

# Biochemiese en Hematologiese Veranderinge Tydens Eksperimentele Hipercholesterolemie\*

D. J. ROSSOUW, M.Sc., M.B. CH.B. UNIV. STELL. EN F. M. ENGELBRECHT, M.Sc., D.Sc. UNIV. STELL., M.N.R. *Weefselbeskadiging en Selmetabolisme Navorsingsgroep, Departement van Fisiologie, Universiteit van Stellenbosch, Stellenbosch, K.P.*

## SUMMARY

Various biochemical and haematological parameters were investigated during experimentally-induced hypercholesterolaemia in rabbits. A close correlation between the total serum cholesterol concentration and the changes in body mass and  $\beta$ -globulin concentration was observed. The initial increase in these parameters was followed by a reduction in body mass and  $\beta$ -globulin concentration and was accompanied by a simultaneous decline in the total serum cholesterol values. The slight increase in total serum protein levels could be attributed to an elevation in the globulin fraction. Both the relative and absolute  $\alpha$  and  $\gamma$ -globulin concentrations increased progressively during the course of the study. The significance of these findings is discussed. Anaemia of a biphasic character (the second phase being haemolytic) was associated with the hypercholesterolaemia. The increased fragility of the red blood corpuscles, however, was not related to the total serum cholesterol concentrations. The marked mononuclear leucocytosis and basophilia which were observed, may be a response to chronic inflammatory processes in the tissues.

*S. Afr. Med. J.*, 47, 2154 (1973).

Die gebruik van die hipercholesterolemiese konyn as 'n eksperimentele model vir ondersoeke aangaande die patogenese van aterosklerose is goed bekend.<sup>1</sup> Sulke ondersoeke handel meestal oor die morfologiese en biochemiese veranderinge wat in die bloedvatwande optree. Eksperimentele hipercholesterolemie gaan egter ook gepaard met histopatologiese veranderinge in organe soos die long, bynier, nier, limfoïede organe en lewer.<sup>26</sup> Veranderinge wat plaasvind ten opsigte van die liggaamsmassa, serumcholesterol, serumproteïene en verskillende hematologiese parameters verteenwoordig die geassosieerde funksionele stoornisse.<sup>1</sup> Die mate waartoe hierdie verskillende veranderinge, direk of indirek, die ontstaan en ontwikkeling van die bloedvatletsels mag beïnvloed, is verder ondersoek.

Cholesterol en ander bloedlipiede word in die bloed vervoer in die vorm van lipoproteïene, wat hoofsaaklik in die  $\alpha$ - en  $\beta$ -globulienfraksies van serumproteïene aangetref word. Verskeie ondersoekers<sup>2</sup> het aangetoon dat die oorgrote meerderheid van die serumcholesterol normaalweg, sowel as in hipercholesterolemiese toestande, in

die  $\beta$ -lipoproteïenfraksie gedra word. Martin Bailey en Tomar<sup>3</sup> beweer egter dat die verhouding van  $\alpha$ -globulien tot cholesterol in hipercholesterolemiese konyne 3-5 keer afneem. Hulle beskou dié oorversadiging van die  $\alpha$ -globulienproteïene as 'n primêre oorsaak vir die infiltrasie van cholesterol in die bloedvatwande.

Eksperimentele hipercholesterolemie in die konyn gaan ook gepaard met 'n anemie.<sup>4-6</sup> Westerman en medewerkers<sup>6</sup> beskryf 'n bifasiese anemie waarvan die tweede fase 'n duidelike hemolitiese eienskap het. Alhoewel laasgenoemde outeurs die verhoogde breekbaarheid van die rooibloedliggaampies deels toeskryf aan 'n verhoogde intrakorporulêre cholesterol-inhoud, is hul van mening dat ander faktore ook tot 'n verkorte lewensduur mag bydra.

