red.). Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
50. HELLEM, A.J. (1958). Demonstration of a substance in the red cells affecting the adhesiveness of blood platelets. *Proc VII Congr. int. Soc. Haemat.*, Rome.
51. HELLEM, A.J. (1960). The adhesiveness of human blood platelets in vitro. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 12, suppl. 51.
52. HELLEM, A.J. (1968). Platelet adhesiveness. *Ser. Haemat.* 1, 99.
53. HELLEM, A.J., STORMORKEN, H. (1969). Platelet Adhesion-aggregation Reaction and its Clinical Significance in "Recent advances in Blood Coagulation" Poller L. (Red.). Churchill, Oxford.

54. HIRSH, J., DOERY, J.C.G. (1971) in "Progress in Hematology", Vol. VII, bls. 185. Brown, E.B., Moore, C.V. (red.). Heinemann Medical Books, London.
55. HÖGERSTEDT, A., NEMSER, M. (1897). Über die kränkliche Verengerung und Verschlussung vom Aortenbogen ausgehender grosser Arterien. Zeitschr. klin. Med. 31, 130.
56. HOLIDAY, E.R., JOHNSON, E.A. (1949). Location of chromatogram spots of purine and pyrimidine derivatives in ultraviolet light. Nature (Lond.) 163, 216.
57. HOLMSEN, H. (1965). Collagen-induced release of adenosine diphosphate from blood platelets incubated with radioactive phosphate in vitro. Scand. J. clin. Lab. Invest. 17, 239.
58. HOLMSEN, H. (1967) in "Biochemistry of Blood Platelets", bls. 81. Kowalski, E., Niewiarowski, S. (Red.) Academic Press, N.Y.
59. HOLMSEN, H., DAY, H.J. (1971). Adenine nucleotides and platelet function. Ser. Haemat. 1, 28.
60. HOLMSEN, H., DAY, H.J., STORM, E. (1969). Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. VI Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction. Biochim. biophys. Acta. (Amst.) 186, 254.
61. HOLMSEN, H., DAY, H.J., STORMORKEN, H. (1969). The blood platelet release reaction. Scand. J. of Haemat. suppl. 8.
62. HOLMSEN, H., ROZENBERG, M.C. (1968). Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. I Adenosine kinase and nucleotide formation from exogenous adenosine and AMP. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 155, 326.
63. HOLMSEN, H., STORMORKEN, H. (1965). Kinetic studies on the breakdown of adenosine diphosphate in human plasma. Scand. J. Lab. clin. Med. 17, (Suppl. 84), 138.
64. HONOUR, A.J., MITCHELL, J.R.A. (1964). Platelet clumping in injured vessels. Brit. J. Exp. Path. 45, 75.
65. HOVIG, T. (1962). The ultrastructure of rabbit blood platelet aggregates. Thrombos. Diathes. haemorrh. 8, 455.
66. HOVIG, T. (1963 a). Release of a platelet-aggregating substance (ADP) from rabbit blood platelets by saline "extract" of tendons. Thrombos. Diathes. haemorrh. 9, 264.

