

Transformationsvorgänge in der Frühphase der Entstehung des arteriellen Thrombus

W. Hofmann, Th. Rommel, Th. Schaupp, F. Seuter, J.A. Rossner,
F.M. Hecht und G. Mall*

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. Dres. h.c. W. Doerr)
und Institut für Pharmakologie der Bayer AG Wuppertal
(Direktor: Prof. Dr. F. Hoffmeister)

Evolution in the Early Changes in the Establishment of Arterial Thrombi

Summary. Ultrastructural studies of thrombi were carried out on the common carotid artery of the rat using a method first described by Meng and Seuter (1977). Induction of thrombus formation *in vivo* was achieved by chilling of a small vessel segment under constant pressure and short-termed stasis. Disturbance of the blood flow was produced by a silver clip. The damaged vessel segments with the thrombotic deposits were removed 5, 10, 30 min, and 1, 4 and 24 h after stimulation of thrombosis. They were fixed and samples were studied as semithin and ultrathin sections morphologically using light and electronmicroscopy.

In the maturation of thrombi exact time intervals could be determined. The most important histopathological characteristics for age determination of arterial thrombi in the early period of thrombogenesis were the cross stripes of fibrin fibres. They appeared after 5 min, reaching a maximum after 10 min and disappeared as a result of increasing fibre density after 1 h. After 4 h nearly complete retraction of fibrin fibres was found which led after 24 h to the formation of a corresponding frame walling in the corpuscular elements. Apart from this aggregation of thrombocytes, which were of two different types were observed, one showing a fibrin-poor aggregate in which the thrombocytes appeared densely packed with numerous pseudopods, and one showing a thrombocyte poor aggregate with abundant interposed fibrin fibres. Agglutination of platelets which occurred in the thrombocyte-rich aggregate in the centre of the thrombus after 5 min led

* Herrn Prof. Dr. Dres. h.c. Wilhelm Doerr, Heidelberg, zum 65. Geburtstag in dankbarer Verehrung gewidmet

Sonderdruckanforderungen an: Prof. Dr. W. Hofmann, Pathologisches Institut der Universität, Im Neuenheimer Feld 220/221, D-6900 Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland

to thrombocytorrhesis after 30 min. The resulting cellular waste stimulated phagocytosis by mononuclear cells and leucocytes. Because of this a massive leucocytosis was found as a result of the early thrombocytorrhesis after 4 h. After 24 h the "viscous metamorphosis" in the fibrin-rich and in the fibrin-poor aggregate was largely completed. Clumping and deformation of erythrocytes was observed in the middle of the thrombus after 5 min and at the periphery of the thrombus after 24 h. Haemolysis did not occur within this time interval.

Key words: Experimental thrombosis – Early transformation processes – Fibrin – Platelets – Viscous metamorphosis – Time-dependent morphological changes.

Zusammenfassung. In unserer ultrastrukturell durchgeföhrten Studie wurden Thromben in der Arteria carotis communis von Ratten nach einer zuerst von Meng und Seuter (1977) beschriebenen Methode experimentell erzeugt. Induktion der Thrombusbildung erfolgte *in vivo* durch Unterkühlung eines kleinen Gefäßabschnittes unter konstantem Druck und kurzfristiger Stase. Eine Änderung des Blutflusses wurde durch einen Silberclip erzeugt. Die geschädigten Gefäßsegmente einschließlich der Thromben bzw. deren Vorstufen wurden nach 5, 10, 30 min und 1, 4 und 24 h nach der Thrombosestimulation entnommen und fixiert. Semidünnsschnitte und Ultradünnsschnitte wurden im Licht- und Elektronenmikroskop morphologisch untersucht.

Den Transformationsvorgängen im Thrombus konnten exakte Zeitmarken zugeordnet werden. Als wichtigstes histopathologisches Merkmal für die Altersbestimmung arterieller Thromben in der Frühphase der Thrombogenese werteten wir die Querstreifung der Fibrinfasern. Diese trat bereits nach 5 min auf, erreichte nach 30 min ein Maximum und verschwand als Folge der zunehmenden Verdichtung der Fasern nach einer Stunde. Nach 4 h sahen wir eine weitgehende Retraktion der Fibrinfasern, die nach 24 h zur Bildung des Fibrinfasergerüstes mit Einmauerung korpuskulärer Elemente führte. Überdies beobachteten wir zwei Thrombocytenaggregate von differenter Struktur. Wir unterschieden ein fibrinarmes Aggregat, in dem die Thrombocyten dichtgepackt und pseudopodienreich erschienen von einem thombocytenarmen Aggregat mit reichlich interponierten Fibrinfasern. Die nach 5 min im Zentrum des Thrombus auftretende Agglutination der Plättchen im thombocytenreichen Aggregat führte nach 30 min zur Thrombocytorrhesis und ergab daher einen weiteren Anhalt für die Altersbestimmung des Coagulum. Der entstandene celluläre Abraum stiimulierte mononukleäre Zellen und Leukocyten zur Phagocytose. Daher sahen wir nach 4 h eine massive Leukocytose als Folge der frühen Thrombocytorrhesis. Nach 24 h war die „viscose Metamorphose“ im fibrinreichen und fibrinarmen Aggregat weitgehend abgeschlossen. Innerhalb des beobachteten Zeitraumes entstand eine Verballung und bizarre Deformierung der Erythrocyten, die bereits nach 5 min vom Zentrum des Thrombus ausging und nach 24 h die Peripherie erreichte. Eine Hämolyse der Erythrocyten war nach dieser Zeit noch nicht erkennbar.

Einleitung

Bisher liegen keine Arbeiten über morphologische Transformationsvorgänge in der Frühphase der Entstehung des arteriellen Thrombus im ultrastrukturellen Bereich vor. Nur einige wenige Untersucher haben sich in lichtmikroskopischen Studien mit zeitlich geordneten strukturellen Veränderungen im Thrombus beschäftigt (Irninger, 1963; Barmeyer und Reindell, 1969; Sandritter und Beneke, 1969; Sinapius, 1972; Leu, 1973; Doerr, Hoepker und Rossner, 1974). Eine exakte Altersbestimmung von Thromben insbesondere von Coronararterienthromben ist z.Z. mit einer Zeitstreuung bis zu drei Tagen belastet (Doerr et al., 1974). Diese Diskrepanz stellt uns vor ein großes Problem im Hinblick auf die noch nicht eindeutig abgeklärte Frage, ob die Coronarthrombose Ursache oder Folge eines Herzinfarktes ist.

In einer Pilotstudie prüften wir, ob in der Frühphase der Thrombogenese zeitlich geordnete und morphologisch faßbare, also gesetzmäßig ablaufende ultrastrukturelle Veränderungen sich abspielen.

Material und Methode

Weibliche Albino-Ratten (Wistar SPF) mit einem Durchschnittsgewicht von 230 g standen für die Versuchsausführung zur Verfügung. Die Tiere erhielten Altromin® als Standarddiät. 16 h vor dem Versuch blieben die Tiere nüchtern, Trinkwasser stand ad libitum zur Verfügung. Im Versuch standen 42 Tiere (7 Tiere/Gruppe) sowie 6 Tiere für die Kontrollserie. Zur Herstellung der Thromben bedienten wir uns einer neuen standardisierten Technik, die von Meng (1975) und Schmidt (1975) erstmals inauguriert wurde. Detaillierte Versuchsbeschreibung s. Meng und Seuter (1977) sowie Seuter u. Mitarb. (1979).

Nach eingeleiteter Äthernarkose wurde die linke Arteria carotis communis freigelegt und auf ca. 1 cm Länge freipräpariert. Das Gefäß wurde für 2 min in die Kühlirille bei einer Temperatur von -15° C eingelegt. Zusätzlich wurden die Arterien vor dem Kopf der Kühlsonde (proximal) abgeklemmt, was während der 2 min zu einer Stase der Blutströmung führte. Anschließend wurde distal (in Richtung des Blutflusses) zu der unterkühlten Stelle ein Silberclip (lichte Weite 0,15 mm) aufgesetzt. Die Vasektomie erfolgte nach jeweils 5, 10 und 30 min, sowie nach 1, 4 und 24 h. Kurz vor der Entnahme wurden alle Gefäße *in vivo* mit heparinisierter, physiologischer Kochsalzlösung gespült.