Ondersoek na die veranderinge in die totale en differensiële witseltellings tydens hipercholesterolemie, mag moontlik lig werp op sommige biochemiese en morfologiese veranderinge. Altschul en Martin<sup>7</sup> kon aantoon dat die leukositose aan 'n neutrofilie toegeskryf kan word as gevolg van die uitgebreide histopatologiese veranderinge wat ingetree het. Spraragan<sup>8</sup> beweer egter dat daar geen korrelasie bestaan tussen die totale serumcholesterolwaardes en die veranderinge wat in die totale en differensiële witseltellings plaasvind nie.

Alhoewel 'n groot verskeidenheid parameters reeds volledig deur baie navorsers bestudeer is, het die meeste ondersoekers gekonsentreer op geïsoleerde aspekte van hipercholesterolemie. Die huidige eksperiment is derhalwe só beplan dat verskillende biochemiese, hematologiese en morfologiese parameters in dieselfde konyn bestudeer kon word. Verder is gepoog om vas te stel in watter mate die dikwels uiteenlopende veranderinge tydens hipercholesterolemie die ontstaan van aterosklerotiese letsels mag beïnvloed.

## MATERIAAL EN TEGNIEKE

Wit Nieu-Zeeland wyfiekonyne is in die ondersoek gebruik. Gedurende die eerste 6 weke het al 18 konyne 'n standaard rantsoen ontvang. Die volgende parameters, naamlik serumcholesterol, serumproteïene, elektroforetiese patrone en roetine hematologiese bepalinge, is tweeweklik bepaal. Die gemiddeldes hiervan word as die basale waardes in die tabelle aangegee. Daarna is die proefdiere vir 15 weke op 'n 1% cholesterolrantsoen (m/m) geplaas, waartydens dieselfde parameters met gereelde tussenposes bepaal is.

\*Datum ontvang: 24 Mei 1973.

## Totale Serumcholesterol-Bepaling

Nadat verskeie cholesterol-bepalingsmetodes en modifikasies van standaard tegnieke op die proef gestel is, is Engelbrecht se modifikasie<sup>1</sup> van die Zak-Zlatkis-metode deurgaans gebruik. Die metode is kort en relatief maklik en omdat die ferrichloried-kleurreagens by kamertemperatuur onbeperk stabiel is, is die metode meer betroubaar en herhaalbaar as baie ander standaard tegnieke.

## Totale Serumproteïen-Bepalings en Elektroforese

Aanvanklik, terwyl die serumcholesterol-konsentrasie nog binne normale perke was, het die spektrofotometriese metode van Weichselbaum<sup>9</sup> vir totale proteïen-bepalings, bevredigende resultate gelewer. As gevolg van die melkerige voorkoms van die hipercholesterolemiese sera kon hierdie metode nie deurgaans gebruik word nie. Derhalwe is die basale en eksperimentele totale serumproteïen-bepalings volgens die mikro-Kjeldahl-metode gedoen.<sup>10</sup>

In die lig van die normale histologiese voorkoms van die lewer en nier,<sup>20</sup> is geen korreksie aangebring vir die bydrae van die nie-proteïenstikstof-verbindings in die serum nie.

Elektroforetiese skeiding van die verskillende serumproteïen-fraksies is met behulp van die Microzone elektroforese-apparaat (Beckman) gedoen. Die duplikaat elektroforetoogramme van elke serummonster is daarna densitometries ontleed sodat die absolute en relatiewe konsentrasies van al die fraksies bereken kon word. Lipoproteïen-elektroforese is op 'n aantal normale en hipercholesterolemiese sera gedoen, volgens die metode van Lees en Hatch.<sup>25</sup>

## Hematologiese Bepalings

Die rooisel- en witseltellings is met die Spencer-Bright-Line hemositometer uitgevoer. Vir die hemoglobien-bepalings is 'n roetine kolorimetriese metode gebruik terwyl die hematokrit-bepalings met behulp van Hawksley se mikro-hematokrit apparaat gedoen is. Die GKHK (gemiddelde korpuskulêre hemoglobienkonsentrasie), GKV (gemiddelde korpuskulêre volume) en die GKH (gemiddelde korpuskulêre hemoglobien) is met behulp van eenvoudige formules bereken<sup>27</sup> om die bevindings in die perifere bloedsmere te korreleer. Die maak van perifere bloedsmere met die hipercholesterolemiese bloed het heelwat probleme opgelewer, maar deur die vars smere in formaliendampe in 'n dessikator te fikseer, kon bevredigende differensiële witseltellings gedoen word.