67. HOVIG, T. (1963 b). Aggregation of rabbit blood platelets produced in vitro by saline "extract" of tendons. *Thromb. Diath. haemorrh.* 9, 248.
68. HOVIG, T. (1964). The effect of calcium and magnesium on rabbit blood platelet aggregation in vitro. *Thromb. Diath. haemorrh.* 12, 179.
69. HUGUES, J. (1960). Accolement des plaquettes aux collagené. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*. 154, 866.
70. HUGUES, J. (1971). Some evidence that ADP is not the only agent responsible for collagen-induced aggregation. *Acta Medica Scand. Suppl.* 525, bls. 141.
71. HURLBERT, P.R. (1957) in "Methods in Enzymology, vol 3" bls. 785. Colowick S.P., Kaplan, N.O. (Red.). Academic Press, N.Y.
72. IRELAND, D.M. (1967). Effect of thrombin on radio-active nucleotides of human washed platelets. *Biochem. J.* 105, 857.
73. IRELAND, D.M., MILLS, D.C.B. (1964). Degradation of adenosine diphosphate in plasma. *Biochem. J.* 92, 30 P.
74. IRELAND, D.M., MILLS, D.C.B. (1966). Detection and determination of adenosine diphosphate and related substances in plasma. *Biochem. J.* 99, 283.
75. ISHIZAKA, T., ISHIZAKA, K. (1962). Biological activities of aggregated gamma-globulin. *J. Immunol.* 89, 709.
76. JAMESON, G.A., URBAN, C., BARBER, A.J. (1971). An enzymatic basis for platelet: collagen adhesion. *The Intern. Soc. on Thrombosis and Haemostasis, II Congress, OSLO*, Abst. bls. 220.
77. JERUSHALMY, Z., ADLER, A., RECHIC, J., KOLM, A., DE VRIES, A. (1962). Effect of myxoviruses on the clotting and clot-retracting activities of human blood platelets in vitro. *Path. Biol.* 10, 41.
78. JOHNSON, S.A. (Red.) (1971 a). "The Circulating Platelet". Academic Press, N.Y., London.
79. JOHNSON, S.A. (1971 b) in "The Circulating Platelet" bls. 358. Johnson S.A. (Red.). Academic Press, N.Y., London.
80. JOHNSON, S.A., VAN HORN, D.L., PEDERSON, H.J., MARR, J. (1966). The function of platelets: a review. *Transfusion (Philadelphia)* 6, 3.

81. JONES, T.W. (1851). *Guy's Hosp. Rep* (2) 7, 1 gekwoteer deur Robb-Smith (1967).
82. JØRGENSEN, S. (1956). Breakdown of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides in human plasma. *Acta Pharmacol* 12, 294.
83. JØRGENSEN, L., HAEREM, J., CHANDLER, A.B., BORCHGREVINK, C.F. (1968). The pathology of acute coronary death. *Acta Anaesthes. Scand. Suppl.* 29, 193.
84. JØRGENSEN, L., ROWSELL, H.C., HOVIG, T., GLYNN, M.I., MUSTARD, J.F. (1967). ADP induced platelet aggregation and myocardial infarction in swine. *Lab. Invest.* 17, 616.
85. JØRGENSEN, L., ROWSELL, H.C., HOVIG, T., MUSTARD, J.F. (1967). Resolution and organization of platelet-rich mural thrombi in carotid arteries of swine. *Amer. J. Path.* 51, 681.
86. JØRGENSEN, L., HOVIG, T., ROWSELL, H.C., MUSTARD, J.F. (1970). ADP induced platelet aggregation and vascular injury in swine and rabbits. *Amer. J. Path.* 61, 161.
87. KÄSER-GLANZMANN, R., LÜSCHER, E.F. (1962). The mechanism of platelet aggregation in relation to hemostasis. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 7, 480.
88. KIESSELBACH, T.H., WAGNER, R.H. (1966). Fibrin-stabilizing factor: a thrombin-labile platelet protein. *Amer. J. of Physiol.* 211, 1472.
89. KNIKER, W.T., COCHRANE, C.G. (1968). The localization of circulating immune complexes in experimental serum sickness. The role of vasoactive amines and hydrodynamic forces. *J. Exptl. Med.* 127, 119.
90. KOWALSKI, E., NIEWIAROWSKI, S. (Red.) (1967). "Biochemistry of Blood Platelets". Academic Press, N.Y., London.
91. LEGRAND, Y., HUC, A. (1971) in "Platelet aggregation", bls. 71. Caen, J. (Red.). Masson et cie, Parys.
92. LEGRAND, Y., PIGNAUD, G. (1971). Some factors influencing the aggregating property of collagen. *Acta Medica Scand. Suppl.* 525, 127
93. LOPACIUK, L., SOLUM, N.O. (1969). Bovine platelet proteins. 1. Soluble proteins studies by immuno electrophoresis and polyacrylamide discelectrophoresis. *Thromb. Diath. haemorrh.* 21, 409.

94. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
95. LÜSCHER, E.F. (1967). Platelets in haemostasis and thrombosis. *Brit. J. Haemat.* 13, 1.
96. MACMILLAN, D.C. (1966). Secondary clumping effect in human citrated platelet-rich plasma produced by adenosine diphosphate and adrenaline. *Nature (Lond.)* 211, 140.
97. MACMILLAN, D.C., OLIVER, M.F. (1965). The initial changes in platelet morphology following the addition of adenosine diphosphate. *J. Atheroscler. Res.* 5, 440.
98. MARCUS, A.J. (1969). Platelet function. *N.E. J. of Med.* 280, 1213, 1278, 1330.
99. MARCUS, A.J., ZUCKER, M.B. (1969). "The Physiology of Blood Platelets". Grune and Stratton, N.Y.
100. MARKHAM, R. (1957) *in* "Methods in Enzymology", Vol. III, bls. 743. Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Ed.) Academic Press, N.Y.
101. MARKWARDT, F., BARTHEL, W., GLUSA, E., HOFFMAN, A. (1967). Untersuchungen über den Einfluss von Papaverin auf Reaktionen der Blutplättchen. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* 257, 420.
102. MARKWARDT, F., BARTHEL, W., HOFFMAN, A., WITTEWERT, E. (1965). Untersuchungen über den Mechanismus der aminfreisetzenden Wirkung von proteolytischen Fermenten an Blutplättchen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* 251, 255.
103. MILLS, D.C.B. (1966). The breakdown of adenosine diphosphate and of adenosine triphosphate in plasma. *Biochem. J.* 98, 32 P.
104. MILLS, D.C.B. (1972). Drugs that affect platelet behaviour. *Clin. in Haemat.* 1, 295.
105. MILLS, D.C.B., ROBB, I.A., ROBERTS, G.C.K. (1968). The release of nucleotides, 5-hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation. *J. Physiol. (Lond.)*. 195, 715.
106. MILLS, D.C.B., SMITH, J.B. (1971). The influence on platelet aggregation of drugs that affect the accumulation of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in platelets. *Biochem. J.* 121, 185.

107. MITCHELL, J.R.A., SHARP, A.A. (1964). Platelet clumping in vitro. *Brit. J. Haemat.* 10, 78.
108. MOORE, S. (1964). The relation of superficial cortical scars of the kidney to aortic atherosclerosis; a hypothesis of renal ischaemia. *J. Path. Bact.* 88, 471.
109. MOORE, S., MERSEREAU, W.A. (1965). Platelet embolism and renal ischaemia. *J. Path. Bact.* 90, 579.
110. MORE, R.H., HAUST, M.D. (1961) in "Anticoagulants and Fibrinolysis", bls. 143. MacMillan, R.L., Mustard, J.F. (Red.). Lea and Febiger, Philad.
111. MUSTARD, J.F. (1968). Hemostasis and Thrombosis. *Semin. Hemat.* 5, 91.
112. MUSTARD, J.F., HEGARDT, B., ROWSELL, H.C., MACMILLAN, R.L. (1964). Effect of adenine nucleotides on platelet aggregation and clotting time. *J. Lab. Clin. Med.* 64, 548.
113. MUSTARD, J.F., PACKHAM, M.A. (1969). Platelet function and myocardial infarction. *Circulation* 39-40, suppl. 4, 20.
114. MUSTARD, J.F., PACKHAM, M.A. (1970 a). Thrombo-embolism, a manifestation of the response of blood to injury. *Circulation* 42, 1.
115. MUSTARD, J.F., PACKHAM, M.A. (1970 b). Factors influencing platelet function, adhesion, release and aggregation. *Pharm. Rev.* 22, 97.
116. MUSTARD, J.F., ROWSELL, H.C., MURPHY, E.A., DOWNIE, H.G. (1963) in "Evolution of the Atherosclerotic Plaque" bls. 183. Jones R.J. (Red.). Univ. Chicago Press.
117. NACHMAN, R.L. MARCUS, A.J., SAFIER, L.B. (1967). Platelet thrombasthenin: subcellular localization and function. *J. Clin. Invest.* 46, 1380.
118. O'BRIEN, J.R. (1962). Platelet aggregation II. Some results from a new method of study. *J. Clin. Path.* 15, 452.
119. O'BRIEN, J.R. (1963). Some effects of adrenaline and anti-adrenaline compounds on platelets in vitro and in vivo. *Nature (Lond.)* 200, 763.
120. O'BRIEN, J.R. (1964). A comparison of platelet aggregation produced by seven compounds and a comparison of their inhibitors. *J. Clin. Path.* 17, 275.