Aus den insgesamt 6 Zeitgruppen wurden jeweils bei 7 Tieren ca. 17 mm lange Gefäßproben entnommen. Diese wurden zur exakten topographischen Orientierung distal, d.h. strömungsfern, etwa 2 mm längs eingeschnitten. Anschließend wurden die Gefäßproben 16 h in 3%igem Glutaraldehyd in Sörensen-Puffer (155 mosm) fixiert.

Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine Nullserie untersucht. Diese bestand aus 3 Gruppen mit je 2 Tieren. Die Gefäße der Gruppe 1 wurden direkt entnommen, gespült und fixiert. Bei der Gruppe 2 wurde lediglich die Kühlsonde aufgelegt, ohne Einschaltung des Kryostaten, so daß eine Gefäßkompression durch das Gewicht allein erzielt wurde. Bei der Gruppe 3 wurde zusätzlich der Kryostat eingeschaltet und die Sonde bei -15° C eingesetzt. Allen Gruppen gemeinsam war der Zeitfaktor 0, d.h. alle Proben wurden so schnell wie eben methodisch möglich durch Präparation gewonnen. Alle fixierten Proben wurden anschließend mit einer Waschpufferlösung behandelt. Die Nachfixierung erfolgte mit einer 1%igen OSO₄-Lösung. Eingebettet wurden die Proben in Araldit. Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt und lichtmikroskopisch betrachtet. Ultradünn schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung stand ein Zeiss EM 9A zur Verfügung.

Ergebnisse

Fibrin

Im Zentrum des Thrombus findet man nach 5 min intermediäre Fibrinogenketten. Es handelt sich dabei nach Untersuchungsergebnissen von Köppel (1962) um das erste Produkt der Polymerisation von Fibrin. Daneben beobachtet man in der frühen Phase der Thrombogenese bereits die laterale Kettenassoziation von Dissoziationsprodukten der intermediären Fibrinogenketten. Hierbei entstehen durch Seit-zu-Seit-Lagerung intermediärer Fibrinogenketten Fibrinfasern. Als morphologisches Äquivalent der Faserbildung beobachtet man bereits nach 5 min eine beginnende Querstreifung (Abb. 1). Die nun folgende Lateralassoziation der Fibrinogenketten führt nach 10 min zu einer fortschreitenden Fibrinfaserbildung (Abb. 2 und 3). Bemerkenswert ist, daß diese sich häufig in der Nähe von Erythrocyten und Thrombocyten lokalisiert. In einigen Fällen sieht man einen direkten Kontakt der Fibrinfasern mit den Thrombocytenmembranen. Solitär liegende Fasern treten vergleichsweise selten auf. Die Rhythmisik der Querstreifung beträgt 230 Å.

Insgesamt nimmt die Querstreifung der Fibrinfasern nach 10 min deutlich zu und erreicht nach 30 min ihr Maximum. Die Fasern werden zugleich durch

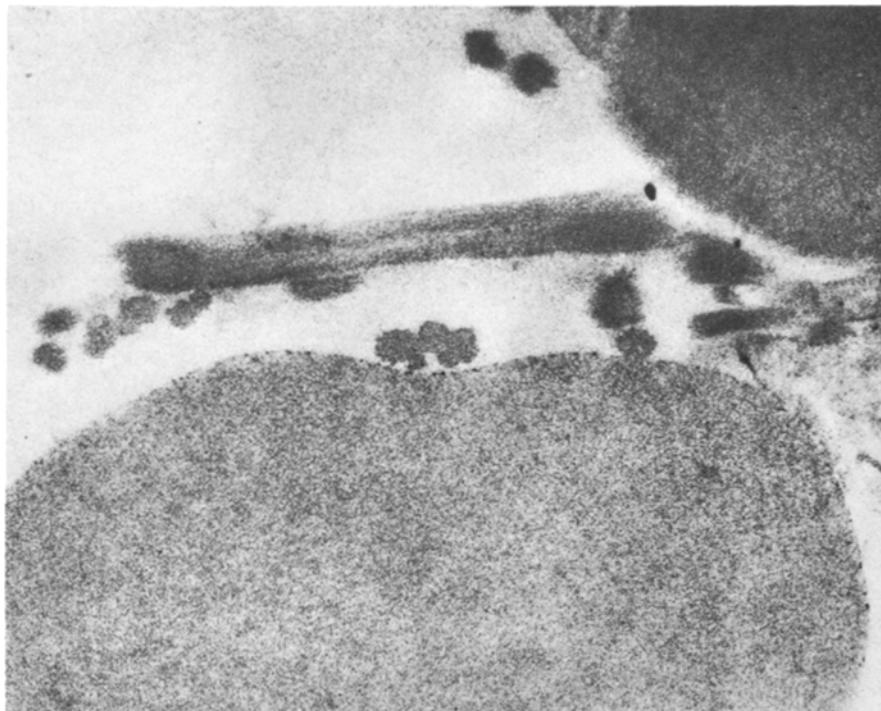


Abb. 1. Fibrinfasern mit beginnender Querstreifung bei homologer Lateralassoziation intermediärer Fibrinogenketten nach 5 min. Vergrößerung: $6200 \times 4,2$

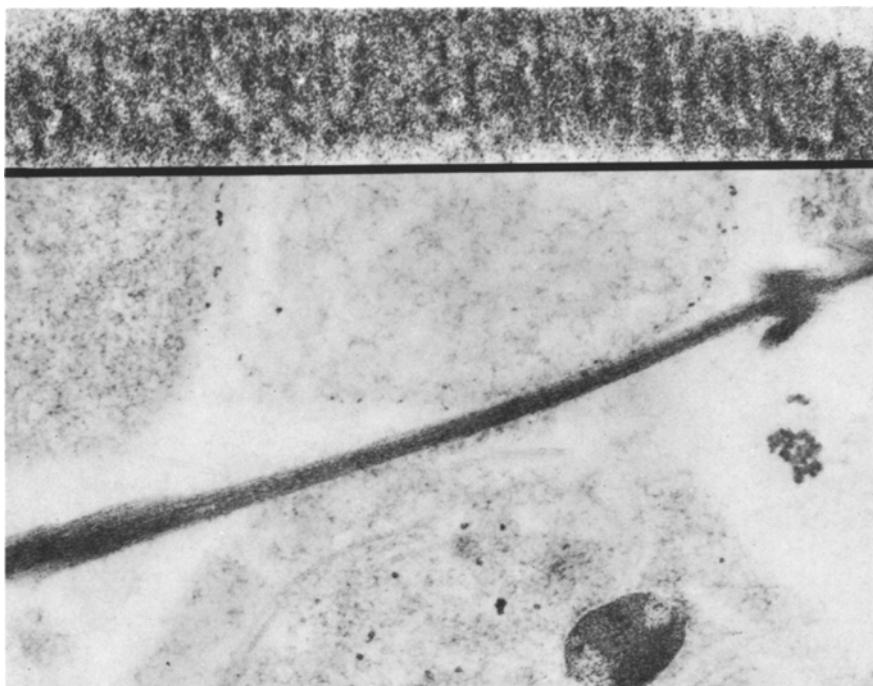


Abb. 2. Fortschreitende Fibrinfaserbildung mit ausgeprägter periodischer Querstreifung nach 10 min. Vergrößerung: $18000 \times 2,4$. Inset: Fibrinfaser mit deutlicher Querstreifung nach 10 min. Vergrößerung 62000



Abb. 3. Lateralassoziation von intermediären Fibrinogenketten nach 10 min. Vergrößerung $18000 \times 2,4$

