

Charakterisierung und Funktion eines Retraktions-Cofaktors

*Aus der Medizinischen Universitätsklinik (Ludolf-Krehl-Klinik), Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes)*

H. Hartert, H. G. Lasch und I. Pfisterer

Während Tocantins (36) mehr die Zahl der im Fibrinnetz eingeschlossenen Thrombozyten für den limitierenden Faktor der Retraktion des Blutgerinnsels hielt, sah Glanzmann (11) in einem von den Thrombozyten abgegebenen Ferment, dem Retraktozym, den Wirkungsmechanismus der Retraktion. Nach Fonio (10) ist dieses Ferment an das Hyalomer der Plättchen gebunden und bewirkt die Retraktion durch eine Schrumpfung der Fibrinfasern. Wright und Minot (37) beschrieben 1917 die „visköse Metamorphose“ der Blutplättchen, die sie mit der Retraktion in Zusammenhang brachten.

Nach den Vorstellungen von Hartert (14, 15) wirkt Retraktozym (Thromboglutin) nur in unmittelbarer Umgebung der Plättchen, indem es proteolytisch die an den Thrombozyten fixierten Fibrinfäden verkürzt. Der Fibrinfaden wird nach dieser Hypothese nicht in seiner ganzen Länge, sondern nur bei unmittelbarer Berührung mit dem Plättchen vom Retraktionsvorgang erfaßt, ähnlich einer Kerze, die an den heißen Ofen gedrückt wird.

Daß die Fibrinfasern sich wie Muskelfibrillen zusammenziehen, wird von Fenchel und Seegers (8) angenommen. Nach der Ansicht von Budtz-Olsen (5) sowie Lüscher (28, 29) u. a. verhält sich das Fibrin bei der Retraktion rein passiv, eine retrahierende Aktivität entwickeln lediglich die Pseudopodien der Plättchen.

Wenn man annimmt, daß bei der Retraktion die Plättchen und das Fibrin die Hauptrolle spielen, dann ist die weitere Frage, ob auch andere Faktoren des Blutes bzw. des Gerinnungssystems diesen Vorgang beeinflussen. R. Jürgens und Studer (19) sowie Quick (30, 31) schreiben dem Thrombin eine beschleunigende Wirkung auf die Retraktion zu. Von Quick wird sie mit einer Thrombinablagerung auf der Plättchenoberfläche und konsekutiver Zunahme der Thrombozytenadhärenz erklärt. Es ist möglich, daß der von Budtz-Olsen postulierte Faktor, dessen Entstehung während der Gerinnung erst die Plättchen zur Retraktion befähigt, mit dem Thrombin identisch ist. Einen ähnlichen Mechanismus nehmen Bounameaux (4) sowie Bergsagel (3) insofern an, als sie den Vorstufen der Thrombokinase, Faktor VIII und IX sowie dem Kalzium eine stimulierende Wirkung auf die visköse Metamorphose der Plättchen und damit für die Auslösung der Retraktion zuschreiben. Nach Lüscher (29) ist die Glukose ein wesentlicher Bestandteil der viskösen Metamorphose (s. u.).

Bei eigenen Untersuchungen über die Retraktion mittels der thrombelastographischen Methode wurde ein Prinzip im Serum nachgewiesen, dessen Fehlen trotz Anwesenheit von Fibrinogen, Thrombin, Kalzium und Plättchen den Aufbau eines normal festen Thrombus unmöglich macht. Das als „Retraktions-Cofaktor“ bezeichnete Prinzip (Hartert [16, 17]), ist mit keinem der bekannten Gerinnungsfaktoren identisch. Es scheint für die Entwicklung der physiologischen Thrombusfestigkeit unerlässlich zu sein.

Die vorliegenden Untersuchungen geben weitere Einzelheiten zur physikochemischen und gerinnungsphysiologischen Definition dieses Faktors.

Methodik

Die Wirksamkeit des retraktionsfördernden Prinzips im Serum wurde geprüft

1. mit der Retraktionsmessung im Glase,
 - a) mit unverdünntem Plasma,
 - b) mit verdünntem Plasma (1 : 6) nach Benthous (2),
2. mit der Thrombelastographie.

Zur Beziehung zwischen Retraktion im Glase und Thrombelastographie sei folgendes erwähnt:

Die Retraktion im Glase und die Ausbildung eines elastisch-rigiden Gerinnsels im Thrombelastographen hängen beide in erster Linie von der retraktionsauslösenden Funktion der Plättchen ab. Eine Verschlechterung dieser Funktion verringert gleichsinnig die Retraktion im Glase und die elastische Festigkeit ($m\epsilon$ -Wert) im Thrombelastogramm (TEG).

Das TEG reagiert empfindlicher auf Änderungen der retraktiven Funktion der Plättchen insofern, als es auch dann noch differenzierte ($m\epsilon$)-Amplitudenwerte liefert, wenn die retraktive Funktion im Glase unerschwellig ist.

