

**BIOCHEMIESE VERANDERINGE IN DIE
HARTSPIERWEEFSEL VAN SKAPE MET
GOUSIEKTE ONDER LEDE**

deur

Leendert Dekker Snyman

*Proefskrif voorgelê ter voldoening aan die vereistes vir die graad Doctor Scien-
tiae (Biochemie) aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër
Onderwys.*

PROMOTOR: DR. C. J. REINECKE

Potchefstroom

Januarie 1978

678/1669

Aan my vrou, kinders en familie.

INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK 1

Inleiding	1
------------------	---

HOOFSTUK 2

Literatuuroorsig	7
2.1 Inleiding	9
2.2 Tipering van gousiekte	9
2.2.1 Etiologie	9
2.2.2 Patologie	11
2.2.3 Histologie	12
2.2.4 Fisiologie	14
2.2.5 Gevolgtrekking	15
2.3 Miokardiale energiemetabolisme en hartdefekte	16
2.3.1 Energieproduksiesisteem	16
2.3.1.1 Aerobiese energieproduksie	17
2.3.1.2 Anaerobiese energieproduksie	21
2.3.2 Energiebenuttingsisteem..	24
2.3.2.1 Kontraktiele-proteïen-ATPase	25
2.3.2.2 Kontraktiele-proteïensisteem en hartversaking	29
2.4 Werkshiptese	31

HOOFSTUK 3

Eksperimentele opwekking van gousiekte... ..	35
3.1 Inleiding	37
3.2 Proefdiere	37
3.3 Plantmateriaal	38

3.4	Metode van dosering	39
3.5	Diagnose van gousiekte	39
3.6	Monsterneming..	40
3.7	Eksperimentele uiteensetting	41

HOOFSTUK 4

	<i>Post-mortem</i> -beeld van eksperimentele gousiekte	45
4.1	Kongestiewe hartversaking..	47
4.2	Edeem van die hartspierweefsel	47
4.3	Hipertrofie	48
4.4	Gevolgtrekking	49

HOOFSTUK 5

	Die status en produksie van energie in die hart= spierweefsel van gousiektediere	51
5.1	Algemene inleiding	53
5.2	Energiereserwes (ATP en KrP)	53
5.2.1	Inleiding..	53
5.2.2	Metodes	54
5.2.3	Resultate	57
5.2.4	Bespreking	60
5.3.	Anaerobiese energiemetabolisme	62
5.3.1	Inleiding	62
5.3.2	Metodes	62
5.3.3	Resultate	65
5.3.4	Bespreking	66
5.4	Aerobiese energiemetabolisme	67
5.4.1	Inleiding	67
5.4.2	Metodes	68

5.4.3	Resultate	71
5.4.4	Bespreking	71
5.5	Samevattende bespreking	73

HOOFSTUK 6

	Aktiwiteit van die miokardiale kontraktiele- proteïen-sisteem as 'n energie-benuttings- sisteem	75
6.1	Algemene inleiding	77
6.2	Superpresipitasie	77
6.2.1	Inleiding	77
6.2.2	Metode... ..	79
6.2.3	Resultate	82
6.2.4	Bespreking	86
6.3	Adenosientrifosfatase-aktiwiteit	87
6.3.1	Inleiding	87
6.3.2	Metode	88
6.3.3	Resultate	89
6.3.3.1	Die invloed van ATP	89
6.3.3.2	Die invloed van Mg^{2+}	91
6.3.3.3	Die invloed van Ca^{2+}	93
6.3.4	Bespreking	94
6.4	Ca^{2+} -sensitiwiteit ten opsigte van isometrie- se spanningsontwikkeling	96
6.4.1	Inleiding	96
6.4.2	Metode	98
6.4.3	Resultate	100
6.4.4	Bespreking	101
6.5.	Samevattende Bespreking	103

HOOFSTUK 7

	Bespreking	105
7.1	Inleiding	107
7.2	Energiestatus	107
7.3	Energietransformering	108
7.3.1	Produksie van energie	108
7.3.2	Benutting van energie	111
7.3.3	Samevattend	114
7.4	Moontlike invloed van <i>in vivo</i> -faktore op die energiestatus van die hart	115
7.4.1	Akkumulering van intrasellulêre metaboliete	115
7.4.1.1	Melksuur	116
7.4.1.2	Lang-ketting-vetsure en die Asiel-KoA-derivate daarvan	117
7.4.1.3	Kalsium	118
7.4.2	Meganiese distorsie	119
7.4.3	Kompensasie meganismes	120
7.5	Doodsoorsaak tydens gousiekte	121

HOOFSTUK 8

	Slotopmerkings: Enkele suggesties vir verdere biochemiese navorsing op gousiekte	125
8.1	Biochemiese patogenese van die versaking ...	128
8.2	Primêre veranderinge	132
8.3	Isolering van die toksien	135

HOOFSTUK 9

	Opsomming	141
	Summary	143
	Literatuurverwysings	147
	Bedankings	163

HOOFSTUK 1

Inleiding

P2

Gousiekte is 'n kongestiewe kardiomiopatie wat by herkouers na die inname van 'n plant wat algemeen bekend staan as gousiektebossie, voorkom. Hierdie plant word in vyf verskillende spesies aangetref en kom sover bekend slegs in Suidelike Afrika voor. Die siekte is daarom 'n eg suid-Afrikaanse probleem en veroorsaak jaarliks vrektes van groot getalle beeste en skaap. Hierdie verskynsel is vir die landboubedryf van groot ekonomiese belang en word as sodanig as een van die belangrikste, indien nie dié belangrikste nie, plantvergiftiging in Suid-Afrika, bestempel (Hurter et al., 1972).

Gousiekte is vir die eerste keer deur Theiler en medewerkers (Theiler et al., 1923) beskryf. Die naam gousiekte is ontleen aan die feit dat die diere op die oog af geen opvallende vooraf-simptome vertoon nie, en dan, gewoonlik na 'n skielike inspanning, onverwags neerslaan en aan hartversaking beswyk. Die volgende aanhaling (Theiler, 1971) is tiperend hiervan en gee 'n treffende beskrywing van die eerste kennismakings met gousiekte deur Sir Arnold Theiler en sy medewerker:

I should like to recount some details ... of the gousiekte investigations ... which I believe are little known. In briefing me, Sir Arnold explained that farmers in certain highveld grassland areas of the Transvaal, particularly Kaalfontein near Kempton Park had complained that sheep and cattle, after being introduced to the grazing in early summer for just over a month had suddenly dropped dead ... A plant cause seemed to be indicated. I was required to go and report upon the veld and bring material of any known poisonous plants for testing. The areas were examined far and wide, the species being listed; but no known poisonous ones could be found.

However, shortly after that, a farmer, who had reported deaths on particular pasturage in early summer, again telephoned one afternoon that he had had deaths. Sir Arnold immediately arranged that I should take him to meet the farmer on the spot the next morning at 9 a.m. We arrived at 8.45 by my Indian motor cycle and side car. As we approached,

we could see a large number of sheep at rest ... Sir Arnold cautioned me to go at snail's pace and we stopped about 200 yards from the animals and watched them silently.

At 9 a.m. we espied the farmer approaching across the veld, with his herdsman and a dog. As soon as these arrived within 100 yards of the sheep the huge dog rushed forward barking loudly and aggressively. The sheep jumped up in alarm and commenced to scatter. Then we witnessed a tragic thing: a large number just dropped dead. Over 200 were found! Well, instead of examining the grassland, we were engaged in post mortems until past midday - the hearts, chiefly, were taken to Onderstepoort. Before leaving, Sir Arnold obtained the farmer's permission to conduct experiments on his veld.

At Onderstepoort that afternoon, whilst Sir Arnold was demonstrating to me the full, regular post mortems on several of the sheep ... sections of the hearts ... were flashed on to screens in the post mortem hall alongside similar sections of normal hearts. Sir Arnold then explained how the ventricular muscle had been progressively changed by the plant toxin, causing the development of a fibrotic myocarditis. Thus the fierce barking of the dog would cause fright and sudden strain on the sheep's heart in jumping up and running, that syncope would result.

Navorsing tot en met die jare sestig is hoofsaaklik aan identifisering van die toksiese materiaal, post mortem en histologiese ondersoeke gewy. Hierna het ook werk gevolg oor die simptomatologiese en hemodinamiese veranderinge tydens die verloop van die siektetoestand. Afgesien van enkele ondersoeke oor die funksie van die hartmikrosome (Pretorius et al., 1973; Van der Walt, 1972) is tot op hede nog geen subsellulêre biochemiese georiënteerde ondersoeke onderneem nie. So 'n ondersoek is nie slegs van belang vir die opklaring van die probleem nie, maar kan ook 'n belangrike bydrae lewer om die meganisme van hartversaking in die algemeen te karakteriseer. Verder mag dit ook 'n bydrae lewer deur sekere biochemiese karakteristieke betreffende die meganisme van hartwerking te manifesteer en aan die lig te bring.

Vanweë indirekte aanduidings van 'n versteurde energiemetabolisme tydens gousiekte (Pretorius et al., 1973) en die belangrike plek wat dit mag inneem ten opsigte van die meganisme van hartversaking, is die bestudering van die biochemiese veranderinge tydens gousiekte op die energiemetabolisme toege=spits. Twee aspekte hiervan is ondersoek, naamlik die produk= sie en verbruik daarvan in die hartspierseel.

P6

HOOFSTUK 2

Literatuuroorsig

2.1 Inleiding

Literatuur in verband met gousiekte handel in hoofsaak oor die opwekking van gousiekte deur middel van die verskillende gousiekteplante, *post mortem*-ondersoeke, anatomiese en histopatologiese ondersoeke van gousiektehart, en die bestudering van die vooraf simptome en sekere kardiodynamiese funksies tydens gousiekte.

'n Oorsig oor hierdie aspekte is vooraf noodsaaklik as oriëntasie om te kan kom tot die hoofdoel van hierdie ondersoek, naamlik; *Biochemiese veranderinge in die hartspierweefsel van skape met gousiekte onder lede.*

2.2 Tipering van gousiekte

2.2.1 Etiologie

Gousiekte is vir die eerste keer deur Theiler, Du Toit en Mitchell (1923) beskryf na bevestiging dat *Pachystigma pygmaeum* (Schltr.) Robyns (figuur 2.1) die siekte veroorsaak.

Dit was as enigste oorsaak van gousiekte beskou totdat in 1954 vasgestel is dat ook *Pavetta harbori* S. Moore sodanige effekte tot gevolg het (Uys & Adelaar, 1957). Die vasstelling van *Pavetta schunariana* F. Hoffm. as gousiekte-veroorsakende plant het kort hierna gevolg (Naude & Adelaar, 1962) en later ook *Pachystigma thammus* Robyns deur Adelaar en Terblanche in 1967 en *Padogia monticola* Robyns deur Hurter et al., 1972. Al vyf hierdie plante behoort tot die familie *Rubiaceae* en kom sover bekend slegs in suidelike Afrika voor. Die ver-



*
 Figuur 2.1 *Pachystigma pygmaeum* (Geplaas met goedkeuring van die Direkteur, Navorsingsinstituut vir Veeartsenykunde, Onderstepoort)



*
 Figuur 2.2 Verspreiding van die vyf gousiekte-veroorsakende plante van die familie *Rubiaceae* (met erkenning aan die Direkteur, Navorsingsinstituut vir Plantkunde, Pretoria)

spreading van die plante word aangedui in figuur 2.2.

Die effek van al vyf plante is basies dieselfde, naamlik hartversaking wat sover bekend, slegs by herkouers voorkom.

2.2.2 Patologie

Reeds in die pioniersdae van gousiekteavorsing is vasgestel dat gousiekte te wyte is aan hartversaking (Theiler et al., 1923). Nadoodse ondersoeke van gousiektegevalle toon duidelike tekens van kongestiewe hartversaking soos aangedui deur die voorkoms van kongestie en edeem van die longe, hidrotoraks, askites, hidroperikardium en dilatasie (figuur 2.3) van die hart (Theiler et al., 1923; Adelaar et al., 1966). Die hart is meestal baie vergroot en die wande abnormaal dun, en baie ferm,



Figuur 2.3 'n Tipiese voorbeeld van 'n gedilateerde hart van 'n skaap wat gousiekte onder lede gehad het (regs) in vergelyking met 'n normale skaaphart (links). (Geplaas met goedkeuring van die Direkteur, Navorsingsinstituut vir Veeartsenykunde, Onderstepoort)

met 'n ligte grys tot lig-pienk voorkoms (Theiler et al., 1923). Geen tekens van ventrikulêre hipertrofie is tydens nadoodse ondersoeke waargeneem nie (Pretorius & Terblanche, 1967).

2.2.3 Histologie

'n Karakteristieke fokale chroniese miokarditis met vervanging van die hartspierselle deur bindweefsel kom voor in gousiekte-harte (Theiler et al., 1923; Smit, 1959). Hierdie letsels is veral in die apeks waarneembaar. In vroeë gevalle van gousiekte is dit meestal beperk tot die apeks, terwyl dit in meer uitgesproke gevalle ook in die linkerventrikelwand en die septum voorkom en in uitgesproke gevalle ook uitbrei na die regterventrikelwand (Smit, 1959). Die verplasing van die spiervesels deur fibroblaste en kollagene vesels lei tot 'n verlies in elastisiteit en saamtrekbaarheid met dilatasie tot uiteinde-like gevolg (Smit, 1959).

Dit is eksperimenteel waargeneem (Pienaar, J.G., persoonlike mededeling) dat daar 'n verband tussen die dosis van gousiekte-plantmateriaal-toediening en die letsels blyk te wees. Uitgesproke letsels kom voor by toediening van hoë dosisse plantmateriaal. Veral by laasgenoemde gevalle word erg gedilateerde harte gepaard met vogaansameling in die liggaamsholtes en in die longe gesien. Onder natuurlike omstandighede (Pienaar, J. G., persoonlike mededeling) egter, word dilatasie van die hart met die vogaansamelings minder dikwels gesien en is die algemene beeld dikwels 'n heeltemal negatiewe nadoodse ondersoek of 'n beeld met geringe vogaansameling in die longe en liggaamsholtes, sonder opvallende hartverwyding.

Daar is verder ook verwys na 'n hialien nekrose van die spier=vesels met 'n gegaardgaande verlies van dwarsstreping tydens die akute stadium van die letsels (McKinney, 1974). Voorlopige elektronmikroskopiese gegewens van die letsels dui op 'n geleidelike dissolusie van die miofilamente. (Dit blyk dat die miosienfilamente lank voor die aktienfilamente wegraak) (Pienaar, J.G., persoonlike mededeling). Saam met hierdie oënskynlike gousiektekarakteristieke veranderinge van die kontraktiele elemente in die letselgedeeltes, is dit belangrik om ook nog rekening te hou met 'n versteuring van die kontraktiele-proteïen-organisasie as 'n resultaat van kongestiewe hartversaking. Die biochemiese veranderinge wat dit tot gevolg mag hê, word deur die volgende aanhaling (Opie, 1969) gesuggereer. *A basic finding that has not been fully appreciated is the distortion and destruction of the sarcomere structure by undue stretching in congestive failure (Sonnenblick et al., 1964). Extreme degrees of stretch must lead to spatial distortion with poor interaction between actin and myosin at the cross-bridges. The consequences could well include decreased ATPase activity (Chandler et al., 1967; Alpert & Gordon, 1962) decreased contractility of isolated myofibrils (Kako & Bing, 1958), decreased usage of high energy phosphates, and heart failure with a normal or near-normal level of high energy phosphates (Pool et al., 1967). Another possible result of mechanical distortion is the early occurrence of mitochondrial damage, which would explain decreased rates of oxidative phosphorylation and a shift from aerobic to anaerobic metabolism in terminal heart failure (Nagano & Hochrein, 1963; Gudbjarnason et., 1964).*

2.2.4 Fisiologie

Pretorius en Terblanche (1967) gee die mees omvattende ondersoek van eksperimentele gousiekte. 'n Duidelike beeld van die gemiddelde aanvang, verloop en opeenvolging van die verskillende simptome word gebied, soos in tabel 2.1 saamgevat, en opgestel deur hierdie outeurs.

Tabel 2.1

<u>Dae voor dood</u>	<u>%</u>	<u>Simptoom</u>
1,5	24	dispnoea
6	86	tagikardie
7	48	galloppritme
10	72	hiperpnoea
	67	splitsing, eerste hartgeluid
11	66	sistoliese geruis
	56	aritmie
27	45	dowwe eerste hartgeluid

Dit blyk dat daar nie 'n vasgestelde patroon ten opsigte van die voorafsimptome vir individuele skaap neergelê kan word nie. Trouens, Pretorius en Terblanche (1967) het bevind dat in 10% van die gevalle, die skaap aan gousiekte gevrek het selfs sonder enige vooraf simptome.

Dit is verder van betekenis dat die outeurs rapporteer dat in 4% van die gevalle waar ernstige simptome van gousiekte reeds aanwesig was, herstel van die proefdier plaasgevind het. Dit kan moontlik dui op 'n baie beperkte, maar tog moontlike, om-

keerbare inhibisie van die meganismes wat hartversaking tot gevolg het.

'n Bestudering van die hartfrekwensie met behulp van ballistokardiografiese en bloedvloeiemetodes (Pretorius et al., 1973) dui op 'n vroeë afname in miokardiale kontraktiliteit vir gousiekteskaap. Die volgende belangrike suggestie is gemaak ten einde 'n moontlike verklaring te bied vir die afname in kontraktiliteit. *The ballistocardiographic changes during gousiekte indicated early derangement of the contractility of the heart. The slope of all segments of the BCG showed a marked decrease during gousiekte. This was assumed to be indicative of decreased contractility due to intoxication of the myocardial energy transformation mechanisms by the active principle in the plant material* (Pretorius et al., 1967). Dit kan geïnterpreteer word as 'n moontlike defek van die energieproduksie- en/of die energieverbruik (*energy utilization*)-sisteme van die hart.

2.2.5 Gevolgtrekking

Uit die literatuuroorsig blyk dit duidelik dat die bestudering van gousiekte (wat 'n kongestiewe tipe kardiomiopatie is), nog nie deurgevoer is tot op die vlak van die biochemiese patogeenese nie. Dit is 'n ernstige tekortkoming na ongeveer 70 jaar van gousiektenavorsing, aangesien daar nog nie tot die kern van die gousiekteprobleem deurgedring kan word sonder om hierdie terrein van die navorsing te betree nie. Die basiese probleemstelling wat in hierdie proefskrif na vore kom, is dus 'n eerste oriëntasie van biochemiese veranderinge in die hartspierweefsel van skape met gousiekte onder lede.

Die suggestie van Pretorius et al. (1967) van 'n versteuring op bioënergetiese vlak tydens gousiekte verdien beslis nadere ondersoek. Soveel te meer vanweë die feit dat dit sterk onderskraag word deur 'n moontlike verband tussen meganiese distorsie van die hartspier en 'n defektiewe oksidatiewe fosforilering (energieproduksie) en kontraktiele-proteïen-ATPase (energieverbruik) tydens kongestiewe hartversaking in die algemeen (Opie, 1969).

Dit is egter noodsaaklik om eers 'n oorsigtelike literatuuraftergrond ten opsigte van geselekteerde aspekte van energietransformering tydens verskillende patologiese toestande van die hart te verkry voordat tot 'n sinvolle hipotese oor biochemiese veranderinge in hartspierweefsel van proefdiere met gousiekte gekom kan word.

2.3 Miokardiale energiemetabolisme en hartdefekte

Die transformering van energie kan in breë trekke ingedeel word in die produksie en verbruik van energie, en sal dan ook onder hierdie indeling bespreek word.

2.3.1 Energieproduksiesisteem

Die hartspier is vir byna al sy energie wat benodig word vir die doeleindes van die kontraksieproces, aangewese op aerobiese (mitochondriale) energieproduksie (Opie, 1969a). Alhoewel die anaerobiese-funksionerende glikoliseproses 'n belangrike kompensatoriese meganisme is vir die daarstelling van ATP onder toestande van ontoereikende aerobiese energievoorsiening aan die hartspier, is die bydrae daarvan egter beperk. 'n Verhoogde aktiwiteit van die glikoliseproses het meestal 'n sty-

ging van die melksuur- (laktaat) inhoud van die weefsel tot gevolg, wat moontlik nadelige gevolge vir die kontraksieproses kan inhou (Katz & Hecht, 1969).

2.3.1.1 Aerobiese energieproduksie

Enige faktor wat 'n inhiberende invloed uitoefen op die aktiwiteit van die aerobiese energieproduserende sisteem sal na verwagting 'n onderdrukkende effek op die hartfunksie hê.

Benewens die inhiberende invloed van sekere chemiese stowwe soos dinitrofenol, arsenaat en oligomisien (Huijing & Slater, 1961) op die respiratoriese-ketting en oksidatiewe fosforilering is daar verskeie situasies *in vivo* wat die aktiwiteit daarvan kan beïnvloed. Dit is byvoorbeeld gevind dat mitochondria wat uit die hartspierweefsel van nie-versaakte gehiptrofeerde harte geïsoleer is, 'n verhoogde doeltreffendheid van oksidatiewe fosforilering toon (Arcos et al., 1968; Racznik et al., 1977) asook 'n toename van die respirasie-aktiwiteit (Schwartz et al., 1973). Sodanige veranderinge in mitochondriale funksie is waarskynlik die resultaat van kompensasie waartydens 'n intensifisering van onder andere die energiefunksie plaasvind (Meerson, 1969; Gevers, 1972). Indien die prikkel vir hipertrofie egter eise aan die hartspier stel wat die aanpassingsvermoë daarvan oorskry, lei dit tot uiteindelijke versaking.

Versaking van die hartspier word gekenmerk deur 'n verlaagde aktiwiteit van sekere subcellulêre funksies daarvan, waaronder die mitochondriale energieproduksiesisteem (Schwartz et al., 1973). Alhoewel 'n onderdrukking van die oksidatiewe

fosforileringsproses van mitochondria wat geïsoleer is uit die weefsel van kongestief-versaakte harte in heelwat ondersoekte aangetoon is (Argus et al., 1964; Gertler, 1961; Lindenmayer et al., 1968; Lochner et al., 1968; Schwartz & Lee, 1962; Wollenberger et al., 1963) moet egter ook gemeld word dat in sommige gevalle (Chidsey et al., 1966; Plaut & Gertler, 1959; Sobel et al., 1967; Stoner et al., 1968) geen veranderinge gevind kon word nie. Laasgenoemde bevindings is toegeskryf aan sub-optimale isolasie en bepalingse toestandes (Lindenmayer et al., 1968).

Ook die graad van hartversaking blyk 'n invloed te hê op die resultaat wat verkry word. Schwartz et al. (1973), het byvoorbeeld tot die gevolgtrekking gekom dat 'n verlaagde mitochondriale respirasie slegs voorkom tydens 'n ernstige graad van kongestiewe hartversaking, terwyl dit normaal is vir middelmatige gevalle van versaking. Sommige navorsing (Saito, 1973) dui ook nog op spesiesesifisiteit ten opsigte van mitochondriale respirasie tydens hartversaking.

Onsekerheid bestaan ten opsigte van die primêre rol van 'n defektiewe mitochondriale energieproduksiesisteam in die ontstaan van hartversaking. Sommige navorsers (Raczniak et al., 1977) meen dat dit wel primêr betrokke kan wees, terwyl so 'n moontlikheid deur ander weer (Schwartz et al., 1973) as 'n onsekerheid beskou word.

'n Defektiewe mitochondriale funksie kan verder ook die gevolg wees van 'n versteurde intrasellulêre metabolisme tydens hartversaking of iskemiese toestande van die hart. Verskeie navorsers (Kurien et al., 1969; Oliver et al., 1968) het byvoorbeeld 'n styging in die konsentrasie van die vry vetsure in

die bloed tydens miokardiale iskemie en infarksie aangetoon. Alhoewel 'n styging hiervan in die selle en mitochondria van die hartspier nog nie aangetoon is nie, is dit moontlik aangesien die vry vetsure deur middel van 'n passiewe diffusieproses deur die selmembrane beweeg (Neely & Morgan, 1974). Dit kan moontlik ont koppeling van die oksidatiewe fosforileringsproses (Borst et al., 1962; Hülsmann et al., 1960) tot gevolg hê.

'n Ander tipe verbinding wat moontlik 'n invloed mag uitoefen op die mitochondriale aktiwiteit, is die langketting-asiel-KoA-derivate van die vetsure wat gevorm word tydens die β -oksidasie van vetsure. Dit is aangetoon dat die konsentrasie daarvan tydens miokardiale iskemie styg en mag dus moontlik 'n onomkeerbare inhibisie van die adenien-nukleotied-translokase ensiem tot gevolg hê (Harris et al., 1972; Shug et al., 1975). Die translokase ensiem is gesetel op die binneste mitochondriale membraan, en vervul 'n belangrike funksie ten opsigte van die transporter en uitruiling van ATP en ADP oor hierdie membraan om sodoende die ATP tot ADP verhouding te beheer (Shrago, 1976; Souverign et al., 1970). Dit spreek dus vanself dat enige ingreep op die aktiwiteit van hierdie ensiem 'n drastiese ingreep op die regulering van die intrasellulêre energiemetabolisme tot gevolg sal hê. Dit is egter gevind (Lochner et al., 1976) dat 'n verlaagde oksidatiewe fosforilering tydens anoksie nie toegeskryf kon word aan inhibisie van die adenien-nukleotied-translokase ensiem nie.

Intrasellulêre kalsium-oorbelading tydens hartversaking is nog 'n faktor wat die mitochondriale energieproduksie kan onderdruk. (Dhalla, 1976). Die akkumulering van groot hoeveelhede

Ca^{2+} in die mitochondria veroorsaak 'n onderdrukking van die mitochondriale respirasie, gepaardgaande met 'n verhoogde deur= laatbaarheid en 'n uitputting van die endogene piridien-nukleotiede (Vinogradov et al., 1972). 'n Verlaagde konsentrasie van die intrasellulêre Ca^{2+} aan die ander kant, sal moontlik ook 'n verlaagde produksie van energie tot gevolg hê, aangesien 'n opti= mum... hoeveelheid Ca^{2+} nodig is vir die oksidatiewe fosforile= ringsproses. Hierdie abnormale konsentrasies van Ca^{2+} word waarskynlik veroorsaak deur defekte in die membraansisteme van die sel (Dhalla, 1976). Ook die verlies aan mitochondriale K^+ tydens iskemie (Calva et al., 1966) en kongestiewe hartver= saking (Harrison et al., 1930; Moore et al., 1954; Oleson, 1964) sal die effektiwiteit van die mitochondriale energieproduksie= sisteem nadelig beïnvloed (Pressman & Lardy, 1952; Harrison et al., 1972).

Dit blyk verder dat ook die lisosome 'n invloed op die ener= gieproduksiesisteem van die hartspier kan uitoefen. Dit is byvoorbeeld genoem (Dhalla, 1976) dat aktivering van so= genaamde destruktiewe meganismes, waaronder die lisosome, op 'n bepaalde stadium van 'n verlaagde energiestatus plaasvind waartydens beskadiging van die kontraktiele=proteïene en die membraanstrukture van die sel plaasvind en onomkeerbare ver= saking van die hart bewerkstellig word. Hierdie verskynsel word in 'n mate ondersteun deur bevindings van 'n ont koppeling van oksidatiewe fosforilering *in vitro* deur lisosome (Mellors et al., 1967) en 'n toename van die lisosoomaktiwiteit tydens hi= pertrofie en versaking van die hart (Kottmeier & Wheat, 1967; Schneider et al., 1971; Tolnai & Beznak, 1971).

'n Verlaagde aktiwiteit van die respiratoriese ketting as die gevolg van 'n ensiemdefek, of as gevolg van te min suurstof aan die end van die respiratoriese ketting, sal noodwendig 'n akkumulering van gereduseerde piridien-nukleotiede tot gevolg hê indien die produksie daarvan nie dienooreenkomstig verlaag word nie. Fedelesova en Dhalla (1971) het gevind dat 'n vyfminuteperiode van *asfiksie* by rotte 'n betekenisvolle styging van gereduseerde piridien-nukleotiede tot gevolg gehad het met 'n gegaardgaande daling in ATP en kreatienfosfaat en 'n styging in laktaat. Dieselfde patroon van verandering ten opsigte van bogenoemde parameters is ook gevind vir distrofiese harte van Siriese hamsters. Waar die defek by die geasfiksieerde rotte toegeskryf kan word aan verstourings in die terminale fase van die respiratoriese ketting, is die defek by die gedistrofieerde harte toegeskryf aan 'n swak verbruik van die piridien-nukleotied-gekoppelde waterstof.

Die gelyktydige styging van laktaat in bogenoemde ondersoek dui op 'n toename in aktiwiteit van die glikoliseproses. Dit is bekend dat die anaerobiese-funksionerende glikoliseproses 'n belangrike kompensatoriese energieproduksiefunksie tydens toestande van ontoereikende aerobiese energieproduksie vervul.