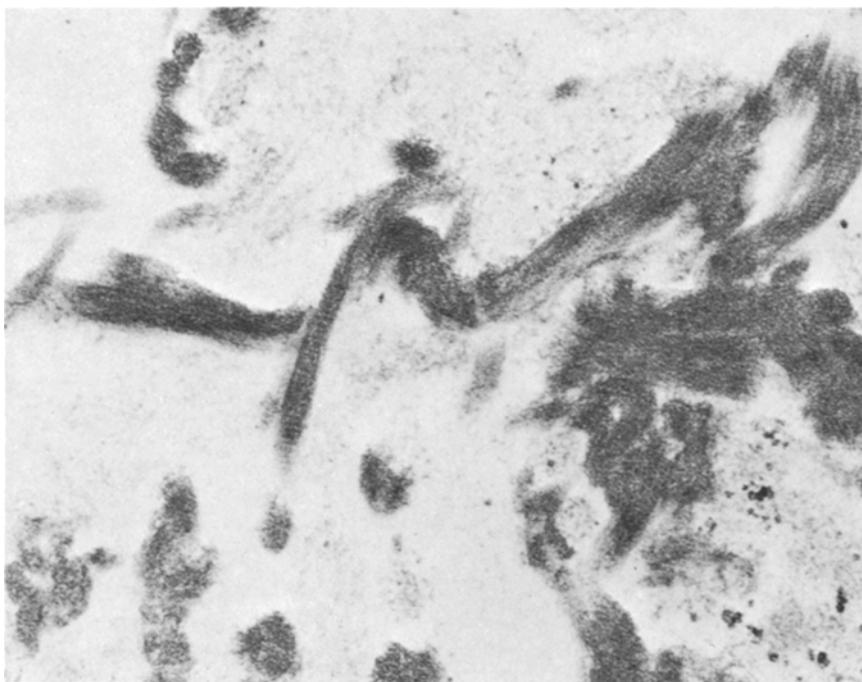


Abb. 4. Fibrinfasern mit maximal ausgeprägter Querstreifung nach 30 min. Vergrößerung: $6200 \times 2,4$

kontinuierliche Lateralassoziation verbreitert (Abb. 4). Im Fortgang der Zeit verdichten sich die Fibrinfaserbündel zunehmend. Dieser Vorgang wird durch die Schrumpfung der Fasern verstärkt. Die fortschreitende Retraktion führt zu einem weitgehenden Verlust der Querstreifung. Die Bildung der Fibrinfaserbündel ist nach etwa 4 h nahezu abgeschlossen. Die Querstreifung geht durch die Retraktion fast völlig verloren. Die Umrisse der einzelnen Fasern sind nur noch stellenweise im Bündel erkennbar. Nach 24 h sind alle korpuskulären Elemente, insbesondere Erythrocyten und Thrombocyten im Fibringerüst eingemauert (Abb. 5).

Die histo-morphologischen Frühveränderungen des Fibrin sind in einer schematischen Übersicht in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Thrombocyten

Im frischen Thrombus sieht man nach einer Zeit von 5 min zwei differente Plättchenaggregate. Zum einen ein fibrinarmes Aggregat, in dem die Thrombocyten dichtgepackt und pseudopodienreich erscheinen (Abb. 6). Zum anderen ein thrombocytenarmes Aggregat mit reichlich interponierten Fibrinfasern (Abb. 7). Es handelt sich also um ein fibrinarmes und um ein fibrinreiches Aggregat. Die intakten Plättchen dienen im fibrinreichen Aggregat als „Orientierungs- und Kondensationszentrum der Fibrinfaserbildung“ (de Robertis, 1955). Obwohl sich eine unterschiedliche Neigung zur Pseudopodienbildung abzeichnet,

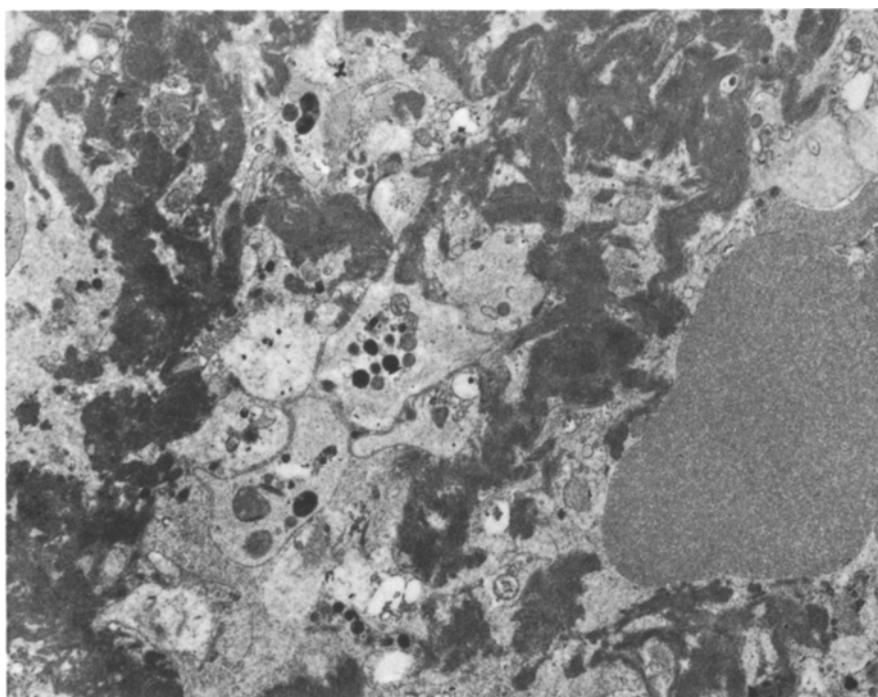


Abb. 5. Vollständige Retraktion der Fibrinfasern mit Einmauerung der korpuskulären Elemente (Erythrocyten, Thrombocyten) nach 24 h. Vergrößerung: $3400 \times 2,4$

Tabelle 1. Schematische Übersicht der Veränderungen des Fibrin und seiner Vorstufen während der ersten 24 h der Thrombogenese

Zeit	Histomorphologische Veränderungen des Fibrin
5 min	intermediäre Fibrinogenketten Fibrinfasern mit beginnender Querstreifung
10 min	vermehrte Bildung von Fibrinfasern Zunahme der Querstreifung
30 min	Fibrinfasern mit beginnender Retraktion Bildung von Fibrinfaserbündel volle Ausbildung der Querstreifung
1 h	Fibrinfaserbündel mit fortschreitender Retraktion zunehmender Verlust der Querstreifung
4 h	nahezu vollständiger Verlust der Querstreifung bei weitgehender Retraktion der Faserbündel
24 h	Fibringerüst mit Einmauerung korpuskularer Elemente

sind die Zellmembranen der Thrombocyten in beiden Aggregaten fast durchweg intakt. Im fibrinarmen Aggregat zeigt sich eine beginnende Agglutination mit Diskontinuität der Membrangrenzen und Zentralisation des Granulomer. Nach 10 min beobachtet man im lockeren Gefüge des fibrinreichen Thrombocytenag-