Die Entwicklung der retraktiven Spannung ist vom Aufbau der Fibrinstruktur in ein und demselben TEG nicht zu trennen. Mit einem technischen Kunstgriff läßt sich jedoch im Thrombelastographen demonstrieren, daß der Retraktionsvorgang unmittelbar mit der Bildung der ersten zusammenhängenden Fibrinfasern beginnt (Hartert [14, 15]). Eine quantitative Angabe über die isolierte Retraktionsfunktion der Plättchen erhält man im TEG bei Kontrolle mit lyophilisierten Thrombozyten im gleichen Plasma. Bei konstanter Plättchenfunktion kann umgekehrt der quantitative und strukturelle Einfluß des Fibrins auf die Gerinnselfestigkeit geprüft werden.

Während also die Plättchen einen gleichsinnigen, positiven Einfluß auf den $m\epsilon$ -Wert des TEGs und auf die Retraktion ausüben, verhält sich das Fibrin in den beiden Methoden verschieden: eine Verminderung des Fibrins verbessert die

Retraktion im Glase, während sie dagegen den $m\epsilon$ -Wert im TEG verschlechtert und umgekehrt. Bei der Retraktion im Glase „behindert“ das Fibrin den Retraktionsvorgang quantitativ, im TEG dagegen wird die Maximalamplitude um so höher, je mehr Fibrin vorhanden ist; Plättchenfunktion und Fibrinmenge bzw. -strukturfestigkeit addieren sich im TEG im Sinne einer erhöhten mechanischen Belastbarkeit des Gerinnsels.

Eine starke Adhäsion der Plättchen begünstigt die Retraktion im Glase, da sich dann eine zusammenhängende Plättchenschicht auf der Behälteroberfläche bildet, die den zu festen Kontakt des Fibrins mit dem Behälter verhindert. Das TEG wird von der Adhäsionsneigung der Plättchen in weiten Grenzen nicht beeinflusst. Erst eine extrem geringe Haftung des Gerinnsels führt auch im Thrombelastographen zur Lösung des Thrombus und damit zu einer charakteristischen Störung des Kurvenverlaufs.

Einen gewissen Einfluß auf das TEG hat die Vernetzung der Fibrinfasern durch die Plättchen. Diese Vernetzung scheint im TEG besonders dann als Festigungsfaktor hervorzutreten, wenn die Plättchenzahl so niedrig ist, daß im Glase keine Retraktion mehr zustandekommen würde.

Tab. 1

		Retraktion im Glase		TEG-Amplitude		Vergleich der Wirkung auf Amplitude im TEG und auf Ausmaß der Retraktion im Glase
		stärker	schwächer	größer	kleiner	
Fibrinmenge	groß		+	+		Gegensinnig
	klein	+			+	
Fibrinstruktur	grob		?	+		?
	fein	?			+	
Vernetzung	stark		(?)	+		?
	schwach	(?)			+	
Thrombozytenzahl	hoch	+		+		Gleichsinnig
	niedrig		+		+	
retraktive Thrombozytenfunktion	gut	+		+		Gleichsinnig
	schlecht		+		+	
Thrombozytenadhäsion	stark	(+)			(+)	nicht vergleichbar
	schwach		+			
Blutzell-Gesamtvolumen	groß		+		(+)	Gleichsinnig (Effekt auf TEG nur durch rel. Plasmamangel)
	klein	+		(+)		

In Tabelle 1 sind Retraktion und TEG gegenübergestellt. Die Verschiedenartigkeit der Reaktion des TEGs und der Retraktion auf die verschiedenen mechanischen Qualitäten des Gerinnsels erlaubt die gegenseitige Kontrolle der Ergebnisse in Kreuzversuchen.

Die früher (17) beschriebenen Grundzüge zur Bestimmung des Cofaktors wurden weitgehend beibehalten. Verwendet wurden: Fibrinogenlösung vom Rind, 0,6% (Behringwerke), Thrombozyten vom Schwein, vom Rind und vom Menschen, Veronal-Puffer (O w r e n) mit einem pH von 7,5, Thrombinlösung (Roche), sowie als Träger des zu untersuchenden Cofaktors die Seren vom Schwein, Rind und Menschen. Rinderserum hatte die konstanteste Cofaktor-Aktivität. Die Thrombozyten wurden durch zweimaliges Zentrifugieren in Kälte oder Wärme und Resuspendieren in einer 9:1 Kochsalz-Zitratlösung gewaschen. Alle Gerinnungsansätze in der Küvette des Thrombelastographen geschahen in folgendem Mengenverhältnis:

- 0,1 ccm Fibrinogenlösung
- 0,05 ccm Thrombozytensuspension
- 0,09 ccm Normalserum
- 0,06 ccm Veronalpuffer
- 0,06 ccm Kalziumchloridlösung, darin Thrombin gelöst (Gerinnungszeit 1 bis 2 Minuten).

Zu den Retraktionsversuchen in Gläsern wurden ausgeglühte Reagenzgläser genommen. Als Gerinnungsansatz wurde in allen Anteilen die doppelte Menge des Ansatzes für den Thrombelastographen verwendet; Röhrchenweite für diese Versuche 8 mm. Bei der Modifikation von B e n t h a u s (2) wurden abgesehen von der physiologischen Kochsalzlösung zur Verdünnung und der entsprechend höheren Kalziummenge die gleichen Ansatzmengen verwendet; Röhrchenweite 15 mm.