2.3.1.2 Anaerobiese energieproduksie

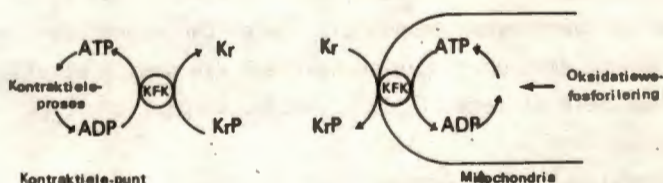
Die bydra van die anaerobiese energieproduksiesisteem (glikolise) tot die totale energieproduksie in hartspierweefsel is relatief gesien, min. Feitlik alle energie vir die doeleindes van die kontraktsieproses, word deur die mitochondria geproduseer (Opie, 1969a). Dit is byvoorbeeld gevind (Scheuer, 1972) dat die glikoliseproses maar 'n bydrae van 6% tot 8% van

die totale energieproduksie uitmaak het in gevalle waar rotharte met die Langendorff tegniek geperfuseer is onder ten volle geoksigeneerde toestande. Gedurende toestande van ontoereikende aerobiese energievoorsiening, vervul die glikoliseproses egter 'n belangrike kompensatoriese funksie. Deur die gebruik van 'n ligte graad van sianiedvergiftiging (Müller-Ruchholtz & Lochner, 1971) is die bydrae van die glikolise-energie verhoog tot 12% van die totale energie-aanvraag. Kompensasie deur die glikolise is egter nie in staat om die normale meganiese aktiwiteit van die hartspier tydens anoksiese toestande te onderhou nie (Opie, 1968; Scheuer & Stezoski, 1970) alhoewel aangetoon is (Opie, 1968) dat dit die energiebehoefte kan balanseer vir 'n anoksietydperk van tot twee minute.

'n Toename in die aktiwiteit van die anaerobiese energiemetabolisme soos weerspieël deur 'n styging van die laktaatinhoud, wat terselfdertyd ook 'n verlaagde aerobiese energieproduksie impliseer, is vir sekere kardiomiopatieë gevind (Fedelesova & Dhalla, 1971; Skinner et al., 1973). Die verlaagde konsentrasies van ATP en veral KrP saam met 'n styging in laktaat, is tipiese metaboliese veranderinge van 'n ontoereikende aerobiese energieproduksie. 'n Styging van die NADH inhoud (Fedelesova & Dhalla, 1971) is waarskynlik 'n teken van die mitochondria se onvermoë om hierdie eindproduk van substraat-oksidasie vinnig genoeg weg te oksideer.

'n Styging in die konsentrasie van laktaat tydens versaking (Fedelesova & Dhalla, 1971; Skinner et al., 1973), anoksie (Scheuer, 1972) en iskemie (Gudbjarnason et al., 1970; Braasch et al., 1968) van die hartspier, hou nadelige effekte in vir die kontraksieproses. Die daling in pH as gevolg van die styging in laktaatinhoud van die sel het volgens huidige eksperi-

mentele aanduidings (Gudbjarnason et al., 1970) waarskynlik 'n inhiberende invloed op die mitochondreale kreatiefosfokinase ensiem. Dit lei tot inhibisie van die intramitochondriale hoë-energiefosfaatoordrag na die ekstramitochondriale kompartement. 'n Betrokkenheid van die mitochondreile kreatiefosfokinase by die oordrag van hoë-energie-fosfaat is gesuggereer (Jacobs et al., 1964). Die gevolg hiervan is dan waarskynlik 'n kompartementisering van ATP wat 'n intramitochondriale styging met 'n gepaardgaande ekstramitochondriale uitputting van ATP beteken. Die ATP wat beskikbaar is vir die kontraktiesproses neem dus af. Hierdie beskouing bied volgens Gudbjarnason et al.,(1970) 'n verklaring vir die verskynsel tydens iskemiese en infarksietoestande dat die hartspier ophou saamtrek, terwyl daar oënskynlik nog voldoende ATP beskikbaar is vir die kontraktiesproses. Die betrokkenheid van die mitochondriale kreatiefosfokinase ensiem in hierdie hele saak word deur Seraydarian en Artaza (1976) soos volg voorgestel (figuur 2.4).



KFK	Kreatiefosfokinase
Kr	Kreatien
KrP	Kreatiefosfaat

Figuur 2.4 Skematiese voorstelling van twee interafhanklike sisteme

Die ekstramitochondriale kreatiefosfokinase by die kontraktiele punt is 'n isosiem van die mitochondriale kreatiefosfokinase en word waarskynlik nie deur die akkumulering van

laktaat beïnvloed nie.

Die versteuring van die intrasellulêre ATP-verspreiding het 'n wanbalans in die verhouding van ATP:KrP van die sel tot gevolg, 'n verskynsel wat vir verskeie tipes van kardiomiopatieë aangetoon is (Fox et al., 1965; Furchgott & Lee, 1961; Pool & Seagren, 1966; Pool et al., 1967; Lochner et al., 1970). Hartspierweefsel wat slegs onderwerp is aan 'n verhoogde energie-aanvraag, sodanig dat die aanvraag die produksie daarvan oorskry, het ook 'n daling van ATP en KrP tot gevolg, dog geen versteuring van die ATP:KrP-verhouding nie en ook geen betekenisvolle styging van die laktaatinhoud nie (Gudbjarnason et al., 1970).

Benewens 'n invloed op die intrasellulêre oordrag van energie, het 'n akkumulering van laktaat waarskynlik ook 'n invloed op die aktivering van die kontraktiele sisteem. Volgens die hipotese van Katz en Hecht (1969) kan die styging van H^+ -ione 'n kompetisie veroorsaak tussen die H^+ - en Ca^{2+} -ione vir die Ca^{2+} -bindingsplekke op troponien waardeur die sensitiwiteit van die kontraktiele sisteem vir Ca^{2+} verlaag word.

2.3.2 Energiebenuttingsisteem

Energie (ATP) in die hartspiersel word deur hoofsaaklik drie funksies verbruik, naamlik: die aktiewe transporterings van ione deur die membraansisteme van die sel (sarkolemma, sarkoplasmiese retikulum en mitochondria); die sintese van chemiese verbindings en veral proteïene; en vir kontraktiele proteïen-interaksie (kontraksie). Veral laasgenoemde funksie kan aansienlike hoeveelhede ATP verbruik en kan as sodanig 'n belangrike invloed op die energiereserwes (ATP en KrP) van die

sel uitoeven.

Die ATPase-aktiwiteit van die kontraktiele-proteïene bepaal die tempo waarteen ATP deur die kontraktiele-proteïene verbruik sal kan word en vervul dus 'n belangrike funksie in die transformering van energie deur die kontraktiele-proteïene.

2.3.2.1 Kontraktiele-proteïen-ATPase

Die ATPase-aktiwiteit van die kontraktiele-proteïene is in *miosien*, en meer spesifiek, in subfragment 1B van die swaar meromiosiengedeelte gesetel. *In vivo* funksioneer die miosien-ATPase egter in assosiasie met aktien en staan bekend as aktomiosien-ATPase. *In vitro*-studies het aangetoon dat kondisies wat aktomiosien *dissosieer*, die aktomiosien-ATPase-aktiwiteit verlaag.

Die soute van magnesium en van alkaliemetale sal wanneer dit in hoë konsentrasies teenwoordig is, die aktomiosien-ATPase inhibeer (Maruyama & Watanabe, 1962; Mommaerts & Seraidarian, 1947; Watanabe et al., 1953). Dit word, behalwe die effek wat sommige van hierdie soute op die miosien-ATPase self het, toegeskryf aan 'n addisionele dissosiasie-effek van die hoë soutkonsentrasie op aktomiosien (Katz, 1970). Lae konsentrasies van hierdie soute het egter 'n stimulerende uitwerking op aktomiosien-ATPase (Katz, 1970)

ATP is nog 'n stof wat bokant sekere konsentrasies dissosiasie van aktomiosien tot gevolg het en daardeur die aktomiosien-ATPase-aktiwiteit verlaag (Tada, 1967). Die konsentrasie van ATP waarbokant inhibisie van die aktomiosien-ATPase as gevolg

van dissosiasie plaasvind, word beïnvloed deur die samestelling van die reaksiedium. In die eerste plek het die aktomiosien self 'n invloed. Dit is byvoorbeeld gevind dat skeletspier-aktomiosien-ATPase makliker onderdruk word deur 'n hoë konsentrasie van ATP as hartspieraktomiosien-ATPase (Tada, 1967), waarskynlik as gevolg van 'n makliker dissosiasie van eersgenoemde. Dit is verder ook gevind (Murphy et al., 1969) dat optimale ATP-konsentrasies vir skeletspier-aktomiosien-ATPase, 'n dissosiasie en inhibisie van arteriële aktomiosien-ATPase tot gevolg het. Dit mag wees dat hierdie verskille moontlik ook by dieselfde soort spier onder verskillende patologiese toestande kan voorkom, byvoorbeeld onder normale en kongestief-versaakte toestande van die hartspier.

'n Ander faktor in die reaksiedium wat 'n invloed mag uitoefen is die verhouding van ATP tot magnesium. In 'n studie waar die effek van die substraatkonsentrasie op die magnesium geaktiveerde miofibril-ATPase nagegaan is (Perry & Grey, 1956) is gevind dat substraatinhibisie plaasvind wanneer die ATP konsentrasie die magnesium-konsentrasie oorskry, maar opgehef word indien die magnesium-konsentrasie gelyk gestel word aan die van die substraat, of deur die byvoeging van kalsium.

'n Aktivering van die ATPase aktiwiteit deur aktien blyk ook duidelik uit sommige *in vivo*-eksperimente. Dit is byvoorbeeld (Portzehl et al., 1969a) onder 'n verskeidenheid van eksperimentele kondisies gevind dat die ATPase-aktiwiteit van verslakte miofibrille ongeveer ses tot agt keer minder is as dié vir saamgetrekte miofibrille. Alhoewel die verslakte miofibrille 'n dissosiasie van ongeveer 90% getoon het, het die ATPase-aktiwiteit onder hierdie omstandighede nogtans die karakteris-

tieke van 'n tipiese aktomiosien-ATPase getoon.

Lae konsentrasies van Mg^{2+} het soos reeds vermeld, 'n aktiverende invloed op die aktiwiteit van die aktomiosien-ATPase wat 'n S-vormige toename teenoor 'n toename in pMg vertoon (Nihei, 1967). Dit is in teenstelling met die inaktiverende effek daarvan op die ATPase-aktiwiteit van miosien alleen (Brahms & Kay, 1963; Gergely et al., 1956). Dit kan dus verwag word dat stowwe wat 'n dissosiasie van aktomiosien bewerkstellig, die miosien-ATPase ensiem in 'n groter mate sal blootstel aan die inhiberende effek van Mg^{2+} (Katz, 1970). Dit is bekend dat Mg^{2+} 'n kompleks met ATP vorm om dan as integrale deel van die substraat deel te neem aan die ensiemgekataliseerde-hidrolise van ATP. Alhoewel dit ook bekend is dat Mg^{2+} met een of meer ligte kettings in die globulêre kopgedeelte van miosien bind (Dreizen & Richards, 1973) is die betekenis hiervan vir die ATPase-aktiwiteit onbekend.

Ca^{2+} besit 'n belangrike fisiologiese funksie ten opsigte van die regulering van die aktien-miosien-interaksie en daarom ook van die aktomiosien-ATPase (natuurlike aktomiosien)-aktiwiteit (Katz, 1970). Aktivering van die aktomiosiensisteam deur Ca^{2+} vind alleenlik plaas met die volledige kontraktiele-proteïensisteam. 'n Kontraktiele-proteïensisteam wat hersaamgestel is vanaf hoogs gesuiwerde aktien en miosien (hersaamgestelde aktomiosien) toon byvoorbeeld geen superpresipitasie- of ATPase-reaksie in die teenwoordigheid van Mg^{2+} teenoor 'n Ca^{2+} -konsentrasie van kleiner as $10 \mu M$ nie (Ebashi, 1963; Ebashi & Ebashi, 1964; Katz, 1966). Dit is aangetoon dat sowel tropomiosien as troponien as deel van die kontraktiele-proteïensisteam, essensieel is vir die reguleringsfunksie van Ca^{2+} (Ebashi & Kodama,

1966; Hartshorne & Mueller, 1967). Die verklaring hiervoor is naamlik dat die Ca^{2+} sy aktiverende effek uitoefen via binding met troponien (Ebashi et al., 1967). Dit is bekend dat die Ca^{2+} -binding met skeletspiertroponien in 'n molêre verhouding van 1:1 plaasvind (Katz, 1970). Dit het dan waarskynlik 'n opheffing van die inhiberende invloed van die modulerende proteïene (tropomiosien en troponien) tot gevolg wat lei tot beide ATPase-stimulering en fisies-chemiese interaksie tussen aktien en miosien, met verkorting van die spier as resultaat (Katz, 1970).

Die intensiteit van die Ca^{2+} -effek word bepaal deur die konsentrasie Ca^{2+} wat vir binding beskikbaar is. In 'n reaksiedium bestaande uit 0,08 M KCl, 1,0 mM MgATP en by 'n pH van 6,8 en 'n temp. van 25°C , is gevind dat geen aktivering plaasvind by 'n Ca^{2+} -konsentrasie van 10^{-7} M nie, terwyl 'n maksimale reaksie verkry is by 'n Ca^{2+} -konsentrasie van ongeveer 10^{-5} M (Katz, 1970). Hierdie waardes vir begin- en maksimum aktivering is naastenby in ooreenstemming met waardes wat verkry is vir die ATPase-aktiwiteit en isometriese spanningsontwikkeling van hartspiermiofibrille (Solaro et al., 1974) en isometriese spanningsontwikkeling van gliserolgeëkstraheerde hartspierve-sels (Henry et al., 1972).

'n Verandering in die pH van die reaksiedium het 'n aansienlike invloed op die Ca^{2+} sensitiwiteit van die aktomiosiensisteam. Portzehl et al. (1969) het aangetoon dat 'n daling in die pH vanaf 8 na 7, die Ca^{2+} -aanvraag tienvoudig laat toeneem het, terwyl 'n daling van 7 na 6 die Ca^{2+} aanvraag drievoudig laat styg het. Hierdie bevinding kan moontlik verklaar word deur die hipotese van Katz & Hecht (1969), naamlik dat daar tydens sekere patologiese toestande waar 'n daling in die intrasellu-

lere pH ontstaan, 'n kompetisie tussen Ca^{2+} - en H^+ -ione vir die Ca^{2+} -bindingsplekke op troponien ontstaan. Nog 'n faktor wat 'n verandering in die Ca^{2+} -sensitiwiteit van die aktomiosiensisteem tot gevolg kan hê, is 'n verandering in die sulfhidriël groepe van troponien. Die verlies aan Ca^{2+} -sensitiwiteit deur gliserolgeëkstraheerde spierwesels oor 'n lang tyd is 'n bekende verskynsel en kan waarskynlik toegeskryf word aan 'n oksidasie van sulfhidriëlgroepe op troponien (Katz, 1970).

2.3.2.2 Kontraktiele-proteïensisteem en hartversaking

Dit is beweer (Opie, 1969a) dat 'n defektiewe verbruik van energie, die mees waarskynlike oorsaak is van hartversakings wat ontstaan as die gevolg van 'n meganiese oorbelading van die hart. In 'n oorsigartikel deur Schwartz et al. (1973) word verder daarop gewys dat literatuur na 1965 dui op 'n funksionele letsel (ATPase) in die kontraktiele-proteïene van versake harte. Hiervan moet afgelei word dat 'n defek van die kontraktiele-proteïen-ATPase moontlik 'n karakteristieke verandering tydens die versakingsstadium mag wees en in baie gevalle selfs oorsakend kan wees ten opsigte van hartversaking.

'n Defek in die funksie van die kontraktiele-proteïene is onder meer aangetoon deur 'n verlaagde ontwikkeling van isometriese spanning deur die gliserol-geëkstraheerde hartspierwesels van honde wat 'n chroniese kongestiewe hartversaking onder lede gehad het (Benson et al., 1957). Alhoewel hierdie outeurs geen afwyking in die ATPase-aktiwiteit van die geëkstraheerde spierbundels kon vasstel nie, is 'n defek ten opsigte van die miofibril-ATPase wel in die meerderheid van ondersoekte gevind. Alpert & Gordon (1962) vind behalwe 'n laer ATPase-aktiwiteit vir die miofibrille wat vanaf pasiënte wat kongestiewe hart-

versaking onder lede gehad het verkry is, ook 'n betekenisvol laer styging van die ATPase-aktiwiteit in reaksie op 'n toename in die magnesiumkonsentrasie van die reaksiedium. Geen verskil in substraat-afhanklikheid kon gevind word tussen miofibrille van die versaakte en kontroleharte nie. Chandler et al. (1967) het bevind dat die sensitiwiteit van die miofibril-ATPase ten opsigte van Mg^{2+} en Ca^{2+} dieselfde is vir kontrole en vir eksperimenteel versaakte harte van katte. 'n Betekenisvolle onderdrukking van die miofibril-ATPase as sodanig is egter deur die outeurs vir die versaakte harte gevind. 'n Onderdrukking van die miofibril ATPase tydens hartversaking is ook nog deur ander navorsers aangetoon (Gordon & Brown, 1966). Ander faktore wat gevind is moontlik 'n onderdrukken-de effek op die ATPase aktiwiteit van die kontraktiele-proteïene te kan hê, is naamlik 'n verwydering van die bynierkorteks-funksie (Rovetto et al., 1970), hipertrofie deur middel van pulmonêre afbinding (Henry et al., 1972) of isoproterenol-toediening (Gordon et al., 1972) en ouderdom (Alpert et al., 1967). Geen afwyking ten opsigte van Ca^{2+} - of Mg^{2+} -afhanklikheid van aktomiosien kon in die geval van hipertrofie deur middel van isoproterenoltoediening aangetoon word nie.

Die verlaagde ATPase-aktiwiteit van die kontraktiele-sisteem van versaakte harte kan gesetel wees in die ATPase-aktiwiteit van die miosienmolekule of dit kan die gevolg wees van 'n verlaagde aktienaktivering. 'n Defek in die troponien-tropomiosien sisteem wat met behulp van superpresipitasiestudies aangetoon is vir iskemiese hartspierweefsel van honde (Schwartz et al., 1973) dui ook nog op die moontlikheid van 'n defektiewe regulering van die aktien-miosien-interaksie. Met behulp van isometriese spanningsontwikkeling deur gliserolgeëkstraheerde vesels van gehiptrofeerde konynharte, kon Henry et al. (1972)

egter geen afwyking in Ca^{2+} -sensitiwiteit van die sisteem meet nie, terwyl 'n verlaagde ATPase-aktiwiteit van die gliserolgeëkstraheerde vesels wel gemeet is.

Gegewens in die literatuur (Luchi et al., 1969; Rovetto et al., 1970; Conway et al., 1975) dui daarop dat 'n defek in die miosien-ATPase wel 'n belangrike rol mag speel as verklaring vir 'n verlaagde miofibril-ATPase-aktiwiteit tydens hartversaking, alhoewel in enkele ondersoeke (Olson et al., 1961) ook geen afwyking vir die miosien-ATPase gevind kon word nie.

2.4 Werkshipotese

Die basiese probleemstelling van hierdie ondersoek gaan naamlik om die *biochemiese veranderinge in die hartspierweefsel van skape met gousiekte onder lede*. Soos reeds genoem is tot op hede nog geen inligting in hierdie verband bekend nie (2.2.5).

'n Suggesie deur Pretorius et al. (1967) dui in die besonder op 'n bioënergetiese versteuring in die hartspiersel tydens gousiekte. Hierdie suggestie word ondersteun deur tekens van iskemie (Pretorius & Terblanche, 1967) en aanduidings van miofilamentdissolusie (Pienaar, J.G., persoonlike mededeling) tydens gousiekte. Dit word ook nog verder gerugsteun deur die feit dat dit in ooreenstemming is met 'n defektiewe energie-metabolisme wat vir ander tipes van hartversaking aangetoon is, soos in die voorafgaande literatuuroorsig bespreek is. Gegewens ten opsigte van hartversaking in die algemeen dui op 'n defek wat geleë mag wees in die mitochondriale energieproduksie, en/of energiebenutting deur die kontraktiese proteïene.

Dit is in ooreenstemming met die hipotese van Olson & Schwartz (1951) wat stel dat daar vanuit 'n molekulêre oogpunt in die algemeen twee tipes van hartversakings gevisualiseer kan word, naamlik dié waar 'n defek geleë is in die energieproduksie en die waar dit geleë is in die energiebenuttingsstelsel, of moontlik ook 'n kombinasie hiervan. In hierdie lig beskou, kan verwag word dat 'n sodanige defek ook mag voorkom in die hartspierweefsel van gousiekte diere.

Die volgende werkshipotese is dienooreenkomstig opgestel vir 'n ondersoek na die bioënergetiese veranderinge tydens gousiekte:

- (1) Skape word as proefdiere gebruik, aangesien gousiekte sover bekend is, slegs onder herkouers voorkom. Dit is belangrik dat die plantmateriaal aan die normale spysverteringsveranderinge onderworpe sal wees, aangesien dit 'n bydrae kan lewer, of selfs die oorsaak vir die kenmerkende gousiekte simptome kan wees.
- (2) Die analyses in hierdie ondersoek is uitgevoer op hartspierweefsel van gousiekte diere wat duidelike simptome van hartversaking getoon het. Dit verseker nie alleen dat die biochemiese veranderinge in verband gebring sal kan word met 'n bepaalde stadium van die siekte nie, maar ook dat dit as 'n model gebruik sal kan word om die meganisme van hartversaking in die algemeen te bestudeer.
- (3) Twee aspekte van die energietransformering, naamlik die vorming en die benutting van ATP, is nagegaan. Hierdie ondersoek sluit dus die verskillende aspekte wat voorkom in die hipotese van Olson en Schwartz in en kan dus ten opsigte van hierdie hipotese reeds 'n bydrae ten opsigte van die

meganisme van hartversaking lewer. Dié benadering tot hierdie ondersoek kan as 'n belangrike raamwerk gebruik word om die aard van 'n moontlike defek ten opsigte van die energietransformering na te gaan.

HOOFSTUK 3

Eksperimentele opwekking van gousiekte

3.1 Inleiding

Die wyse van plantmateriaal-inname het waarskynlik 'n invloed op die simptome van gousiekte. 'n Dosis van 200 g nat plantmateriaal per kilogram liggaamsmassa, toegedien per rumenfistula oor 'n tydperk van agt dae, word aanbeveel (Naudé, T.W., persoonlike mededeling) vir 'n geskatte LD-100-waarde. Die toediening van dosisse baie groter as 25 g/kg liggaamsmassa/dag raak fisiologies onhanteerbaar en het rumenstase en/of diaree tot gevolg.

Dit is verder ook waargeneem (Pienaar, J.G.; Persoonlike mededeling) dat daar 'n verband tussen dosissterkte en letsels blyk te wees. Uitgesproke letsels kom voor by toediening van hoë dosisse plantmateriaal en gee aanleiding tot die ontstaan van erg gedilateerde harte.

In hierdie ondersoek is daarom 'n chroniese doseringsprogram met hoë dosisse plantmateriaal (fisiologies hanteerbaar) gevolg ten einde uitgesproke letsels en simptome te verseker.

3.2 Proefdiere

Die proefdiere wat vir hierdie ondersoek gebruik is, was tweetotviertand Merino- en Duitse-merinohamels. Die skaap is aangekoop in 'n area waar geen gousiekte veroorsakende plante voorkom nie. Die skaap is direk na aankope met 'n breë-spektrum-rondewurmmiddel, tiabendasoel (Thibenzole, M.S.D) teen inwendige parasiete behandel en teen bloutong en bloednier gespuit. 'n Rumenfistula is vir elke skaap wat met gousiektebossie gedoseer sou word, aangebring, waarna elke skaap afsonderlik in 'n hok geplaas is.

Elkeen van die skaap, kontroles ingesluit, is *ad lib* voorsien met water, ongemaalde lusern en 'n sout-beenmeelmengsel (1:1). Die skaap het daagliks 200 g meliemeel elk ontvang. Daaglikse metings van elke skaap is gedoen ten opsigte van die rektale temperatuur, frekwensie van asemhaling, frekwensie van rumenbewegings, en die hartfrekwensie, tydens die vooraf sowel as die doseringsperiode.

Kontroleskaap het 'n identiese behandeling ontvang, behalwe dat hulle nie gefistuleer is nie.

3.3 Plantmateriaal

Pachystigma pygmaeum van die Ventersdorpdistrik is as die gouesiekte-veroorsakende plantmateriaal vir hierdie ondersoek gebruik. Die plant met sy uitgebreide ondergrondse wortelstelsel vertoon gedurende droogtetoestande groen en welig in vergelyking met ander beweibare plante en is dus veral onder hierdie omstandighede aanneemlik vir beweiding.

Die blare van die plant is in die oggend geoes en na ongeveer 'n half-dag in 'n koelkamer by $\pm 5^{\circ}\text{C}$ gestoor totdat dit gebruik is. Dit is gewoonlik nie langer as drie dae gestoor nie, waarna vars materiaal geoes is. Gedroogde plantmateriaal is verkry deur vars geoste materiaal op sifrakke oop te gooi en vir ongeveer 12 ure by $\pm 40^{\circ}\text{C}$ te droog. Hierna is dit in lugdigte houers by -20°C gestoor totdat dit vir dosering benodig was.

3.4 Metode van dosering

Die skape se vastende liggaamsmassas is bepaal en daarna elke oggend, nadat dit oornag gevas is, teen 'n dosis van 25 g nat materiaal/kg liggaamsmassa gedoseer totdat uitgesproke simptome van hartversaking waargeneem is. Die plantmateriaal is per rumenfistula toegedien. Voor toediening is die sand eers afgespoel waarna die blare fyn geknip is vir makliker toediening en om 'n moontlike impaksie in die rumen te probeer voorkom.

In die geval van gedroogde plantmateriaal is 200-300 g van die plantmateriaal per skaap toegedien, afhangende van die grootte van die skaap.

3.5 Diagnose van gousiekte

Uit 'n simptomatologiese studie op skape en bokke met gousiekte onder lede (Pretorius & Terblanche, 1967) blyk dit dat die voorkoms van tagikardie, 'n gallopritmie en/of 'n geruis, 'n betroubare maatstaf is om versaking van die hart tydens die sieketoestand te diagnoseer. 'n Hartfrekwensie van meer as 100 vir minstens twee agtereenvolgende dae, verkieslik saam met 'n gallopritmie en/of 'n geruis, is as kriterium vir die diagnose van gousiekte aanvaar.

Notering van die hartfrekwensie en hartgeluide is daaglik in die oggend voor dosering gedoen. Koorsmetings is gedoen om 'n moontlike bydrae van infeksie tot verhoogde hartfrekwensie te kan evalueer.

3.6 Monsterneming

Vir monsterneming is alle skaap, indien moontlik, oornag gevas. Die skaap is die volgende oggend genarkotiseer deur die intraveneuse toediening van natriumpentobarbitoon.* Hierna is die longe deur gebruikmaking van 'n trageabuis met suurstof geventileer. Die hart is blootgelê deur middel van 'n opening wat deur die ribbes ingesny is. Na verwydering van die perikardium is 'n gedeelte van die apeks van die kloppende hart oombliklik bevries deur dit plat te druk met 'n spesiaal aangepaste tang. Die bek van die tang is vooraf afgekoel in vloeibare stikstof. Hierdie metode van *metaboliese bevriësing* is toegepas na analogie van die metode beskryf deur Wollenberger et al. (1958). Hierdeur is verseker dat geen afbraak van die labiele hoë-energie-fosfaatverbindings sou plaasvind nie.

Die bevrore weefsel is vervolgens in 'n mortier met vloeibare stikstof verpoeier met 'n stamper wat ook vooraf in vloeibare lug afgekoel is. Die effek van vogkondensasie is so konstant moontlik gehou deur die verpoëtering in 'n klimakamer met konstante temperatuur en vogregulering te doen. Die verpoëiede weefsel is hierna na 'n vooraf verkoelde houer oorgedra, en in vloeibare stikstof gestoor totdat die analises ten opsigte van ATP, KrP, anorganiese fosfaat, laktaat (melksuur) en NADH uitgevoer kon word.

Die res van die hart is onmiddellik na bevriësing en verwydering van gemelde weefsel uit die borskas losgesny. 'n Vetrvrye gedeelte van die ventrikel is uitgeknipt en onmiddellik in yskoue KEA-medium (0,18 M KCl, 10 mM EDTA, 0,5% albumien, pH 7,4) fyngeknipt vir die isolering van mitochondria en 'n daaropvolgende meting van oksidatiewe fosforilering.

