

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
der Philipps - Universität Marburg
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold
Klinik für Innere Medizin,
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. med. A. Neubauer

Zur Transglutaminase-Aktivität der
Untereinheit A des Faktor XIII in
plättchenarmem und plättchenreichem Plasma
sowie in Thrombozytenkonzentraten bei
Patienten mit heterozygotem, doppelt
heterozygotem und homozygotem Faktor XIII-
Mangel

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps - Universität Marburg vorgelegt von

André Dupin
aus Essen
Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 03.06.2004.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. R. Egbring

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. T. Stief

Abkürzungsverzeichnis

Faktor XIII-A	Untereinheit A des Faktor XIII
Faktor XIII-B	Untereinheit B des Faktor XIII
Faktor XIIIa	aktive Form des Faktor XIII
PRP	Plättchenreiches Plasma
PPP	Plättchenarmes Plasma
TZK	Thrombozytenkonzentrat
RG	Reagenzglas

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Thema	Seite
1.	Einleitung	7
2.	Die Struktur des Faktor XIII	16
2.1.	Die Biochemie des Faktor XIII	16
2.1.1.	Die Aktivierung des Faktor XIII	18
2.2.	Die Physiologie des Faktor XIII	24
2.3.	Die Pathophysiologie des Faktor XIII	27
2.4.	Die Klinische Bedeutung des angeborenen Faktor XIII-Mangels	29
2.5.	Die Diagnostik des Faktor XIII-Mangels	33
2.6.	Die Therapie des Faktor XIII-Mangels	37
3.	Probanden, Material und Methoden	41
3.1.	Die Probanden	41
3.2.	Material, Reagenzien und Geräte	44
3.2.1.	Für die radiologische Methode der Bestimmung der Aktivität des Faktor XIII	44
3.2.2.	Für die Herstellung der Thrombozytenkonzentrate	46
3.3.	Methoden	48
3.3.1.	Versuchssystematik	48
3.3.2.	Die Herstellung der Thrombozytenkonzentrate (TZK) und der plättchenreichen (PRP) bzw. -armen	50

	Plasmen (PPP)	
3.3.3.	Die Bestimmung der Aktivität des Faktor XIII mit der vereinfachten radiologischen Methode nach Loewy	52
3.3.4.	Die Durchführung der Auftauvorgänge	57
4.	Ergebnisse	59
4.1.	Die Durchführung des Ablesevorganges bei der Faktor XIII-Aktivitätsbestimmung	59
4.2.	Ergebnisse im PPP und im PRP	61
4.2.1.	Ergebnisse der gesunden Probanden	61
4.2.2.	Ergebnisse der heterozygoten Probanden	62
4.2.3.	Ergebnisse der homozygoten bzw. doppelt heterozygoten Probanden	63
4.2.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse im plättchenarmen Plasma (PPP)	64
4.2.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse im plättchenreichen Plasma (PRP)	66
4.3.	Ergebnisse in den TZK	68
4.3.1.	Ergebnisse der gesunden Probanden	68
4.3.2.	Ergebnisse der heterozygoten Probanden	69
4.3.3.	Ergebnisse der homozygoten bzw. doppelt heterozygoten Probanden	70
4.3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse in den Thrombozytenkonzentraten (TZK)	71
4.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Thrombozytenzählungen im PPP, PRP und TZK vor und nach den fünf	73

	Einfriervorgängen	
4.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse bezogen auf die 3 Probandengruppen	74
5.	Diskussion	78
6.	Zusammenfassung	95
7.	Literaturverzeichnis	97
8.	Anhang	116
	Meine Akademischen Lehrer	120
	Danksagung	121

1. Einleitung

Zum Aufbau und zur Funktion des Faktor XIII

Der Blutgerinnungsfaktor XIII wurde unter den nach römischen Zahlen benannten Gerinnungsfaktoren als (zunächst) letzter eingereiht und chronologisch mit der Zahl XIII belegt⁴⁰.

Der Faktor XIII, auch Fibrin-stabilisierender Faktor genannt, bewirkt am Ende der Gerinnungskaskade durch Aktivierung mit Thrombin und Ca^{2+} die Quervernetzung von Fibringerinnseln untereinander. Er bedingt so die Stabilisierung der Gerinnsel und behindert die reaktive Fibrinolyse, die zur Auflösung des Gerinnsels und zur erneuten Blutung führen könnte⁹⁸.

Faktor XIII findet sich sowohl im Plasma als auch in bestimmten Zellen der Hämatopoese. Im Blut zirkuliert er als durch nichtkovalente Bindungen zusammengehaltenes Heterotetramer aus je zwei identischen Untereinheiten A (Protransglutaminase)⁶⁰ und B (Trägerprotein) (A₂B₂)^{9,10,118}, während er z. B. in Plättchen bzw.

in Megakaryozyten lediglich als Homodimer der Untereinheit A (A₂) vorliegt^{1,56,99}.

Leberzellen sind anscheinend neben differenzierten Knochenmarkszellen der Ort der Synthese der Untereinheit A im Blut, während die Untereinheit B ausschließlich in der Leber produziert wird. Monozyten synthetisieren ihren eigenen Faktor XIII, während Faktor XIII auch in Plättchen vorhanden ist, die aus dem Plasma von reifen Megakaryozyten abgespalten werden⁹⁸.