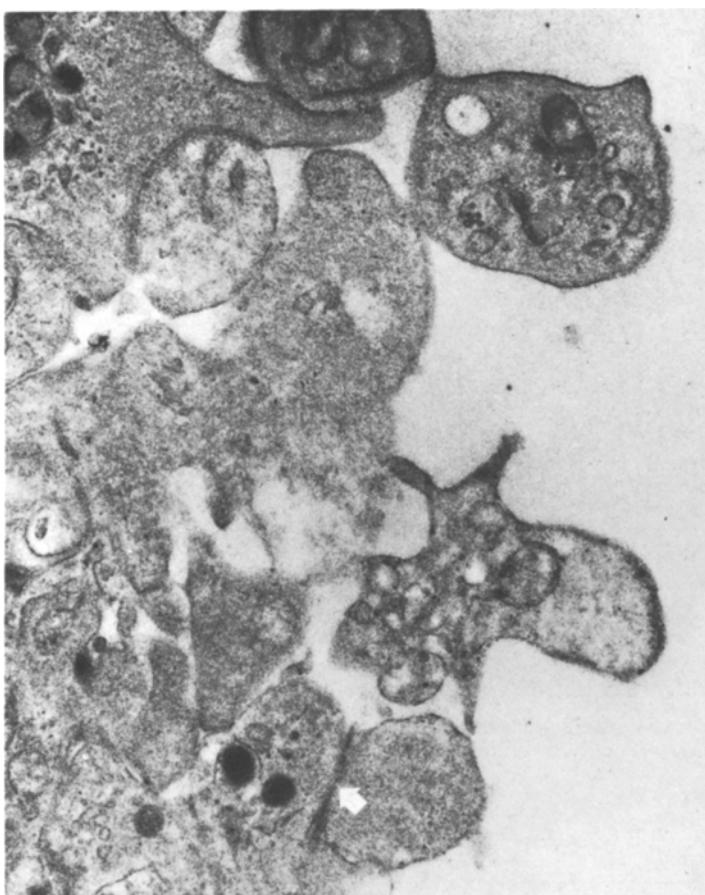


Abb. 6. Fibrinarme, pseudopodienreiches Thrombocytenaggregat mit beginnender Agglutination (*Pfeil*). Zentralisation der Granulome nach 5 min. Vergrößerung: $6200 \times 2,9$

gregates zunehmende Pseudopodienbildung. Dagegen weisen solitär gelegene Thrombocyten auch bei Anwesenheit von Fibrinfasern keine Veränderungen auf. Bereits nach 30 min beginnt die Retraktion im fibrinreichen Plättchenaggregat. Bemerkenswert ist, daß jetzt auch solitär liegende Thrombocyten vereinzelt pseudopodiale Fortsätze ausbilden. Im fibrinreichen Aggregat nimmt die Agglutination der Plättchen zu dieser Zeit erheblich zu (Abb. 8). Im Zentrum beobachtet man eine bizarre Deformation der Plättchen und eine beginnende Thrombocytorrhesis, wodurch die Zellorganellen zu einer amorphen Masse verschmelzen. In der Peripherie des Aggregates überwiegen die intakten Thrombocyten. Im Gegensatz dazu zeigt das fibrinarme Aggregat nach 30 min lediglich verstärkte Pseudopodienbildung und erste Zeichen beginnender Agglutination, die nach 60 min deutlich erkennbar wird. Die Plättchen nehmen ballonähnliche Gestalt an. Agglutination und Thrombocytorrhesis nehmen nach 4 h in beiden Aggregaten nur geringfügig zu. Nach 24 h ist sowohl im fibrinarmen, als auch

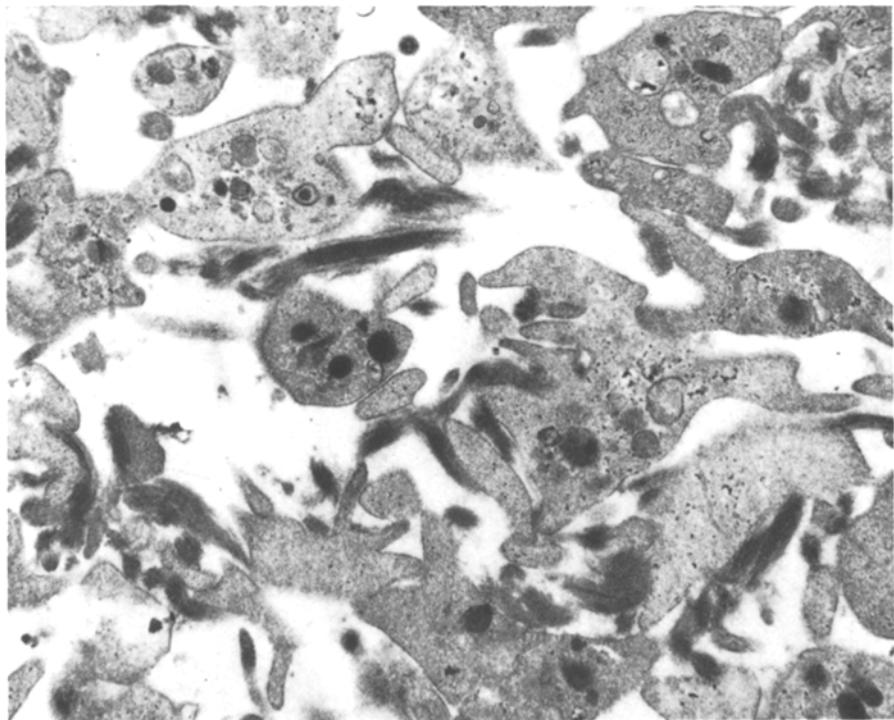


Abb. 7. Fibrinreiches Thrombocytenaggregat nach 10 min. Vergrößerung: $6200 \times 2,4$

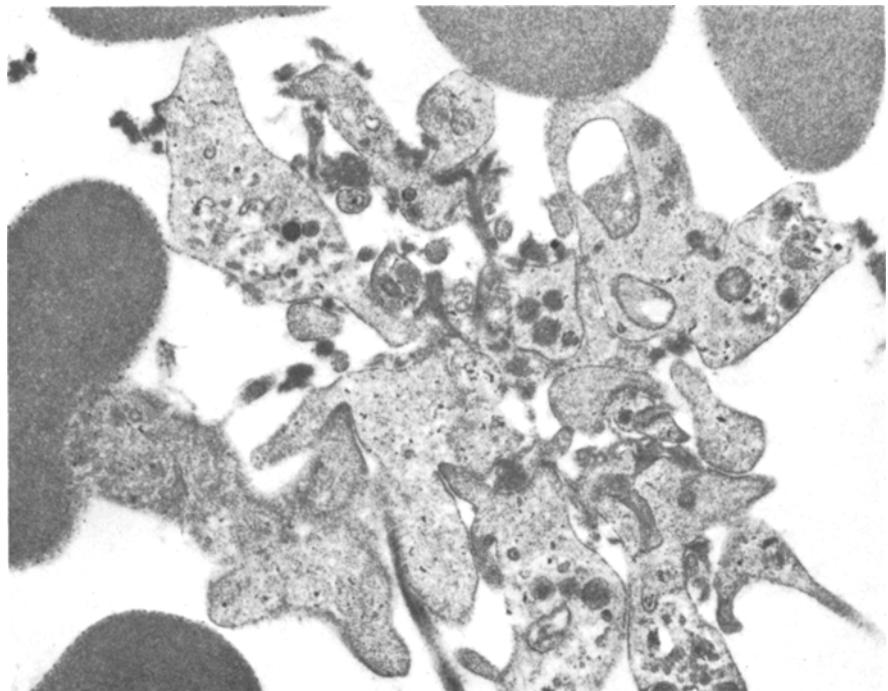


Abb. 8. Fortgeschrittenes Thrombocytenagglutination mit beginnender Auflösung der Zellorganellen nach 30 min. Vergrößerung: $3400 \times 2,7$