## Statistiese Ontleding

Die resultate is statisties ontleed volgens die standaard metodes vir variansie-analise, en die kleinste betekenisvolle verskille tussen die rekenkundige gemiddeldes is met behulp van die *t*-verdeling-tabelle bereken.

## RESULTATE EN BESPREKING

Verslae oor die veranderinge wat plaasvind tydens eksperimentele hipercholesterolemie handel dikwels oor geïsoleerde aspekte van die kardiovaskulêre patologie. In hierdie ondersoek is daar gepoog om, met behulp van roetine bepalingmetodes, verskillende parameters te bestudeer, om vas te stel in watter mate die biochemiese en hematologiese veranderinge die histopatologiese letsels moontlik kon beïnvloed. 'n Ander faktor wat vergelykende interpretasies van resultate baie bemoelik of dikwels onmoontlik maak, is die feit dat die verskillende ondersoekers baie uiteenlopende tegnieke gebruik om hipercholesterolemie in hul proefdiere op te wek. Derhalwe het ons al die verskillende parameters in dieselfde proefdier onder dieselfde omstandighede bestudeer.

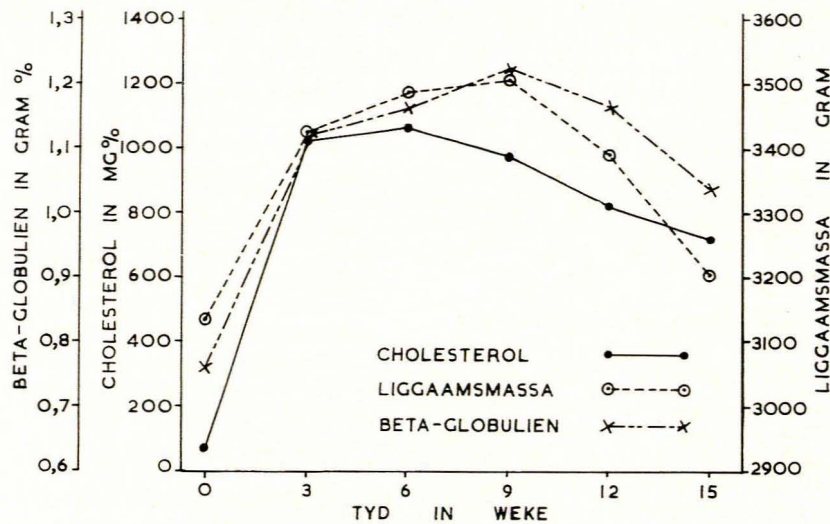
## Liggaamsmassa

Die veranderinge in die liggaamsmassa, totale serumcholesterol- en totale serumproteïen-konsentrasies in konyne op 'n 1% cholesterol-dieet (m/m) oor 'n tydperk van 105 dae, word in Tabel I aangegee. Die progressiewe afname in die liggaamsmassa en totale serumcholesterol-konsentrasie na 9 weke op 'n cholesterolryke dieet toon ook 'n opvallende korrelasie (Afb. 1). In teenstelling hiermee kon Moses en Longabaugh<sup>11</sup> oor 'n tydperk van 6 weke geen verband tussen die liggaamsmassa en serumcholesterol-konsentrasies aantoon nie. Hulle beweer dat daar 'n geringer graad van aterosklerose bestaan het in dié proefdiere waar die hipercholesterolemie gepaard gegaan het met 'n afname in die liggaamsmassa, in vergelyking met dié diere waar die liggaamsmassa toegeneem het. Die presiese verband tussen die liggaamsmassa en serumcholesterol-konsentrasie in hipercholesterolemiese konyne is nog nie duidelik nie. Popják<sup>12</sup> het egter