* Sagatal, May Baker.

Vir die doeleindes van meganiese bestudering van die Ca^{2+} -sensitiwiteit van gliserol-geëkstraheerde-spiervesels, is 'n papillêre spier in skywe van ongeveer 1 mm dik gesny en soos later onder 6.4.2 beskryf met 50% gliserol by lae temperatuur geëkstraheer. Van die ventrikelweefsel is fyngeknip en op dieselfde wyse vir 5 tot 6 maande met gliserol geëkstraheer vir latere superpresipitasie en ATPase metings van n-aktomiosien. Nog 'n monster van ongeveer 1 g is van die ventrikelwand geneem waarop 'n vogbepaling, soos beskryf onder 4.2, gedoen is.

Die res van die hart is skoongeknip van vet, die atria weggesny, en 'n massabepaling op die oorgeblewe gedeelte van die ventrikels gedoen. Die totale ventrikelmassa is verkry deur die massas van die afsonderlike monsters wat geneem is, ook in berekening te bring. Die karkasmassa van die diere is verkry na verwydering van die vel en spysverteringskanaal.

3.7 Eksperimentele uiteensetting

'n Samevattende uiteensetting van die ondersoek word in tabel 3.1 aangegee.

Vier afsonderlike ondersoeke is in vier afsonderlike jare gedoen. Vanweë die beperkte getalle proefdiere in groep IA en IB, is die resultate daarvan as een groep, naamlik groep I, behandel.

Al die groepe is met vars materiaal gedoseer, behalwe groep IA, wat met sowel vars-ingevoersede as gedroogde materiaal gedoseer is.

Tabel 3.1 Samevattende uiteensetting van die ondersoek

Groep	Jaartal	Materiaal		Parameters nagegaan
I(1A)	1973	ingevries, gedroog	Energiemetab.	ATP, KrP, ATP:KrP
(1B)	1974	vars	Energiemetab.	ATP, KrP, ATP:KrP
II	1975	vars	Energiemetab.	ATP, KrP, ATP:KrP laktaat, anorganiese fosfaat, NADH
			Kontraktiele-prot.	Ca ²⁺ -sensitiwiteit (gliserol-geëkstraheerde-vesels)
			Hipertrofie	ventrikelmassa, ventr.: karkasmasa
			Edeem	droë: natmasa
III	1976	vars	Energiemetab.	ATP, KrP, ATP:KrP laktaat, anorganiese fosfaat, NADH O ₂ -opname, P:O-verh. (mitochondria)
			Kontraktiele-prot.	superpresipitasie; omvang, tempo, verheldering (n-aktomiosien) ATPase; ATP-, Ca ²⁺ -, en Mg ²⁺ -afhanklikheid (n-aktomiosien)
			Hipertrofie	ventrikelmassa, ventr.: karkasmasa
			Edeem	droë: natmasa

Aanvanklik (groep I) is slegs belang gestel of 'n afwyking in die konsentrasie van die energiereserwes tydens gousiekte voorkom. Nadat so 'n abnormaliteit bevestig is (1973, 1974), is die ontledings vir groep II uitgebrei om meer inligting ten opsigte van energieproduksie te bekom. 'n Enkele meting ten opsigte van die kontraktsiele-proteïen-funksie is ook gedoen. Om uiteindelik 'n geheelbeeld te verkry ten opsigte van die energietransformering, is nie net die energieproduksie nie maar ook bepaalde komponente van die energie-benuttingsstelsel (groep III) in meer besonderhede ondersoek.

P44

HOOFSTUK 4

Post mortem-beeld van eksperimentele gousiekte

P46

4.1 Kongestiewe hartversaking

✓ Visuele *post mortem*-waarnemings dui op 'n uitgesproke graad van kongestiewe hartversaking vir die meeste gevalle van gou-siekte. 'n Uitermate hoë graad van dilatasie van die hart, ge=paardgaande met 'n uitgesproke hidroperikardium is vir feitlik alle gousiekte-gevalle waargeneem. In die meeste gevalle is ook hidrotoraks opgemerk, terwyl in minder gevalle, ook aski=tes te bespeur was. Edeem van die longe het in baie gevalle voorgekom.

4.2 Edeem van die hartspierweefsel

Die voginhoud van die hartspierweefsel is bepaal deur 1 g van die ventrikelwand vir 24 uur in 'n oond by 110°C te droog.

Tabel 4.1 *Droë:nat-massa van die hartspierweefsel van gousiek=te- en kontroleskaap*

Groep No.	Getal skaap	Droë:nat-massa (%) (ventrikelweefsel)
KONTROLE		
II	5	20,9 \pm 0,2
III	10	20,5 \pm 0,1
GOUSIEKTE		
II	6	18,2 \pm 0,4
III	7	17,7 \pm 0,2

* $P < 0,01$ vir 'n betekenisvolle verskil (Variansie-analise)

Die verhouding van droë:nat-massa (%) is 'n indikasie van die voginhoud en word vir die gousiekte- en kontroleskaap van groep II en III in tabel 4.1 aangedui.

Uit bostaande resultate blyk dit dat daar 'n statisties betekenisvolle verskil ($p < 0,01$) tussen die voginhoud van gousiekte- en kontroleskaap se hartspierweefsel bestaan. Die gegewens dui op edeem van die hartspierweefsel van gousiekteskaap en is in ooreenstemming met die waarnemings deur Theiler et al., (1923), asook met die toename in interstisiële edeem wat histologies deur Jacobson waargeneem is, volgens resultate gepubliseer deur McKinney (1974).

4.3 Hipertrofie

Die vasstelling of enige hipertrofie al dan nie tydens gousiekte plaasvind kan 'n belangrike aanduiding wees van die tipe kardiomiopatie en aard van die defek. Aangesien die liggaamsmassa 'n invloed mag hê op die hartmassa, is sowel die ventrikelmassa as die ventrikel:karkasmasa as parameters vir hipertrofie geneem. Die ventrikelmassa van die gousiekteskaap is onder andere genormaliseer vir 'n normale voginhoud, aangesien hipertrofie weefselgroei impliseer. Die massabepalings is gedoen soos onder 3.6 bespreek. Genoemde parameters vir gousiekte- en kontroleskaap word in tabel 4.2 aangegee.

Sowel die ventrikelmassa as die ventrikel:karkasmasa dui op 'n geringe mate van hipertrofie. Wanneer egter vir die verhoogde voginhoud van die harte van gousiekteskaap gekorrigeer word, kan geen statisties betekenisvolle verskil ten opsigte van beide parameters gevind word nie. Hierdie bevinding is in ooreenstemming met die waarneming van Pretorius en Terblanche (1967).

Tabel 4.2 Parameters van hipertrofie vir die ventrikels van gousiekte- en kontroleskaap

Groep No.	Getal skaap	Ventrikel= massa (gram)	Ventr.- massa, korri= geer vir normale water= inhoud	Ventr.: karkas- massa (%)	Ventr.:kar= kas-massa (%) korri= geer vir normale water= inhoud	Karkas= massa (kg)
KONTROLE						
II	5	86,6 \pm 3,8		0,55 \pm 0,03		15,7 \pm 0,6
III	10	86,7 \pm 4,9		0,55 \pm 0,02		16,1 \pm 0,8
GOUSIEKTE						
II	6	101,9 \pm 2,4	89,5 \pm 3,0	0,66 \pm 0,02	0,58 \pm 0,02	15,3 \pm 0,5
III	7	106 \pm 5,8	90,5 \pm 4,8	0,60 \pm 0,03	0,51 \pm 0,03	17,8 \pm 0,9
		*	NB	*	NB	NB

* $p < 0,01$ vir 'n betekenisvolle verskil (veelvoudige vergelyking - student Newman Keuls)

NB Nie-betekenisvol

4.4 Gevolgtrekking

Die *post mortem*-beeld dui op kongestiewe hartversaking met geen hipertrofie van die hart nie, wat in ooreenstemming is met die bestaande beeld van gousiekte, en die waarnemings ten opsigte van hipertrofie (Pretorius & Terblanche, 1967) en edeem (Theiler et al., 1923) bevestig.

Dit is dus duidelik dat die biochemiese ondersoek uitgevoer is op proefdiere wat 'n tipiese beeld van gousiekte (hartversaking) vertoon het.

P50

HOOFSTUK 5

**Die status en produksie van energie in die hartspierweefsel
van gouslekte-diere**

P52

5.1 Algemene inleiding

Reeds met die eerste ondersoek van gousiektegevalle (Theiler et al., 1923) is vasgestel dat die hartspier aangetas word. *Post mortem*-ondersoek het duidelike tekens van kongestiewe hartversaking getoon, terwyl simptomatologiese waarnemings (Pretorius & Terblanche, 1967) alreeds 'n hele tyd voor dood abnormaliteite ten opsigte van die hartfunksie aangetoon het. Kardiodinamiese studies (Pretorius & Terblanche, 1967) dui op 'n toestand van iskemie in die harte van gousiekteskaap, terwyl 'n verandering in die energievystellingsfunksie van die harte van gousiekteskaap ook gesuggereer is (Pretorius & Terblanche, 1967).

In die lig van bogenoemde bevindings en uitgaande van die hipotese van Olson & Schwartz (1951) is eerstens die status van metaboliete en kofaktore geassosieer met energieveranderinge in die harte van gousiekteskaap ondersoek.

5.2 Energiereserwes (ATP en KrP)

5.2.1 Inleiding

Die ATP-inhoud van die hartspierweefsel is die resultaat van die balans tussen die produksie en verbruik van ATP. 'n Daling in die konsentrasie van ATP kan 'n verlaagde produksie en/of 'n verhoogde verbruik daarvan beteken. ATP as sodanig gee egter nie onder alle omstandighede 'n realistiese weerspieëling van die verandering in die energiesituasie nie. Dit is byvoorbeeld gevind dat die verandering van ATP en KrP tydens 'n verhoogde aanvraag van energie in dieselfde verhouding plaasvind, terwyl iskemiese toestande 'n aansienlik groter daling van KrP tot

gevolg het (Gudbjarnason et al., 1970). Om hierdie rede is besluit om die inhoud van sowel ATP as KrP in die hartspierweefsel van gousiekteskaap na te gaan. Hierdeur kon dan ook 'n indirekte aanduiding van die oorsaak van die energiemetaboliese versteuring verkry word.

5.2.2 Metodes

Ekstraksie van ATP en KrP (en anorganiese fosfaat)

ATP en KrP is met enkele aanpassings gesamentlik geëkstraheer volgens die metode soos deur Furchgott en de Gubareff (1956) beskryf. Ongeveer 70 mg verpoeierde hartspierweefsel is in 'n nylonbuis, wat vooraf in vloeibare stikstof afgekoel is, afgeweeg. Afweging is gedoen met die afgekoelde buis in 'n noupassende opening van 'n polistireenblokkie waardeur verwarming van die buis en vogkondensasie daarteenaan voorkom is. Die buis met monster is hierna in 'n bak met droë ys geplaas en 1,5 ml fyngestampde veryste perchloorsuur (0,3 M) by die weefselmonster gekrap, en deeglik vermeng. Die buis is vervolgens in 'n noupassende opening van 'n gekoelde aluminiumblok geplaas, en die inhoud voortdurend geroer totdat die perchloorsuur ontdooi was. Hierna is dit vir nog 'n verdere vyftien minute geroer en daarna vir 15 minute by 4°C teen 25 000xg gesentrifugeer. Van die supernatant is 1,0 ml tot 5 ml met water by 4°C verdun.

Alle monsters is in duplikaat gedoen en 'n standaard bevattende 160 µg KrP en 200 µg ATP is terselfdertyd aan dieselfde ekstraksieprosedures onderwerp. Hierdie omslagtige ekstraksieprosedure is noodsaaklik om te verseker dat die minimum hidroliese van ATP en KrP plaasvind.

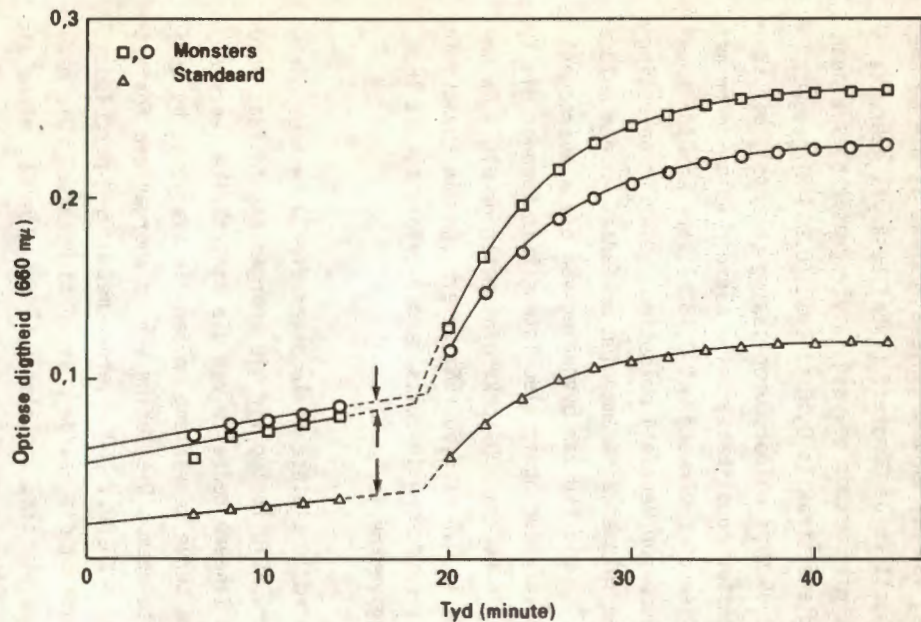
Bepaling van KrP (en anorganiese fosfaat)

Vir die bepaling van KrP en anorganiese fosfaat is die metode soos deur Furchgott en de Gubareff (1956) beskryf, gebruik, behalwe dat die mikrometode gewysig is vir groter hoeveelhede. By 4,0 ml van die ekstrak is 0,16 ml CuSO_4 (0,004 M) gevoeg. 2,4 ml van 'n 0,05 M perchloorsuuroplossing (blanko), die standaard en die monster (duplikaat) is in hierdie volgorde en met half-minuut tussenposes vermeng met 0,48 ml vars bereide koue FSM-(Fiske en Subbarow Mengsel) oplossing. Die FSM-oplossing bestaan uit twee volumes 2,5% ammonium-molibdaat en een volume reduseermiddel.^{*} Die tyd van byvoeging van die kleurreagens is genoteer en die verandering in kleurintensiteit teenoor die tyd is by 660 m μ in 'n Beckman DU-spektrofotometer gevolg. Na ongeveer 12 minute is 0,3 ml H_2SO_4 (5N) by elk van die kuvette ingeroer, en die verandering in OD is verder gevolg totdat 'n konstante lesing verkry is.

In figuur 5.1 word 'n tipiese verloop van die OD teenoor die tyd geïllustreer. Die lesing vir die anorganiese fosfaat word verkry deur die lineêre gedeelte van die aanvanklike (eerste 12 minute) kurwe terug te verleng en dan die afsnypunt by tyd= 0 op die OD-as te neem. Die lesing van 'n anorganiese fosfaatstandaard (0,007 M KH_2PO_4 , 60 \times verdun met 0,05 M perchloorsuur) word gebruik om die waarde daarvan te bereken. Die maksimum lesing na afplating van die verandering in OD, minus die lesing verkry vir die anorganiese fosfaat, gee die lesing vir KrP.

* reduseermiddel - 0,2% 1-amino-2 naftol-4 sulfoonsuur, 1,2% Na_2SO_3 , 12% NaHSO_3

** $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$



Figuur 5.1 Verandering in optiese digtheid as die resultaat van kreatienfosfaat hidrolise, soos geles teenoor 'n reagensblanko. Die monsters- en standaard is by tyd=0 met die kleurreagens (FSM) gemeng en 5 N H_2SO_4 op die tydstip soos deur die pyltjies aangedui, bygevoeg.

Meting van ATP

Vir die meting van ATP is basies die metode van Strehler en McElroy (1957) gevolg. Vuurvliegglanternekstrak (Sigma Chemical Company) is in 10 ml water opgeskud. Hiervan is 1 ml in 'n kwartz-kuvet geplaas en deur middel van 'n waterbad by 'n temperatuur van 20°C gebring. Die kuvet is hierna in 'n Beckman DU-spektrofotometer waarvan die spleet heeltemal toe was, geplaas.

Die monsterekstrak is nog 'n verdere tien keer met water verdun en hiervan is 0,2 ml met behulp van 'n mikropipet op 'n reproduceerbare wyse by die vuurvliegglanternekstrak geblaas. Die verandering in intensiteit van die fluorisensie-straling wat hierdeur ontstaan, is geregistreer, en die maksimum intensiteit van straling eweredig aan die konsentrasie ATP geneem.

5.2.3 Resultate

Die ATP- en KrP-konsentrasies vir verskillende groepe proefdiere word in tabelle 5.1 en 5.2 saamgevat.

'n Betekenisvolle daling in die waardes van ATP en KrP is vir die hartspierweefsel van gousiekteskaap gevind wanneer dit met die waardes van kontroleskaap vergelyk is ($p < 0,01$). Dit is gevind vir elkeen van die individuele groepe sowel as vir die totale gousiekteskaap gesamentlik (tabel 5.1). Die daling in KrP vir sterwende gousiekteskaap (tabel 5.2) was heelwat groter, sodanig dat die waarde daarvan selfs betekenisvol laer was as dié vir gousiekteskaap ($p < 0,05$). Die daling in ATP was egter vir albei gevalle dieselfde (tabel 5.2).

Tabel 5.1 ATP- en KrP-inhoud van die hartspierweefsel van gousiekte- en kontroleskaap

Groep No.	Aantal proefdiere	ATP (μ mole/g nat weefsel)	KrP (μ mole/g nat weefsel)	ATP:KrP
KONTROLE				
I	7	5,60 \pm 0,49	11,33 \pm 1,10	0,51 \pm 0,05
II	5	5,94 \pm 0,09	11,48 \pm 0,25	0,52 \pm 0,01
III	13	5,91 \pm 0,12	10,92 \pm 0,27	0,54 \pm 0,01
GOUSIEKTE				
I	8	3,58 \pm 0,24*	5,86 \pm 0,81*	0,76 \pm 0,19
II	6	4,50 \pm 0,16*	7,35 \pm 0,56*	0,63 \pm 0,05
III	8	4,79 \pm 0,29*	7,10 \pm 0,49*	0,68 \pm 0,03*
		**	**	**

* p-waardes van 0,05 of minder vir betekenisvolle verskil (student-t-toets) vir elke gousiektegroep ten opsigte van die ooreenstemmende kontrolegroep

** p-waardes van 0,05 of minder vir betekenisvolle verskil (variensie-analise) vir totale gousiekteskaap ten opsigte van die totoale kontroleskaap

Die daling van ATP in die hartspierweefsel van gousiekteskaap het gepaard gegaan met 'n groter persentasie daling van KrP. Dit het 'n sodanige styging van die ATP:KrP-verhouding tot gevolg gehad dat die ATP:KrP-verhouding van gousiekteskaap betekenisvol hoër ($p < 0,02$, tabel 5.1) was as die van kontroleskaap. In die geval van sterwende gousiekteskaap was die styging in die ATP:KrP-verhouding nóg groter, en wel in so 'n mate dat die ATP:KrP-verhouding vir sterwende gousiekteskaap betekenisvol hoër was as die van gousiekteskaap ($p < 0,02$, tabel 5,2).

Tabel 5.2 ATP- en KrP-inhoud van die hartspterweefsel van sterwende gousiekteskaap† wat onder narkose beswyk het

Skaap No.	Groep No.	ATP (μ mole/g nat weefsel)	KrP (μ mole/g nat weefsel)	ATP:KrP
1	I	2,8	2,4	1,16
2	II	4,7	4,6	1,02
3	II	4,6	5,9	0,78
4	III	4,7	1,3	3,60
		4,2 \pm 0,47	3,6 \pm 1,04	1,64 \pm 0,66
		NB	*	*

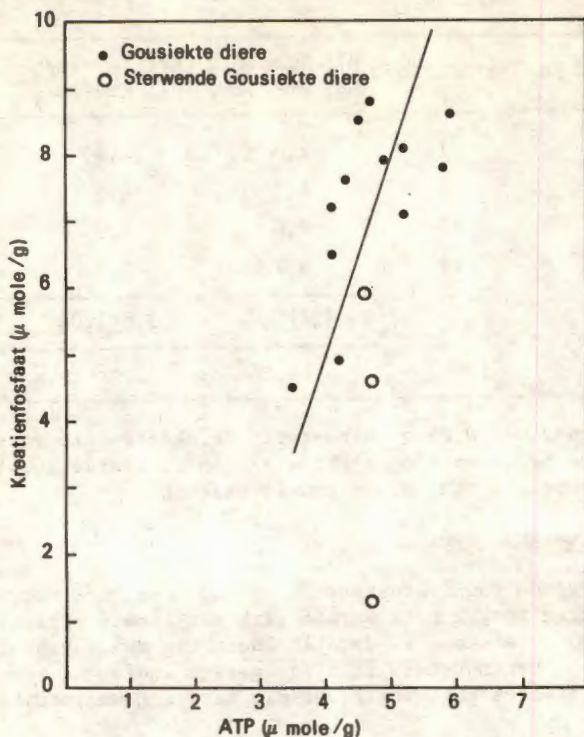
* waardes van 0,05 of minder vir betekenisvolle verskil (Wilcoxon se twee-steekproeftoets) van sterwende gousiekteskaap ten opsigte van totale gousiekteskaap.

NB Nie betekenisvol

† Sterwende gousiekteskaap is skaap wat net voor of tydens narkose beswyk het, vermoedelik aan finale versaking van die hart. Die skaap is dadelik kunsmatig met suurstof gerespireer. Hartmonsters is slegs geneem indien 'n redelike mate van fisiese aktiwiteit van die hart nog waarneembaar was.

Die korrelasie tussen ATP en KrP van die hartspterweefsel van die gousiekteskaap van groepe II en III word in figuur 5.2 aangedui. Die groter daling van KrP as ATP blyk duidelik uit die lineêre regressielyn wat deur die verskillende punte gepas is (Alhoewel die waardes van die sterwende gousiekteskaap aange-
toon is, is dit nie in berekening gebring vir die verkryging van die regressielyn se afsnitpunte nie). By 'n ATP-waarde van 6,0 word 'n ATP:KrP-verhouding van 0,54 verkry, terwyl 'n ATP-waarde van 4,0 ooreenstem met 'n ATP:KrP-verhouding van 0,80. Dit is verder van belang dat slegs een skaap 'n ATP-waarde van

laer as 4,1 het.



Figuur 5.2 Verband tussen die ATP- en kreatiefosfaatinhoud van die hartspierweefsel van gousiekteskaap

5.2.4 Bespreking

Die resultate toon 'n verlaging van die ATP- en KrP-inhoud van die hartspierweefsel van gousiektediere. Die betekenisvolheid van die bevinding word verhoog deur die feit dat dit met drie afsonderlike groepe proefdiere gedurende drie afsonderlike

seisoene verkry is. Dit toon ook duidelik dat die effek van die gousiektemateriaal ten opsigte van die energiereserwes in die hartspierweefsel van gousiekteskaap met hartversaking onder lede, 'n konstante effek is wat waarskynlik nie deur eksterne faktore soos seisoensinvloede op die plant beïnvloed word nie.

Die daling in KrP-inhoud was aansienlik meer as die daling in ATP met 'n gevolglike styging van die ATP:KrP-verhouding, 'n verskynsel wat ook vir ander tipes van hartversaking waargeneem is (Feinstein, 1962; Fox et al., 1965; Lochner et al., 1970). Hierdie verskynsel is ook by sterwende gousiekteskaap opgemerk, met die verskil dat die ~~styging van die ATP:KrP-verhouding~~ vir sterwende gousiekteskaap net baie meer, vanweë die groter daling in KrP was. Dit toon duidelik die verskil in die staat van energiemetabolisme tussen die twee groepe proefdiere, moontlik as gevolg van uitgebreide komplikasies in die finale versakingsfase van die sterwende groep. Die feit dat byna al hierdie skaap ATP-waardes van groter as $4.1 \mu\text{mole}$ per gram weefsel gehad het, mag moontlik meer ligwerp op die aard van die energiemetaboliese afwyking tydens gousiekte.

Hierdie gegewens dui dus onomwonde op 'n wanbalans tussen produksie en verbruik van energie, sodanig dat die produksie van energie nie tred hou met die verbruik daarvan nie. Die hartspier is uitsluitlik op aerobiese energieproduksie aangewese, en enige ondersoek na 'n abnormale produksie van energie sal dus heel logies by die mitochondriale produksie van energie begin. Ten einde 'n moontlike abnormale produksie van energie nader te karakteriseer, is benewens 'n ondersoek van die mitochondriale funksie, ook sekere *in vivo*-metings van bepaalde intermediêre metaboliëte wat die aktiwiteit van anaerobiese metabolisme sal weerspieël, nodig.

5.3 Anaerobiese energiemetabolisme

5.3.1 Inleiding

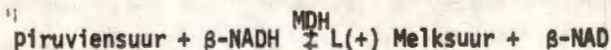
Die toename in die verhouding van ATP:KrP tydens 'n verlaging van die energiereserwes in die hartspierweefsel van gousiekte-diere, dui moontlik op 'n verlaagde beskikbaarstelling of benutting van suurstof (Gudbjarnason et al., 1970). Ten einde bevestiging te verkry vir so 'n toestand, asook om die aard van die metaboliese defek verder toe te lig, is die konsentrasies van melksuur, anorganiese fosfaat en NADH in die hartspierweefsel bepaal.

5.3.2 Metodes

Laktaat

Die laktaatinhoud van die hartspierweefsel is ensiematies bepaal soos beskryf in die Sigma tegniese bulletien no. 826-UV, Oktober 1968, en aangepas vir hartspierweefsel.

Die beginsel van die metode berus op die volgende reaksie



In die teenwoordigheid van 'n oormaat $\beta\text{-NAD}$ verloop die reaksie van regs na links. Om die reaksie volledig te laat verloop word die gevormde piruviensuur met hidrazien gekomplekseer. Die hoeveelheid $\beta\text{-NADH}$ wat gevorm word, is eweredig aan die konsentrasie melksuur wat aanvanklik teenwoordig was en kan spektrofotometries by 340 m μ gemeet word.

Die ekstraksie van laktaat is op presies dieselfde wyse gedoen as beskryf onder 5.2.2 vir ATP en KrP, behalwe dat 100-250 mg verpoëerde hartspierweefsel gebruik is en dit geëkstraheer is met 1 ml 8% perchloorsuur. Geen verdunning van die supernatant is gedoen nie.

Vir die ensiematiese omsetting van melksuur na piruviensuur en die vorming van β -NADH, is 'n gebufferde ensiemoplossing net voor gebruik opgemaak deur 4,0 ml water, 2,0 ml glisienbuffer (Sigma 826-3) en 0,1 ml melksuur-dehidrogenase (MDH) ensiem-suspensie (Sigma 826-6) met 10 mg β NAD (Sigma 260-110) in die verskafte houer te vermeng. By 2,8 ml hiervan is 0,2 ml melksuur-ekstrak gevoeg, gevolg deur 'n 60 minute inkubasie by 37°C. Die monster is in duplikaat gedoen en vir 'n blanko en 'n standaard is respektiewelik 0,2 ml 8% HClO₄ en 0,2 ml standaardoplossing (0,048 mg) gebruik. Na inkubasie is die gevormde β -NADH, wat eweredig is aan die melksuur wat aanvanklik teenwoordig was, teenoor die blanke by 340 m μ in 'n Beckman DU-spektrofotometer gelees.

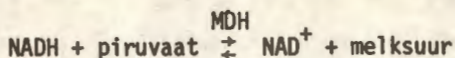
Anorganiese fosfaat

Die anorganiese fosfaatinhoud van die hartspierweefsel is soos reeds onder 5.2.2 bepaal beskrywe.

NADH

Vir die bepaling van NADH is die metode van Klingenberg (1963) gevolg. Die bepaling berus op dieselfde reaksie as die bepaling van melksuur, behalwe dat dit in hierdie geval vanweë die afwesigheid van 'n oormaat NAD en die teenwoordigheid van

'n oormaat piruviensuur, in die rigting van melksuur verloop.



Die grootte van die afname in OD by 340 m μ weerspieël die hoeveelheid NADH wat omgesit is na NAD⁺, en is dus 'n direkte maatstaf van die hoeveelheid NADH wat in die ekstrak teenwoordig was.