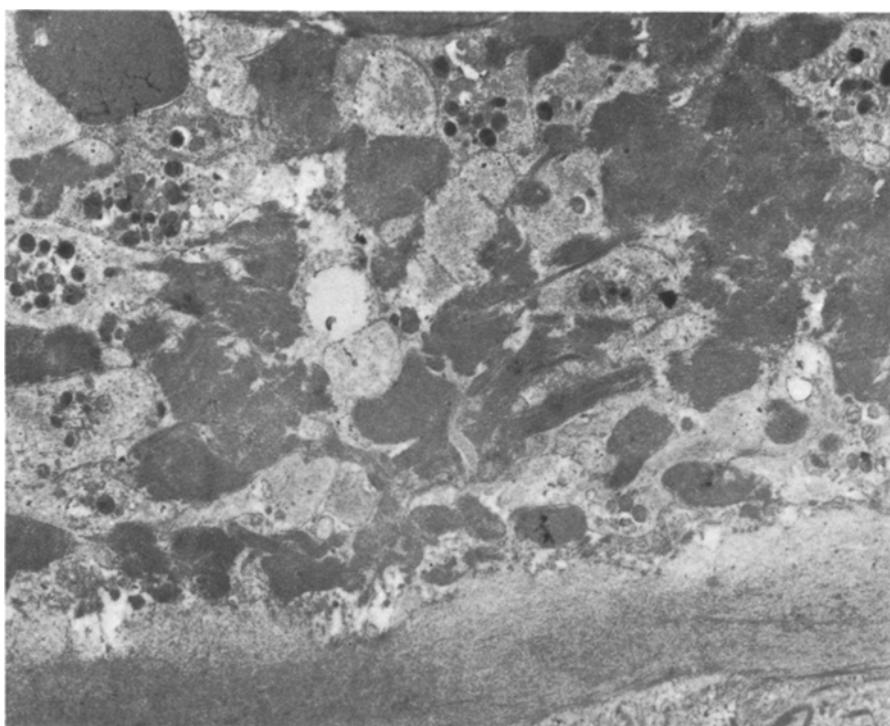


Abb. 9. „Viscöse Metamorphose“ im fibrinreichen Aggregat nach 24 h. Vergrößerung: $6200 \times 2,5$

Tabelle 2. Schematische Übersicht der zeitabhängigen morphologischen Veränderungen der Plättchenaggregate

Zeit	Fibrinreicher Aggregattyp	Fibrinärmer Aggregattyp
5 min	wenige pseudopodienarme Thrombocyten mit reichlich interponiertem Fibrin	pseudopodienreiche, dichtgepackte Thrombocyten. Beginnende Agglutination im Zentrum
10 min	Zunahme der Pseudopodienbildung	Zunahme der Agglutination
30 min	beginnende Retraktion der Fibrinfasern	Thrombocytorrhesis
1 h	Agglutination und beginnende Thrombocytorrhesis	Thrombocytorrhesis
4 h	Agglutination und beginnende Thrombocytorrhesis	Thrombocytorrhesis
24 h	weitgehende viscöse Metamorphose	weitgehende viscöse Metamorphose

im fibrinreichen Aggregat eine weitgehende „viscöse Metamorphose“ (Eberth und Schimmelbusch, 1866) eingetreten (Abb. 9). Die zeitabhängigen morphologischen Veränderungen der Thrombocyten sind schematisch in Tabelle 2 dargestellt.

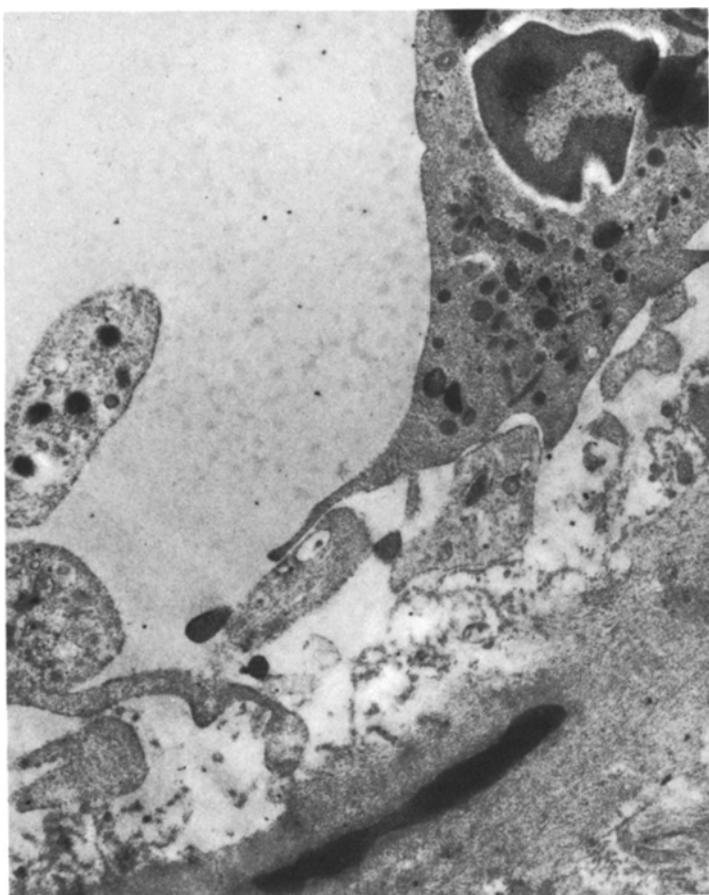


Abb. 10. Granulocyt bei der Phagocytose zerfallener Thrombocyten nach 4 h. Vergrößerung: 6200 \times 2,4

Erythrocyten

Nach 5 min beobachtet man Erythrocytenverballungen im Zentrum des Thrombus. Nach der Peripherie zu überwiegt eine geldrollenartige Schichtung der roten Blutzellen. Unabhängig von der Lokalisation scheinen die Thrombocyten nicht miteinander verklebt zu sein, da die Zellmembranen gut gegeneinander abgrenzbar sind. Vereinzelt beobachtet man den Kontakt zwischen Erythrocyten und pseudopodialen Fortsätzen der Thrombocyten. Nach 1 h setzt sich die Verballung der Erythrocyten in die Peripherie des Coagulum fort. Dabei kommt es zu einer bizarren Deformierung der roten Blutzellen. Dieser Vorgang erreicht nach 24 h die Peripherie. Eine Agglutination und eine Hämolyse tritt nicht auf.

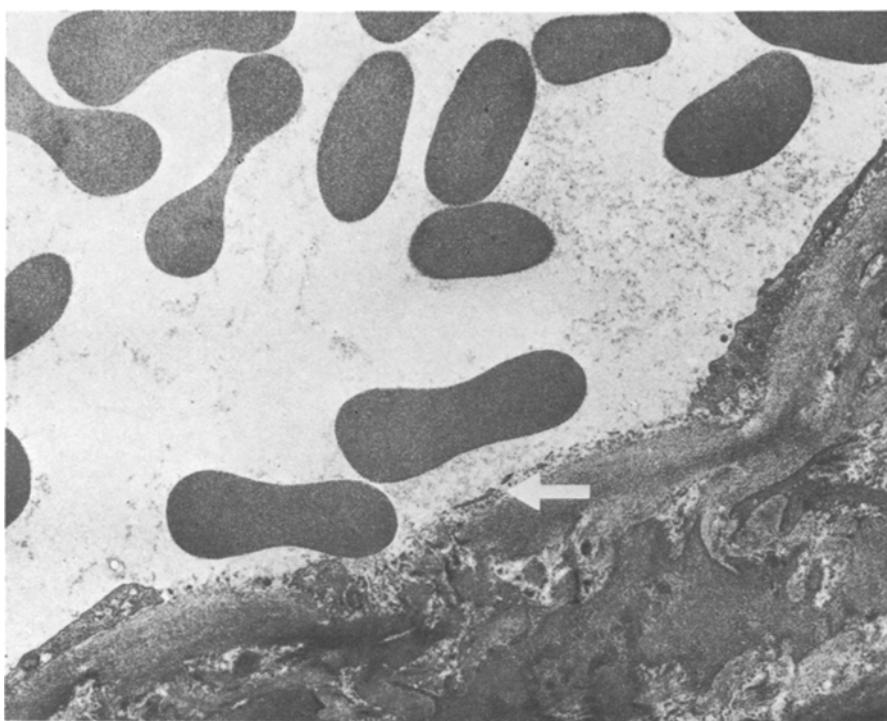


Abb. 11. Endothelfreier Wandabschnitt (*Pfeil*) mit Fibrinfasern und Erythrocyten nach 1 h. Vergrößerung: $1700 \times 2,9$

Leukocyten

Leukocyten erscheinen nach 5 min nur ganz vereinzelt. Nach 30 min nehmen segmentkernige Granulocyten und mononucleäre Zellen etwas zu. Granulocyten und Monocyten liegen meist in der Nähe von Thrombocytenaggregaten. Nach 4 h entwickelt sich eine massive Leukocytose. Gleichzeitig treten als Folge der Thrombocytorrhesis erhebliche Mengen cellulären Abraumes auf. Die meisten Granulocyten zeigen zu dieser Zeit eine starke Phagocytose von Zelltrümmern (Abb. 10).