Ergebnisse

1. *Stabilität gegen Lagerung und Temperatur.* In Tabelle 2 sind die thrombelastographischen Vergleichswerte aus demselben Serum während Lagerung bei Zimmertemperatur, bei 37° C und bei + 4° angegeben. Es zeigte sich, daß der Cofaktor unter allen drei Bedingungen bis zu 10 Tagen seine volle Aktivität behält (TEG-Untersuchung). Die Aufbewahrung von Serum bei - 1° führte bereits nach 28 Stunden zu völligem Aktivitätsverlust. Eingefrorenes (- 16°) und wieder aufgetautes Serum zeigte ebenfalls keine Aktivität im Sinne der Cofaktorfunktion. Wurde Serum 30 Min. lang auf 57° erhitzt, war keine Aktivität mehr nachweisbar.

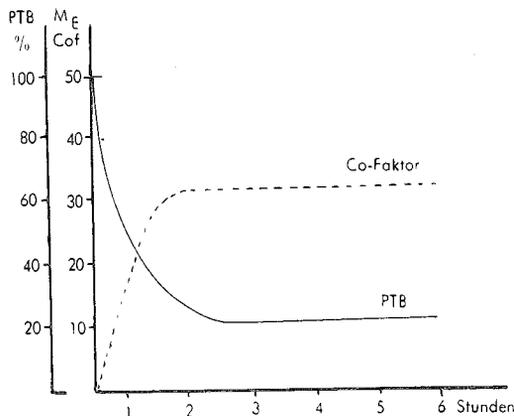
2. *Adsorbierbarkeit.* Wurde Serum mit Bariumsulfat, Aluminiumhydroxyd, Bariumkarbonat und Kohle adsorbiert, dann zeigte sich kein Aktivitätsverlust. Die Behandlung des Serums mit Chloroform, Azeton, Äther führte zu keiner wesentlichen Abnahme der Cofaktor-Funktion im Serum (TEG-Untersuchungen).

3. *Verhalten des Cofaktors während des Gerinnungsprozesses:* Plasma zeigte eine geringe Cofaktor-Aktivität. Wurde thrombozytenhaltiges Plasma durch Rekalzifizierung zur Gerinnung gebracht, dann nahm mit fortschreitender Ge-

Tab. 2: Über die Aktivität des Retraktions-Cofaktors bei verschiedenen Temperaturen und bei Lagerung.

Temperatur	Zeit	Maximale Festigkeit m_g
+ 4°	10 Tage	44
+ 24°	10 Tage	47
+ 37°	10 Tage	46
- 1°	28 Stunden	11
+ 40°	10 Minuten	40
+ 45°	10 Minuten	41
+ 50°	10 Minuten	39
+ 55°	10 Minuten	38
+ 60°	10 Minuten	40
+ 70°	10 Minuten	8
+ 57°	30 Minuten	9

rinnung die Aktivität im Sinne des Cofaktors zu. Zwei Stunden nach Gerinnungsbeginn war eine volle Aktivität erreicht, die sich in den folgenden Stunden nicht mehr änderte (Abb. 1). Im fast thrombozytenfreien Plasma war bei Rekalzifizierung während des Gerinnungsablaufes eine wesentlich geringere Aktivitätszunahme zu beobachten. Wurde dagegen thrombozytenarmes Plasma unter Hinzugabe von Gewebsthrombokinase zur Gerinnung gebracht, dann zeigte sich eine größere Zunahme der Cofaktor-Aktivität während des Gerinnungsablaufes. Wurde im Ansatz der Prothrombinverbrauch gemessen, dann stellte sich in der Phase des maximalen Prothrombinverbrauches auch die optimale Zunahme der Cofaktor-Aktivität ein (Abb. 1; TEG-Untersuchungen).

Abb. 1: Abnahme des Prothrombins mit gleichzeitiger Zunahme des Retraktionskofaktors, gemessen an der Zunahme des m_g -Wertes im TEG.

4. Identität des Cofaktors mit anderen Gerinnungsfaktoren: Die Tatsache, daß der Cofaktor während der Gerinnung an Aktivität zunahm, ließ bei glei-

chem Verhalten anderer Akzeleratoren der Blutgerinnung, Faktor V—VI, Faktor VII, Faktor IX, an die Möglichkeit denken, daß eine dieser Komponenten mit dem Retraktions-Cofaktor identisch ist. Der Ersatz von Serum im Ansatz durch Fraktionen mit überwiegendem Gehalt an Faktor VII, Faktor V—VI erwies sich als unwirksam. Dagegen zeigten Faktor-VII-freies Rinderplasma, prothrombinarmes Rinderplasma und Faktor-V-armes Menschenplasma Cofaktor-Aktivität. Demnach ist der Cofaktor offenbar nicht mit den Faktoren V, VII und IX identisch. Seitzfiltration konnte den Cofaktor nicht aus dem Serum entfernen (TEG-Unters.).

5. *Fällbarkeit*: Wurde Serum durch Kochen, oder nach Folin-Wu, oder mit Trichloressigsäure enteiweißt, dann war in der überstehenden Flüssigkeit keine Aktivität im Sinne der Cofaktor-Funktion mehr nachweisbar. Ammoniumsulfat und Zinkacetat fällten den Cofaktor aus.