TABEL I. VERANDERINGE IN DIE LIGGAAMSMASSA, TOTALE SERUMCHOLESTEROL- EN TOTALE SERUMPROTEÏEN-KONSENTRASIES TYDENS HIPERCHOLESTEROLEMIE IN DIE KONYN\*

Tydsverloop (weke)	Liggaamsmassa (g)	Serumcholesterol (mg/100 ml)	Serumproteïen (g/100 ml)
Basale waarde	3137,4 ±255,9	65,7 ±9,3	5,93 ±0,46
3 weke	3411,3 ±317,9	1007,0 ±180,9	6,68 ±0,58
6 weke	3471,8 ±331,3	1055,3 ±167,0	6,90 ±0,52
9 weke	3503,6 ±277,9	947,9 ±136,0	6,86 ±0,39
12 weke	3383,2 ±319,9	805,3 ±124,3	7,12 ±0,49
15 weke	3201,3 ±363,7	715,1 ±96,6	7,16 ±0,48

\* Alle waardes is die gemiddeld van 17 proefdiere ± 1 standaard afwyking.



Afb. 1. Veranderinge in die totale serumcholesterol-konsentrasie, liggaamsmassa en beta-globulien-konsentrasie tydens eksperimentele hipercholesterolemie in die konyne.

waargeneem dat sommige vetdepots in hierdie proefdier makroskopies minder opvallend word en soms selfs verdwyn. Ander ondersoekers<sup>13</sup> is van mening dat daar moontlik 'n onvermoë bestaan om neutrale vette te deponer. Hierteenoor het Vles en medewerkers<sup>14</sup> aangetoon dat wanneer 'n cholesterolryke dieet later vervang word met 'n isokaloriese cholesterolvrye dieet, die daling in die serumcholesterol-konsentrasie gepaard gaan met 'n beduidende toename in die liggaamsmassa. Die gelyktydige afname in die serumcholesterol-konsentrasie en liggaamsmassa (Afb. 1) moet egter ook gesien word in die lig van die sogenaamde cholesterolvergiftigings-beeld wat tydens ekstreme hipercholesterolemiese toestande bestaan.<sup>15</sup>

### Serumcholesterol

Baie teenstrydige resultate is verkry ten opsigte van die veranderinge in die serumcholesterol-konsentrasie van eksperimenteel geïnduseerde hipercholesterolemiese konyne. In die huidige ondersoek is 'n aanvanklike vinnige styging met 'n daaropvolgende daling, tot 'n waarde wat na 15 weke (Tabel 1) hoogs betekenisvol verskil van die maksimum waarde ( $P < 0,001$ ), verkry. Hierdie bevinding is teenstrydig met die waarnemings van Adams en medewerkers,<sup>16</sup> maar ooreenstemming met die resultate van ander ondersoekers.<sup>15,17,18</sup>

Daar bestaan geen bevredigende verklaring vir die daling in die serumcholesterol-konsentrasie, ten spyte van 'n volgehoue hoë cholesterol-inname, nie. Volgens Hellström<sup>19</sup> kan die konyne nie onder hipercholesterolemiese toestande meer cholesterol via 'n verhoogde galsuurproduksie in die lewer kataboliseer nie. Dit laat die vraag ontstaan of daar nie meganismes ontwikkel wat die absorpsie van cholesterol of die endogene cholesterol sintese beïnvloed nie. Of die omvang van die inhibisie van cholesterol sintese<sup>20</sup> van so 'n aard is om die afname in die serumcholesterol-konsentrasie te verklaar, is nie dui-

delik nie. Anders as in die mens, wat maar ongeveer 10% van die cholesterol in die dieet absorbeer, kan die konyne tot 70% van die cholesterol in 'n cholesterolryke dieet opneem.<sup>21,22</sup> Dit is egter nog onbekend of hipercholesterolemiese konyne die vermoë kan ontwikkel om die absorpsie van cholesterol uit die spysverteringskanaal te onderdruk. Ondersoeke in hierdie verband word verder bemoeilik omdat kwantitasie van cholesterol absorpsie tegnies moeilik is vanweë die enterohepatiese en enterolimatiese sirkulasie van die sterol.