Gefäßwand

Nach 1 h finden wir Erythrocyten in enger Nachbarschaft zu endothelfreien Wandbezirken, denen verezelte Fibrinfasern angelagert sind (Abb. 11). Bei erhaltenem Endothelsaum bleiben die roten Blutzellen mehr auf Distanz.

Innerhalb des von uns untersuchten Zeitraumes treten keine reaktiven Veränderungen der Gefäßwand auf. Auch nach 24 h sind keine Anzeichen für eine beginnende Organisation des Thrombus zu erkennen.

Diskussion

Nach der von Meng (1975), Schmidt (1975), Meng und Seuter (1977) sowie Seuter u.Mitarb. (1979) beschriebenen standardisierten Technik konnte in einem hohen Anteil der Gefäße arterielle Thromben erzeugt werden, die somit einen Einblick in die Transformationsvorgänge in der Frühphase der Thrombogenese erlaubten. Durch die Methode war es möglich, frisch entstandene Thromben nach 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 4 h und 24 h sowohl in Semidünnsschnitten als auch ultrastrukturell zu untersuchen. Alle experimentell induzierten Thromben entstanden multifaktoriell.

Einerseits war der Kältereiz wirksam, andererseits wurde wahrscheinlich das exogene Gerinnungssystem durch die Wandläsionen mitaktiviert. Endothelabschilferungen führten zur Freilegung subendothelialer Strukturen (z.B. Kollagen) und damit zur Adhäsion von Thrombocyten (Hugues, 1959; Spät et al., 1962). Inwieweit Vorgänge der Prostacyclin (PGI₂)- und Thromboxan (TXA₂)-Balance beeinflußt wurde, lässt sich anhand dieser Untersuchungen nicht abschätzen. Die verminderte Blutströmung wurde durch den distalen Clip während des Thrombuswachstums verursacht. Die proximale Klemme und das Gewicht der Kältesonde führten während der 2 min dauernden Unterkühlung zur Stase. In der Versuchsanordnung wurde mehr oder weniger die von Rudolf Virchow im Jahre 1856 klar erkannte klassische Trias nachvollzogen, bei welcher der Wandfaktor, der Blutfaktor und der Strömungsfaktor als Ursache der Thrombogenese von eindeutiger Bedeutung sind. Die von uns angewendete Methode kann mit dem Vorgang einer Gefäßwandverletzung verglichen werden, wobei sowohl das Extrinsic- als auch das Intrinsic-System (via freigesetzter Plättchenfaktoren) aktiviert werden.

Die theoretischen Grundlagen unserer Studie basieren vornehmlich auf den Arbeiten Köppels (1962), der umfangreiche Untersuchungen an Polymerisationsvorgängen des Fibrin durchgeführt hat. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte er bis dahin unbekannte Polymerisationszwischenprodukte des Fibrin beschreiben. Allerdings stammen seine Erkenntnisse von konstanten Beobachtungen des Gerinnungsablaufes von humanem Nativblut auf Zaponlackfolie extravasal.

In unserer Pilotstudie haben wir versucht, die Köppelschen Beobachtungen auf das *in vivo*-Experiment zu transformieren. Im spontan gerinnenden Nativblut fand Köppel (1962) nach 2 bis 3 min die durch polare Kettenassoziation von 3 bis 8 Fibrinogenmolekülen entstandenen intermediären Fibrinogenketten, deren Struktur bereits im Jahre 1950 von Braunsteiner u.Mitarb. bei ihren ultrastrukturellen Untersuchungen beschrieben wurde.

Das Fibrinogenmolekül besteht aus 3 Peptidkettenpaaren, die über Disulfidbrücken verbunden eine symmetrische Konfiguration aufweisen (Hall und Slayter, 1959; Gardlund et al., 1977). Nach Darstellung von Lüscher (1961) werden an diesen Fibrinmonomeren durch Peptidabspaltung Wasserstoffbindungen frei. Im zweiten Polymerisationsschritt lagern sich dann intermediäre Fibrinogenketten über diese Wasserstoffbindungen zu Fibrinfasern zusammen. Dieser Vorgang wurde von Köppel (1962) als strukturhomologe Lateralassoziation bezeichnet. Frühestens nach 15 min konnte er dabei das Auftreten der Fibrinfasern im

spontan gerinnenden Nativblut beobachten. Das Fibrinnetz bildet das Endprodukt dieses stufenweisen Polymerisationsablaufes. Als morphologisches Äquivalent der Faserbildung beschrieb Köppel (1962) ferner eine periodische Querstreifung mit einer Rhythmisik von 230 Å, die mit unseren Messungen völlig identisch war.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Köppel finden wir bereits nach 5 min quergestreifte Fibrinfasern, nach 10 min nimmt der Kontrast der Querstreifung zu und nach 30 min erreicht er sein Maximum. Nach Ablauf einer Stunde ist die Querstreifung weitgehend verschwunden. Es handelt sich um Strukturveränderungen an den Fibrinfasern, die eine Altersbestimmung von Thromben in der frühen Phase, d.h. bis zu einem Zeitraum der ersten Stunde zulassen. Über diesen Zeitraum hinaus führt jedoch die Bildung von Fibrinfaserbündeln sowie deren Retraktion zu Verlust der Querstreifung, was bedeutet, daß das Fibrin dann nicht mehr als Indikator für die Altersbestimmung herangezogen werden kann.

Zeitabhängige Veränderungen finden wir auch bei den Thrombocyten. So sind bereits nach 5 min zwei differente Formen der Aggregatbildung zu unterscheiden. Wir finden sowohl einen fibrinarmen Aggregattyp, bei dem die Thrombocyten dicht gepackt und pseudopodienreich erscheinen, als auch einen fibrinreichen Aggregattyp mit wenigen pseudopodienarmen Thrombocyten. Ein Phänomen, das die Ergebnisse von Frost u. Mitarb. (1968), Rodman u. Mitarb. (1962), Köppel (1958) und Schulz (1958) in vollem Umfang bestätigt.

In dem fibrinreichen Thrombocytenkomplex sehen wir bizarre Verformungen der Thrombocyten mit teilweise zentraler Konzentration des Granulomer. Im Zentrum des fibrinarmen thrombocytenreichen Aggregates ist nach 5 min die beginnende Agglutination der Thrombocyten nachweisbar, was an der gelegentlichen Diskontinuität der Plättchenmembrangrenzen und einer Zentralisation des Granulomer erkennbar ist. Es handelt sich also um Veränderungen, die die Initialphase der „viskösen Metamorphose“ im Sinne von Eberth und Schimmelbusch (1886) darstellen.

Auch Apitz (1942) unterschied lichtmikroskopisch zwei Stadien der Thrombocytenaggregation, bei der zuerst die Thrombocyten noch gut gegeneinander abgrenzbar waren, später aber zu wolkigen Massen zerflossen. Später durchgeführte lichtmikroskopische Untersuchungen von Rinehart (1955), Hutter (1957) und Rodman u. Mitarb. (1962 und 1963) führten zur weiteren Differenzierung zwischen Aggregation, Präagglutination, Agglutination und Thrombocytorrhesis. Die von uns beobachtete betonte Pseudopodienbildung im fibrinarmen Aggregattyp deuten wir als Abschluß der Präagglutinationsphase. Mit der zentral beginnenden Agglutination der Thrombocyten entsteht aus der reversiblen eine irreversible Thrombocytenaggregation. Im Gegensatz dazu stellt der fibrinreiche, aber pseudopodienarme Typ ein voll reversibles Aggregat dar. Die Pseudopodienbildung ist ein energieabhängiger Prozeß, bei dem großen Mengen von ATP verbraucht werden und dadurch ADP in vermehrtem Maße anfällt (Bleyl, 1977).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß nicht nur der Untergang der Thrombocytenmembran zur Freisetzung von ADP führt, sondern daß auch im umgekehrten Fall freies ADP intakte Zellmembranen schädigen kann (Charter et al., 1977). Die volle Reversibilität pseudopodienbildender Plättchenaggregate ist damit in erster Linie von den Rest-ATP-Mengen abhängig, die zur Aufrechterhaltung der Membranfunktionen ausreichen müssen (O'Brien, 1964).