Die metode van Klingenberg is met wysigings in die tegniek soos volg uitgevoer: 2 ml alkoholiese KOH is in 'n Kolberbuis met 'n geslypte prop gevoeg en vir ongeveer twee minute in 'n waterbad by 70°C verhit. Hierna is 100-400 mg van die verpoeierte hartspierweefsel so vinnig moontlik met behulp van 'n lang spatel oorgedra en opgeskud met die alkoholiese KOH, waarna die prop gesluit en die NADH vir 'n verdere een minuut in die waterbad by 70°C geëkstraheer is. Hierna is dit onmiddellik in 'n bak met ys gedruk en die buis gedraai vir vinnige afkoeling. Na ongeveer tien minute is die KOH geneutraliseer met 'n tri-etanolamien-hidrochloried-fosfaatbuffer tot 'n pH van 7,8. Nadat dit vir ongeveer 30 minute by kamertemperatuur gestaan het, is dit vir 15 minute by 20 000 \times g gesentrifugeer.

Vir die ensiematiese reaksie is by 2,0 ml van die supernatant in 'n kwartskuvet, 10 μ l piruvaatoplossing (1,0 M) gevoeg en die absorpsielesing by 340 m μ op 0,400 optiese digtheidseenhede ingestel. Hierna is 10 μ l MDH* suspensie (0,5 mg proteïen/ml) ingeroer en die afname in die OD genoteer. Die Δ OD is eweredig aan die konsentrasie NADH.

* MDH - vanaf Boehringer Mannheim.

Elke monster is in vyfvoud gedoen, met hoeveelhede van die weefsel wat gevarieer het tussen 100-400 mg. Die ΔOD is grafies teenoor die massas van die weefsel uiteengesit en 'n verteenwoordigende lesing is vanaf 'n reguit lyn wat die punte die beste bevredig, verkry. Die waarde is bereken deur die lesing te vergelyk met dié van 30 μ mole standaard. Die weefselmassa vir die berekening is verkry deur die sediment na sentrifugering vir 24 uur by 110°C te droog, waarop 'n massabepaling gedoen is. Die nat massa is bereken deur gebruikmaking van die persentasie vog soos reeds bepaal in 4.2.

5.3.3 Resultate

Die verandering in die inhoud van die hartspierweefsel ten opsigte van laktaat, anorganiese fosfaat, en NADH tydens gousiekte word in tabel 5.3 aangetoon.

'n Statisties betekenisvolle styging ($p < 0,05$) in die laktaatinhoud van die hartspierweefsel van gousiekteskaap teenoor kontroles, is aangetoon. Geen betekenisvolle verandering kon egter vir die anorganiese fosfaat- en NADH-inhoud van gousiektehartspierweefsel aangetoon word nie.

Tabel 5.4 gee die waardes van individuele sterwende gousiekteskaap ten opsigte van die laktaat, anorganiese fosfaat- en NADH-inhoud van die hartspierweefsel.

Individuele waardes ten opsigte van laktaat, anorganiese fosfaat en NADH vir sterwende gousiekteskaap dui op 'n drastiese toename van die anaerobe toestand tydens wat waarskynlik die finale fase van versaking is.

Tabel 5.3 Laktaat-, anorganiese fosfaat-, en NADH-inhoud van die hartspierweefsel van kontrole- en gousiekteskaap.

Groep No.	Laktaat (μ mole/g nat weefsel)	Anorganiese fosfaat (μ mole/g nat weefsel)	NADH (μ mole/g nat weefsel)
KONTROLE			
II	1,80 \pm 0,38(5)	2,34 \pm 0,27(5)	102,2 \pm 20,3(4)
III	1,36 \pm 0,10(13)	2,85 \pm 0,19(13)	129,9 \pm 7,4(11)
GOUSIEKTE			
II	2,30 \pm 0,56(6)	2,40 \pm 0,22(6)	118 \pm 7,6(5)
III	3,09 \pm 0,16(7)*	3,25 \pm 0,31(8)	145 \pm 22,3(8)
	* *	NB	NB

* p-waardes van 0,05 of minder vir betekenisvolle verskil (student-t-toets) vir elke gousiektegroep ten opsigte van die ooreenstemmende kontrolegroep.

* * p-waardes van 0,05 of minder vir betekenisvolle verskil (variensie-analise) vir totale gousiekteskaap ten opsigte van die totale kontroleskaap.

Die syfer in hakies dui die getal skaap in die betrokke groep aan.

5.3.4 Bespreking

'n Toename in die laktaatinhoud van hartspierweefsel word algemeen aanvaar as 'n aanduiding van 'n verlaagde suurstofvoorsiening aan die weefsels. Aangesien 'n verlaagde vermoë om suurstof te benut dieselfde metaboliese effek tot gevolg behoort te hê, kan die styging van laktaat in die hartspierweefsel van gousiektediere enige van bogenoemde twee defekte be-

teken. 'n Verlaagde benutting van suurstof sal noodwendig 'n defek van die mitochondriale energieproduksiesisteem beteken.

Die styging in laktaat is nie noodwendig 'n realistiese weerspieëling van die afname in aerobiese energieproduksie nie, aangesien 'n uitwaartse diffusie daarvan na die bloedstroom 'n minder uitgesproke styging daarvan in die hartspierweefsel tot gevolg het (Mathur & Case, 1973). Die styging daarvan word ondersteun deur 'n geringe toename (nie-betekenisvol) van anorganiese fosfaat en NADH.

Tabel 5.4 Laktaat-, anorganiese fosfaat- en NADH-inhoud van die hartspierweefsel van sterwende gousiekteskaap

Skaap no.	Groep no.	Laktaat ($\mu\text{mole/g nat weefsel}$)	Anorganiese fosfaat ($\mu\text{mole/g nat weefsel}$)	NADH ($\text{nmole/g nat weefsel}$)
1	I	-	-	-
2	II	3,0	4,05	289
3	II	-	4,70	-
4	III	10,4	6,80	348
		<u>6,7+3,7</u>	<u>5,18+0,83</u>	<u>318+30</u>

5.4 Aerobiese energiemetabolisme

5.4.1 Inleiding

Die hartspier is vir bykans al sy energie vir die doeleindes van die kontraksieproses aangewese op aerobiese energieproduksie deur die mitochondria (Schwartz et al., 1973). 'n Toe-

name in laktaat en ATP:K_rP-verhouding in die hartspierweefsel van gousiekte diere dui op 'n moontlike defek hiervan, en 'n ondersoek na die energieproduksiefunksie van die mitochondria van gousiekte diere is dus van belang.

Die aspekte van die mitochondriale funksie waaraan aandag gegee is, is suurstofopname en die P:O-verhouding van geïsoleerde mitochondria.

5.4.2 Metode

Isolering van mitochondria

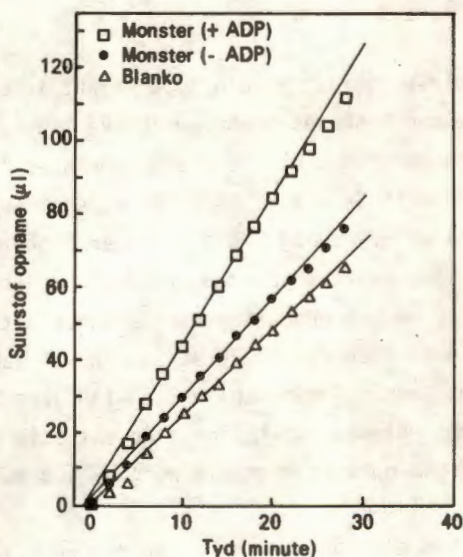
Mitochondria is volgens die metode van Sordahl et al., (1971) geïsoleer. Alle isolasieprosedures is uitgevoer by 4°C.

Een gram van die fyngeknipte hartspierweefsel is met 'n Ultra-Turrax, drie keer vir 40 sekondes, in 12 volumes KEA medium (0,18 M KCl, 10 mM EDTA, 0,5% Albumien*, pH 7,4) gehomogeniseer. Die homogenaat is vervolgens vir tien minute lank by 1 200 × g gesentrifugeer. Die mitochondria is hierna uit die supernatant geïsoleer deur vir 15 minute by 10 000 × g te sentrifugeer. Die mitochondriale sediment is in die helfte van die vorige volume KEA-medium gesuspendeer, en weer teen 10 000 × g vir agt minute gesentrifugeer. Hierdie prosedure is nog een keer herhaal, waarna die mitochondria in 1,0 ml KEA-medium gesuspendeer is.

* Bees serum-albumien fraksie V, vanaf Sigma Chemical Company is gebruik.

Suurstofopname

2,0 ml gefortifiseerde inkubasiemedium bestaande uit: 8 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 12 mM NaF, 20 mM KH_2PO_4 , 15 mM α -ketoglutaraat, 0,015 mM sitochroom C, 0,5 mM NAD, 70 mM sukrose, en 0,3 mM EDTA, pH 7,4, is in 'n Gilsonreaksiefles gepipetteer. Behalwe vir die teenwoordigheid van sukrose, EDTA en α -ketoglutaraat as die substraat, is die medium dieselfde as wat deur Lochner et al. (1975) gebruik is. 0,5 ml van die mitochondriale suspensie in KEA-medium is by die inkubasiemedium gepipetteer en vir 'n tydperk van 15 minute by $37^{\circ}C$ in die waterbad van 'n Gilson-respirometer geëkwilibreer. Hierna is



Figuur 5.3 Opname van suurstof deur geïsoleerde mitochondria van skaaphartspierweefsel in die teenwoordigheid van ADP en die afwesigheid van ADP in die reaksiemengsel.

die reaksie gefinisieer deur die byvoeging van 2 mg heksokinase wat opgelos is in 0,2 ml van 'n 0,25 M glukose-oplossing, en 0,05 ml ADP, wat 'n eindkonsentrasie van 0,3 mM gee. Lesings is elke twee minute oor 'n tydperk van 28 minute geneem. Die blanko het presies dieselfde samestelling gehad, maar dan sonder mitochondria. Na 30 minute is die reaksie beëindig deur die byvoeging van 0,2 ml yskoue HClO_4 , nadat die reaksiemengsel vir 30 sekondes op ys afgekoel is. Die presipitaat is deur sentrifugering verwyder en die supernatant is vir die bepaling van die vry anorganiese fosfaat gebruik. Figuur 5.3 dui 'n tipiese verloop van die suurstofopname in die teenwoordigheid en in die afwesigheid van ADP aan.

Anorganiese fosfaat

Die vry anorganiese fosfaat in die supernatant is bepaal volgens die metode van Fiske en Subbarow (Fiske & Subbarow, 1925), met die nodige aanpassings om die regte kondisies te verkry. By 1,0 ml supernatant is 0,3 ml 5N H_2SO_4 , 0,24 ml CuSO_4^* , 0,72 ml FSM en 1,0 ml water gevoeg. Die Fiske en Subbarow mengsel (FSM) is berei soos beskryf deur Furchgott en de Gubareff (1956). Een volume van 'n reduserende reagens bestaande uit 0,2% 1-amino-2-naftol-4-sulfoonsuur, 1,2% Na_2SO_3 en 12% NaHSO_3 is net voor gebruik met twee volumes van 'n 2,5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oplossing gemeng. Kleurontwikkeling vind volledig binne tien minute plaas en die optiese digtheid word by 660 m μ gemeet.

Die verskil tussen die fosfaatinhoud van die reaksiemengsel met en sonder mitochondria gee die hoeveelheid fosfaat wat vir oksidatiewe fosforilering gebruik is, aan.

* $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,004M

Mitochondriale proteïen

Die mitochondriale proteïen is bepaal volgens die biuret-metode. Bees-albumien is as standaard gebruik.

5.4.3 Resultate

'n Statisties betekenisvol ($p < 0,05$) laer opname van suurstof is gevind vir mitochondria wat geïsoleer is uit die hartspierweefsel van gousiekteskaap teenoor dié wat geïsoleer is uit die hartspierweefsel van kontroleskaap (tabel 5.5). Alhoewel geen betekenisvolle verskil ten opsigte van die opname van anorganiese fosfaat aangetoon kon word nie, toon die gemiddelde waarde dieselfde neiging (daling) as die suurstofopname. Die resultaat hiervan is naamlik 'n P:O-verhouding, wat ook nie betekenisvol verskil van die kontrolewaarde nie (tabel 5.5). Oor die algemeen was die P:O-waardes van gousieke sooswel as van kontroles laer as wat teoreties verwag word. Dit mag die gevolg wees van sub-optimale isolering van mitochondria, of van mitochondria wat nie volledig funksioneel aktief is nie, onder andere weens beskadiging tydens homogenisering met die Ultra-Turrax of as gevolg van sub-optimale inkubasie kondisies.

5.4.4 Bespreking

Die verlaagde opname van suurstof deur geïsoleerde mitochondria van gousiekteharde, dui op 'n verlaagde benutting van suurstof. Dit mag moontlik 'n verklaring bied vir die verlaging van die hart se energiereserwes en gepaardgaande toename in die anaerobiese metabolisme soos afgelei uit 'n toename in laktaat-inhoud en ATP:KrP-verhouding. 'n Normale P:O-verhouding is 'n indikasie dat dit nie toegeskryf kan word aan

Tabel 5.5 *Aktiwiteit van oksidatiewe fosforilering van mitochondria getsoleer vanuit die hartspierweefsel van gousiekte- en kontroleskaap van groep III (α -keto-glutaraat as substraat)*

Skaap no.	Suurstofopname (μ atome/mg proteïen/ 20')	Anorganiese fosfaat opname (μ mole/mg proteïen/20')	P:O-verhouding
KONTROLE			
1	2,63	6,70	2,55
2	2,78	6,30	2,27
3	1,62	3,23	1,99
4	1,99	3,90	1,96
5	1,89	3,85	2,04
6	2,46	4,70	1,91
7	2,49	4,45	1,79
	2,27 \pm 0,16	4,73 \pm 0,49	2,07 \pm 0,10
GOUSIEKTE			
8	1,96	4,06	2,07
9	1,80	3,83	2,13
10	1,84	4,92	2,67
11	1,59	3,74	2,35
12	1,46	3,03	2,07
	1,73 \pm 0,09	3,92 \pm 0,30	2,26 \pm 0,11
	*	NB	NB

* $p < 0,05$ vir betekenisvolle verskil (Wilcoxon se twee-steekproef-toets) vir gousiekte ten opsigte van kontroleskaap.

NB Nie betekenisvol.

'n ontkoppeling van die oksidatiewe fosforilerings proses nie. Trouens, die gemiddelde waarde vir gousiekte diere lê aan die hoër kant (nie-betekenisvol), wat 'n aanduiding van kompensasie vir hoër doeltreffendheid mag beteken. 'n Sodanige verandering van die P:O-verhouding is vir gehipertrofeerde nie-ver=saakte harte gevind (Lindenmayer et al, 1971).

5.5 Samevattende bespreking

Die gegewens in hierdie ondersoek dui op 'n verlaagde mitochondriale suurstofverbruik gepaardgaande met 'n toename in die anaerobe staat van die hartspierweefsel van gousiekte diere. Hierdie toestand bied 'n gedeeltelike verklaring vir die verlaagde inhoud van ATP en kreatienfosfaat en kategoriseer gousiekte volgens die hipotese van Olson en Schwartz, (1951) as 'n hartversaking met 'n molekulêre defek op minstens die vlak van energieproduksie. Aangesien die ATP-inhoud van die hartspierweefsel egter die balans weerspieël ten opsigte van produksie en verbruik, is dit nodig om ook laasgenoemde sisteem te ondersoek om sodoende die hipotese van Olson en Schwartz in sy geheel te dek.

HOOFSTUK 6

**Aktiwiteit van die miokardiale kontrakiele-proteïen-
sisteem as 'n energie-benuttingsisteem**

6.1 Algemene inleiding

In die vorige hoofstuk is vasgestel dat 'n verlaagde konsentrasie van ATP en KrP in die hartspierweefsel van gousiekteskaap voorkom en dat dit minstens gedeeltelik toegeskryf kan word aan die verlaagde aerobiese fase van biologiese oksidasie. Hierdie waarneming pas in die hipotese van Olson en Schwartz (1951), en toon dat gousiekte, wat 'n vorm van kongestiewe hartversaking is, aansluit by die breë teorie van hartversaking. Ten einde die hipotese in sy geheel te dek, is dit egter nodig om nie net die energie-produksie nie, maar ook die energie-benuttingsstelsel te ondersoek.

Die kontraktiele-proteïen-sisteam is kwantitatief gesien 'n belangrike verbruiker van energie in spierweefsel en 'n defek daarvan kan 'n belangrike invloed uitoefen op die konsentrasie van ATP en KrP. Bestudering van hierdie sisteam is verder ook van belang, aangesien dit 'n sentrale deel van die kontraksiestelsel vorm. 'n Defek in hierdie sisteam sal ongeag die invloed daarvan op die konsentrasie van ATP en KrP, noodwendig die kontraktiliteit van die hartspier beïnvloed.

6.2 Superpresipitasie

6.2.1 Inleiding

Wanneer klein hoeveelhede ATP by 'n suspensie van aktomiosien in gel-vorm in die teenwoordigheid van magnesium gevoeg word, vind 'n toename in troebelheid van die medium plaas. Hierdie verskynsel is bekend as *superpresipitasie* (Katz, 1970). Indien hoë konsentrasies van ATP egter by die medium gevoeg word,

vind 'n vermindering in troebelheid plaas. Dit staan bekend as *verheldering* (Katz, 1970). 'n Karakteristieke verloop van die superpresipitasieproses behels gewoonlik albei bogenoemde verskynsels. Met die inisiëring van superpresipitasie deur die byvoeging van ATP ondergaan die medium eers 'n voorafgaande verhelderingsfase, om daarna oor te gaan in die fase van superpresipitasie. Hierdie twee verskynsels kan eksperimenteel nagegaan word deur meting van die ligdeurlating met behulp van 'n spektrofotometer (Ebashi, 1961). Gedurende die verhelderingsfase vind 'n toename in ligdeurlating plaas, wat omkeer by die aanvang van die superpresipitasiefase. Die verandering in troebelheid word weerspieël deur die verandering in optiese digtheid.

Merin et al. (1974) beskryf die meganisme van die superpresipitasieproses as 'n koppeling van willekeurig geöriënteerde aktien- en miosienfilamente, waardeur deeltjies van 'n toeneemende grootte gevorm word. Dit veroorsaak 'n toenemende mate van ligverstrooiing wat die optiese digtheid van die medium laat toeneem. Dit vind egter nie onmiddellik plaas nie, aangesien die aktomiosien eers gedissosieer word deur die ATP wat 'n interaksie tussen die miofilamente voorkom. Dit is hierdie dissosiasie wat verantwoordelik is vir die verheldering of afname in optiese digtheid aan die begin. Die duur van die verhelderingsfase word bepaal deur die ATP-konsentrasie en die tempo van ATP-hidrolise, aangesien assosiasie van die filamente nie sal plaasvind alvorens die ATP-konsentrasie nie verminder is tot 'n bepaalde drempelwaarde nie. Op hierdie stadium word 'n vinnige toename in ATPase-aktiwiteit en optiese digtheid bemerk. Hierdie siening word algemeen aanvaar, alhoewel 'n ander interpretasie van superpresipitasie is dat dit die gevolg van 'n inkrimping en dehidrasie van die akto-

miosien-gel is (Ebashi, 1961; Katz, 1970). Basies word dit egter aanvaar as 'n interaksie tussen aktien en miosien, waar 'n toename in troebelheid ooreenstem met kontrakisie, terwyl 'n afname (verheldering) ooreenstem met verslapping (Ebashi, 1961). Superpresipitasie kan dus beskou word as 'n *in vitro* model van spierkontrakisie (Hozumi, 1977). Hierdie siening word reeds sedert die ontdekking daarvan deur Szent-Györgi in 1974 gehandhaaf (Hozumi & Hotta, 1977).

Uit die voorafgaande kan dus gestel word dat die superpresipitasieverskynsel 'n fisiese weerspieëling van die fisies-chemiese interaksie van die kontraktiele-proteïene is en dat dit 'n indirekte indikasie van die kontraktiele-proteïen-ATPase is. As sodanig kan dit as 'n metode gebruik word om 'n breë indikasie van die kontraktiele-proteïenfunksie wat vergelykbaar is met die kontrakisieproses, te verkry. In hierdie ondersoek is dit toegepas op n-aktomiosien van gousiekte- en kontroleproefdiere, en die karakteristieke daarvan ontleed.

6.2.2 Metode

Ekstraksie en bewaring met gliserol

'n Monster van die ventrikelweefsel is, soos onder 3.6 en 6.4.2 respektiewelik beskryf, in gliserol geëkstraheer en bewaar. Behalwe vir 'n verlies van Ca^{2+} -sensitiwiteit (Katz, 1970), is geen ander nadelige effekte bekend nie. Gliserolekstraksie het die voordeel dat dit die nie-miofibrillêre proteïene en membraanstrukture verwyder (Katz, 1970), waardeur kontaminasie deur die ATPases afkomstig van die ander strukture, na die byvoeging van natriumasied tot 'n minimum

beperk word.

Ekstraksie van n-aktomiosien*

Die gliserol geëkstraheerde hartspierweefsel is vooraf vier keer met 10 mM imidasool (+ 4⁰C) met tien minute wagperiodes tussen-in gewas, waarna die n-aktomiosien volgens die metode wat deur Merin et al. (1974) beskryf is, geëkstraheer is. Die weefsel is daarna met 'n Ultra-Turrax in ses volumes Weber-Edsall-oplossing (0,6 M KCl, 0,01 M Na₂CO₃, 0,04 M NaHCO₃) met 4 mM di-tiotreitol (DTT) gehomogeniseer. Die oplossing is vooraf met stikstof versadig. Die homogenaat is vervolgens tien minute lank teen 9 500 × g gesentrifugeer, die supernatant na pH 7,0 verander, en daarna stapsgewys met tien volumes koue water, bevattende 0,5 mM DTT, verdun. Die n-aktomiosien wat hierdeur na 'n wagperiode van tien minute gepresipiteer is, is vir 15 minute teen 9 500 × g gesentrifugeer en die supernatant gedekanteer. Die buise is omgekeer en oornag vir volledige dreinerings laat staan, waarna die n-aktomiosien vir superpresipitasie en ATPase metings gebruik is. Al bogenoemde prosedures is in 'n koelkamer (0-4⁰C) uitgevoer.

Afgesien van die genoemde voordele van die gliserol-ekstraksie vooraf, hou hierdie spesifieke metode vir n-aktomiosien-ekstraksie die volgende voordele in:

* n-Aktomiosien staan vir natuurlike-aktomiosien en behels die volledige kontraktiele-proteïen-sisteem. Dit sluit dus die modulerende kontraktiele-proteïene naamlik tropomiosien en troponien ook in, anders as in die geval van gesuiwerde of hersaamgestelde aktomiosien wat slegs uit aktien en miosien molekules bestaan.

1. Die vinnige afkoeling, kort ekstraksietyd, en die gebruik van DTT beskerm die sulfhidriël-groepe (Merin et al., 1974). Die kort ekstraksietyd beperk ook mitochondriale kontaminasie, aangesien mitochondriale proteïene baie minder oplosbaar as n-aktomiosien by 'n hoë ioniese sterkte (Honig & Reddy, 1973) is.
2. Gedurende die ekstraksie word nooit tris-buffer gebruik nie. Dit is gevind dat troponien en tropomiosien wat verantwoordelik is vir die oordrag van die Ca^{2+} -sensitiwiteit, tydens ekstraksie van n-aktomiosien met tris-buffer verwyder word (Schaub et al., 1967).
3. Vanweë die kort ekstraksieperiode, kan die eksperiment binne 'n dag uitgevoer word. Dit is aangetoon dat die Ca^{2+} -sensitiwiteit van n-aktomiosien van hartspier een tot drie dae na ekstraksie (Reddy & Honig, 1972) begin afneem.

Superpresipitasie

Die metode vir superpresipitasie meting is 'n modifikasie van die ligbrekingsmetode van Ebashi (1961) en is uitgevoer in 'n Beckman model DU-spektrofotometer. Die geometrie van die optiese sisteem van hierdie apparaat is sodanig dat dit 'n aansienlike mate van voorwaartse breking van die invallende lig veroorsaak, sodat superpresipitasie as 'n toename in troebelheid van die medium geregistreer word - 'n noodsaaklike vereiste vir die suksesvolle meting van superpresipitasie (Katz, 1970).

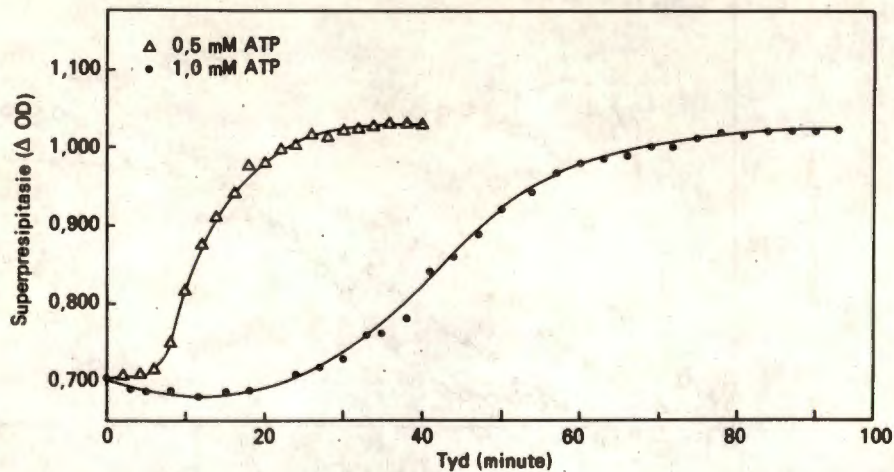
Die reaksie is getniseer deur die byvoeging van 50 μ l ATP en is nagegaan by 'n golflengte van 650 m μ en 'n temperatuur van $+ 23^{\circ}$ C. Die reaksie-medium bestaan uit 100 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 4 mM EGTA-(Ca) (pCa = 5,20), 5 mM Na-Asied, en 20 mM Imidasool (pH = 7,0). 'n Naasteby konstante massa n-aktomiosien van $+ 1$ mg proteïen/ml inkubasie-medium is vir elke meting gebruik. Gedurende die reaksie is die medium geroer om sodoende 'n meer geleidelike en herhaalbare verandering in optiese digtheid te verkry (Yasui & Watanabe, 1965). Die verandering in optiese digtheid (O.D.) is genoteer totdat 'n konstante lesing verkry is.

In figuur 6.1 word 'n tipiese voorbeeld van die verandering in optiese digtheid tydens superpresipitasie in die teenwoordigheid van 'n optimale (ATP=Mg²⁺) en 'n sub-optimale (ATP>Mg²⁺) konsentrasie van ATP getillustreer.

Die toename in die omvang van verheldering en aanvang van superpresipitasie, asook die afname in die snelheid van superpresipitasie, stem ooreen met wat verwag word indien die verhouding van ATP:Mg²⁺ bokant 1,0 verhoog word (Perry & Grey, 1956). Dit toon dus duidelik dat die meettegniek en die karakteristieke van die reaksie voldoen aan die vereistes vir superpresipitasie.

6.2.3 Resultate

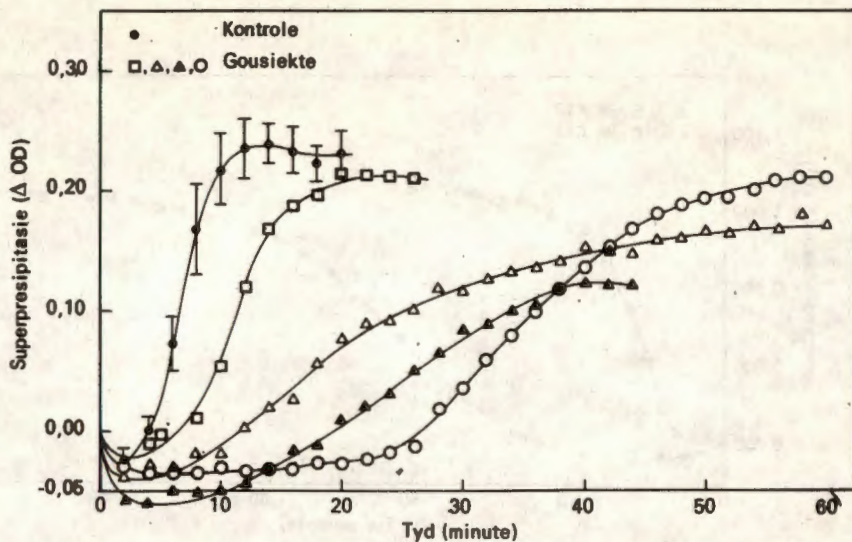
In figuur 6.2 word die verandering in optiese digtheid as 'n gevolg van superpresipitasie, aangedui teenoor die tyd vir gouesiekte- en kontrolediere van groep III.



Figuur 6.1

Die invloed van die ATP-konsentrasie (0,5 mM en 1,0 mM) op die superpresipitasie van n-aktomiosien van hartsierweefsel. (Kontrole skaap)

Kondisies: 100 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM Natrium-asied, 20 mM Imidasool, pH=7,0.