Wurde verdünntes Serum bei verschiedenen pH-Einstellungen 5 Stunden stehengelassen, der Niederschlag abzentrifugiert und im überstehenden Serum das pH wieder auf 7,1 bis 7,2 eingestellt, dann zeigte sich nach vorübergehender Einstellung auf pH 5,1 bis 5,3 ein deutlicher Aktivitätsverlust. Die vorübergehend auf andere Wasserstoffionenkonzentrationen eingestellten Seren zeigten nach Einstellung auf pH 7,3 wieder volle Wirksamkeit (Tab. 3).

Tab. 3: Veränderung der Co-Faktoraktivität bei verschiedener pH-Einstellung

pH	maximale Festigkeit m _g
7,6	44
7,0	43
6,6	47
5,9	42
5,2	8
5,1	14
4,7	39
3,5	55
2,8	53

Wurde der Niederschlag von pH 5,1 in destilliertem Wasser oder in physiologischer Kochsalzlösung oder Traubenzuckerlösung aufgenommen, dann ergab er keine Cofaktor-Aktivität. Wurde hingegen die ausgefallene Eiweißfraktion im inaktiven Überstand, oder in Tutofusin, oder in Ringerlösung wieder aufgenommen, so war eine deutliche Aktivität nachweisbar. Auch die Auflösung des Präzipitats pH 5,1 im Kochsaft von Serum ergab volle Aktivität (Abb. 2).

6. *Dialyse*: Wurde Serum gegen Aqua destillata, physiologische Kochsalzlösung und 5%ige Traubenzuckerlösung dialysiert, ging es seiner Cofaktor-Aktivität verlustig. Diese wurde durch Zugabe von Traubenzuckerlösung oder

physiologischer Kochsalzlösung nicht wieder erreicht. Auch die Substitution mit verschiedenen Salzen in entsprechender Konzentration, wie Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid war ohne Erfolg. Die Zugabe von Ringerlösung oder Tutofusin führte zur Wiederherstellung der Aktivität (TEG-Untersuchungen).

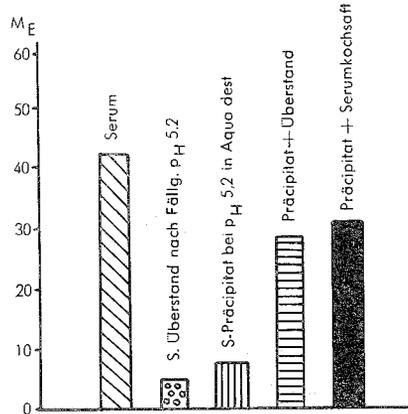


Abb. 2: Wert der elastischen Festigkeit im TEG mit verschiedenen Zusätzen zum Standardansatz. (Standardansatz: Fibrinogen, Plättchen, Kalzium, Thrombin).

7. *Retraktions-Cofaktor und Retraktion im Glase.* Beim Retraktionsansatz im Glase, der Plättchen, Fibrinogen, Serum sowie Calcium-Thrombin enthielt (s. o.), kam es fast immer zu maximaler Retraktion in den Ansätzen nach Benthau (ca. 95%). Bei isoliertem Weglassen des Serums fehlte die Retraktion immer vollständig, auch dann, wenn das Gerinnsel durch eine ruckartige Drehbewegung gelöst wurde. Fehlen der Retraktion wurde ebenfalls beobachtet, wenn statt des Serums die gleiche Menge einer 0,5% Glukoselösung im Sinne der Untersuchungen von Lüscher zugesetzt wurde.

Die Ansätze mit unverdünntem Gerinnungsgemisch zeigten prinzipiell die gleichen Ergebnisse. Es fanden sich hierbei jedoch häufiger Störungen der Retraktion durch mangelhafte Ablösung des Gerinnsels, so daß die Versuche wiederholt werden mußten. In keinem Falle war die Retraktion im unverdünnten Ansatz besser als im verdünnten. — Die Ablesung vor allem der verdünnten Proben erfolgte nach 2 Stunden, da sich hier sehr früh Fibrinolyse bemerkbar machte.

Kontrollen der Retraktion bei isoliertem Weglassen bzw. Blockieren des Ca^{++} durch Zitrat zeigten eine Retraktion von nur 30% gegenüber dem Wert von 95% mit Kalzium.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß für die mit dem Thrombelastographen gemessene Festigung des Gerinnsels neben Fibrin,