121. O'Brien, J.R., HEYWOOD, J.B. (1966). Effect of aggregating agents and their inhibitors on the mean platelet shape. *J. Clin. Path.* 19, 148.
122. PACKHAM, M.A., ARDLIE, N.G., MUSTARD, J.F. (1969). Effect of adenine compounds on platelet aggregation. *Amer. J. Physiol.* 217, 1009.
123. PACKHAM, M.A., GUCCIONE, M.A., PERRY, D.W., KINLOUGH-RATHBONE, R.L., MUSTARD, J.F. (1972). AMP inhibition of reactions of ADP with washed platelets from humans and rabbits. *Amer. J. Physiol.* 223, 419.
124. PACKHAM, M.A., MUSTARD, J.F. (1971). Platelet reactions. *Semin. in Haematol.* 8, 30.
125. PACKHAM, M.A., ROWSELL H.C., JORGENSEN, L., MUSTARD, J.F. (1967). Localized protein accumulation in the wall of the aorta. *Exptl. Molec. Path.* 7, 214.
126. PACKHAM, M.A., STILL, J., SENYI, A., MUSTARD, J.F. (1967). Fate of  $C^{14}$ -ADP during platelet aggregation. *Fed. Proc.* 26, 760.
127. PARMEGGIANNI, A. (1961). Elektronenoptische Beobachtungen an Menschliche Blutplättchen während der viskösen Metamorphose. *Thrombos. Diathes. haemorr.* 6, 517.
128. POOLE, J.C.F., FRENCH, J.E. (1961). Thrombosis. *J. Atheroscler. Res.* 1, 251.
129. RANDERATH, K., STRUCK, H. (1961). Dünnschichtchromatographische Trennung von nuclein Säure-derivaten von Celluloseschichten. *J. Chromatography.* 6, 365.
130. RASMUSSEN, H. (1970). Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 170, 404.
131. REBUCK, J.W. (1971) *in* "The Circulating Platelet" bls. 1. Johnson S.A. (Red.). Academic Press, N.Y.
132. ROBB-SMITH, A.H.T. (1967). Why the platelets were discovered. *Brit. J. Haematol.* 13, 618.
133. RODMAN, N.F., MASON, R.G., McDEVITT, N.B., BRINKHOUS, K.M. (1962). Morphological alterations of human blood platelets during early phases of clotting. Electron microscopic observations of thin sections. *Amer. J. Path.* 40, 271.

134. ROZENBERG, M.C., HOLMSEN, H. (1968). Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. II Uptake of adenosine and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. *Biochem. biophys. Acta (Amst.)* 155, 342.
135. ROZENBERG, M.C., HOLMSEN, H. (1968). Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. IV Platelet aggregation response to exogenous ATP and ADP. *Biochem. biophys. Acta (Amst.)* 157, 280.
136. SALZMANN, E.W., CHAMBERS, D.A., NERI, L.L. (1966). Possible mechanism of aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. *Nature (Lond.)* 210, 167.
137. SALZMANN, E.W., RUBINO, E.B., SIMS, R.V. (1970). Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in human blood platelets. *Ser. Haemat.* 4, 100.
138. SINAKOS, Z., CAEN, J.P. (1967). Platelet aggregation in mammals (human, rat, rabbit, guinea pig, horse, dog). A comparative study. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 17, 99.
139. SKOZA, L., ZUCKER, M.B., JERUSHALMY, Z., GRANT, R. (1967). Kinetic studies of platelet aggregation induced by ADP and its inhibition by chelating agents, guanido compounds and adenosine. *Thrombos Diathes. haemorrh.* 18, 713.
140. SPAET, T.H., CINTRON, J. (1963). Induction of adenosine diphosphate release from human platelets by connective tissue fragments. *Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl.* 13, 335.
141. SPAET T.H., ZUCKER, M.B. (1964). Mechanism of platelet plug formation and role of adenosine diphosphate. *Amer. J. Physiol.* 206, 1267.
142. SPEIDEL, E., LAZAROW, A. (1963). Chemical composition of glomerular basement membrane material in diabetes. *Diabetes* 12, 355.
143. STUART, R.K., THOMAS, D.P. (1967). Comparative effects of ADP and thrombin in producing stasis thrombosis. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 18, 537.
144. SULTAN, Y., DELOBEL, J., CAEN, J.P. (1969). *Actual Hémat.* 3e série bls. 95. Masson et Cie. Paris.
145. SWANK, R.L., FELLMAN, J.H., HISSSEN, W.W. (1963). Aggregation of blood cells by 5-hydroxytryptamine (serotonin).