Die daling in die serumcholesterol-konsentrasie word ook geassosieer met 'n afname in die steroïedsintese in die bynierkortex.<sup>15</sup> Die afname in steroïedproduksie val saam met 'n versnelde infiltrasie van cholesterol in die aortawand. Hierdie verskuiwing van cholesterol uit die plasmapoel na die weefselpoel gaan ook gepaard met 'n infiltrasie van cholesterol in die ekstravaskulêre weefsel, soos bv. die limfoïede organe, long, byniere, niere, ens.<sup>26</sup> Wat die presiese verband tussen bynierkortex-funksie en die ontwikkeling van aterosklerotiese letsels is, is nog onbekend en word tans verder ondersoek.

Op grond van al die bogenoemde waarnemings wil dit voorkom asof die versaking en/of versadiging van die kataboliese paaie vir cholesterol verantwoordelik is vir die uitgesproke hipercholesterolemie in konyne. Die groot-skaalse infiltrasie van cholesterol in die bloedvatwande en ekstravaskulêre weefsels, is moontlik 'n aanduiding van die cholesterolvergiftigings-beeld soos deur Prior en medewerkers beskryf.<sup>15</sup> Dit bied dan ook 'n verklaring vir die daling in die bloedcholesterol-konsentrasie tydens langdurige hoë cholesterol inname.

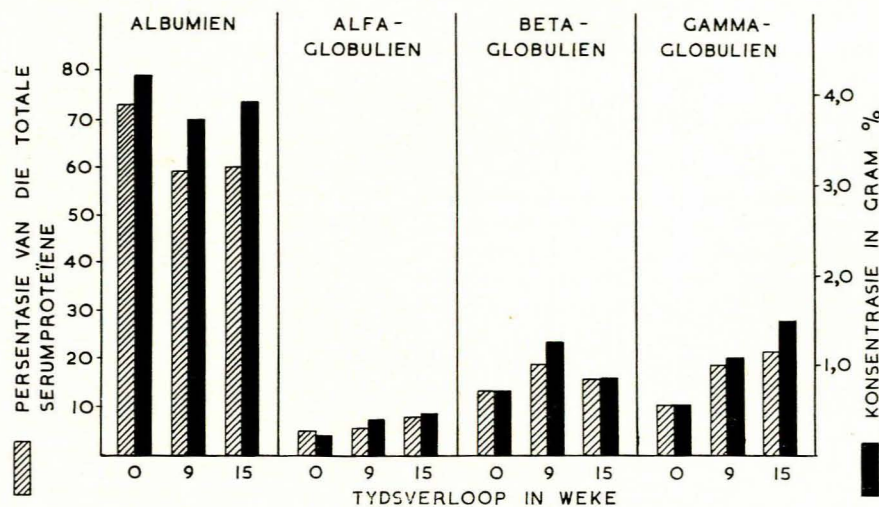
### Serumproteïene

Talle volledige verslae in verband met die fisiese en chemiese eienskappe van lipoproteïene in die mens en in proefdier het reeds verskyn. Daar bestaan egter min

TABEL II. VERANDERINGE IN DIE ROOISELTELLING, HEMOGLOBIEN, HEMATOKRIT EN INDIRECTE HEMATOLOGIESE PARAMETERS TYDENS HIPERCHOLESTEROLEMIE IN DIE KONYN\*