Calcium, Thrombozyten und Thrombin eine weitere Komponente aus dem Serum verantwortlich zu machen ist. Diese schon früher von Hartert (16, 17) beschriebene Komponente ist komplexer Natur. Einmal sind für ihre Wirkung das physiologische Ionenmilieu des Blutes, zum anderen die Aktivität eines Eiweißfaktors verantwortlich zu machen, dessen isoelektrischer Punkt bei pH 5,1 bis 5,3 liegt, und der mit keinem der bisher bekannten Gerinnungsfaktoren identisch ist. Bei der Suche nach anderen bekannten Cofaktoren der Retraktion mit der Frage, inwieweit die hier beschriebene Komponente mit ihnen übereinstimmt, sind zunächst ältere Ergebnisse z. B. von T e z n e r (35) zu erwähnen, die schon damals in einem definierten Ionenmilieu die Voraussetzung einer regelrechten Retraktion sahen. Kürzlich hat Lüscher (28, 29) den Beweis erbringen können, daß die Glukose ein wesentlicher Cofaktor der Retraktion ist. Offenbar kommt dem Zucker hier die Aufgabe einer Energiequelle zu. Da der Effekt der Glukose bei einer relativ fibrinogenarmen Plättchensuspension gefunden wird, ist die Plättchenretraktion möglicherweise nur ein Teilmoment der Retraktion des Blutgerinnsels. Die Ansicht von Fenichel und Seegers (8), wonach unter Einwirkung von 5-Oxytryptamin (Serotonin) eine Fibrinverkürzung ähnlich der Muskelkontraktion während der Retraktion ablaufen soll, berücksichtigt diese Verhältnisse. Serotonin hatte bei unseren Untersuchungen jedoch keine Cofaktor-Aktivität. Der mehrfach (F o n i o [9, 10]), zuletzt von L ü s c h e r publizierte Versuch, wo bei relativer Zunahme der Fibrinogenmenge gegenüber dem Plättchengehalt eine Verringerung des Ausmaßes der Retraktion im Reagensglas zu beobachten war, ist unseres Erachtens kein Argument für die rein passive Beteiligung des Fibrins. Er kann ebensogut als Beweis dafür angesehen werden, daß hinsichtlich der Retraktion eine strenge Korrelation zwischen der Menge des von den Plättchen abgegebenen retraktionsfördernden Prinzips und seinem Substrat Fibrin besteht. E l l i c o t t und C o n l e y (7) berichten über einen Cofaktor der Retraktion im Serum, der ebenso wie Ochsenalbumin, Gummi arabicum und Eiereiweiß eine aktive Verkürzung des Fibrinmoleküls bewirken soll. In unseren Versuchen waren Eiereiweiß und Gummi arabicum wirkungslos.

Eine der Voraussetzungen der Retraktion ist offenbar die richtige Ausbildung des Fibrins (s. u.). Die Wirkung von Thrombin, das als hydrolytisches Ferment durch Spaltung von Peptidbrücken die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin vollzieht, scheint unter physiologischen Bedingungen hierin durch die Aktivität anderer Komponenten unterstützt zu werden. Die Bedeutung von Calciumionen sowie von Thrombozytenferment 2 sind erwiesen. Von L o r a n d (26), L a k i (22, 23) und S h u l m a n (34) wird ein fibrinstabilisierender Serumfaktor diskutiert, der bei Halbsättigung von Ammoniumsulfat ausfällt, dagegen aber bei pH 5,0 bis 5,4 in Lösung bleibt. Bei Dialyse gegen 3,0 molare Harnstofflösung wird seine Aktivität zerstört.

Die Untersuchungen von L o w y und E d s a l l (26), wonach Thioglycolat

und Gluthathion die Serumfaktorfunktion ersetzen, führen zu der Vermutung, daß dieser Serumfaktor SH-Gruppen in seine Wirkung einschließt und möglicherweise aus SH-Gruppen S-S-Brücken intermolekular im Fibrin formt, das damit in Harnstoff unlöslich wird. Substanzen mit Hemmfunktion auf SH-Gruppen (Monojodessigsäure und Para-chloro-mercuribenzoat) hemmen in entsprechender Konzentration auch die Funktion unseres Cofaktors (Hartert und L a s c h [18]). Auf der anderen Seite unterscheidet sich unser Cofaktor, was pH-Fällbarkeit und Löslichkeit anbelangt, von der von L a k i und L o r a n d (21) beschriebenen Wirkungskomponente.

Die Zunahme der Aktivität des Cofaktors während der Blutgerinnung gleichsinnig mit dem Prothrombinverbrauch erinnert an die von A. J. Q u i c k (30, 31) aufgestellte Retraktionstheorie, der diese dritte Phase der Blutgerinnung einmal von der Zahl der Plättchen zum anderen von der Rate des Prothrombinverbrauchs abhängig machte. Allerdings schrieb er dabei dem Thrombin die wesentliche Funktion für die Retraktion zu. Die Vorstellung vom Abbau des Prothrombins ist inzwischen dahingehend erweitert worden, daß außer Thrombin auch die Akzeleratoren Faktor VII (L a s c h und R o k a [24], D e u t s c h und S c h a d e n [6], S e e g e r s und A l k j a e r s i g [32] und Faktor IX (S e e g e r s und J o h n s o n [33]) aus Prothrombin hervorgehen. Da der Retraktions-Cofaktor weder mit Faktor VII noch mit Faktor IX identisch ist, seine Aktivitätszunahme aber an den Prothrombinabbau gekoppelt ist, wird man seine Entstehung aus dem Prothrombinmolekül vermuten können. Der Befund von A g g e l e r , H o w a r d und L u c i a (1), ebenso K o l l e r (20), wonach eine exzessive Hypoprothrombinämie eine gestörte Retraktion nach sich zieht, würde unter diesen Gesichtspunkten die vorliegenden Ergebnisse stützen. Auf der anderen Seite haben G r o s s und M a t i s (12) nachgewiesen, daß bei Patienten mit durch Dicumarol unter 5% gesenktem Prothrombinspiegel die Retraktion im Glase normal war.