Figuur 6.2 Superpresipitasie aktiwiteit vir gousiekte- en kontrolle-n-aktomiosien.

100 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 5 mM Na-Asied, en 20 mM Imidasool (pH=7,0)
 4 mM EGTA-(Ca) (pCa=5,20).

Die superpresipitasiekurwe van n-aktomiosien, geïsoleer uit die hartspierweefsel van kontroleskaap, verteenwoordig die gemiddelde van vier afsonderlike eksperimente, terwyl die superpresipitasieeksperimente vir n-aktomiosien van gousiekte diere individueel aangedui word. Elke eksperiment, vir beide gousiekte en kontrole, is uitgevoer met n-aktomiosien wat geëkstraheer is van die hartspierweefsel van gemiddeld twee skape. 'n Opvallende verlaging in die aktiwiteit van superpresipitasie word opgemerk vir die n-aktomiosien van gousiekte diere. Sekere karakteristieke van die superpresipitasieproses van gousiekte- en kontrole-n-aktomiosien word in tabel 6.1 aangegee.

Tabel 6.1 Superpresipitasie-karakteristieke van n-aktomiosien van gousiekte- en kontrolehartse

Parameter van superpresipitasie	Kontrole	Gousiekte	Betekenisvolheid van verskil (Wilcoxon se twee-steekproeftoets)	
Omvang (maks ΔOD)	0,24 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	p<0,10	NB
Snelheid (tydsduur vir $\frac{1}{2}$ maks ΔOD , $t_{\frac{1}{2}}$, minute)	3,75 \pm 0,72	12,75 \pm 3,06	p<0,02	*
Verhelderingsfase; tydsduur (minute)	4,5 \pm 0,50	16,8 \pm 4,20	p<0,02	*
Verhelderingsfase; omvang ($-\Delta OD$)	-0,03 \pm 0,013	- 0,04 \pm 0,005	p>0,10	NB

Die data in tabel 6.1 dui op 'n toename in die duur van die verhelderingsfase sowel as 'n afname in die snelheid van superpresipitasie vir gousiekte-n-aktomiosien. Alhoewel 'n geringe toename in die omvang van verheldering sowel as 'n afname in die

omvang van superpresipitasie in die gemiddelde waardes vir gousiekteskaap opgemerk word, word hierdie verskille nie as statisties betekenisvol beskou nie. Die neigings is egter in ooreenstemming met 'n defektiewe kontraktiele-proteïen-interaksie.

6.2.4 Bespreking

Die verlaagde aktiwiteit van superpresipitasie vir gousiekte-aktomiosien soos weerspieël deur 'n vertraging in die aanvang van superpresipitasie, 'n laer snelheid van superpresipitasie, en neigings tot 'n toename in die omvang van verheldering sowel as 'n afname in die omvang van superpresipitasie, dui op 'n inaktivering van die aktien-miosien-interaksie.

Die neiging tot 'n toename in die omvang van verheldering sou moontlik as 'n voorlopige aanduiding kon dien van 'n makliker dissosiasie van gousiekte-aktomiosien deur die ATP in die medium (Katz, 1970). Die omvang van verheldering, wat 'n Ca^{2+} -onafhanklike verskynsel is (Merin et al., 1974), hou nie noodwendig verband met 'n vertraging in die aanvang van superpresipitasie en snelheid van superpresipitasie nie. Dit is in ooreenstemming met 'n bevinding van Merin et al. (1974) dat *halotaan* geen effek op die omvang van verheldering gehad het nie, alhoewel dit die aanvang van superpresipitasie vertraag het. Dit kan egter nie uitgesluit word dat die oorsaak vir 'n moontlike toename in die omvang van verheldering ook die direkte oorsaak vir die vertraagde aanvang en snelheid van superpresipitasie kan wees nie. Dit is byvoorbeeld bekend dat die byvoeging van hoë konsentrasies ATP by 'n aktomiosien-gel-suspensie in die teenwoordigheid van Mg^{2+} die troebelheid van die medium verlaag, die verhelderingsfase verleng, en die aanvang van superpresipitasie vertraag (Katz, 1970). Hierdie effekte van ATP reflekteer 'n

dissosiasie van aktien en miosien en het 'n verlaagde aanvangs-aktiwiteit van die Mg^{2+} -geaktiveerde atomiosien-ATPase tot gevolg (Katz, 1970).

Die duur van die verhelderingsfase en die snelheid van superpresipitasie is vergelykbaar met die ATPase aktiwiteit van die n-aktomiosien en word as 'n indirekte maatstaf vir die ATPase-aktiwiteit geneem (Gordon et al., 1972).

Die vergelykende resultate ten opsigte van superpresipitasie dui dus op 'n verlaagde aktien-miosien-interaksie vir n-aktomiosien van gousiekteskaap wat volgens aanduidings moontlik toegeskryf kan word aan makliker dissosiasie van gousiekte-n-aktomiosien. Hierdie afwyking gaan heel waarskynlik gepaard met 'n verlaagde ATPase-aktiwiteit.

6.3 Adenosientrifosfatase-aktiwiteit

6.3.1 Inleiding

Dit is bekend dat die vrystelling van energie vanaf ATP gedurende die kontraktiele proses beheer word deur aktomiosien-ATPase. Superpresipitasie, wat 'n indirekte aanduiding is van die kontraktiele-proteïen-ATPase-aktiwiteit, het in die voorafgaande ondersoek gedui op 'n verlaagde aktiwiteit van die mio-kardiale n-aktomiosien-ATPase vir gousiekteskaap. In hierdie ondersoek word die aktiwiteit daarvan deur middel van 'n direkte ATPase-meting nagegaan. Die karakteristieke van die moontlike defek word ondersoek deur middel van afhanklikheidsstudies ten opsigte van ATP, Mg^{2+} en Ca^{2+} .

6.3.2 Metode

n-Aktomiosien is geëkstraheer soos in 6.2.2 beskryf.

Die ATPase-aktiwiteit is in 'n reaksiedium met 'n soortgelyke samestelling as die vir superpresipitasie nagegaan, behalwe waar anders vermeld. Ca^{2+} en EGTA is egter slegs vir die Ca^{2+} -afhanklike studies bygevoeg, naamlik vir $p\text{Ca}=6,5$ en $5,20$. Mg^{2+} -afhanklike studies is met $\text{Mg}^{2+} = 0,2 \text{ mM}, 0,4 \text{ mM}, 0,6 \text{ mM}, 0,8 \text{ mM},$ en $1,0 \text{ mM}$ uitgevoer, terwyl die substraat-afhanklike ondersoek met $\text{ATP}=0,1 \text{ mM}, 0,2 \text{ mM}, 0,4 \text{ mM}, 0,6 \text{ mM}, 0,8 \text{ mM},$ en $1,0 \text{ mM}$ gedoen is.

Inkubasie is in geslote buise in 'n skudwaterbad by 37°C uitgevoer. Die reaksie is begin deur 5 ml van die ensiem-suspensie ($\pm 1 \text{ mg}$ n-aktomiosien-proteïen/ml reaksie-medium, sonder ATP) met die substraat te meng en is na presies 15 minute beëindig deur die byvoeging van 1 ml 40% TCA (0°C). Die mengsel is onmiddellik tot 0°C afgekoel, gevolg deur lae-spoedsentrifugering by $0-4^{\circ}\text{C}$.

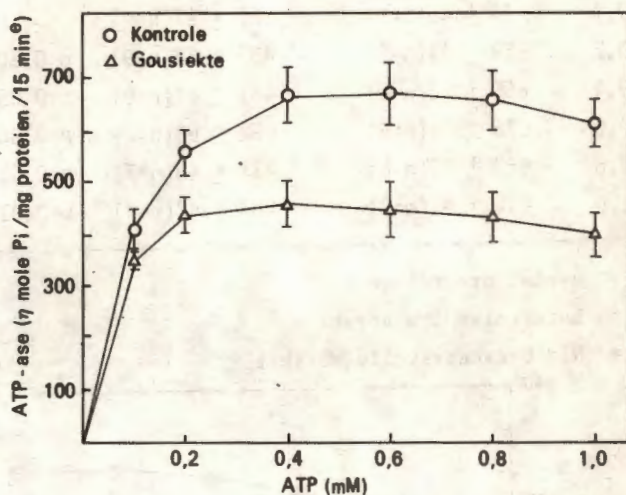
Die anorganiese fosfaat in die supernatant is volgens die metode van Fiske en Subbarow (1925) soos gewysig deur Furchgott en de Gubareff (1956) bepaal, terwyl 'n proteïen-bepaling op die n-aktomiosien-suspensie volgens die biuretmetode gedoen is.

'n Lineêre toename in OD is vir die laagste substraat-konsentrasie ($0,1 \text{ mM}$) oor 'n periode van minstens 15 minute gemeet.

6.3.3 Resultate

6.3.3.1 Die invloed van ATP

Die effek van substraatkonsentrasie op die ATPase-aktiwiteit van n-aktomiosien van gousiekte- en kontroleharte word in figuur 6.3 aangedui.



Figuur 6.3 Korrelasie van n-aktomiosien-ATPase van gousiekte- en kontroleharte met ATP

Kondisies: + 0,25 mg n-aktomiosien/ml, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM Na-asied, 20 mM imidasool, pH=7,0, temp. = 37°C, inkubasietydperk = 15 minute.

'n Duidelike verlagings van die ATPase aktiwiteit van gousiekte-n-aktomiosien is waarneembaar, wat statisties betekenisvol is by alle substraatkonsentrasies groter as 0,2 mM (tabel 6.2). Hierdie tendens neem toe met 'n toename in substraatkonsentrasie.

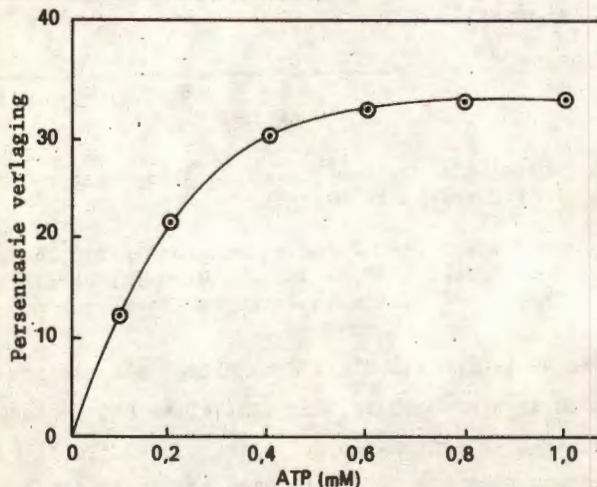
Tabel 6.2 'n Statistiese ontleding van die effek van die individuele substraatkonsentrasies op die n-aktomiosien-ATPase aktiwiteit van gousiekte- en kontrole-harte

ATP, mM	ATPase aktiwiteit (nmole/mg/15')		Betekenisvolheid van verskil (studente-t-toets)	
	kontrole	Gousiekte		
0,1	413 ± 40(n=9)	361 ± 17(n=9)	-	NB
0,2	559 ± 44(n=9)	437 ± 34(n=9)	p<0,10	NB
0,4	665 ± 52(n=9)	461 ± 44(n=9)	p<0,05	*
0,6	675 ± 59(n=8)	452 ± 54(n=7)	p<0,05	*
0,8	663 ± 60(n=8)	437 ± 48(n=7)	p<0,05	*
1,0	618 ± 44(n=9)	407 ± 42(n=9)	p<0,01	*

n = aantal proefdiere

* = betekenisvolle verskil

NB = Nie betekenisvolle verskil

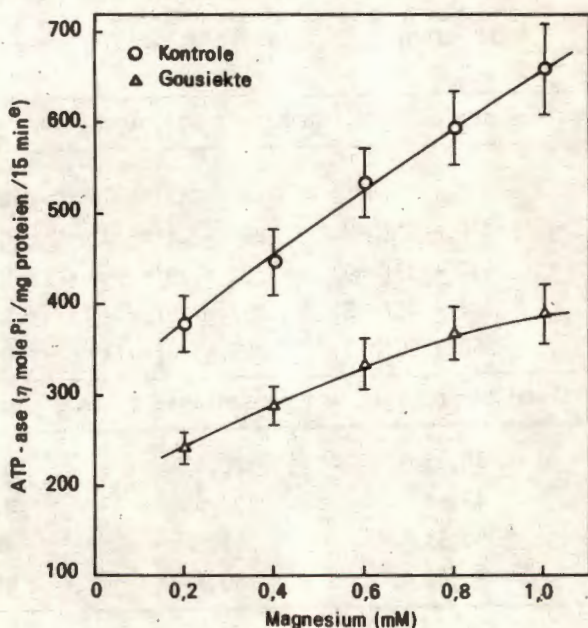


Figuur 6.4 Korrelasie van die verskil tussen gousiekte- en kontrole-ATPase waardes, uitgedruk as persentasie van die kontrolewaarde, met ATP

Wanneer die verlagingspersentasiegewys teenoor die substraatkonsentrasie weergegee word (n-aktomiosien-ATPase van gousiekte ten opsigte van kontrole)(figuur 6.4), blyk dat die toenemende omvang van die verlagings met 'n toename in ATP-konsentrasie, by die hoër konsentrasie van ATP afneem.

6.3.3.2 Die invloed van Mg^{2+}

Die Mg^{2+} -reaksie van n-aktomiosien-ATPase van gousiekte- en kontroleharte word in figuur 6.5 aangedui.



Figuur 6.5 Korrelasie van n-aktomiosien-ATPase van gousiekte- en kontrole-harte met magnesium.

Kondisies: + 0,25 mg n-aktomiosien/ml, 100 mM KCl, 1 mM ATP, 5 mM Na-asied, 20 mM imidasool, pH = 7,0, temp. = 37°C, inkubasietydperk = 15 minute

Die figuur toon 'n opvallend laer aktiwiteit van gousiekte-n-aktomiosien-ATPase aan by al die Mg^{2+} -konsentrasies wat ondersoek is, wat statisties betekenisvol is by al die Mg^{2+} -konsentrasies wat gebruik is (tabel 6.3).

Tabel 6.3 'n Statistiese ontleding van die effek van 'n toemende Mg^{2+} -konsentrasie op; (i) die ATPase aktiwiteit en (ii) persentasie toename in ATPase ten opsigte van die waarde daarvan by 0,2 mM Mg^{2+} , vir gousiekte- en kontrole-n-aktomiosien

Magnesium konsentrasie (mM)	Kontrole-n-aktomiosien-ATPase (μ mole/mg/15')	Gousiekte-n-aktomiosien-ATPase (μ mole/mg/15')	Betekenisvolheid van verskil (student-t)
Ontleed ten opsigte van ATPase waarde			
0,2	377 \pm 30(n=9)	241 \pm 17(n=11)	p<0,01
0,4	446 \pm 37(n=9)	290 \pm 21(n=11)	p<0,01
0,6	535 \pm 37(n=9)	334 \pm 29(n=9)	p<0,01
0,8	594 \pm 41(n=8)	367 \pm 29(n=11)	p<0,01
1,0	658 \pm 50(n=9)	389 \pm 33(n=11)	p<0,01
Ontleed ten opsigte van persentasie toename			
0,2 - 0,4	18,1%	20,5%	NB
0,2 - 0,6	43,5%	37,5%	NB
0,2 - 0,8	59,5%	51,8%	NB
0,2 - 1,0	75,6%	60,4%	NB

'n Berekening van die persentasie toename in ATPase by elk van die Mg^{2+} -konsentrasies ten opsigte van die ATPase by 0,2 mM Mg^{2+} (tabel 6,3) dui op geen betekenisvolle verskil ten opsigte van die Mg^{2+} -reaksie vir gousiekte- en kontrole-n-aktomiosien-ATPase

nie. Hierdie bevinding word ondersteun deur 'n groeikromme-analise volgens die metode van Rao, gebaseer op die persentasie toename ($p > 0,05$, student-t).

6.3.3.3 Die invloed van Ca^{2+}

Die Ca^{2+} -reaksie van n-aktomiosien-ATPase van gousiekte- en kontrolehart word in tabel 6.4 aangedui.

Tabel 6.4 'n Statistiese ontleding van die effek van 'n toenemende Ca^{2+} -konsentrasie op; (i) die ATPase aktiwiteit en (ii) die persentasie toename in ATPase ten opsigte van die waarde daarvan by $[Ca^{2+}] = 0$, vir gousiekte- en kontrole-n-aktomiosien

Kalsium-konsentrasie	Kontrole-n-aktomiosien-ATPase (nmole/mg/15')	Gousiekte-n-aktomiosien-ATPase (nmole/mg/15')	Betekenisvolheid van verskil (studente-t)
Ontleed ten opsigte van ATPase waarde			
$[Ca^{2+}] = 0$	209 ± 15 (n=8)	147 ± 7 (n=11)	$p < 0,01$
pCa = 6,5	937 ± 71 (n=7)	541 ± 26 (n=11)	$p < 0,01$
pCa = 5,2	940 ± 96 (n=6)	602 ± 49 (n=11)	$p < 0,05$
Ontleed ten opsigte van persentasie toename			
$[Ca^{2+}] = 0 - pCa = 6,5$	346%	269%	$p < 0,01$
$[Ca^{2+}] = 0 - pCa = 5,2$	346%	309%	NB

'n Aansienlike verlaging in die ATPase aktiwiteit van gousiekte-n-aktomiosien word by beide konsentrasies van Ca^{2+} waargeneem. Die geringe verskil in die afwesigheid van Ca^{2+} dui daarop dat die verskille in die teenwoordigheid van Ca^{2+} minstens gedeelte=

lik aan 'n Ca^{2+} -onafhanklike faktor toegeskryf moet word. Benewens die absolute verskille word ook 'n verskil in Ca^{2+} -reaksie deur middel van 'n groeikrommeanalise volgens die metode van Rao, gebaseer op die persentasie toename ten opsigte van die ATPase aktiwiteit in afwesigheid van Ca^{2+} gevind.

6.3.4 Bespreking

Die daling in die aktiwiteit van superpresipitasie van gousiekte-n-aktomiosien gaan gepaard met 'n daling in die aktiwiteit van die Mg^{2+} -afhanklike n-aktomiosien-ATPase by variërende konsentrasies ATP, Mg^{2+} en Ca^{2+} .

Die laer aktiwiteit van gousiekte-n-aktomiosien-ATPase by substraatkonsentrasies van groter as 0,2 mM, (tabel 6.2) dui op 'n strukturele defek van n-aktomiosien-ATPase. Dit kan 'n defek wees wat weerspieël word in een of meer van die volgende funksies, naamlik: 'n defek ten opsigte van die ATPase aktiwiteit van miosien as sodanig, 'n defek ten opsigte van die aktien-miosien-interaksie, of 'n defektiewe regulering van die aktien-miosien-interaksie. Die toenemende mate van onderdrukking van gousiekte-n-aktomiosien-ATPase deur hoër konsentrasies ATP, (figuur 6.4) en 'n laer optimum substraatkonsentrasie ($p < 0,05$, student-t), dui op 'n moontlike substraat-inhibisie. Dit is bekend dat ATP bokant 'n sekere drempelwaarde substraat-inhibisie bewerkstellig deur middel van aktomiosien-dissosiasie (Katz, 1970). Dissosiasie van aktomiosien skakel die aktiverende effek van aktien op miosien-ATPase uit (Katz, 1970) na gelang van die mate van dissosiasie met 'n gevolglike verlaging in die aktiwiteit van aktomiosien-ATPase. Hierdie afleiding word ondersteun deur aanduidings uit die voorafgaande superpresipitasiegegewens.

'n Laer aktiwiteit van gousiekte-n-aktomiosien-ATPase by verskillende Mg^{2+} -konsentrasies (tabel 6.3) dui waarskynlik op dieselfde defek. Dit kan nie toegeskryf word aan 'n verlaagde sensitiwiteit van n-aktomiosien-ATPase ten opsigte van die aktiverende effek van Mg^{2+} nie, aangesien geen verskil ten opsigte hiervan statisties vasgestel kon word nie (tabel 6.3). 'n Neiging tot 'n afname in die persentasie toename van gousiekte-n-aktomiosien word egter opgemerk by die hoër konsentrasie Mg^{2+} . Dit is waarskynlik toe te skryf aan 'n toenemende mate van Mg^{2+} -inhibisie op die miosien-ATPase wat moontlik ontstaan vanweë 'n makliker dissosiasie van gousiekte-n-aktomiosien soos wat uit die voorafgaande bespreking blyk, met 'n gevolglike relatiewe toename van miosien tot aktomiosien. Dit is bekend dat Mg^{2+} 'n inhiberende effek op miosien-ATPase het, terwyl dit 'n stimulerende effek op aktomiosien-ATPase uitoefen (Katz, 1970). Dit kan verder moontlik ook verband hou met die feit dat inhibisie van die miofibril-ATPase plaasvind indien die Mg^{2+} -konsentrasie die substraatkonsentrasie oorheers (Perry & Grey, 1956).

'n Normale sensitiwiteit van gousiekte-n-aktomiosien-ATPase beteken dus 'n normale interaksie met Mg^{2+} , en dus ten minste 'n normale funksionering van hierdie deel van die n-aktomiosien-ATPase struktuur. Die presiese meganisme van Mg^{2+} -interaksie is egter nog in 'n groot mate onbekend. Dit is gerapporteer (Dreizen & Richards, 1973) dat een of meer van die ligtekettings wat geassosieer is met die globulêre kop van die miosien-molekule, met Mg^{2+} bind, waarskynlik aan suur- of imidazool-residu's. Die verband wat hierdie binding het met die ATPase aktiwiteit van miosien, is nie duidelik nie. Die binding met die substraat om as 'n ATP-kompleks met die aktiewe punt van die ensiem te bind is egter wel bekend.

'n Verlaagde sensitiviteit van die Mg^{2+} -geaktiveerde n-aktomiosien-ATPase ten opsigte van die aktiverende invloed van Ca^{2+} , is vir gousiektegevalle gevind (tabel 6.4). Dit kan moontlik dui op 'n defektiewe reguleringsfunksie van Ca^{2+} via die modulerende-proteïene, wat onder meer 'n defektiewe binding van Ca^{2+} met troponien of 'n defek ten opsigte van die oordrag van die Ca^{2+} -sensitisering deur die tropomiosien-troponien-sisteem kan beteken. 'n Verlies aan Ca^{2+} -sensitiviteit van spierwesels wat vir 'n lang tydperk in gliserol gestoor word, is byvoorbeeld toegeskryf aan 'n oksidasie van SH-groepe van die troponienmolekule (Katz, 1970). Ook die betrokkenheid van die miosien-molekule blyk nie noodwendig uitgesluit te wees tydens 'n verandering van die Ca^{2+} -sensitiviteit nie. Dit is aangetoon dat die sensitiviteit van aktomiosien ten opsigte van Ca^{2+} , afhanklik is van sulfhidriël-groepe van die troponien-tropomiosien-sisteem sowel as van sulfhidriël-groepe van miosien (Daniel & Hartshorne, 1972) wat waarskynlik in die omgewing van die aktiewe punt van die ensiem geleë is (Stewart & Levy, 1970).

Om die Ca^{2+} -sensitiviteit verder te ondersoek, is ook 'n ander Ca^{2+} -afhanklike funksie van die kontraktiele-proteïene nagegaan, naamlik isometriese spanningsontwikkeling.

6.4 Ca^{2+} -sensitiviteit ten opsigte van isometriese spanningsontwikkeling

6.4.1 Inleiding

Die ekstraksie van spierwesels met gekonsentreerde gliserol vir 'n lang tydperk by 'n temperatuur van laer as $0^{\circ}C$, verwyder alle nie-miofibrillêre proteïene en membraanstrukture (Katz,

1970). Die kontraktiele-proteïene daarenteen word nie geëkstraheer nie en behou hulle ruimtelike oriëntasie en is in staat om na ekstraksie onder bepaalde kondisies, sowel isometriese spanning te ontwikkel en te verkort. Die gebruik van gliserol-geëkstraheerde-spiervesels is vir die eerste keer in 1949 deur Szent-Györgi ingelei. Hy het aangetoon dat dit nie reageer op elektriese prikkels nie, terwyl dit nogtans in die teenwoordigheid van ATP in staat was om spanning, wat naastenby vergelykbaar was met dié van nie-geëkstraheerde spiervesels, te ontwikkel. Die ATP-geïnduseerde kontraktsie van gliserol-geëkstraheerde-spiervesels is deur Hotta en Bowen (1970) beskryf as 'n uitstekende sisteem om die transformering van chemiese potensiële energie na meganiese arbeid deur 'n kontraktiele weefsel na te gaan.

Gliserol-geëkstraheerde-spiervesels vertoon heelwat eienskappe van nie-geëkstraheerde geïsoleerde spiertjies, byvoorbeeld die lengte-spannings-, en krag-snelheidsverbande (Taeschler & Bing, 1953; Henry et al., 1972). Dit vertoon ook ATPase aktiwiteit wat onder normale kondisies goed korreleer met die omvang van spanningsontwikkeling (Bozler & Prince, 1953; Henry et al., 1972). Soos in die *in vivo*-situasie, word die omvang van kontraktsie ook beheer deur Ca^{2+} . Deur die Ca^{2+} -konsentrasie van die medium op enige vlak tussen 10^{-7} en $10^{-5}M$ met EGTA te buffer, kan die mate van kontraktsie presies beheer word, terwyl 'n opeenvolging van kontraktsies en verslappings bewerkstellig kan word deur die vesel na elke kontraktsie met 'n medium sonder Ca^{2+} in aanwesigheid van EDTA te laat verslap (Henry et al., 1972). 'n Toename in die Ca^{2+} -konsentrasie tussen 10^{-7} en $10^{-5}M$ het 'n sigmoïedale toename in die isometriese kontraktsie-spanning tot gevolg (Henry et al., 1972). ATP is essensieel vir sowel

kontraksie as verslapping, terwyl Mg^{2+} veral die inisiële fase van spanningsontwikkeling versnel en in 'n mindere mate ook die maksimum spanning wat ontwikkel, beïnvloed (Hotta & Bowen, 1970).

Die kontraksie van gliserol-geëkstraheerde-spiervesels blyk dus in 'n groot mate verteenwoordigend te wees van die *in vivo* kontraktiele-proteïen-interaksie en kan dus as 'n handige model vir hierdie doel gebruik word. Probleme word egter ondervind met die kwantitatiewe bestudering daarvan as gevolg van swak rekbaarheidseienskappe en 'n neiging tot histereze (Katz, 1970). Verder het die ekstraksie van die spier-vesels oor lang periodes 'n verlies aan Ca^{2+} -sensitiwiteit tot gevolg, waarskynlik as gevolg van 'n verlies aan sulfhidriël-groepe van troponien (Katz, 1970). Deur die gebruik van korter ekstraksieperiodes en farmakologiese inhibering van die aktiwiteit van membraanstrukture wat nie volledig verwyder word nie (Henry et al., 1972) kan hierdie probleem egter grootliks oorbrug word.

6.4.2 Metode

Gliserol-ekstraksie

Die papillêre spiertjies is vir 24 uur by $0^{\circ}C$ in 50% gliserol-medium (20 mM imidasool, 4 mM EGTA, en 1 mM DTT, pH=7,0 by $0^{\circ}C$) geplaas, waarna die medium vervang is met 'n vars ekstraksie-medium waarin die spiertjies vir 8-10 dae by $-20^{\circ}C$ gestoor is (Henry et al., 1972)

'n Spierstrokje van ongeveer 0,4 mm in deursnee en 4-6 mm in lengte is vanaf die gliserol-geëkstraheerde spier gesny en loodreg in 'n reaksiebad opgestel. Dit is gedoen deurdat die punte daarvan met behulp van 'n garedraad (afgedraai en deur bye- was getrek) een aan die onderste punt van die reaksiebad en die ander aan die hefboom van 'n isometriese spanningsomsetter aan die bokant, verbind is. Die passiewe spanning van die spiertjie is met behulp van 'n mikromanipulator waaraan die spanningsomsetter gekoppel is, verstel. Die spiertjie is bedek deur 3 ml reaksie-medium wat by 25°C gehou is deur water vanaf 'n termostaties beheerde waterbad wat om die reaksiebad gesirkuleer het.

Die reaksie-medium is vervang deur middel van 'n uitlaat aan die onderste punt van die bad. Verslappingsmedium het bestaan uit; 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM EDTA, 5 mM Na-asied, en 20 mM imidasool, pH=7,0. Kontraksie-medium het dieselfde samestelling behalwe dat EDTA vervang word met 4 mM EGTA en Ca²⁺. Die gewenste pCa is verkry deur die verhouding van Ca²⁺ tot EGTA te verander (Julian, 1971).