Tydsverloop (weke)	RST (miljoen/mm <sup>3</sup> )	Hb (g/100 ml)	HKT (%)	GKHK (%)	GKH (pg)	GKV ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
Basale waarde	5,219 $\pm$ 0,451	11,8 $\pm$ 0,50	37,8 $\pm$ 1,4	31,18 $\pm$ 1,4	22,71 $\pm$ 1,7	72,89 $\pm$ 5,8
3 weke	5,105 $\pm$ 0,569	11,8 $\pm$ 0,99	36,2 $\pm$ 2,4	32,52 $\pm$ 2,6	23,20 $\pm$ 2,2	71,48 $\pm$ 6,0
6 weke	4,508 $\pm$ 0,652	10,5 $\pm$ 0,90	33,1 $\pm$ 1,7	31,73 $\pm$ 2,2	23,59 $\pm$ 2,4	74,85 $\pm$ 11,1
9 weke	4,163 $\pm$ 0,650	10,2 $\pm$ 1,10	32,1 $\pm$ 1,8	31,68 $\pm$ 2,8	24,84 $\pm$ 3,4	78,98 $\pm$ 13,4
12 weke	3,958 $\pm$ 0,618	9,71 $\pm$ 0,97	30,6 $\pm$ 1,4	31,73 $\pm$ 2,6	24,92 $\pm$ 3,3	78,90 $\pm$ 11,5
15 weke	3,762 $\pm$ 0,455	9,29 $\pm$ 1,16	28,8 $\pm$ 2,9	32,38 $\pm$ 4,0	24,85 $\pm$ 3,1	77,35 $\pm$ 8,8

\* Alle waardes is die gemiddeld van 17 proefdiere  $\pm$  1 standaard afwyking.



Afb. 2. Veranderinge in die verskillende serumproteïen-fraksies tydens eksperimentele hipercholesterolemie in die konyn.

gewens omtrent die veranderinge in die absolute en relatiewe konsentrasies van die verskillende serumproteïen-fraksies tydens eksperimentele hipercholesterolemie in die konyn. Die hoogs beduidende toename in die totale serumproteïen-konsentrasie ( $P < 0,001$ ) in die huidige ondersoek kan toegeskryf word aan 'n toename in veral die globulienfraksie (Tabelle I en II en Afb. 2).

Die geleidelike toename in die  $\alpha$ -globulien-konsentrasie is moontlik 'n aanduiding van weefselbeskadiging en sellulêre afbraak wat plaasvind tydens kroniese hipercholesterolemiese toestande.<sup>1,15</sup> In teenstelling met die algemeen aanvaarde idee beweer Martin Bailey en Tomar<sup>3</sup> dat hierdie toename in die  $\alpha$ -globulienfraksie 'n oorversadiging van die  $\alpha$ -lipoproteïene weerspieël. Hierdie wanverhouding tussen die cholesterol en die beskikbare proteïen-draermolekuul mag 'n primêre rol in die ontstaan van die aterosklerotiese letsels speel.

Die veranderinge in die  $\beta$ -globulien-konsentrasie toon 'n opvallende korrelasie met die veranderinge in die totale

serumcholesterol-konsentrasie (Afb. 1). Op grond van die lipoproteïen-elektroforetogramme was dit ook duidelik dat die  $\beta$ -globulien verantwoordelik is vir die vervoer van die grootste hoeveelheid cholesterol selfs onder ekstreme hipercholesterolemiese toestande.