Der Zusammenhang der vorliegenden thrombelastographischen Untersuchungen mit der Retraktion ergibt sich aus den Retraktionsversuchen im Glase. Schon ein grobmechanischer Vergleich der frischen Gerinnsel vor der Retraktion zeigt, daß ein serumfreies Gerinnsel wesentlich weicher ist als das serumhaltige. Es handelt sich also offensichtlich um eine minderwertige, mechanisch wenig widerstandsfähige Fibrinstruktur im serumfreien Ansatz, wie dies ja auch im TEG zum Ausdruck kommt. Nach den Anschauungen von L ü s c h e r , B u d t z - O l s e n u. a. müßte dieses Gerinnsel besonders gut retrahieren, da es dem Retraktionsbestreben der Plättchen ja viel weniger passiven Widerstand leisten kann als das serumhaltige Fibrin. Tatsächlich retrahiert aber gerade das feste, serumhaltige Fibrin so gut. Das beweist unseres Erachtens, daß das Fibrin bei der Retraktion nicht die passive Rolle spielt, die ihm von den erwähnten Autoren zugeordnet wird.

Daß der Retraktions-Cofaktor aus dem Serum andererseits nicht mit L ü s c h e r s Thrombozyten-Cofaktor der Retraktion identisch ist, geht daraus hervor, daß der Ersatz des Serums durch Glukose genauso die Retraktion (im Fibrin-Thrombus) vermissen läßt, wie das Fehlen des Serums an sich. Ganz gleichsinnig wirkten sich, wie oben gezeigt, diese Versuche auf die Maximalamplitude des TEGs aus.

Im Ca^{++} -freien Ansatz findet eine geringe Retraktion (ca. 30%) statt, obgleich ein solches Gerinnsel im TEG sehr schlaff ist. Dies scheint zu zeigen, daß Ca^{++} -Mangel die funktionelle Beteiligung des Fibrins am Retraktionsvorgang nicht so sehr stört, wie das Fehlen des Retraktions-Cofaktors.

Betrachtet man unsere Ergebnisse mit den erwähnten anderer Autoren, so kann man folgende zusammenfassende Hypothese formulieren: Die Thrombozyten wirken retrahierend, indem sich ihre Pseudopodien verkürzen. Ein integrierendes Prinzip dieses Vorgangs wurde von L ü s c h e r in der Glukose gefunden (Cofaktor des Retraktosyzms?). Die Volumverkleinerung des Fibringerinnsels bei der Retraktion ist aus physikalischen Gründen nur dann möglich, wenn das Fibrin dabei eine eingreifende Änderung seiner Struktur erfährt. Eine Voraussetzung hierfür ist die Anwesenheit des Retraktions-Cofaktors bei der Gerinnung. Sie macht offenbar die Fibrinstruktur substratspezifisch für das Retraktosyzm in den Plättchen.

Die Strukturänderung des Fibrins bei der Retraktion scheint sich nicht ubiquitär auf die Gesamtmasse der Fibrinfasern zu erstrecken, sondern von den Thrombozyten her auf das Fibrin überzugehen. Dadurch wird eine Fibrinfaser nicht auf einmal in ihrer ganzen Länge, sondern sukzessive in dem Maße im Plättchen-nahen Anteil struktur-verändert, in dem die Fibrinfasern Bewegungsfreiheit zum Nachrücken haben.

Der Vorgang läßt sich einfacher beschreiben, wenn man sagt, daß die Plättchen eine visköse Metamorphose durchmachen, an der das mit den Plättchen direkt in Berührung stehende Fibrin teilnimmt.

Zusammenfassung

Die physiologischen Eigenschaften des Blutgerinnsels beruhen zu einem wesentlichen Teil auf seiner mechanischen Festigkeit. Seine Struktur wird primär bestimmt durch die Komponenten Fibrin und Thrombozyten. Wie sich in Untersuchungen mit dem Thrombelastographen und mit der Retraktion im Glase gezeigt hat, ist aber ein Gerinnsel, das aus Fibrinogen und Blutplättchen unter Zusatz von Thrombin und Calcium entstanden ist, von vergleichsweise minimaler mechanischer Festigkeit und nicht retrahierbar. Erst die Hinzufügung von Serum läßt ein normal festes und retrahierendes Gerinnsel entstehen.

Es wurde früher festgestellt, daß für diese Funktion des Serums offenbar ein eigenes, nicht mit einem der bekannten Gerinnungsfaktoren identisches Prinzip verantwortlich ist.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde gefunden, daß dieser Faktor offenbar aus zwei Komponenten besteht, deren eine als Eiweißkörper, deren andere als physiologisches Ionenmilieu des Blutes charakterisiert ist. Der Proteinanteil dieses als Retraktions-Cofaktor bezeichneten Prinzips ist (a) relativ stabil gegen Lagerung und gegen Erhitzen, (b) instabil bei längerem Einfrieren; er ist (c) nicht adsorbierbar an Bariumsulfat, Bariumcarbonat und Aluminiumhydroxyd; (d) er gewinnt seine volle Aktivität erst während des Gerinnungsvorganges, gleichsinnig mit dem Prothrombinverbrauch; (e) sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 5,1 bis 5,3; (f) Serumpräzipitat von pH 5,1 bis 5,3 gewinnt bei Lösung in Kochsaft oder Überstand seine Aktivität zurück.