'n Spierstrokje is aanvanklik in verslappingsmedium opgestel en so vir ongeveer 'n uur gelaat. Die medium is vervolgens met vars verslappingsmedium vervang, waarna die spier gerek is totdat 'n mate van passiewe spanning geregistreer is. Na stabilisering van die passiewe spanning (ongeveer 30 minute) is die verslappingsmedium met kontraksie-medium vervang (pCa=5,2) wat 'n maksimum kontraksie tot gevolg het. Dit is vir ongeveer 30 minute volgehou, waarna die spiertjie weer vir 'n uur verslap is ten einde volledige verslapping te verseker. Hierdie vooraf-prosedure is gevolg om die sisteem vooraf te stabi-

liseer sodat meer betroubare gegewens daarna verkry kon word.

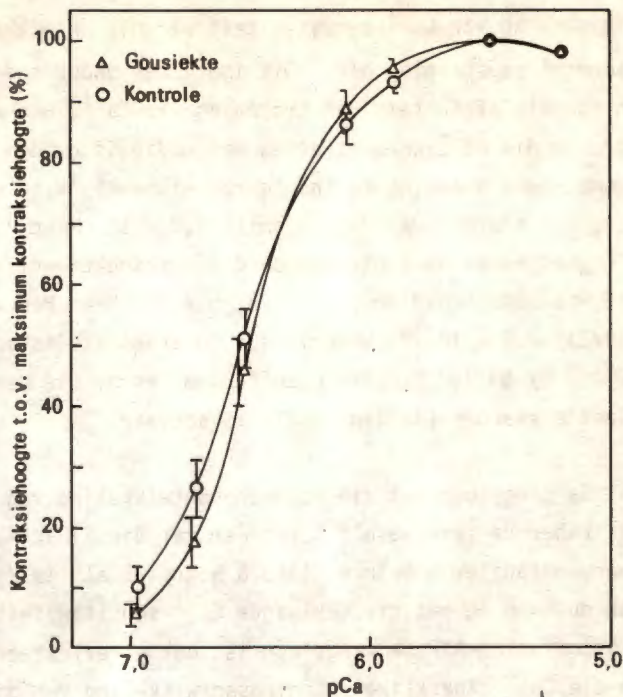
Die Ca^{2+} -isometriese spanningsreaksie is nagegaan met die volgende opeenvolgende Ca^{2+} -bevattende kontraksiemedia; pCa = 6,95, 6,72, 6,51, 6,09, 5,90, 5,49 en 5,20 vir 'n maksimum effek. Figuur 6.6 toon 'n tipiese registrasie van die spanningsontwikkeling by pCa =6,09, 5,90 en 5,49 agtereenvolgend. (figuur 6.6 p. 104).

Die spanningsontwikkeling by die verskillende Ca^{2+} -konsentrasies is as 'n persentasie van die maksimum spanningsontwikkeling uitgedruk en grafies teenoor die verskillende pCa waardes uiteengesit.

6.4.3 Resultate

Die Ca^{2+} -sensitiwiteit van die kontraktiele-proteïen-sisteen ten opsigte van isometriese spanningsontwikkeling word in figuur 6,7 geïllustreer vir gousiekte- en kontroleskaap van groep II.

'n Groeikromme-analise volgens die metode van Rao, gebaseer op die persentasie toename, toon dat daar geen verskil ten opsigte van die Ca^{2+} -sensitiwiteit tussen die vesels van gousiekte- en kontrolehart is nie. Hierdie afleiding word gerugsteun deur feitlik eenderse pCa -waardes wat nodig is om die vesels 'n $\frac{1}{2}$ -maksimum spanning te laat bereik, naamlik $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$ en $2,8 \times 10^{-7} \text{M}$ vir gousiekte- en kontroleproefdiere respektiewelik. Beide kurwes vertoon die karakteristieke sigmoïedale reaksie-kurwe.



Figuur 6.7 Korrelasie van Ca^{2+} met die isometriese spanningsontwikkeling van gliserol-geëkstraheerde spier-vesels van gousiekte- en kontroleharte van groep II.

Kondisies: KCl 100 mM, MgCl_2 5mM, ATP 5 mM, EGTA 4 mM, Na-Asied 5 mM, imidasool 20 mM, pH=7,0, temp. = 25°C.

6.4.4 Bespreking

'n Ooreenstemmende sensitiwiteit ten opsigte van die pCa-isometriese-spanningsontwikkeling vir die gliserol-geëkstraheerde hartspier-vesels van gousiekte- en kontrolediere, dui daarop dat daar geen noemenswaardige verskil bestaan ten opsigte van faktore in die kontraktiele-apparaat wat verantwoordelik is vir

die oordrag van Ca^{2+} -sensitiwiteit vir die ontwikkeling van isometriese spanning nie. Dit impliseer onder andere minstens 'n normale affiniteit van troponien vir Ca^{2+} , wat weerspieël word in die Ca^{2+} -konsentrasies wat nodig is om die $\frac{1}{2}$ -maksimum isometriese spanning te induseer. Alhoewel 'n ietwat laer, vergelyk hierdie waardes, naamlik $3,2 \times 10^{-7}\text{M}$ en $2,8 \times 10^{-7}\text{M}$ vir gousiekte- en kontroleproefdiere respektiewelik, goed met dié wat deur Schädler (1967), $3,5 \times 10^{-7}\text{M}$ en Henry et al., (1972), $3,7 \times 10^{-7}\text{M}$, verkry is. 'n Stabiliteitskonstante van $10^{6,68}$ by pH 7,0 vir die CaEGTA-kompleks by die berekening van hierdie waardes (Julian, 1971) is aanvaar.

Dit is aangetoon dat die spanningsontwikkeling van gliserol-geëkstraheerde-spiervesels korreleer met die ATPase-aktiwiteit daarvan (Bozler & Prince, 1953, & Henry et al., 1972). 'n Mens sou dus wou hê dat die verlaagde Ca^{2+} -sensitiwiteit wat vir n-aktomiosien-ATPase aangetoon is, ook gereflekteer moes word in die Ca^{2+} -afhanklike spanningsontwikkeling van die gliserolgeëkstraheerde-spiervesels. Dit is egter nie die geval nie en kan moontlik verklaar word deur die feit dat 'n ontkoppeling van die paralellisme tussen isometriese spanningsontwikkeling en ATPase-aktiwiteit in sekere omstandighede wel bestaan (Katz, 1970). Verder moet dit miskien ook gesien word in die lig dat isometriese spanningsontwikkeling 'n funksie is van die aantal fisies-chemiese interaksies tussen aktien en miosien, terwyl ATPase aktiwiteit korreleer met die maksimum kontraksiesnelheid (Katz, 1970)

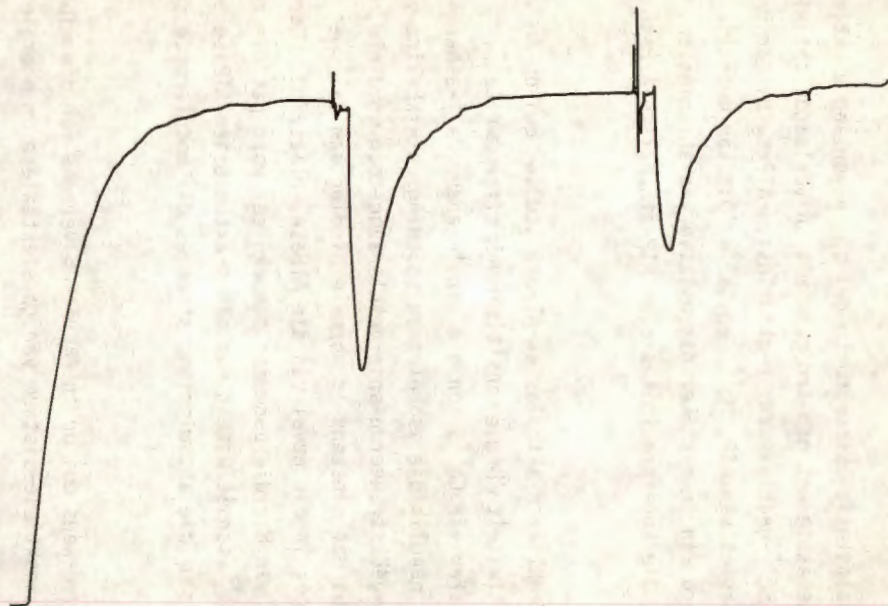
6.5 Samevattende bespreking

Die voorafgaande ondersoek ten opsigte van die kontraktiele-proteïenfunksie van gousiektehart kan soos volg saamgevat word:

Superpresipitasie-eksperimente dui op 'n verlaagde aktien-miosien-interaksie wat gepaard gaan met 'n verlaagde aktiwiteit van die Mg^{2+} -geaktiveerde n-aktomiosien-ATPase by variërende konsentrasies van ATP, Mg^{2+} en Ca^{2+} . Dit kan moontlik toegeskryf word aan 'n makliker dissosiasie van aktomiosien, soos blyk uit die superpresipitasie en ATP-afhanklike ATPase ondersoeke.

Ca^{2+} -afhanklike n-aktomiosien-ATPase studies dui op 'n verlaagde sensitiwiteit vir die sensitiserende effek van Ca^{2+} . 'n Soortgelyke defek vir Ca^{2+} , kon nie vir 'n ander Ca^{2+} -afhanklike funksie, naamlik die isometriese spanningsontwikkeling van gliserol-geëkstraheerde-spiervesels aangetoon word nie, wat daarop dui dat minstens 'n normale binding van Ca^{2+} met troponien, ook in die geval van die ATPase, plaasvind. Daar kan op grond van hierdie gegewens gespekuleer word dat die defek in die Ca^{2+} -sensitiwiteit van die n-aktomiosien-ATPase eerder gesetelis in die aktomiosiensisteem as die modulerende proteïene.

Hierdie gegewens dui op 'n verlaagde vermoë van die miokardiale kontraktiele-sisteem van gousiekte diere om energie te benut.



Figuur 6.6 Registrasie van die isometriese spanningsontwikkeling van 'n gliserol ge-ekstraheerde hartspiestrokke. By drie opeenvolgende Ca^{2+} -konsentrasies van toenemende volgorde, naamlik by $\text{pCa} = 6,09$, $5,90$ en $5,49$ agter-eenvolgend

HOOFSTUK 7

Bespreking

7.1 Inleiding

Hierdie ondersoek na bepaalde biochemiese prosesse in die hartspierweefsel van skape met gousiekte onder lede, dui op 'n defektiewe energiemetabolisme. Hierdie bevinding bevestig die suggestie van Pretorius et al. (1967) alhoewel dit nie duidelik is of dit 'n primêre- of sekondêre effek is nie. Die gewens is verkry van proefdiere wat gousiekte met die tipiese simptome van kongestiewe hartversaking vertoon het. Dit is dus belangrik om gousiekte vir die doeleindes van die bespreking as 'n vorm van kongestiewe hartversaking te sien.

7.2 Energiestatus

Die resultate wat in hierdie ondersoek verkry is toon 'n daling van die energiereserwes in die hartspierweefsel van diere wat gousiekte onder lede het wat dui op 'n wanbalans ten opsigte van die produksie en verbruik van energie. 'n Ondersoek na hierdie twee aspekte van energietransformering het aan die lig gebring dat die verlaagde energiestatus geassosieer is met 'n verlaagde mitochondriale aktiwiteit sowel as 'n verlaagde vermoë van die kontraktiele-proteïene om ATP te benut. Hierdie bevinding ondersteun dus die hipotese van Olson & Schwartz (1951) wat sê dat daar vanuit 'n molekulêre oogpunt gesien in die algemeen twee tipes van hartversaking gevisualiseer kan word naamlik dié waar 'n defek geleë is in die vorming van ATP, en die waar 'n defek geleë is in die verbruik van ATP, terwyl 'n kombinasie hiervan ook mag voorkom. Dit is dus terselfdertyd 'n aanduiding dat die meganisme van hartversaking tydens gousiekte in ooreenstemming is met die gepostuleerde meganisme vir hartversaking in die algemeen.

7.3 Energietransformering

Bepaalde meganismes wat betrokke is by die produksie en benutting van energie sal hieronder vir gousiektegevalle bespreek word.

7.3.1 Produksie van energie

'n Styging in die verhouding van ATP:KrP (tabel 5.1) dui op 'n toename in die anaerobiese energiemetabolisme wat 'n verlaagde produksie van aerobiese energie weerspieël en dus op 'n defek van laasgenoemde funksie dui. 'n Styging van die ATP:KrP is ook vir ander tipes van hartversaking aangetoon (Fox et al., 1965; Furchgott & Lee, 1961; Pool & Seagren, 1966; Pool et al. 1967; Lochner et al., 1970) en is betekenisvol meer in die geval van die sterwende gousiekteskaap (tabel 5.2) uitsluitlik as gevolg van 'n verdere daling van KrP. 'n Styging in die ATP:KrP-verhouding hoofsaaklik vanweë 'n daling van KrP, is tiperend van iskemiese hartspierweefsel (Gudbjarnason et al. 1970) en kan moontlik in verband gebring word met vorige waarnemings van iskemie tydens gousiekte (Pretorius & Terblanche, 1967).

Die feit dat die ATP-waarde nie in verhouding of selfs vinniger daal as die KrP nie, maar vanaf 'n sekere konsentrasie feitlik konstant bly, is vir iskemiese toestande toegeskryf aan 'n inhibisie van die mitochondreale kreatienfosfokinasiem deur melksuur (Gudbjarnason et al., 1970). Dit voorkom die transporterling van hoë-energiefosfaat vanaf die intra- na die ekstramitochondriale ruimte wat dan 'n selektiewe uitputting van die ekstramitochondriale hoë-energiefosfaat tot gevolg

het. So 'n verklaring sou ook van toepassing gemaak kon word vir die hartspierweefsel van gousiekte diere, aangesien 'n betekenisvolle styging van melksuur in die hartspierweefsel van gousiektegevalle gevind is (tabel 5.3).

Die individuele waardes ten opsigte van melksuur, anorganiese fosfaat en NADH vir sterwende gousiekte diere (tabel 5.4), dui op 'n drastiese versteuring van die energiemetabolisme en is vergelykbaar met 'n toestand van iskemie. Die styging in anorganiese fosfaat ontstaan as gevolg van 'n verlaagde hersintese van KrP wat dan 'n ekwivalente toename van vry anorganiese-fosfaat in die sel tot gevolg het (Mathur & Case, 1973). Die abnormaal hoë akkumulering hiervan, asook van die melksuur, vind waarskynlik plaas as gevolg van 'n verlaagde koronêre bloedvloei wat die uitwaartse diffusie van hierdie metaboliete na die bloedstroom beperk. Die aansienlike styging van NADH dui op 'n ernstige versteuring van die aktiwiteit van die respiratoriese ketting.

Die styging van melksuur in die hartspierweefsel van gousiekte diere (tabel 5.3) toon, alhoewel betekenisvol, nie 'n baie groot toename daarvan nie, naamlik 'n verhoging tot ongeveer een-en-'n-half keer die normale waarde. Waardes van drie keer normaal vir 'n relatiewe graad van iskemie (Skinner et al, 1973) en agt keer en meer as vier keer normaal vir rothartweefsel na vyf minute van asfiksia en vir versaakte harte van geneties gedistrofieerde hamsters (Fedulesova & Dhalla, 1971) respektiewelik, is gemeet. Gudbjarnason et al. (1970) het 'n toename van ongeveer vier-en-'n-half keer normaal gevind vir iskemiese weefsel op die stadium wat dit ophou kontraheer het. Dit is moontlik dat die inhibering van die mitochondriale aktiwiteit op hierdie stadium van gousiekte, nog nie sulke ernstige

afmetings aangeneem het nie. Dit is ook moontlik dat dit gedeeltelik toegeskryf kan word aan 'n uitwaartse diffusie van melksuur, anders as wat in die geval van iskemiese weefsel is. In so 'n geval sou egter 'n groter mate van NADH-akkumulering verwag word, alhoewel Fedelesova en Dhalla (1971) maar 'n geringe toename in NADH (230 na 272) gemeet het na vyf minute van asfixia, terwyl 'n aansienlik styging in melksuur (\pm agt keer) gemeet is. Die toename in NADH tydens gousiekte (tabel 5.3) was ongeveer 10% (nie-betekenisvol) ten opsigte van die kontrolewaarde.

Die patroon van verandering ten opsigte van ATP, KrP, NADH en melksuur tydens gousiekte, stem in die breë gesien ooreen met dié in die hartspierweefsel van die geneties distrofiese hamster en geasfiksieerde rotte (Fedelesova & Dhalla, 1971). Dit dui op die moontlikheid van 'n gemeenskaplike oorsaak wat in die geval van die geasfiksieerde rotte, 'n verlaagde aktiwiteit van die respiratoriese ketting beteken, en in die geval van die distrofiese hamster, waarskynlik 'n defektiewe oksidatiewe fosforilering (Fedelesova & Dhalla, 1971). Dit stem ooreen met die verlaagde suurstofopname deur die mitochondria van gousiekteskaap (tabel 5.5). 'n Ontkoppeling van die oksidatiewe fosforilering, het volgens die huidige gegewens geen bydraende effek tot die verlaagde aerobiese energieproduksie nie. Of die mate van verlaagde aktiwiteit van suurstofopname deur gousiekte mitochondria soos in hierdie ondersoek gemeet, alleen 'n sodanige verlaging in die konsentrasies van ATP en KrP tot gevolg kan hê, is nie moontlik om te sê nie.

Dit is belangrik om die *in vitro*-verkrygde gegewens ten opsigte van die mitochondreale funksie met groot omsigtigheid op die *in vivo*-situasie toe te pas, aangesien verskeie faktore 'n in-

vloed op die uitslag van die resultaat kan hê. Verskille ten opsigte van isolasie- en inkubasietegnieke, asook die stadium van hartversaking waarop proefdiere gedood is, is volgens Lindenmayer et al. (1968) van die belangrikste redes vir teenstrydige resultate wat in die verlede verkry is. Die verlaagde suurstofopname wat in hierdie ondersoek vir gousiektegevalle gemeet is, pas egter in by die verkrygde patroon van metaboliese veranderinge tydens gousiekte en is in ooreenstemming met die siening van Schwartz et al. (1973), naamlik dat 'n defek ten opsigte van mitochondriale energieproduksie 'n karakteristiek is van 'n ernstige graad van versaking.

7.3.2 Benutting van energie

'n Verlaagde Mg^{2+} -afhanklike ATPase-aktiwiteit is aangetoon vir n-aktomiosien wat geïsoleer is uit die hartspierweefsel van skaap met gousiekte onder lede. Dit is onder variërende konsentrasies van ATP, Mg^{2+} en Ca^{2+} gevind (figure 6.3 en 6.5 en tabelle 6.2, 6.3 en 6.4) en word ondersteun deur 'n defektiewe superpresipitasie van gousiekte-n-aktomiosien (figuur 6.2). 'n Verlaagde ATPase-aktiwiteit van n-aktomiosien impliseer 'n verlaagde vermoë van die kontraktiele-proteïene om die chemiese energie van ATP vir meganiese arbeid beskikbaar te maak.

'n Verandering van die ATPase-aktiwiteit van die aktomiosien-kompleks kan in die breë gesien aan een of albei van die volgende verskynsels toegeskryf word. Die eerste, wat analoog is aan 'n verandering in die ATPase-aktiwiteit van miosien alleen word verteenwoordig deur meganismes wat die ensiemaktiwiteit van die aktomiosienkompleks beïnvloed sonder om die interaksie tussen aktien en miosien te beïnvloed. Verder kan die ATPase-

aktiwiteit van die aktomiosienkompleks ook beïnvloed word deur faktore wat aanleiding gee tot 'n dissosiasie van aktien en miosien (Katz, 1970). Uit sekere karakteristieke van die superpresipitasieproses van gousiekte-n-aktomiosien asook van die ATP-afhanklike ATPase-eienskappe daarvan, is afgelei dat die aktien en miosien van gousiekte-n-aktomiosien makliker dissosieer. Dit dui dus op die laasgenoemde defek, dog sluit die moontlikheid van 'n defek ten opsigte van eersgenoemde verskynsel nie uit nie. Daar moet egter op gelet word dat die dissosiasie van aktomiosienegelle waarskynlik twee afsonderlike verskynsels verteenwoordig, naamlik 'n ensiematiese en 'n fisies-chemiese. Dit is byvoorbeeld gevind (Perry & Cotterill, 1964; Perry & Cotterill, 1965) dat die behandeling van F-aktien met sulfhidriël-reagense die interaksie daarvan met swaar-meromiosien by 'n lae ioniese sterkte benadeel terwyl dit feitlik geen effek gehad het op die vermoë daarvan om die ATPase-aktiwiteit van swaar-meromiosien te aktiveer nie. Die verklaring vir die verlaagde n-aktomiosien-ATPase vir gousiektegevalle, naamlik dat dit toegeskryf kan word aan 'n makliker dissosiasie van aktomiosien soos afgelei uit bepaalde superpresipitasie karakteristieke, moet dus met 'n mate van voorbehoud aanvaar word.

'n Verdere karakterisering van die n-aktomiosien-ATPase van gousiektehartes dui op 'n normale sensitiwiteit ten opsigte van die aktiverende effek van Mg^{2+} (tabel 6.3). Die betekenis hiervan is reeds bespreek (6.3.4).

Die ondersoek ten opsigte van die invloed van Ca^{2+} op die n-aktomiosien-ATPase-aktiwiteit van gousiektehartes, toon 'n verlaagde sensitiwiteit ten opsigte van die aktiverende effek

van Ca^{2+} (tabel 6.4) terwyl geen verskil in sensitiviteit vir Ca^{2+} aangetoon kon word ten opsigte van die isometriese spanningsontwikkeling van gliserol-geëkstraheerde spiervesels van gousiekte- en kontroleharte nie (figuur 6.7). Hierdie bevinding skyn teenstrydig te wees met die algemene parallelisme wat tussen die ATPase-aktiwiteit en isometriese spanningsontwikkeling van die kontraktiele-apparaat gevind is (Solaro et al., 1974; Henry et al., 1972). Dit toon egter dat alhoewel albei funksies dieselfde reageer ten opsigte van sekere fisiologiese prikkels soos Ca^{2+} (Solaro et al., 1974) en sarkomeerlengte (Henry et al., 1972), dit nie noodwendig van mekaar afhanklik is nie. 'n Ontkoppeling van hierdie parallelisme is dus moontlik, soos ook aangetoon deur sekere tipes van eksperimentele ingrepe, byvoorbeeld 'n toename van die Ca^{2+} -konsentrasie bokant 'n sekere waarde wat 'n afname in die mate van spanningsontwikkeling veroorsaak maar terselfdertyd die ATPase-aktiwiteit laat toeneem (Bowen & Martin, 1958).

'n Berekening van die hoeveelheid Ca^{2+} wat aan die gliserol-geëkstraheerde spiervesels bind dui op 'n normale binding van die troponien-tropomiosien-sisteem met Ca^{2+} . 'n Verlaagde Ca^{2+} -sensitering van die n-aktomiosien-ATPase kan dus nie toegeskryf word aan 'n defektiewe binding van Ca^{2+} nie. Hierdie bevinding ten opsigte van gousiekte-n-aktomiosien verskil met dié van Schwartz et al. (1973) vir iskemiese hartspierweefsel van honde, wat daarop dui dat die verlaagde sensitiviteit van superpresipitasie wat vir Ca^{2+} gevind is, toegeskryf kan word aan 'n defek van die Ca^{2+} -bindingspunte op die troponien-tropomiosienkompleks.

'n Verlaagde aktiwiteit van n-aktomiosien-ATPase gedurende gousiekte vergelyk goed met 'n ATPase-defek vir die meeste ander

tipes van hartversaking (Alpert & Gordon, 1962; Conway et al., 1975; Chandler et al., 1967; Gordon & Brown, 1966; Rovetto et al., 1970; Luchi, 1969.) Daar is egter nie algemene ooreenstemming ten opsigte van bepaalde eienskappe van die defektiewe ATPase tydens versaking nie. Chandler et al. (1967) het byvoorbeeld gevind dat die verlaagde ATPase-aktiwiteit van die miofibrille van versaakte harte nie toegeskryf kan word aan 'n veranderde sensitiwiteit ten opsigte van Ca^{2+} en Mg^{2+} nie, terwyl Alpert & Gordon (1962) gerapporteer het dat die graad van reaksie van die miofibril-ATPase ten opsigte van Mg^{2+} aansienlik verskil het tussen kontrole- en versaakte harte. Schwartz et al. (1973) weer het 'n verlaagde Ca^{2+} -sensitiwiteit ten opsigte van superpresipitasie ('n indirekte metode van ATPase meting) van n-aktomiosien wat geïsoleer is uit iskemiese hartspierweefsel van honde, gerapporteer. Hierdie fynere verskille mag moontlik die gevolg wees van verskille in metodes en preparate wat gebruik is, of dit kan ook wees dat waar 'n verlaagde ATPase-aktiwiteit van die kontraktiele-proteïene met hartversakings in die algemeen korreleer, die spesifieke defek in die kontraktiele-proteïene gekoppel is aan die tipe kardiomiopatie, in hierdie geval dan gousiekte.

7.3.3 Samevattend

'n Afwyking van die energietransformering ten opsigte van die produksie en benutting van energie, is in ooreenstemming met soortgelyke defekte wat ook vir ander tipes van hartversaking gevind is. (Schwartz et al., 1973). Alhoewel dit, soos vooreen genoem, gousiekte binne die raamwerk van die algemene meganisme van hartversaking plaas, blyk dit uit hierdie ondersoek dat die defektiewe meganismes wat onderliggend tot hierdie afwykings is, moontlik tiperend van gousiekte-hartversaking kan

wees. Dit kan 'n verskil in oorsaak vir versaking weerspieël by verskillende kardiomiopatieë.

Die verlaagde energiestatus van die hartspierweefsel is volgens die huidige ondersoek die resultaat van 'n verlaagde mitochondriale suurstofkonsumpsie sowel as 'n verlaagde Mg^{2+} -afhanklike ATPase-aktiwiteit van n-aktomiosien. Die verlaagde ATPase-aktiwiteit lyk egter in stryd met 'n daling van ATP en KrP . Die daling kan moontlik verklaar word deur 'n daling van die energieproduksie wat 'n afname in die verbruik van energie oorheers. Vir 'n realistiese interpretasie is dit egter nodig om ook die moontlike invloed van sekere *in vivo*-faktore op die transformering van energie in die hartspiersel tydens kongestiewe hartversaking te evalueer.

7.4 Moontlike invloed van *in vivo*-faktore op die energiestatus van die hart

7.4.1 Akkumulering van intrasellulêre metaboliete

Tydens versaking van die hart vind 'n kettingreaksie van verstourings van die intrasellulêre metabolisme plaas as die gevolg van meer primêre verstourings. Dit het 'n akkumulering van sekere metaboliete tot gevolg. Alhoewel die werklike *in vivo*-effekte hiervan onbekend is, dui *in vitro*-gegewens dat dit in baie gevalle 'n verdere verstouring van die bioënergie-tiese prosesse tot gevolg kan hê. Dit kan dus belangrike faktore wees om mee rekening te hou ten einde die veranderde energiestatus in die hartspierweefsel van gousiekte diere te kan interpreteer. Enkele bekende gevalle sal bespreek word.

7.4.1.1 Melksuur

Melksuur is seker een van die bekendste gevalle van akkumulering tydens veral iskemiese toestande van die hartspierweefsel en is ook tydens sekere tipes van hartversaking vasgestel.

Die effek van 'n intrasellulêre styging van melksuur is tweërlei van aard. Eerstens het dit waarskynlik 'n invloed op die intrasellulêre distribusie van ATP. Soos reeds bespreek, het die daling in pH waarskynlik 'n inhiberende effek op die mitochondriale kreatien-fosfokinase ensiem waardeur die transportering van die hoë-energiefosfaat vanaf die intra- na die ekstramitochondriale ruimte voorkom word. (Gudbjarnason et al., 1970). Dit lei dan tot 'n selektiewe uitputting van die ekstramitochondriale hoë-energiefosfaatverbindinge en is minder ATP gevolglik beskikbaar vir die kontraksieproses. 'n Styging van melksuur in die hartspierweefsel van gousiekte diere, asook van die ATP:K_rP-verhouding wat so 'n wandistribusie weerspieël (tabel 5.1), toon dat die styging in melksuur wel 'n sodanige effek in die geval van gousiekte hartversaking kon gehad het.

'n Akkumulering van melksuur kan volgens die hipotese van Katz en Hecht (1969), ook 'n kompetisie laat ontstaan tussen die H⁺-ione (as gevolg van die melksuurstyging) en die Ca²⁺-ione vir die Ca²⁺-bindingsplekke op die tropomiosien-troponiensisteam.