146. THOMAS, D.P. (1967). Effects of catecholamines on platelet aggregation caused by thrombin. *Nature (Lond.)* 215, 298.
147. THOMAS, D.P. (1968). The role of platelet catecholamines in the aggregation of platelets by collagen and thrombin. *Exp. Biol. Med.* 3, 129.
148. TURPIE, A.G.G., McNICOL, G.P., DOUGLAS, A.S. (1971). Platelets: haemostasis and thrombosis in "Recent Advances in Haematology" bls. 249. Churchill Livingstone, Edin. en London.
149. VARLEY, H. (1967). "Practical Clinical Biochemistry" (4e uitgawe) bls. 760. William Heinemann Medical Books, London.
150. VERMYLEN, J. (1972). Hypercoagulability: myth or reality? *Abst. Int. Soc. for Haemat; Sao Paulo.*
151. VERMYLEN, J., DE GAETANO, G., VERSTRAETE, M. (Red.) (1971). Round-the-table conference on normal and modified platelet aggregation. *Acta Medica Scand.*, suppl. 525.
152. VON ROKITANSKY, C. (1844). *Handbuch der Pathologischen Anatomie Vol. II.* Vienna: Braunmüller u. Seidel. (Aangehaal deur Duguid 1948).
153. VON ROKITANSKY, C. (1852). Über einiger der wichtigsten Krankheiten der Arterien. Vienna: Meidinger. (Aangehaal deur Duguid 1948).
154. WALSH, P.N. (1972). Albumin density gradient separation and washing of platelets and the study of platelet coagulant activities. *B.J. Haematol.* 22, 205.
155. WESSLER, S. (1962). Thrombosis in the presence of vascular stasis. *Amer. J. Med.* 33, 648.
156. WESSLER, S. (1963). Stasis hypercoagulability and thrombosis. *Fed. Proc.* 22, 1366.
157. WESSLER, S., REINER, L., FREIMAN, D.G., REINER, S.M., LERTZMAN, M. (1959). Serum-induced thrombosis. Studies of its induction and evolution under controlled conditions. *Circulation* 20, 864.
158. WHITE, J.G. (1968). Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate. *Blood* 31, 604.
159. WILNER, G.D., NOSSEL, H.L. LE ROY, E.C. (1968). The aggregation of platelets by collagen. *J. Clin. Invest.* 47, 2616.

160. WOJCIK, J.D., VAN HORN, D.L., WEBBER, A.J., JOHNSON, S.A. (1969). Mechanism whereby platelets support the endothelium. *Transfusion (Philadelphia)* 9, 324.
161. WOOLF, N., CARSTANS, K.C. (1967). Infiltration and thrombosis in atherosclerosis. A study using immunofluorescent techniques. *Amer. J. Path.* 51, 373.
162. ZUCKER, M.B. (1947). Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal, thrombocytopenic, heparinized and hypoprothrombinemic rats. *Amer. J. Physiol.* 148, 275.
163. ZUCKER, M.B., BORELLI, J. (1962). Platelet clumping produced by connective tissue suspensions and by collagen. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 109, 779.