Der Retraktions-Cofaktor ist ein Teilfaktor für die Entstehung der physiologischen Festigkeit des Blutgerinnsels. Ein ohne seine Mitwirkung entstandenes Fibringerinnsel ist extrem weich und retrahiert auch in Anwesenheit intakter Thrombozyten nicht.

Es läßt sich gegenwärtig noch nicht entscheiden, ob der Retraktions-Cofaktor neben der Verfestigung des Gerinnsels nur die Substratspezifität der Fibrinstruktur für den Retraktionsvorgang bewirkt, oder ob er auch ein Cofaktor des Plättchen-Retraktozyms ist.

Die Retraktion des Blutgerinnsels erscheint ohne einen Strukturwandel des Fibrins nicht möglich. Es wird daher die Hypothese aufgestellt, daß die mit den Plättchen in Berührung stehenden Anteile der Fibrinfasern sich an deren visköser Metamorphose beteiligen und auf diese Weise verkürzt werden.

Summary

The physiologic properties of a blood clot are chiefly dependent on the mechanical consistence. The structure of the clot is determined to a large extent by the fibrin and thrombocytes. A clot formed by the action of thrombin and calciumions on fibrinogen and platelets does not retract and has a poor mechanical resistance. This has been demonstrated by thromboelastographic studies and clot retraction in glasstubes. The addition of serum is required for a retractil and firm clot.

It has been shown that the responsible principle in serum does not correspond to any known coagulation factor. It is demonstrated in this study that the factor is apparently composed of two components, one is a protein, the other one is characterized by the ionic strenght. The protein component of the retraction co-factor.

a) is relatively storage- and thermostable,

- b) does not resist prolonged freezing,
- c) is not adsorbed onto BaSO_4 , BaCO_3 and $\text{Al}(\text{OH})_3$,
- d) the maximal activity of the factor develops during the first phase of the coagulation concomitantly with the prothrombin consumption,
- e) the isoelectric point lays between pH 5,1—5,3, the full activity of the serum precipitate (pH 5,1—5,3) can be recovered if dissolved in saline or the supernatant.

The retraction-cofactor is one of the factors responsible of the firmness of a clot. The clots are soft and do not retract in the absence of this cofactor, even if platelets are present in the system.

It is impossible at present to know if the retraction-cofactor has, besides a role in the firmness of a clot, also an influence on the retractability of fibrine structure or is directly related with the retractozyme of platelets.

The clot retraction supposes structural changes of the fibrin molecule. Therefore the hypothesis is suggested that both, the fibrin fibrils — the latter only in the parts close to the platelets undergo the viscous metamorphosis.

Résumé

Les propriétés physiologiques du caillot sanguin dépendent en grande partie de sa consistance mécanique. La structure du caillot est surtout déterminée par la fibrine et les thrombocytes. Un caillot, formé par l'action de la thrombine et du calcium sur du fibrinogène et des thrombocytes, n'a pas de rétraction et est dépourvu de résistance mécanique. Ceci a été démontré à l'aide du thrombo-elastographe et par l'étude de la rétraction dans des éprouvettes en verre. L'addition de sérum est nécessaire pour obtenir un caillot retractant et ferme.

Il a été démontré que l'action du sérum ne correspond à aucun facteur connu de la coagulation. Le facteur responsable est apparemment constitué de deux composants, l'un étant une protéine, l'autre est caractérisé par la force ionique du milieu. Le composant protidique de ce cofacteur de la rétraction est

- a) relativement stable et résiste à la chaleur;
- b) est inactivé par la congélation prolongée,
- c) n'est pas adsorbé ni au sulfate de Barium, ni au carbonate de Barium ni à l'hydroxyde d'Aluminium.
- d) l'activité maximale de ce facteur se développe pendant la première phase de la coagulation en même temps que la consommation de la prothrombine,
- e) le point iso-électrique est entre les pH 5,1—5,3, le précipité sérique entre les pH 5,1—5,3 peut être dissout dans du sérum physiologique ou dans le liquide surnageant, tout en maintenant son activité.

Le cofacteur de la rétraction est un des facteurs responsables de la consi-

stance du caillot. L'absence de ce facteur donne lieu à la formation de caillots moux et irrétractibles, même en présence de thrombocytes.

Il est à présent impossible d'affirmer si le cofacteur de la rétraction a, en dehors de son action sur la consistance du caillot, comme unique rôle la préparation spécifique de la structure de la fibrine ou s'il est également un cofacteur de la rétractozyme plaquettaire.

La rétraction du caillot est impossible sans changement de structure de la fibrine. C'est pourquoi l'hypothèse est formulée que des fibres de fibrine sont entraînées par la métamorphose visqueuse des plaquettes et raccourcissent en conséquence.