'n Verlaagde Ca²⁺-binding het 'n verlaagde sensitisering van die kontraktilie apparaat tot gevolg en daarom ook van die ATPase-aktiwiteit. Dit behoort 'n energiebesparende effek tot gevolg

te hê. Die effek hiervan op die energiestatus van die hartspier tydens gousiekte is waarskynlik nie baie prominent nie. In die geval van sterwende gousiektediere byvoorbeeld, het 'n verdere daling van KrP (tabel 5.2) ten spyte van tekens van 'n baie hoër anaerobiese toestand plaasgevind. Dit mag moontlik wel verligting bied en so die tempo van metaboliese agteruitgang vertraag.

Dit is moeilik om die kwantitatiewe bydrae van bogenoemde verskynsels tot die energiestatus van die hart te evalueer, aangesien geen kwantitatiewe gegewens hieromtrent beskikbaar is nie. Alhoewel verwag kan word dat 'n pH-verandering ook 'n effek op ander bioënergetiese ensiemstelsels sal hê, kan terselfdertyd ook verwag word dat klein veranderinge in die H^+ -konsentrasie van die sel, deur die buffersistelsels van die sel teengewerk sal word. Die bepalingmetode vir melksuur was byvoorbeeld nie spesifiek vir die suurvorm nie.

7.4.1.2 Lang-ketting-vetsure en die Asiel-KoA-derivate daarvan

Dit is aangetoon dat vry vetsure *in vitro*, ont koppeling van die oksidatiewe fosforilering bewerkstellig (Borst et al., 1962; Hülsmann et al., 1960). Alhoewel 'n verhoogde intrasellulêre konsentrasie van vry vetsure tydens iskemiese- of anoksie-toestande nog nie aangetoon is nie, is 'n styging daarvan in die bloed onder iskemiese toestande wel gevind (Kurien et al., 1969; Oliver et al., 1968). Dit kan egter aanvaar word dat dit *in vivo* slegs van toepassing sal wees by abnormaal hoë konsentrasies daarvan, aangesien dit 'n normale bestanddeel van die sel is wat by uitstek deur die hartspiersel geöksideer word vir die verskaffing van energie. Die anoksies geöriënteerde energie-metabolisme wat in hierdie ondersoek waargeneem is, maak dit

egter wel iets om mee rekening te hou.

Die asiel-KoA-derivate van die lang-ketting-vetsure is nog 'n groep verbindings waarmee rekening gehou moet word tydens gousiekte. Dit is aangetoon (Harris et al., 1972; Pande & Blanchaer, 1971; Shug et al., 1971) dat die adenien-nukleotied-translokase-ensiem van lewer- en hartmitochondria omkeerbaar geïnhibeer word deur lang-ketting-vetsuur-asiel-KoA-esters. Hierdie esters akkumuleer as gevolg van onvolledige oksidasie van vetsure in die mitochondria, 'n verskynsel wat ontstaan tydens iskemiese toestande van die hart (Shug et al., 1975). Die adenien-nukleotied-translokase-ensiem wat gesetel is op die binneste mitochondriale membraan, kataliseer die uitruiling van ATP vir ADP op 'n molekule-vir-molekule-basis. Hierdeur vervul dit 'n belangrike funksie ten opsigte van die handhawing van die regte verhoudings van ATP en ADP in die mitochondria en sitosol (Shrago, 1976). Dit spreek vanself dat die funksie daarvan die beheer van die oksidatiewe fosforileringsproses ten nouste raak. In die geval van sterwende gousiekte diere waar aanduidings bestaan van 'n aansienlike styging in NADH (tabel 5.4) mag wel 'n inhibisie van die vet-suuroksidasie ontstaan met gevolglike akkumulering van die genoemde esters. 'n Inhibering van die translokase-ensiem met gevolglike versteuring van die mitochondriale energieproduksie kan dus moontlik in die geval van sterwende gousiekte diere plaasvind.

7.4.1.3 Kalsium

'n Verlaagde vermoë van sarkoplasmiese-retikulum wat geïsoleer is uit gousiekte harte, om Ca^{2+} te akkumuleer (Pretorius et al., 1973), kan aanleiding gee tot 'n akkumulering van Ca^{2+} in die

sarkoplasma. Dit kan 'n oorstimulering van die Ca^{2+} -afhanklike ATPase tot gevolg hê wat 'n verdere uitputting van die energie-reserwes kan beteken (Dhalla, 1976). Dit mag wees dat hierdie verskynsel in 'n mate teengewerk sal word deur genoemde effek van 'n gelyktydige akkumulering van H^+ -ione. Hierdie effek op die energiestatus van die hart kan verder aangehelp word deur 'n onderdrukkende effek van die verhoogde Ca^{2+} -konsentrasie op die mitochondriale energieproduksie. Dit kan gebeur deurdat die mitochondria optree as 'n adaptasiemeganisme en die oormaat Ca^{2+} deur opname te probeer verwyder uit die mioplasma. Die oormaat intramitochondriale Ca^{2+} kan 'n verlaagde aktiwiteit van oksidatiewe fosforilering bewerkstellig (Dhalla, 1976).

Dit moet egter in gedagte gehou word dat die mitochondria self en veral die sarkolemma, 'n belangrike funksie besit ten opsigte van die intrasellulêre Ca^{2+} -regulering. Daar kan dus nie sonder meer aanvaar word dat 'n verhoogde Ca^{2+} -konsentrasie wel aanwesig sal wees tydens gousiekte nie.

7.4.2 Meganiese distorsie

Dit mag wees dat die verlaagde energiestatus van die hart tydens gousiekte 'n verskynsel is wat slegs intree in die terminale fase van hartversaking, as die resultaat van buitensporige verrekking van die sarkomeerstruktuur tydens kongestiewe hartversaking. Die versteuring van die sarkomeerstruktuur moet noodwendig lei tot 'n verswakte interaksie tussen aktien en miosien met 'n afname in ATPase-aktiwiteit tot gevolg (Opie, 1969). Mitochondriale beskadiging is nog 'n moontlike gevolg van meganiese distorsie (Opie, 1969).

7.4.3 Kompensasiemeganismes

By die interpretering van die energiestatus tydens gousiekte, is dit van uiterste belang om benewens die genoemde *in vivo*-faktore, ook deeglik rekening te hou met die invloed van die hart se fisiologiese en biochemiese beheermeganismes. Ten einde te verseker dat die hart, ten spyte van 'n verlaagde aktiwiteit van sy energieproduksie en benuttingsisteme, nogtans die benodigde hoeveelheid bloed sirkuleer, sal dit sekere van sy kompensatoriese sisteme aktiveer. 'n Toename in die aantal mitochondria en/of kontraktiele-proteïene of 'n toename van die hartfrekwensie is maar enkele voorbeelde hiervan.

Dit is interessant dat geen hipertrofie vir gousiektehartte bepaal kon word nie. Dit kan moontlik vertolk word dat die toksien die proses van hipertrofie voorkom. Dit kan moontlik verband hou met 'n voorlopige bevinding (Pienaar, J.G., persoonlike mededeling) wat dui op 'n verdwyning van veral die mio-sien-filamente in die letsel. Dit kan ook wees dat die effek van die toksien op die hartspier sodanig is dat die meganismes wat hipertrofie inisieer, nie onder hierdie omstandighede in werking gestel word nie. Laasgenoemde lyk egter meer onwaarskynlik aangesien sekere prikkels vir hipertrofie naamlik 'n verlaagde konsentrasie van ATP (Meerson & Pomoinitsky, 1972) wel aanwesig is.

'n Verhoogde hartfrekwensie is by al die skaap in die terminale fase van versaking waargeneem. Dit het heel waarskynlik ingetree in 'n laaste poging tot kompensasie vanweë ondoeltreffende anatomiese funksionering as die gevolg van kongestiewe hartversaking byvoorbeeld kleplekkasies (Van Ryssen, 1969) of 'n aktien-miosien-interaksie wat op die dalende been van die

Starling-kurwe funksioneer. Hierdie verhoogde energie aanvraag per tydseenheid kan 'n belangrike faktor wees wat aanleiding gee tot 'n verlaagde energiestatus van die hart, ten spyte van 'n afname in die ATPase-aktiwiteit van n-aktomiosien.

Dit is beweer (Katz, 1973) dat 'n afname in ATPase-aktiwiteit van aktomiosien tydens versaking as 'n kompensatoriese meganisme beskou moet word, eerder as 'n defek. Die verlaagde ATPase-aktiwiteit wat deur middel van 'n molekulêre struktuurverandering op die hartspier afgedwing word, dwing die hartspier om minder energie per tydseenheid te verbruik, die energiewanbalans te verbeter en die hartspier se kanses op oorlewing te begunstig. Hierdie beskouing hang natuurlik daarvan af of die verandering 'n oorsaak en of dit 'n gevolg van versaking is.

7.5 Doodsoorsaak tydens gousiekte

Met verwysing na die voorafgaande besprekings kan die volgende aspekte moontlik uitgesonder word as 'n waarskynlike oorsaak vir die finale versaking van die hart tydens gousiekte:

- (1) 'n Inhibering van die kontraktiele-proteïen-interaksie as die gevolg van 'n uitermate hoë toename van die anaerobe toestand in die hartspierweefsel (Sterwende gousiekteskaap; tabel 5.4).
- (2) 'n Selektiewe uitputting van ATP in die nie-mitochondreale ruimte. Hierdie afleiding is gegrond op die hoë waardes wat verkry is vir die ATP:KrP vir sterwende gousiekteskaap (tabel 5.2).

- (3) Dit is duidelik dat die finale versaking nie plaasgevind het as gevolg van 'n algehele uitputting van ATP nie, aangesien in slegs een van hierdie gevalle 'n ATP-waarde van laer as $4.1 \mu\text{mole/g}$ weefsel aangetoon is. Dit is gevind (Gudbjarnason et al., 1970) dat die hartspierweefsel in staat is om te kan funksioneer tot en met waardes so laag as $1,5 - 2,0 \mu\text{mole/g}$ weefsel.

Die ATP-waarde tydens dood kan moontlik meer lig werp op die oorsaak van die verlaagde energiestatus gedurende gousiekte. Op grond van die ondersoek deur Gudbjarnason et al. (1970) kan afgelei word dat 'n uitputting van die energievoorraad as gevolg van 'n uitermate verhoogde aanvraag daarna, die ATP-waarde baie laag laat daal ($1,5-2,0 \mu\text{mole/g}$ weefsel) sonder 'n styging van die ATP:KrP of melksuur. 'n Daling van die energiereserwes as gevolg van 'n verlaagde produksie vanweë iskemiese toestande aan die ander kant het 'n kleiner daling van ATP dog 'n styging van die ATP:KrP en melksuur tot gevolg. Hiervolgens wil dit voorkom asof die verlaagde energiestatus tydens gousiekte nie toegeskryf kan word aan 'n verhoogde energieaanvraag nie, maar eerder aan 'n verlaagde produksie wat verband hou met iskemiese toestande.

Bogenoemde aspekte dek slegs enkele sake wat verband hou met hierdie ondersoek. Talle ander faktore wat ewenwel die doods-oorsaak kan wees, is dus nie bespreek nie. Daar moet in gedagte gehou word dat vanweë die talle komplikasies wat intree gedurende die eindfase van gousiekte, die finale oorsaak vir hartstilstand, moeilik bepaalbaar is.

Die verloop van gousiektehartversaking kan moontlik aan die hand van sekere beskikbare gegewens in die breë soos volg gesuggereer word:

- (1) Ingrep van die toksien op 'n proses wat lei tot versaking van die hart wat vanuit 'n bioënergetiese oogpunt gesien vergelykbaar is met ander versakings maar wat nie 'n aktivering van sekere kompensatoriese meganismes wat hipertrofie tot gevolg het, veroorsaak nie.
- (2) Sekondêre komplikasies wat 'n verdere verswakking van die hartfunksie tot gevolg het, 'n verlaagde koronêre bloedsirkulasie, 'n relatiewe toestand van iskemie, en die ontstaan van kondisies wat bogenoemde doodsoorsake tot gevolg het.

HOOFSTUK 8

Slotopmerkings: Enkele suggesties vir verdere biochemiese navorsing op gouslekte

Uit hierdie proefskrif het dit na vore gekom dat die biochemiese patogeneese van gousiekte harte dui op 'n energiewanbalans wat geassosieerd is met 'n defektiewe funksie van mitochondriale energieproduksie tesame met 'n verlaagde energiebenuttingsvermoë deur die kontraktiele-proteïene. Die resultaat van hierdie afwykings *in vivo*, is 'n verlaagde konsentrasie van ATP en kreatiefosfaat, gepaardgaande met 'n toename in die anaerobe-toestand.

Dit is nie moontlik om te kan sê of hierdie afwykings die primêre oorsaak van gousiekte is nie en of dit 'n sekondêre gevolg van die ontstaan van kongestiewe hartversaking is nie en of dit selfs primêr in reaksie op die effek van die toksien is nie. In die lig van die volgende stelling: *It is improbable that congestive cardiomyopathy is a single entity: it is probably a final common path of many types of ventricular damage caused in different ways.* (Goodwin, 1970), is dit moontlik dat hierdie defekte eerder tiperend is van hartversaking in die algemeen as van gousiekte spesifiek. Bepaalde karakteristieke van die defek mag egter tiperend wees van die oorsaak van versaking, aangesien min ooreenkomstige ten opsigte hiervan in die literatuur tussen verskillende kardiomiopatieë bestaan.

Dit is duidelik dat verdere biochemiese navorsing op gousiekte hoofsaaklik toegespits behoort te word op die volgende aspekte: (1) 'n Uitbreiding van die biochemiese patogeneese tydens versaking; (2) primêre veranderinge wat inname van die plantmateriaal tot gevolg het. 'n Derde aspek, naamlik die isolering van die toksiese komponent van die gousiektebossie is egter van net soveel belang, aangesien die geïsoleerde komponent van groot nut mag wees by die opklaring van die probleem. In die hieropvolgende bespreking sal kortliks aan hierdie drie aspekte

aandag gegee word. Hierdie bespreking het dan ten doel om enkele rigtinggewende voorstelle vir verdere navorsing op gousiekte te verskaf. Enkele eksperimentele gegewens ter ondersteuning van sommige voorstelle sal aangebied word.

8.1 Biochemiese patogene se van die versaking

Die biochemiese patogene se van die huidige ondersoek het slegs rondom die hipotese van Olson en Schwartz (1951) gesentreer en gevolglik ander minder belangrike sisteme gesien vanuit die oogpunt van energieverbruik, dog belangrik gesien in die lig van sellulêre beheer, buite rekening gelaat. Alhoewel 'n defek ten opsigte van die baie belangrike Ca^{2+} -reguleringsfunksie reeds vir die sarkoplasmiese-retikulum tydens gousiekte (Pretorius et al., 1973) aangetoon is, is 'n ondersoek daarvan op die mitochondria en sarkolemma van ewe groot belang. Ook ander belangrike funksies, byvoorbeeld die elektriese-(aktiewe transporter van ione oor die selmembraan) en hormonale beheer (adrenalin, sikliese-AMP, adenielsiklase, proteïen-kinase), asook die beheer van proteïen-sintese wat primêr verantwoordelik is vir die kenmerkende kompensasiermoë van die hartspier, is belangrik vir 'n volledige biochemiese patogene se van die hartspier. Evaluering van die laasgenoemde funksie behoort te geskied in die lig van die feit dat gousiekte 'n kongestiewe kardiomiopatie met geen hipertrofie is, wat moontlik verband mag hou met voorlopige aanduidings van miofilament-dissolusie, van verlamiosien (Pienaar, J.G., persoonlike mededeling).

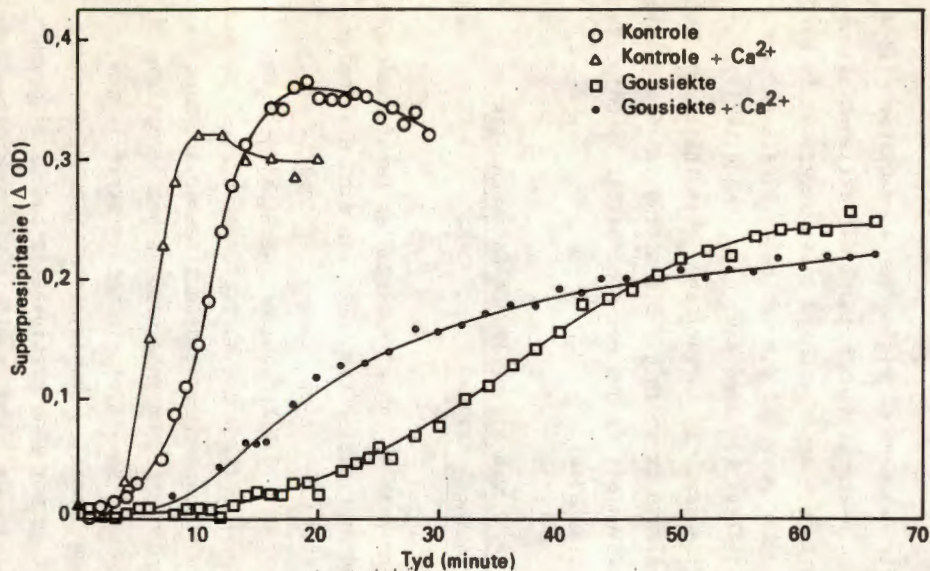
Uit die gegewens van die huidige ondersoek het egter die volgende probleemstellings na vore gekom wat 'n verdere opvolgstudie benodig ten einde die vasgestelde defekte beter te karakteriseer:

(i) 'n Verklaring vir die verlaagde aktiwiteit van n-aktomiosien-ATPase

Vanweë die waargenome neiging tot 'n makliker dissovasiasie van n-aktomiosien behoort die aktien-miosien-interaksie in hierdie verband nader ondersoek te word. Dit kan egter wees dat die verlaagde ATPase-aktiwiteit toegeskryf kan word aan 'n verlaagde aktivering deur aktien sowel as 'n verlaagde aktiwiteit van die miosien-ATPase as sodanig. Die meting van die miosien-ATPase-aktiwiteit is dus ook noodsaaklik in enige verdere opvolgstudies.

(ii) 'n Verklaring van die verlaagde Ca^{2+} -sensitiwiteit van n-aktomiosien-ATPase

Deur gebruikmaking van uitruilstudies kan funksioneel bepaal word in watter komponent van die n-aktomiosien-molekule die defek geleë is. Schwartz et al. (1973) het deur die troponien-tropomiosien-sisteem te isoleer uit iskemiese hartsperweefsel van honde en dit te kombineer met gedesensiteerde aktomiosien van kontroleharte, en andersom, vasgestel dat die verlaagde Ca^{2+} -sensitiwiteit toe te skryf is aan 'n defektiewe troponien-tropomiosien-sisteem. Hierdie ondersoek is met superpresipitasiestudies uitgevoer. Die verlaagde Ca^{2+} -sensitiwiteit vir gousiekte-n-ak-



Figuur 8.1 Die invloed van Ca^{2+} op die superpresipitatie van gousiekte- en kontrolle-n-aktomiosien

tomiosien-ATPase sou dus moontlik ook nog met superpresipitasiestudies herhaal kon word en op 'n soortgelyke wyse verder ondersoek word.

In 'n steekproef in hierdie ondersoek is die effek van Ca^{2+} op die superpresipitasie van gousiekte- en kontrole-n-aktomiosien nagegaan waarvan die resultate in figuur 8.1 aangedui word.

Alhoewel duidelike verskille tussen die superpresipitasieaktiwiteit van gousiekte- en kontrole-n-aktomiosien bestaan, is daar op die oog af geen duidelike verskil ten opsigte van die aktiverende effek van Ca^{2+} tussen gousiekte- en kontrolediere nie. Hierdie gegewens moet egter slegs as illustratief beskou word, aangesien geen statistiese verwerking hierop toegepas is nie.

(iii) Bepaling van die mitochondriale aktiwiteit

Die bepaling van die mitochondriale oksidatiewe-fosforilering behoort onder ander kondisies van isolasie en meting van die aktiwiteit herhaal te word, aangesien dit 'n belangrike invloed op die uitslag van die resultaat (Lochner et al., 1976) mag hê. Die bevinding ten opsigte van die mitochondriale suurstofopname stem egter ooreen met die gegewens in die literatuur vir hartversaking (Schwartz et al., 1973) en die defek wat waarskynlik geleë is in die respiratoriese ketting behoort verder ondersoek te word deur die aktiwiteit van sekere ensieme, byvoorbeeld die sitochroom-oksidasie, na te gaan. 'n Normale en selfs

bo-normale konsentrasie van NADH in die teenwoordig-
heid van 'n verlaagde ATPase en kreatienfosfaatinhoud,
dui op 'n normale substraat oksidasie en 'n ondersoek
na hierdie aspekte blyk dus nie nodig te wees nie.

'n *In vivo*-bepaling van die mitochondriale aktiwiteit sou die
ideaal wees, aangesien die aktiwiteit daarvan *in vivo* soos
afgelei uit *in vitro* eksperimente, aansienlik beïnvloed kan
word deur 'n intrasellulêre akkumulاسie van sekere stowwe
tydens versaking van die hart. Daar 'n direkte metode eg-
ter nie bestaan nie, sou dit gewens wees om 'n indirekte me-
tode, byvoorbeeld die ATP:ADP as indikasie te gebruik. So
'n waarde sou miskien meer realisties wees om die ATPase en
kreatienfosfaatinhoud van die weefsel te verklaar, alhoewel
die gevaar bestaan dat dit op sigself ook weer deur nie-mi-
tochondriale faktore beïnvloed kan word.

8.2 Primêre veranderinge

Die primêre veranderinge wat die inname van die plantma-
teriaal in die hartspierweefsel veroorsaak kan op een van
twee maniere nagegaan word. Dit kan gedoen word deur wille-
keurig sekere parameters wat verteenwoordigend van sekere
aspekte van die hartspiermetabolisme is, op enige stadium
vanaf na inname, na te gaan, of andersom, deur sekere para-
meters wat verander het tydens versaking, tot so na as
moontlik aan die doseringsstadium terug te volg. In beide
hierdie benaderings moet egter rekening gehou word met die
snelle kompensatoriese meganismes van die hartspier en moet
'n verandering selfs op 'n baie vroeë stadium nie noodwendig
vertolk word as die direkte effek van die toksien nie.

In 'n poging om 'n beeld van die energiemetabolisme in die pre-versakingsfase te verkry, is die hartspierweefsel-inhoud van ATP, KrP en NADH gemeet van skape wat vir slegs 11-14 dae met die gousiekteplantmateriaal gedoseer is en geen diagnostiese of nadoodse simptome van versaking getoon het nie. Tabel 8.1 toon die resultate wat verkry is.

Tabel 8.1 ATP, KrP, ATP:KrP-verhouding, NADH en droë:nat massa waardes vir die hartspierweefsel van kontroleskaap en skaap na 11 - 14 dae van gousiekte-plantmateriaal

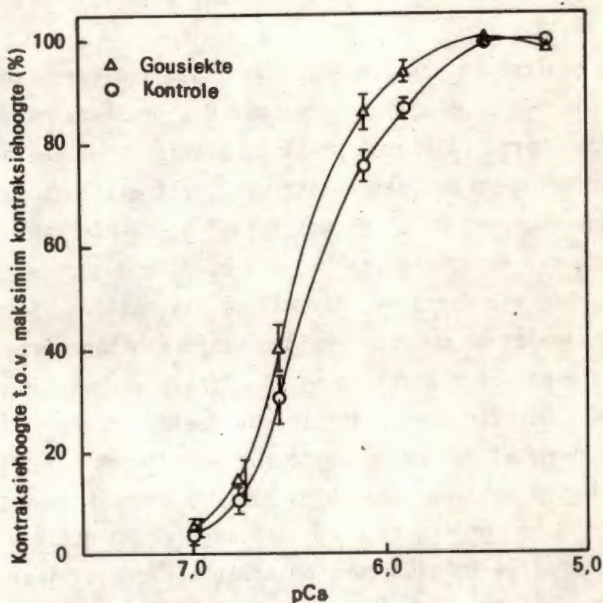
Skaap No.	ATP (μ mole/g)	KrP (μ mole/g)	ATP:KrP	NADH ($\frac{1}{2}$ mole/g)	Droë:nat massa van die ventrikelweefsel
GEDOSEERDE GROEP					
1	4,1	6,4	0,64	55	20,5%
2	6,6	11,1	0,59	47	20,8%
3	8,3	13,6	0,61	106	23,8%
4	6,4	10,3	0,62	42	22,9%
Gem.	6,4	10,3	0,61	63	22,0%
KONTROLEGROEP					
1	6,3	11,3	0,55	155	21,0%
2	5,9	12,9	0,45	120	19,7%
3	4,3	9,4	0,45	153	21,7%
4	5,8	10,0	0,58	122	20,9%
Gem.	5,6	10,9	0,51	138	20,8%
	NB	NB	*	*	NB

* $P < 0,02$ vir betekenisvolle verskil (Wilcoxon se twee-steekproef-toets) vir gousiekte van kontroles.

NB Nie-betekenisvolle verskil.

Die resultate toon geen wanbalans ten opsigte van die ATP- en KrP-inhoud in die hartspierweefsel van gousiekte-materiaal-gedoseerde skaap nie, alhoewel 'n betekenisvolle verskuiwing in die verhouding van ATP tot KrP wel bestaan. Hierdie teken ten opsigte van 'n verandering in die energiemetabolisme gaan gepaard met 'n opvallende afname in die konsentrasie van NADH. Dit kan dui op een van twee moontlike oorsake, naamlik 'n verlaagde produksie van NADH wat dan na verwagting 'n verlaagde produksie van ATP tot gevolg moes gehad het, of 'n verhoogde aanvraag daarna, moontlik as gevolg van 'n aktivering van die mitochondriale sisteem as gevolg van kompensasiemeganismes. Laasgenoemde lyk volgens die huidige gegewens na die mees waarskynlike. Hierdie gegewens dui op 'n normale energiebalans, dog op 'n pre-versakingsverandering in die energiemetabolisme. 'n Bevestiging van hierdie bevindings en 'n verdere terugvoering na die beginstadium van dosering lyk na 'n logiese volgende ondersoek in hierdie verband. Gelyktydige elektronmikroskopiese opnames sou baie kon bydra tot die interpretasie van die gegewens en sal 'n goeie aanduiding kan gee van die primêre veranderinge in die sel. Ook die toepassing van gelyktydige hemodinamiese metings, ten einde die veranderinge in die hartspier eerder te koppel aan sy funksie as aan 'n tydsrooster, kan bestudering van die siektetoestand aansienlik vergemaklik. Dit is gevind dat aansienlike variasie tussen individuele skaap bestaan ten opsigte van die tydsverloop van die siektetoestand en ook dat ossilasies ten opsigte van die waarde van sekere metings verwag kan word (Fizel & Fizelova, 1971) wat eerder funksie- as tydsgekopeld sal wees.

'n Voorlopige ondersoek op dieselfde skaap (11-14 dae van gousiektemateriaal inname) ten opsigte van die Ca^{2+} -sensitiwiteit van gliserol-geëkstraheerde hartspierwesels vir isometriese spanningsontwikkeling, het getoon dat daar geen opvallende verskil tussen gousiekte- en kontroleharte bestaan nie. (Figuur 8.2).



Figuur 8.2 Die effek van Ca^{2+} -konsentrasie op die isometriese spanningsontwikkeling van gliserol-geëkstraheerde hartspierwesels van gousiekte- en kontrolediere.

8.3 Isolering van die toksien

Isolering van die toksien vorm 'n belangrike aspek van die gousiekte-avorsing, aangesien die gebruikmaking van die

geïsoleerde toksien die opwekking van die siektetoestand baie meer hanteerbaar sal maak en gevolglik op 'n baie meer gestandaardiseerde wyse sal kan laat plaasvind. Die eintlike voordeel hiervan lê egter opgesluit in die feit dat die direkte effek van die toksien op *in vitro*-sisteme van die sel, sonder die gekompliseerde inwerking van kompensatoriese meganismes, nagegaan sal kan word. Die primêre effek mag moontlik slegs op hierdie wyse vasgestel word.

Die evaluering van die effek van 'n geïsoleerde verbinding op die *in vivo*-sisteem moet met die grootste omsigtigheid gedoen word. Alhoewel prakties miskien onuitvoerbaar sou toediening op die natuurlike wyse, dit wil sê soos wat die plant ingeneem word, en wel totdat gousiektesimptome verskyn, die enigste finaal korrek bewysde metode wees. Die simptome van die dier, dit wil sê diagnosties, patologies, histologies en ook ten opsigte van die biochemiese patogenese kan as maatstawwe vir 'n finale vergelyking gebruik word. Direkte toediening (byvoorbeeld intraperitoneaal of intraveneus) wat deurgang deur die SVK kortsluit, kan tot gevolg hê dat makromolekules nie die afbraak daarvan in die SVK kan ondergaan nie. Dit mag ook moontlik wees dat die werklike toksien eers ontstaan na veranderinge in die rumen. Hierdie lyk na 'n aantreklike moontlikheid, gesien in die lig dat gousiekte slegs by herkouers voorkom. 'n Interessante eksperiment in hierdie verband sou wees om die isolasie te doen op materiaal wat 'n geruime tyd onderwerp was aan rumenvertering. Nie-geëkstraheerde rumenverteerde materiaal kan ook as sodanig aan nie-herkouers gevoer word.