Ist diese Prämisse nicht erfüllt und liegen als Abfallprodukte größere Mengen von ADP vor, so wird wiederum die Agglutination der Plättchen gefördert (Brambel und Brambel, 1964; Gaarder und Laland, 1964). Dies scheint der

Grund für die rasche Metamorphose der Thrombocyten im pseudopodienreichen Aggregat zu sein. Die Existenz zweier Thrombocytenaggregate, die sich in ihren morphologischen Alterationen zeitlich unterschiedlich verhalten, sind für die Altersbestimmung insbesondere in der Frühphase der Thrombogenese von besonderer Bedeutung. So zeigt das thrombocytenreiche, fibrinarme Aggregat nach 30 min im Zentrum bereits Thrombocytorrhesis. Im Gegensatz dazu weist das fibrinreiche Aggregat lediglich eine beginnende Faser retraktion auf.

Die Interaktion der Thrombocyten mit den Polymerisationsstufen des Fibrin wurde ausführlich von Köppel (1962) dargestellt. Er vermutete, daß Thrombocyten einen Faktor mit Wirkung auf den ersten Polymerisationsschritt absondern, der die End-zu-End-Vereinigung der Fibrinogenfäden bei Kontakt mit Thrombocyten früher erfolgen läßt als thrombocytenfern.

Auch der zweite Polymerisationsschritt soll durch Thrombocyten beschleunigt werden können, die einer bestimmten Belastung, z.B. Temperaturschwankungen ausgesetzt worden sind. Dadurch soll aus dem Plättcheninneren ein Faktor (möglicherweise Thromboxan) abgesondert werden, der die Faserbildung fördert. Sehr wahrscheinlich spielen die von Köppel angeführten Temperaturschwankungen auch bei unseren Thromben eine Rolle. Die Retraktion der Fibrinfasern, deren Fortschreiten wir nach einer Stunde beobachten konnten, soll durch die Thrombocyten mit Hilfe eines provozierenden Retraktionsfaktors beschleunigt werden können (Benthaus, 1969; Ballerini et al., 1959; Marx, 1957 und Sommer, 1958).

Diese Faser retraktion führt zu einer zunehmenden Einmauerung korpuskulärer Elemente, die sehr wahrscheinlich nach 24 h nicht weiter vorangeht, da die korpuskulären Bestandteile im Coagulum eine strukturhomologe Lateralassoziation unterbinden. Zu den raumfordernden cellulären Elementen, die eine Fibrin retraktion einschränken, zählen auch die Erythrocyten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der initialen hämostatischen Pflropfbildung. Nach Untersuchungen von Berqvist u. Mitarb. (1976) ist den Erythrocyten in der Frühphase der Gerinnung eine größere Bedeutung beizumessen als dem Kollagen der Gefäßwand. Turitto und Baumgartner (1975) deuteten den Kontakt zwischen Plättchen und Erythrocytenmembran im Sinne einer physikalischen Wechselbeziehung. Hingegen sind Berqvist u. Mitarb. (1976) der Ansicht, daß die Erythrocyten über die Freisetzung von ADP den Anstoß zur Agglutination der Thrombocyten geben.

Bei unseren Untersuchungen sahen wir bereits nach 5 min im Zentrum des Thrombus vereinzelt eine Anlagerung von Thrombocyten an Erythrocyten, die mit deutlicher Pseudopodienbildung einhergeht. Desgleichen sieht man eine Diskontinuität der Plättchenmembran mit beginnender Zentralisation des Granulomer. Die Erythrocyten zeigen zu diesem Zeitpunkt geldrollenartige Zusammenballungen. Irniger (1963) vermutete, daß diese Formationen sofort nach der Entstehung des Thrombus in seinen zentralen Anteilen auftreten. Gemäß seinen Aussagen soll die Verballung der Erythrocyten nach 12 h auf die Peripherie des Coagulum übergreifen. Im Gegensatz dazu beobachteten wir, daß dieser Prozeß sich bereits nach einer Stunde vollzogen hatte. Die roten Blutzellen sind dabei bizarr deformiert. Eine Hämolyse in den 24 h alten Thromben ist nicht erkennbar.

Tabelle 3. Histopathologische Merkmale zur Altersbestimmung art. Thromben in einem experimentellen Thrombosemodell (Ratte).

Zeit	Fibrin und Vorstufen	Thrombocytenaggregate		Erythrocyten	Leukocyten
		fibrinreich	fibrinarm		
5 min	intermediäre Fibringenketten einzelne Fibrinfasern beginnende Querstreifung	wenige und pseudopodienarme Thrombozyten	pseudopodienreich dichtgepackt beginnende Agglut. im Zentrum	vereinzelt Kontakt zwischen Thrombozyten und Erythrozyten geldrollenartige Zusammenlagerungen der Erythrocyten im Zentrum des Thrombus	treten nur vereinzelt auf
10 min	Fibrinfasern vermehrt Zunahme der Querstreifung	Zunahme der Pseudopodienbildung (Präagglutination)	Zunahme der Agglutination	zunehmende, in die Peripherie reichende Erythrocytenverballungen	
30 min	Fibrinfasern Fibrinfaserbündel volle Ausbildung der Querstreifung	beginnende Retraktion der Fibrinfasern (thrombocytophotogener Retraktionsfaktor)	Thrombocytorrhesis		
1 h	Fibrinfaserbündel fortschreitende Retraktion zunehmender Verlust der Querstreifung	Agglutination Thrombocytorrhesis		bizarre Deformierungen der Erythrocyten	
4 h	völlige Retraktion der Faserbündel nahezu vollständiger Verlust der Querstreifung		Leukocytose		maximale Leukocytose Phagocytose des cellulären Abraumes
24 h	Fibringerüst mit Einmauerung korpuskularer Elemente	weitgehende viscose Metamorphose	weitgehende viscose Metamorphose	noch keine Hämolyse erkennbar	treten nur vereinzelt auf

Die weißen Blutzellen zeigen in der Frühphase der Thrombogenese keine signifikanten morphologischen Veränderungen. Erst nach 4 h tritt eine auffällige Leukocytose auf; ein Ergebnis, das sich weitgehend mit denen von Joergensen u.Mitarb. (1967) deckt. Die Leukocyten zeigen eine Phagocytose zugrundegegangener Thrombocyten. Möglicherweise ist die maximale Leukocytose zu diesem Zeitpunkt als Folge der früh einsetzenden Thrombocytorrhesis zu deuten. Nach 24 h nimmt die Leukocytenzahl ab. Besondere morphologische Veränderungen der weißen Blutzellen können wir in dem von uns beobachteten Zeitraum nicht feststellen, wobei wir allerdings über das beobachtungsfreie Intervall von der 4. bis zur 24. h keine Aussage machen können. Vermutlich treten aber in diesem Zeitraum Veränderungen an den Leukocyten auf, auf welche bereits Lubnitzky (1885) und Irniger (1963) aufmerksam gemacht haben.

Reaktive Veränderungen der Gefäßwand, einschließlich des Endothelsaumes sind in unserem Beobachtungszeitraum nicht auszumachen.

In der Tabelle 3 sind schematisch alle diejenigen Ergebnisse unserer Arbeit zusammengestellt, die als Kriterien für die Altersbestimmung arterieller Thromben in der Frühphase der Thrombogenese gelten können.