Literatur

- (1) Aggeler, P. M., Howard, J. und Lucia, S. P.: Platelets counts and Platelets function; Blood 1: 472 (1946).
- (2) Benthau, J.: Über den Einfluß der Gerinnungsfaktoren auf die Retraktion. 63. Tagg. Dtsch. Ges. inn. Med., Wiesbaden 1957.
- (3) Bergsagel, D. E.: zitiert aus: V. Europ. Hämatologenkongreß, Freiburg 1955.
- (4) Bounameaux, B.: Arch. Int. Physiol. 63: 243 (1955).
- (5) Budtz-Olsen, O. E.: „Clot retraction“. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1951).
- (6) Deutsch, E. und Schaden, W.: Zur Reinigung und Charakterisierung des VII. Blutgerinnungsfaktors. Biochem. Zschr. 324: 266 (1953).
- (7) Ellicott, C. E. und Conley, C. L.: Retraction of clots formed from purified prothrombin. Bull. Johns Hopk. Hosp. 88: 321 (1952).
- (8) Fenichel, R. L. und Seegers, W. H.: Studies on human Clot retraction. J. Appl. Physiol 10: 71 (1957).
- (9) Fonio, A.: Die Thrombozyten des menschlichen Blutes. Verlag H. Huber, Bern, 1942.
- (10) Fonio, A.: Neuere Untersuchungen über die retraktionsauslösende Funktion der Thrombozyten. Schweiz. R'schau Med. Heft 43, S. 1 (1947).
- (11) Glanzmann, E.: Hereditäre hämorrhagische Thromboasthenie. Jb. Kinderheilk. 85: 113 (1918).
- (12) Gross, R. und Matis, P.: Die Retraktion des Blutkuchens und ihre Störungen. Z. klin. Med. 150: 13 (1952).
- (13) Hartert, H.: Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie. Klin. Wschr. 577 (1948).
- (14) Hartert, H.: Thrombelastographische Untersuchungen zur Thrombusbildung. Klin. Wschr. 789/90 (1949).
- (15) Hartert, H.: Thrombelastographische Untersuchungen zur Retraktion. Klin. Wschr. 78 (1950).
- (16) Hartert, H.: Ein Re.-Cofaktor im Serum. Arch. exp. Path. u. Pharm. 222: 154 (1954).
- (17) Hartert, H.: Der Retraktions-Cofaktor im Serum. Klin. Wschr. S. 139 (1954).
- (18) Hartert, H. und Lasch, H. G.: Unveröffentlichte Ergebnisse.
- (19) Jürgens, R. und Studer, A.: Zur Wirkung des Thrombins. Helv. physiol. Acta 6: 130 (1948).
- (20) Koller, F.:
- (21) Laki, K. und Lorand, L.: On the solubility of fibrin clots. Science 108: 280 (1945).
- (22) Laki, K.: The Polymerisation of Proteins. Action of Thrombin on Fibrinogen. Arch. Biochem. and Biophys. 32: 317 (1951).
- (23) Laki, K.: The clotting of fibrinogen. Blood 8: 845 (1953).
- (24) Lasch, H. G. und Róka, L.: Über die Prothrombinbildung in der Leber. Z. phys. Chem. 294: 30 (1953).

- (25) Lasch, H. G. und Róka, L.: Über den Bildungsmechanismus der Gerinnungsfaktoren Prothrombin und Faktor VII. *Klin. Wschr.* S. 460 (1954).
- (26) Lorand, L.: Contributions to the Fibrinogen — Fibrinproblem; III. *Int. Congress, Haematol. Cambridge 1950.*
- (27) Lowy, E. und Edsall, J. T.: zit. bei Laki, K.: *Blood* 8: 845 (1953).
- (28) Lüscher, E. F.: Viscosis metamorphosis of blood Platelets and Clot retraction; *Vox sanguinis* 1: 133 (1956).
- (29) Lüscher, E. F.: Glukose als Cofaktor bei der Retraktion des Blutgerinnsels. *Experienta* 12: 294 (1956).
- (30) Quick, A. J.: The Role of platelets in the coagulation of the Blood. *Am. J. Med. Sci.* 217: 198 (1949).
- (31) Quick, A. J.: *The Physiology and pathology of hemostasis.* Lea a. Febiger, Phil. 1951.
- (32) Seegers, W. H. und Alkjaersig, N.: Nature of the blood coagulation mechanism in SPCA plasma. *Circulation Res.* 3: 514 (1955).
- (33) Seegers, W. H. und Johnson, S.: The Preparation of Prothrombin Derivates and an Indication of their properties. *Arch. Biochem. and Bioph.* 61: 1 (1956).
- (34) Shulman, S.: The fibrin serum factor. *Nature* 171: 606 (1953).
- (35) Tezner, O.: Der Einfluß verschiedener Salze auf die Retraktion des Blutgerinnsels. *Z. exper. Med.* 64: 462 (1929).
- (36) Tocantins, L. M.: Platelets and the spontaneous syneresis of blood. *Am. J. physiol.* 110: 278 (1934).
- (37) Wright, J. H. und Minor, G. R.: The viscous metamorphosis of the blood platelets. *J. exp. Med.* 26: 395 (1917).