Ten opsigte van die  $\gamma$ -globulien kon McMillan en medewerkers<sup>23</sup> geen verband aantoon tussen die omvang van die aterosklerotiese letsels en die veranderinge in die  $\gamma$ -globulien-konsentrasie nie. Hulle kom dus tot die gevolgtrekking dat die biochemiese en morfologiese veranderinge tydens hipercholesterolemie heelwaarskynlik nie 'n immunologiese grondslag het nie. Die resultate van die huidige ondersoek toon egter 'n progressiewe toename in beide die absolute en relatiewe  $\gamma$ -globulien-konsentrasie oor 'n tydperk van 15 weke. Voordat hierdie hoogs beduidende toename in die  $\gamma$ -globulien ( $P < 0,001$ ) in 'n immunologiese verband geïnterpreteer kan word, is dit essensieel dat die relatiewe belang van die verskillende tipes immunoglobulien bestudeer moet word. As gevolg

TABEL III. VERANDERINGE IN DIE TOTALE EN DIFFERENSIËLE WITSELTELLINGS TYDENS HIPERCHOLESTEROLEMIE IN DIE KONYN\*

Tydsverloop (weke)	Totale WST (per mm <sup>3</sup> )	Differensiële witseltelling (%)				
		Neutrofiele	Eosinofiele	Basofiele	Limfosiete	Monosiete
Basale waarde	7 838	47	2	3	41	7
3 weke	9 856	46	5	2	37	10
15 weke	11 722	31	2	5	50	12

\* Alle waardes is die gemiddeld van 17 proefdiere.

van die nie-spesifieke geaardheid van die proteïenkomponeent van lipoproteïenkomplekse, vind onderlinge uitruiling van lipiede tussen lipoproteïene plaas.<sup>24</sup> Die moontlikheid bestaan dus dat die hipergammaglobulinemie te wyte is aan 'n verhoogde transport van cholesterol aan proteïene wat elektroforeties saam met die  $\gamma$ -globuliene migreer.

### Anemie

Hipercholesterolemie gaan ook gepaard met 'n uitgesproke anemie. Die progressiewe afname in die rooiseltellings, hemoglobien- en hematokritwaardes korreleer egter nie met die totale serumcholesterol-konsentrasie nie (Tabel II). Daar was ook 'n baie uitgesproke toename in die aantal sirkulerende, gekernde rooibloedliggaampievooorlopers in die perifere bloedsmeer. Tesame met die toename in die GKV (Tabel II), dui dit op die teenwoordigheid van 'n hemolitiese anemie. Verskeie ander ondersoekers<sup>4-6</sup> het ook aangetoon dat hipercholesterolemie gepaard gaan met 'n hemolitiese anemie. Daar is aanduidings dat die milt nie direk verantwoordelik is vir die verhoogde breekbaarheid van die rooibloedliggaampies nie, omdat 'n splenektomie nie die hemolitiese aard van die anemie ophef of verbeter nie.<sup>5</sup> Alhoewel Westerman en medewerkers<sup>6</sup> die verkorte lewensduur van die rooibloedliggaampies toeskryf aan 'n verhoogde intrakorpuskulêre cholesterol-inhoud, verskaf dit nog nie 'n bevredigende verklaring vir die hemolitiese neiging nie. Die geassosieerde hipergammaglobulinemie (Tabel II) mag moontlik dui op 'n immunologiese basis vir die hemolise, en hierdie moontlikheid word tans verder ondersoek.

### Leukosiete

Soos Spraragan,<sup>8</sup> kon ons geen verband tussen die serumcholesterol-konsentrasie en die veranderinge in die totale en differensiële witseltellings aantoon nie. Die matige leukositose wat na 15 weke in die huidige ondersoek aangetoon is, was hoofsaaklik te wyte aan 'n toename in die mononukleêre leukosiete (Tabel III). Op grond van roetine observasies gedurende die eksperiment sowel as die volledige nadoodse ondersoek wat op elke konyn uitgevoer is, was daar geen tekens van ander siekteprosesse as net dié wat aan die hipercholesterolemie self toegeskryf kan word nie. In die perifere bloedsmeer was een van die mees opvallende waarnemings die gevakuoleerde voor-

koms van die sitoplasma van die monosiete. Of hierdie selle as intravaskulêre fagosiete optree en aanleiding gee tot die ontstaan van sirkulerende lipofage (skuimselle), is 'n aspek wat verdere ondersoek vereis.