Frau Antoni, Herrn Ing. grad. Derks und Herrn Rieger sei für ausgezeichnete technische Assistenz herzlichst gedankt.

Literatur

- Apitz, K.: Die Bedeutung der Gerinnung und Thrombose für die Blutstillung. *Virchows Arch. Path. Anat.* **308**, 540–614 (1942)
- Ballerini, G., Seegers, W.H.: A description of clot retraction as a visual experience. *Thromb. Diath. Haem.* **3**, 147–164 (1959)
- Barmeyer, J., Reindell, H.: Untersuchungen über die Kausalität der Koronarthrombose beim Herzinfarkt. *Z. Kreislauff.* **59**, 219–225 (1969)
- Benthaus, J.: Über die Retraktion des Blutgerinnsels. *Thromb. Diath. Haem.* **3**, 311–352 (1959)
- Berqvist, D., Arfors, K.E.: Red blood cells and initial haemostatic plug formation. *Microvasc. Res.* **12**, 237–238 (1976)
- Bleyl, U.: Morphologic diagnosis of disseminated intravascular coagulation; histologic, histochemical and electronmicroscopic studies. *Sem. Thromb. Haemost.* **3**, 247–267 (1977)
- Brambel, Ch.E., Brambel, F.D.: Metal ions in platelet aggregation. Twelfth annual symposium on blood. Wayne State University, College of Medicine and Mayo Clinic 1964
- Braunsteiner, H., Febvre, H.: Thrombocyten und Fibrinbildung im Elektronenmikroskop. *Acta Haematol.* **3**, 174–178 (1950)
- Charter, B.V.: Platelet aggregation induced in vitro by therapeutic ultrasound. *Thrombos. Haemostas.* **38**, 640–651 (1977)
- De Robertis, E.: Electron microscope observation of the platelet-fibrin relationship in blood clotting. *Blood* **10**, 528–533 (1955)
- Doerr, W., Hoepker, W.W., Rossner, J.A.: Neues und Kritisches vom und zum Herzinfarkt. *Sitzungsber. Heidelberger Akad. d. Wissenschaften, math.-naturw. Kl. Jg. 1974*, 4. Abh. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1974
- Eberth, J.C., Schimmelbusch, C.: Experimentelle Untersuchungen über Thrombose. II. Die Entstehung von Thromben in größeren Gefäßen von Säugetieren. *Virchows Arch. Path. Anat.* **105**, 331–350 (1886)
- Frost, H.: Endothelschädigung und Abscheidung von Elementen des strömenden Blutes als initiales Geschehen in der Pathogenese der Arteriosklerose. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., Schlegel, B. u. Bergmann, J.F. (Hrsg.), S. 1139–1145. München: Bergmann 1972*
- Gaarder, A., Laland, S.: Hypothesis for the aggregation of platelets by nucleotide. *Nature* **202**, 909–910 (1964)
- Gardlund, B., Hessel, B., Marguerie, G., Murano, G., Blombäck, B.: Primary structure of human

- fibrinogen. Characterization of disulfide-containing cyanogen-bromide fragments. *Eur. J. Biochem.* **77**, 595–610 (1977)
- Hall, C.E., Slayter, H.S.: The fibrinogen molecule: Its size, shape, and mode of polymerization. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 11–15 (1959)
- Hugues, J.: Agglutination précoce des plaquettes au cours de la formation du clou hémostatique. *Thromb. Diath. Haem.* **3**, 177–186 (1959)
- Hutter, R.V.P.: Electron observation on platelets from human blood. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 447–460 (1957)
- Irniger, W.: Histologische Altersbestimmung von Thrombose und Embolie. *Virchows Arch. path. Anat.* **336**, 220–237 (1963)
- Joergensen, L., Rowsell, H.C., Hovig, T., Mustard, J.T.: Resolution and organization of plateletrich mural thrombi in carotid arteries of swine. *Am. J. Pathol.* **51**, 681–719 (1967)
- Köppel, G.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Funktionsmorphologie der Thrombozyten und zum Gerinnungsablauf im normalen menschlichen Nativblut. *Z. Zellforsch.* **47**, 401–439 (1958)
- Köppel, G.: Die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin. *Thromb. Diath. Haem.* (Suppl.) **VII**, 7–219 (1962)
- Leu, H.J.: Histologische Altersbestimmung von arteriellen und venösen Thromben und Emboli. *Vasa* **2**, 265–274 (1973)
- Lüscher, E.F.: Human fibrinogen. *Bull. Schweiz Akad. Med. Wiss.* **17**, 153–161 (1961)
- Lubnitzky, S.: Die Zusammensetzung des Thrombus in Arterienwunden in den ersten fünf Tagen. *Med. Dissertation, Bern* 1885
- Marx, R.: Zur Kenntnis der für die Thrombusfestigkeit bedeutsamen Blutfaktoren; zugleich ein Beitrag zum Problem einer unspezifischen Blutstillungsförderung durch Transfusionen. *Ber. 6. Tagg. dtsch. Ges. Bluttransfusion Köln 1957. Erg. Bluttransfusionsforsch.* **III**, 147–153 (1957)
- Meng, K.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur antithrombotischen Wirkung von Acetylsalicylsäure. *Ther. Ber.* **43**, 69–69 (1975)
- Meng, K., Seuter, F.: Effect of acetylsalicylic acid on experimental induced arterial thrombosis in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **301**, 115–119 (1977)
- O'Brien, J.R.: A comparison of platelet aggregation produced by seven compounds and a comparison of their inhibitor. *Am. J. Clin. Pathol.* **17**, 275–281 (1964)
- Rinehart, J.F.: Electron microscope studies of sectioned white blood cells and platelets. *Am. J. Clin. Pathol.* **25**, 605–619 (1955)
- Rodman, N.F., Mason, R.G., McDevitt, N.B., Brinkhouse, K.M.: Morphologic alterations of human blood platelets during early phases of clotting. *Am. J. Clin. Pathol.* **40**, 271–277 (1962)
- Rodman, N.F., Painter, J.C., McDevitt, N.B.: Platelet disintegration during clotting. *J. Cell Biol.* **16**, 225–242 (1963)
- Sandritter, W., Beneke, G.: Thrombose. In: *Handbuch der speziellen path. Anat.*, 11./12. Aufl. Kaufmann, E. und Staemmler, M. (Hrsg.). Berlin: de Gruyter 1969
- Sinapius, D.: Beziehungen zwischen Koronarthrombosen und Myokardinfarkten. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **97**, 443–448 (1972)
- Schmidt, R.: Eine neue Methode zur Erzeugung von Thromben durch Unterkühlung der Gefäßwand und ihre Anwendung zur Prüfung von ASS und Heparin. *Inaugural-Dissertation, Gießen 1975*
- Schulz, H., Jürgens, R., Hiepler, E.: Die Ultrastruktur der Thrombocyten bei der konstitutionellen Thrombopathie (v. Willebrand, Jürgens) mit einem Beitrag zur submikroskopischen Orthologie der Thrombocyten. *Thromb. Diath. Haem.* **2**, 300–323 (1958)
- Seuter, F., Busse, W.D., Meng, K., Hoffmeister, F., Möller, E., Horstmann, H.: The antithrombotic activity of Bay 6575. *Arzneim.-Forsch./Drug. Res.* **29**, 54–59 (1979)
- Sommer, W.: Untersuchungen über den Ausgangswert der Komponente me (maximale Scherelastizität) im Thrombelastogramm. *Inaug. Diss., München 1958*
- Spaet, T.H.: Studies in the in vivo behavior of blood coagulation product I in rats. *Thromb. Diath. Haem.* **8**, 276–285 (1962)
- Turitto, V., Baumgartner, H.: Platelet interaction with subendothelium in a perfusion system. Physical role of the red blood cells. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **21**, 593–601 (1975)
- Virchow, R.: Thrombose und Embolie. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin.* Frankfurt a.M.: Meidinger 1856