Daar moet egter gewaak word om nie summier te aanvaar dat hartversaking tydens gousiekte deur 'n toksien veroorsaak word nie. Dit is bekend dat bepaalde dieetsfaktore soos 'n gebrekkige inname van sekere vitamienes of minerale, hartdefekte kan veroorsaak. 'n Siektetoestand wat in Australië bekend staan as *falling disease*, vertoon 'n noue ooreenkoms met gousiekte (Bennetts et al., 1941). Die diere wat weidings met 'n lae koper inhoud bewei ontwikkel 'n verlaagde koper status in die liggaam wat dan waarskynlik versaking van die hart tot gevolg het. Alhoewel 'n verlaagde aktiwiteit van sitochroom-oksidasie wat vir hartspierweefsel onder hierdie omstandighede gevind is, goed sou inpas by die huidige biochemiese patogeenese van gousiekte, kon 'n verlaagde koper status nie in die lewers van gousiektediere gevind word nie (Naudé, T.W., persoonlike mededeling). 'n Verhoogde mangaaninhoud wat vir *Pachybtigma pygmaeum* van die Ventersdorpdistrik gevind is (Kruger, G.H.J., 1969) mag moontlik 'n interaksie met die absorpsie van ander belangrike minerale tot gevolg hê. Die feit dat gousiekte egter kan voorkom selfs na 'n lang latente-periode van geen toksiese plantmateriaal inname, maak dieetsfaktore as 'n oorsaak, 'n minder aantreklike moontlikheid.

'n Baie belangrike karakteristiek van gousiekte om in aanmerking te neem by die vorming van enige hipotese, is die feit dat dit nie akute vrektes veroorsaak nie, en verder dat gousiektediere aan hartversaking kan vrek na 'n latente periode van geen gousiektebossie inname nie, terwyl dit aan die einde van die doseringstydperk nog geen uiterlik waarneembare simptome vertoon het nie. Dit weerspieël dus

blykbaar een of ander onomkeerbare beskadiging van een of ander sisteem gedurende die doseringstydperk. In die latente periode daarna het dit dan skynbaar 'n chroniese degeneratiewe effek op die hartspier, sodanig dat geen kompensatoriese hipertrofie kan plaasvind nie, met uiteindelijke kongestiewe hartversaking tot gevolg. Dit kan moontlik verband hou met voorlopige aanduidings van miofilament (veral miosien) dissolusie in die letselgedeeltes van gousieke harte (Pienaar, J.G., persoonlike mededeling). 'n Ondersoek na die sintese van die miokardiale kontraktiele-proteïene in besonder miosien, blyk dus essensieel vir enige verder gousieke navorsing te wees. 'n Sodanige ondersoek kan in samehang met sekere kontraktiele-proteïen funksiestudies, byvoorbeeld superpresipitasie, gedoen word.

HOOFSTUK 9

OPSOMMING

SUMMARY

OPSOMMING

Gousiekte is 'n kongestiewe tipe kardiomiopatie by herkouers wat volgens die huidige ondersoek met geen ventrikulêre hipertrofie gepaard gaan nie. Feitlik geen inligting ten opsigte van die biochemiese patogenese daarvan is bekend nie. Na aanleiding van indirekte aanduidings van 'n defektië transformering van energie (Pretorius et al., 1973) is dié aspek ten opsigte van sowel die produksie as die verbruik daarvan in hierdie ondersoek nagegaan.

Die gegewens van hierdie ondersoek dui op 'n wanbalans ten opsigte van die produksie en/of verbruik van ATP en kreatienfosfaat (KrP). Dit is bevestig deur 'n verlaagde aktiwiteit wat vir beide hierdie sisteme *in vitro* gevind is.

Die energieproduksiesisteen word gekenmerk deur 'n verlaagde aktiwiteit van suurstofopname deur geïsoleerde mitochondria. Dit verklaar moontlik 'n toename van die melksuurkonsentrasie in die hartspierweefsel van gousiekte diere. 'n Geringe nie-statisties betekenisvolle styging in die gemiddelde waardes van NADH en anorganiese fosfaat ondersteun hierdie tekens van 'n toename in die anaerobe toestand. 'n Analise van die patroon van ATP:KrP-verandering tydens gousiekte ondersteun 'n verlaagde produksie van energie as oorsaak vir die daling in energiereserwes en toon dat dit eerder hieraan toegeskryf moet word as aan 'n verhoogde aanvraag na energie. Die ATP-waardes toon dat die harte nie finaal versak as gevolg van 'n algehele uitputting van ATP in die hartspierweefsel nie, maar waarskynlik eerder as gevolg van 'n swak benutting daarvan.

'n Verlaagde n-aktomiosien-ATPase-aktiwiteit by variërende konsentrasies van ATP, Mg^{2+} en Ca^{2+} dui op 'n verlaagde benutting van energie deur die kontraktiele-proteïensisteem. Dit word ondersteun deur 'n verlaagde aktiwiteit van n-aktomiosien-superpresipitasie, 'n indirekte metode van ATPase-meting.

Aanduidings van 'n makliker dissosiasie van gousiekte-aktomiosien is verkry uit genoemde metings, en kan as 'n moontlike verklaring aangebied word vir die verlaagde ATPase-aktiwiteit. Hierbenewens blyk dit dat ook 'n verlaagde sensitiwiteit ten opsigte van die aktiverende effek van Ca^{2+} bestaan. Dit kan waarskynlik nie toegeskryf word aan 'n defektiewe binding van Ca^{2+} met die kontraktiele-sisteem, soos afgelei vanaf die Ca^{2+} -sensitiwiteit van die gliserol-geëkstraheerde hartspierwesels ten opsigte van die isometriese spanningsontwikkeling, nie.

'n Normale Ca^{2+} -sensitiwiteit vir die gliserol-geëkstraheerde hartspierwesels ten opsigte van die ontwikkeling van isometriese spanning is vir gousiekte diere gevind. Dit toon dat gemeenskaplike sisteme wat betrokke is by die Ca^{2+} aktivering (byvoorbeeld Ca^{2+} -binding) van beide spanningsontwikkeling en ATPase dus normaal is en nie verantwoordelik is vir die defektiewe Ca^{2+} -sensitiwiteit van die ATPase sisteem nie.

Bogenoemde veranderinge tydens gousiekte bevestig die suggestie van Pretorius et al. (1967) en is in ooreenstemming met die breë hipotese vir die meganisme van hartversaking soos voorgestel deur Olson en Schwartz (1951). Die besondere defekte is egter nie in ooreenstemming met dié van ander tipes van versaking nie en blyk verband te hou met die oorsaak of tipe versaking, eerder as 'n algemene karakteristiek van hartversaking.

SUMMARY

Gousiekte is a congestive type of cardiomyopathy which occurs among ruminants. *Post mortem* analysis performed in this investigation on hearts from animals suffering from gousiekte have shown that this cardiomyopathy is not associated with cardiac hypertrophy. In this respect gousiekte differs from most other forms of congestive cardiomyopathies.

The biochemical pathogenesis of gousiekte is virtually unknown. Physiological studies on gousiekte (Pretorius et al., 1973) suggested the possibility of a defective transformation of energy in the hearts of gousiekte sheep. Such defects are furthermore known to occur in other classes of congestive cardiomyopathies (Olson & Schwartz, 1951). These observations therefore prompted this investigation on aspects of both the energy production and energy utilization in these hearts. It was shown by *in vitro* experiments that a defect in the balance between the production and utilization of ATP and creatine-phosphate (CrP) exists, which is manifested by an impairment found for both of these systems.

The energy production system is characterized by a depressed activity of oxygen uptake by isolated mitochondria. This could possibly explain the increase in the concentration of lactic acid which was found in the heart muscle of the gousiekte sheep. This indication of an increased anaerobic state is corroborated by a small though insignificant increase in the mean values of NADH and inorganic phosphate. An increase in the ATP:CrP ratio, also points to a lowered production of energy as the

cause of a lowering in the energy reserves, rather than an increased demand for energy. The ATP-values show that the final failure of gousiekte hearts can not be attributed to a total depletion of ATP in the heart muscle, but may rather be the result of an incapability of the contractile system to utilize ATP.

A depressed activity of n-actomyosin ATPase at varying concentrations of ATP, Mg^{2+} and Ca^{2+} indicates a depressed utilization of energy by the contractile protein system. This finding is corroborated by a depressed activity of superprecipitation by gousiekte n-actomyosin, an indirect indication of ATPase activity.

An easier dissociation of gousiekte n-actomyosin appeared to be possible. This is based on ATPase and superprecipitation characteristics and could be offered as a possible explanation for the depression in ATPase activity. A depressed sensitivity of the ATPase system to the activating effect of Ca^{2+} was also found. This can probably not be related to a defective binding of Ca^{2+} to the contractile proteins, as was calculated from Ca^{2+} -isometric tension response curves of glycerol-extracted cardiac muscle fibres.

In contrast to the depressed ATPase activity, a normal Ca^{2+} sensitivity of glycerol extracted muscle fibres with respect to the generation of isometric tension was found. This may indicate that systems, like Ca^{2+} binding, which are necessary for the concomitant Ca^{2+} activation of ATPase and isometric tension development, can not be the cause for the depressed Ca^{2+} sensitivity of gousiekte n-actomyosin ATPase.

The above mentioned derangements during gousiekte are in accordance with the suggestion made by Pretorius et al. (1967) as well as with the hypothesis made for the mechanism of heart failure by Olson and Schwartz (1951). It seems however that some aspects on the detail of the defects, for instance the characteristics of the ATPase defect, are related to a specific cause or type of failure, rather than a common characteristic of heart failure.

LITERATUURVERWYSINGS

- Adelaar, T.F., Terblanche, M. & Smit, J.D. (1966)
Journal of the South African Veterinary Medical Association, 37, 199.
- Adelaar, T.F. & Terblanche, M. (1967)
Journal of the South African Veterinary Medical Association, 38, 25.
- Alpert, N.R. & Gordon, M.S. (1962)
American Journal of Physiology, 202, 940.
- Alpert, N.R., Gale, H.H. & Taylor, N. (1967)
(In: Tanz, R.D., Kavalier, F. & Roberts, J., red. Factors Influencing Myocardial Contractility. New York & London, Academic Press. p. 127).
- Arcos, J.C., Sohal, R.S., Sun, S.C. Argus, M.F. & Burch, G.E. (1968)
Experimental and Molecular Pathology, 8, 49.
- Argus, M.F., Arcos, J.C., Sardesai, V.M. & Overby, J.L. (1964)
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 117, 380.
- Bennetts, H.W., Beck, A.B., Harley, R. & Evans, S.T. (1941)
The Australian Veterinary Journal, 17, 85.
- Benson, E.S., Hallaway, B.E., Turbak, B.S. & Turbak, C.E. (1957)
Circulation Research, 6, 122.

- Borst, P., Loos, J.A., Christ, E.J. & Slater, E.C. (1962)
Biochimica et Biophysica Acta, 62, 509.
- Bowen, W.J. & Martin, H.L. (1958)
American Journal of Physiology, 195, 311.
- Bozler, E. & Prince, J.T. (1953)
Journal of General Physiology, 37, 53.
- Braasch, W., Gudbjarnason, S., Puri, P.S., Ravens, K.G. & Bing, R.J. (1968)
Circulation Research, 23, 429.
- Brahms, J., & Kay, C.M. (1963)
Journal of Biological Chemistry, 238, 198.
- Calva, E., Mujica, A., Nunez, R., Aoki, K., Bistení, A. & Sodi-Pallares, D. (1966)
American Journal of Physiology, 211, 71.
- Chandler, B.M., Sonnenblick, E.H., Spann, J.F., Jr. & Pool, P.E. (1967)
Circulation Research, 21, 717.
- Chidsey, C.A., Weinbach, E.C., Pool, P.E. & Morrow, A.G. (1966)
Journal of Clinical Investigation, 45, 40.
- Conway, G., Heazlitt, R.A., Montag, J. & Mattingly, S.F. (1975)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 7, 817.
- Daniel, J.L. & Hartshorne, D.J. (1972)
Biochimica et Biophysica Acta, 278, 567.

- Dhalla, N.S. (1976)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 8, 661.
- Dreizen, P. & Richards, D.H. (1973)
Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology,
37, 29.
- Ebashi, S. (1961)
The Journal of Biochemistry, 50, 236.
- Ebashi, S. (1963)
Nature, 200, 1010.
- Ebashi, S. & Ebashi, F. (1964)
Journal of Biochemistry (Tokyo), 55, 604.
- Ebashi, S. & Kodama, A. (1966)
Journal of Biochemistry (Tokyo), 59, 425.
- Ebashi, S., Ebashi, F. & Kodama, A. (1967)
Journal of Biochemistry (Tokyo), 62, 137.
- Fedelesova, M. & Dhalla, N.S. (1971)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 3, 93.
- Feinstein, M.B. (1962)
Circulation Research, 10, 333.
- Fiske, C.H. & Subbarow, Y. (1925)
Journal of Biological Chemistry, 66, 325.

- Fizel, A. & Fizelova, A. (1971)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2, 187.
- Fox, A.C., Wilker, N.S. & Reed, G. E. (1965)
Journal of Clinical Investigation, 44, 202.
- Furchgott, R.F. & de Gubareff, T. (1956)
Journal of Biological Chemistry, 223, 377.
- Furchgott, R.F. & Lee, K.S. (1961)
Circulation, 24, 416.
- Gergely, J., Gouvea, M.A. & Kohler, H. (1956)
Circulation, 14, 940.
- Gertler, M.M. (1961)
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 106, 109.
- Gevers, W. (1972)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 4, 537.
- Goodwin, J.F. (1970)
The Lancet, 1, 731.
- Gordon, A.L., Inchiosa, M.A. Jr. & Lehr, D. (1972)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 4, 543.
- Gordon, M.S. & Brown, A.L. Jr. (1966)
Circulation Research, 18, 534.

- Gudbjarnason, S., de Schryver, C., Hunn, G. & Bing, R.J. (1964)
Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 64, 796.
- Gudbjarnason, S., Mathes, P. & Ravens, K.G. (1970)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1, 325.
- Harris, R.A., Farmer, B. & Ozawa, T. (1972)
Archives of Biochemistry and Biophysics, 150, 199.
- Harrison, C. E. Jr., Cooper, G., Zujko, K.J. & Coleman, H.N.
(1972)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 4, 633.
- Harrison, T.R., Pilcher, C. & Ewing, G. (1930)
Journal of Clinical Investigation, 8, 325.
- Hartshorne, D.J. & Mueller, H. (1967)
Journal of Biological Chemistry, 242, 3089.
- Henry, P.D., Ahumada, G.G., Friedman, W.F. & Sobel, B.E.
(1972)
Circulation Research, 31, 740.
- Honig, C.R. & Reddy, Y.S. (1973)
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,
184, 330.
- Hotta, K. & Bowen, W.J. (1970)
American Journal of Physiology, 218, 332.
- Hozumi, T. (1977)
The Journal of Biochemistry, 81, 329.

- Hozumi, T. & Hotta, K. (1977)
The Journal of Biochemistry, 81, 1141.
- Hulsmann, W.C., Elliot, W.B. & Slater, E.C. (1960)
Biochimica et Biophysica Acta, 39, 267.
- Hurter, L.R., Naudé, T.W., Adelaar, T.F., Smit, J.D. & Codd, L.E. (1972)
Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 39, 71.
- Huijing, F. & Slater, E.C. (1961)
The Journal of Biochemistry, 49, 493.
- Jacobs, H., Heldt, H.W. & Klingenberg, M. (1964)
Biochemical and Biophysical Research Communication, 16, 516.
- Julian, F.J. (1971)
Journal of Physiology, 218, 117.
- Kako, K. & Bing, R.J. (1958)
Journal of Clinical Investigation, 37, 465.
- Katz, A.M. (1966)
Journal of Biological Chemistry, 241, 1522.
- Katz, A.M. (1970)
Physiological Reviews, 50, 63.
- Katz, A.M. (1973)
Circulation, 47, 1076.

- Katz, A.M. & Hecht, H.H. (1969)
American Journal of Medicine, 47, 497.
- Klingenberg, M. (1963)
(In: Bergmeyer, H.U., red. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York & London, Academic Press. P. 531.)
- Kottmeier, C.A. & Wheat, M.W. (1967)
Circulation Research, 21, 17.
- Kruger, G.H.J. (1969)
Ongepubliceerde Verhandeling - P.U. vir C.H.O.
- Kurien, V.A., Yates, P.A. & Oliver, M.F. (1969)
Lancet, 2, 185.
- Lindenmayer, G.E., Sordahl, L.A. & Schwartz, A. (1968)
Circulation Research, 23, 439.
- Lindenmayer, G.E., Sordahl, L.A., Harigaya, S., Allen, J.C.
Besch, H.R. & Schwartz, A. (1971)
American Journal of Cardiology, 27, 277.
- Lochner, A., Opie, L.H. & Brink, A.J. (1968)
Cardiovascular Research, 2, 297.
- Lochner, A., Brink, A.J. & Van der Walt, J.J. (1970)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1, 47.
- Lochner, A., Opie, L.H., Owen, P., Kotzé, J.C.N., Bruyneel,
K. & Gevers, W. (1975)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 7, 203.

- Lochner, A., Kotzē, J.C.N. & Gevers, W. (1976)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 8, 465.
- Luchi, R.J., Kritcher, E.M. & Thyrum, P.T. (1969)
Circulation Research, 24, 513.
- Maruyama, K. & Watanabe, S. (1962)
Journal of Biological Chemistry, 237, 3437.
- Mathur, P.P. & Case, R.B. (1973)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 5, 375.
- McKinney, B. (1974)
(In: Pathology of the Cardiomyopathies. London, Butterworths & Co. (Publishers) Ltd. p. 537).
- Meerson, F.Z. (1969)
Circulation Research, 25 (Supplement: 2) 1.
- Meerson, F.Z. & Pomoinitsky, V.D. (1972)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 4, 571.
- Mellors, A., Tappel, A.L., Sawant, P.L. & Desai, I. (1967)
Biochimica et Biophysica Acta, 143, 299.
- Merin, R.G., Kumazawa, T. & Honig, C.R. (1974)
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 190, 1.
- Monmaerts, W.F.H.M. & Seraidarian, K. (1947)
Journal of General Physiology, 30, 401.

Moore, F.D., Edelman, I.S., Olney, J.M., James, A.H., Brooks,
L. & Wilson, G.M. (1954)

Metabolism, 3, 334.

Müller-Ruchholtz, E.R. & Lochner, W. (1971)

Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 3, 15.

Murphy, R.A., Bohr, D.F. & Newman, D.L. (1969)

American Journal of Physiology, 217, 666.

Nagano, M. & Hochrein, H. (1963)

Klinische Wochenschrift, 41, 792.

Naudé, T.W. & Adelaar, T.F. (1962)

Ongepubliceerde data.

Neely, J.R. & Morgan, H.E. (1974)

Annual Review of Physiology, 36, 413.

Nihei, T. (1967)

Nature, 215, 886.

Oleson, K.H. (1964)

Acta Medica Scandinavia, 175, 301.

Oliver, M.F., Kurien, V.A. & Greenwood, T.W. (1968)

Lancet, 1, 710.

Olson, R.E. & Schwartz, W.B. (1951)

Medicine, 30, 21.

- Olson, R.E., Ellenbogen, E. & Iyengar, R. (1961)
Circulation, 24, 471.
- Olson, R.E. (1964)
Circulation Research, 15 (Suppl. II), 109.
- Opie, L.H. (1968)
American Heart Journal, 76, 685.
- Opie, L.H. (1969a)
American Heart Journal, 77, 100.
- Opie, L.H. (1969)
American Heart Journal, 77, 383.
- Pande, S.V. & Blanchaer, M.C. (1971)
Journal of Biological Chemistry, 246, 402.
- Perry, S.V. & Grey, T. C. (1956)
Biochemical Journal, 64, 184.
- Perry, S.V. & Cotterill, J. (1964)
Biochemical Journal, 92, 603.
- Perry, S.V. & Cotterill, J. (1965)
Nature, 206, 161.
- Plaut, G.W.E. & Gertler, M.M. (1959)
Annals of the New York Academy of Science, 72, 515.
- Pool, P.E. & Seagren, S.C. (1966)
Circulation, 34 (Suppl. III), 190.

Pool, P.E., Spann, J.F. Jr., Buccino, R.A., Sonnenblick, E.H.
& Braunwald, E. (1967)

Circulation Research, 21, 365.

Portzehl, H., Zaoralek, P. & Gaudin, J. (1969a)

Biochemica et Biophysica Acta, 189, 429.

Portzehl, H., Zaoralek, P. & Gaudin, J. (1969)

Biochimica et Biophysica Acta, 189, 440.

Pressman, B.C. & Lardy, H.A. (1952)

Journal of Biological Chemistry, 197, 547.

Pretorius, P.J. & Terblanche, M. (1967)

Journal of the South African Veterinary Medical Association, 38,29.

Pretorius, P.J., Terblanche, M. & Van der Walt, J.J. (1967)

In: Proceedings of the 6th European Congress in Balistocardiography, p. 46. (Bibl. cardiol. 21,46).

Pretorius, P.J., Terblanche, M., Van der Walt, J.D. & Van
Ryssen, J.C.J. (1973)

(*In: Cardiomyopathies*, vol. 2, p. 385, red. by Bajusz, E.
& Rona, G., with Brink, A.J. & Lochner, A. Baltimore,
University Park Press).

Rao, C.R. (1958)

Biometrics, 14,1.

- Raczniak, T.J., Chesney, C.F. & Allen, J.R. (1977)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 9, 215.
- Reddy, Y.S. & Honig, C.R. (1972)
Biochimica et Biophysica Acta, 275, 453.
- Rovetto, M.J., Murphy, R.A. & Lefer, A.M. (1970)
Circulation Research, 26, 419.
- Saito, H. (1973)
Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology, 6, 1019.
- Schadler, M. (1967)
Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere. 296, 70
- Schaub, M.C., Hartshorne, D.J. & Perry, S.V. (1967)
Biochemical Journal, 104, 263.
- Scheuer, J. & Stezoski, S.W. (1970)
Circulation Research, 27, 835.
- Scheuer, J. (1972)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 4, 689.
- Schneider, F.H., Ito, Y. & Chidsey, C.A. (1971)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 3, 173.
- Schwartz, A. & Lee, K.S. (1962)
Circulation Research, 10, 321.

Schwartz, A., Sordahl, J.A., Entman, M.L., Allen, J.C., Reddy, Y.S., Goldstein, M.A., Luchi, R.J. & Wyborny, L.E. (1973)
American Journal of Cardiology, 32, 407.

Seraydarian, M.W. & Artaza, L. (1976)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 8, 669.

Shrago, E. (1976)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 8, 497.

Shug, A., Lerner, E., Elson, C. & Shrago, E. (1971)
Biochemical and Biophysical Research Communications,
43, 557.

Shug, A.L., Shrago, E., Bittar, N., Folts, J.D. & Koke, J.R. (1975)
American Journal of Physiology, 228, 689.

Skinner, F.P., Scott, R.F., Morrison, E.S., Imai, H., Jarmolych, J. & Lee, K.T. (1973)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 5, 515.

Smit, J.D. (1959)
Journal of the South African Veterinary Medical Association, 30, 447.

Sobel, B.E., Spann, J.F., Pool, P.E., Sonnenblick, E.H. & Braunwald, E. (1967)
Circulation Research, 21, 355.

- Solaro, R.J., Wise, R.M., Shiner, J.S. & Briggs, F.N. (1974)
Circulation Research, 34, 525.
- Sonnenblick, E.H., Spotnitz, H.M. & Spiro, D. (1964)
Circulation Research, 15 (Suppl. II), 70.
- Sordahl, L.A., Johnson, C., Blallock, B. & Schwartz, A. (1971)
(In: Schwartz, A., red. *Methods in Pharmacology*.
New York, Appleton-Century-Crofts, 1, p. 247)
- Souverign, J.H.M., Weijers, E.J., Groot, G.S.P. & Kemp, A. Jr.
(1970)
Biochimica et Biophysica Acta, 223, 31.
- Stewart, J.M. & Levy, H.M. (1970)
Journal of Biological Chemistry, 245, 5764.
- Stoner, C.D., Resselat, M.M. & Sirak, H.D. (1968)
Circulation Research, 23, 87.
- Strehler, B.L. & McElroy, W.G. (1957)
In: Methods in Enzymology, Volume 3, p. 871, red.
by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, New York, Academic
Press.
- Szent-Györgyi, A. (1949)
Biological Bulletin, 96, 140.
- Tada, M. (1967)
Journal of Biochemistry (Tokyo) 62, 658.

- Taeschler, M. & Bing, R.J. (1953)
Circulation Research, 1, 129.
- Theiler, A., Du Toit, P.J. & Mitchell, D.T. (1923)
9th & 10th Reports of the *Director of Veterinary Education and Research*, p. 1.
- Theiler, G. (1971)
In: *Arnold Theiler, 1876-1936. His Life and Times.*
Edited. Van Schaik's Boekhandel (Edms) Bpk., Pretoria.
- Tolnai, S. & Beznak, M. (1971)
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 3, 193.
- Uys, P.L. & Adelaar, T.F. (1957)
Journal of the South African Veterinary Medical Association, 28, 5.
- Van der Walt, J.D. (1972)
Ongepubliseerde Proefskrif - P.U. vir C.H.O.
- Van Ryssen, J.C.J. (1969)
Ongepubliseerde verhandeling - P.U. vir C.H.O.
- Vinogradov, A., Scarpa, A. & Chance, B. (1972)
Archives of Biochemistry and Biophysics, 152, 646.
- Watanabe, S., Tonomura, Y. & Shiokawa, H. (1953)
Journal of Biochemistry (Tokyo), 40, 387.

Wollenberger, A., Krause, E.G. & Wahler, B.E. (1958)
Naturwissenschaften, 45, 294.

Wollenberger, A., Kleitke, B. & Raabe, G. (1963)
Experimental and Molecular Pathology, 2, 251.

Yasui, T. & Watanabe, S. (1965)
The Journal of Biological Chemistry, 240, 98.

BEDANKINGS

Ek wil graag my opregte dank teenoor die volgende persone en instansies wat aan hierdie studie help meewerk het, betuig.

- *Prof. C.J. Reinecke, hoof van die departement Biochemie, P.U. vir C.H.O., onder wie se leiding hierdie proefskrif gedoen is.*
- *Prof. P.J. Pretorius en Prof. J.J. van der Walt, hoof en direkteur onderskeidelik van die departement Fisiologie en Instituut vir Fisiologiese navoreing, P.U. vir C.H.O., wat hierdie studie moontlik gemaak het en meegehelp het aan die uitvoering daarvan.*
- *Dr. T.W. Naudé en dr. J.G. Pienaar van die Instituut vir Veeartsenykunde te Onderstepoort, vir vrugbare samesprekings.*
- *Dr. T.S. Kellerman, mev. R.A. Schultz en mnr. B.P. Maartens van die Instituut vir Veeartsenykunde te Onderstepoort vir die fistulering van die proefdiere.*
- *Dr. H.S. Steyn, departement Statistiek, P.U. vir C.H.O., vir advies en hulp in verband met die statistiese ontledings.*
- *Mnr. P.J. Schutte, departement Fisiologie, P.U. vir C.H.O., vir hantering van die proefmateriaal.*
- *Mnr. J.P. van der Walt en personeel van die Instrumentmakingery, P.U. vir C.H.O., vir die ontwerp en vervaardiging van gespesialiseerde apparatuur.*
- *Mnr. S. Dire, vir tegniese hulp.*
- *Mej. M.M. du Plessis, vir die finale versorging van figure.*

- *Dr. D.P. Wissing en mr. J.E. Coetsee, vir die taalkundige versorging van die Afrikaans en Engelstalige gedeeltes onderskeidelik.*
- *Mev. E. Schutte en mev. H.C. Kroeze vir die finale- en konseptiewerk onderskeidelik.*
- *Departement Landbou-Tegniese-Dienste vir finansiële ondersteuning.*
- *Herald Drukkery vir die duplisering en bind van hierdie proefskrif.*

A F K O R T I N G S

ADP	-	Adenosiendifosfaat
ATP	-	Adosientrifosfaat
ATPase	-	Adosientrifosfatase
EDTA	-	Etileendiaminotetra-asetaat
EGTA	-	Etileenglikool-bis-(β -amino-eties- eter) N,N' tetra-asetaat
MDH	-	Melksuurdehydrogenase
NAD	-	Nikotienadeniendinukleotied
TCA	-	Trichloorasynsuur