Die matige toename in die basofiel-getalle tydens volgehoue hipercholesterolemie, kan gesien word as 'n respons tot die kroniese inflammatoriese veranderinge wat in die verskillende weefsels waargeneem is.<sup>28</sup>

'n Woord van dank aan professor S. J. Pretorius van die Departement van Wiskundige Statistiek vir die statistiese ontleding van die resultate, en ook die tegniese beamptes van die Departement van Fisiologie vir tegniese hulp.

### VERWYSINGS

- Rossouw, D. J. (1971): M.Sc.-tesis, Universiteit van Stellenbosch, Stellenbosch.
- Friedman, M., Beyers, S. O. en Rosenman, R. H. (1967): *Cowdry's Arteriosclerosis: A Survey of the Problem*, 2de uitg. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas.
- Martin Bailey, J. en Tomar, R. (1965): *J. Atheroscler. Res.*, **5**, 203.
- Pinter, G. G. en Bailey, R. E. (1961): *Amer. J. Physiol.*, **200**, 292.
- Silver, M. M., McMillan, G. C. en Silver, M. D. (1964): *Brit. J. Haemat.*, **10**, 271.
- Westerman, M. P., Wiggins, R. G. en Mao, R. (1970): *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 893.
- Altschul, R. en Martin, M. E. (1951): *Arch. Path.*, **51**, 617.
- Spraragan, S. C. (1968): *J. Atheroscler. Res.*, **8**, 777.
- Weichselbaum, F. (1946): *Amer. J. Clin. Path.*, **10**, 40.
- Wootton, I. D. P. (1964): *Micro-analysis in Medical Biochemistry*, 4de uitg., bl. 140. Londen: J. & A. Churchill.
- Moses, C. en Longabaugh, G. M. (1950): *Arch. Path.*, **50**, 179.
- Popják, G. (1946): *Biochem. J.*, **40**, 608.
- Lynn, W. S., Brown, R. H., Perryman, N. C. en Weber, C. (1960): *Biochemistry of Lipids*. Oxford: Pergamon Press.
- Vies, R. O., Büller, J., Gottenbos, J. J. en Thomasson, H. J. (1964): *J. Atheroscler. Res.*, **4**, 170.
- Prior, J. T., Kurtz, D. M. en Ziegler, D. D. (1961): *Arch. Path.*, **71**, 672.
- Adams, C. W. M., Bayliss, O. B., Ibrahim, M. Z. M. en Roper, W. A. G. (1964): *J. Atheroscler. Res.*, **4**, 283.
- Billian, A., Evrard, E., van den Bosch, J., Joossens, J. V. en de Somer, P. (1963): *Ibid.*, **3**, 222.
- Albrecht, W. en Schuler, W. (1965): *Ibid.*, **5**, 353.
- Hellström, K. (1965): *Acta physiol. scand.*, **63**, 21.
- Dietschy, J. M. en Wilson, J. D. (1970): *New Engl. J. Med.*, **282**, 1241.
- Cook, R. P., Kliman, A. en Fieser, L. F. (1954): *Arch. Biochem.*, **52**, 439.
- Wilson, J. D. en Lindsey, C. A. (1965): *J. Clin. Invest.*, **44**, 1805.
- McMillan, G. C., Ritchie, A. C. en Weigensberg, B. I. (1961): *Arch. Path.*, **71**, 81.
- Fredrickson, D. S., McCollister, D. L., Havel, R. J. en Ono, K. J. (1958): *Chemistry of Lipids as Related to Atherosclerosis*. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas.
- Lees, R. S. en Hatch, F. T. (1963): *J. Lab. Clin. Med.*, **61**, 518.
- Rossouw, D. J. en Engelbrecht, F. M. (1973): *S. Afr. Med. J.*, **47**, 1460.
- Wassermann, H. P. (1971): *Kliniese Fisiologie van Sykamer Ondersoeke*, bl. 74. Stellenbosch: Universiteits-uitgewers.