Die Bildung der aktiven Form des Faktor XIII beginnt mit einer proteolytischen Abspaltung des Aktivierungspeptids von der Untereinheit A durch Thrombin, gefolgt von der Dissoziation der Untereinheiten A und B sowie der Freilegung des eigentlich versteckten aktiven Zentrums auf der Untereinheit A.

Dabei entsteht eine aktive Transglutaminase, welche Peptidketten durch epsilon-(gamma-glutamyl)-lysyl-isopeptid-Bindungen quervernetzt.

In Plättchen enthaltener Faktor XIII wird durch einen nicht-proteolytischen Prozess aktiviert. Wenn bei der Plättchenaktivierung das intrazelluläre Ca²⁺ ansteigt, nimmt das Pro-Zymogen in Abwesenheit von Untereinheit B eine aktive Konfiguration ein⁷⁸.

Faktor XIII im Plasma wirkt mit bei der Wundheilung, der Gewebestabilisierung und -reparatur⁶⁹; außerdem ist er notwendig, um eine Schwangerschaft aufrechtzuerhalten. Bei der Implantation des befruchteten Eies kommt es zu einer Quervernetzung der Fibrin(ogen)brücken zwischen Eizelle und Uteruswand⁹⁸.

Faktor XIII aus Plättchen könnte - sofern er an der Oberfläche der Plättchen exponiert würde - die Funktion des plasmatischen Faktor XIII unterstützen oder ggf. übernehmen; die Funktion und Bedeutung des im Plättchenstroma enthaltenen Faktor XIII ist letztlich noch nicht geklärt. Denkbar ist die Aufrechterhaltung des Faktor XIII-Spiegels im Blut/Plasma durch Plättchenmauserung in der Milz⁹⁸.

Sowohl das Genom als auch die primäre Proteinstruktur beider Unterheiten sind entschlüsselt worden⁹⁸; nach Untersuchungen von Yee, Le Trong, Bishop et al.¹²⁹ wurde durch Röntgen-Kristallographie die dreidimensionale Struktur der das aktive Zentrum tragenden Untereinheit A aufgedeckt, was wesentlich zum genaueren Verständnis seiner biochemischen Funktion beitrug¹⁶.

Das aus 14 Exons bestehende Gen für die Untereinheit A des Faktor XIII befindet sich auf

dem kurzen Arm des Chromosoms 6p24-25^{11,104}. Ihm fehlt interessanterweise eine für extrazelluläre Proteine typische Leader-Sequenz. Das Gen für die Untereinheit B ist auf dem langen Arm des Chromosoms 1q31-32.1 lokalisiert¹²⁷ und weist eine solche Leader-Sequenz auf¹⁰⁶.

Der Faktor XIII-Mangel und seine Therapie

Der Mangel an Faktor XIII kommt angeboren in homozygoter, doppelt heterozygoter und heterozygoter Form und bei einer Vielzahl von Erkrankungen als erworbene Störung vor. Der schwere Faktor XIII-Mangel mit Werten unter 10-30% der Norm kann zu einer hämorrhagischen Diathese führen^{21,52}.

Der seltene angeborene Faktor XIII-Mangel wurde erstmals von Duckert beschrieben, die homozygote Form wird nicht geschlechtsgebunden vererbt²¹. Er führt zu einem typischen klinischen Bild bei den betroffenen Patienten: Aborte, Nachblutungen aus dem Nabelschnurstumpf⁶, wiederholtes Nachbluten von Wunden und relativ häufig Blutungen im Zentralnervensystem.

Die Ursachen des erworbenen Faktor XIII-Mangels sind vielfältig; dies gilt sowohl für Störungen der Eiweißsynthese als auch für einen erhöhten Umsatz oder Verbrauch.

Einen erworbenen Faktor XIII-Mangel (Untereinheit A-Mangel) beobachten wir postoperativ, bei Lebererkrankungen, bei disseminierter intravaskulärer Coagulation (DIC), Morbus Henoch-Schönlein (MHS), bei Sepsis sowie bei Knochenmarks- und Tumorerkrankungen^{12,17,32,33,40,53}.

Bei der Entstehung von Blutungen unterscheidet man primäre und sekundäre Risikofaktoren. Die Blutungsneigung ist erhöht, wenn als primärer Risikofaktor ein angeborener genetischer Defekt vorliegt (Disposition) und eine Diapedeseblutung begünstigt, während sekundär für eine Blutung ein Trauma oder Mini-Trauma (Exposition) als Triggermechanismus notwendig ist.

Die prophylaktische Substitution von Faktor XIII zur Vermeidung von Blutungskomplikationen wie sie bei doppelt hetero- bzw. homozygoten Anlageträgern des Faktor XIII-Mangels vorkommt, erfolgt alle 4-6 Wochen^{29,39,44,61,62}.

Die Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität des Faktor XIII wurde die modifizierte vereinfachte radiologische Methode nach Loewy benutzt^{35,23,24,79}. Hierzu wurde uns von Loewy seine Laboranweisung überlassen, die in einer Modifikation nützlich angewandt werden konnte. Dabei erfolgt die Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität durch Messung der Einbaurate von radioaktiv markiertem Putrescin in Casein.

C₁₄-markiertes Putrescin wird in Gegenwart von aktiviertem Faktor XIII als Amidonator in Casein eingebaut.

Die Einbaurate pro Zeit, die proportional der Faktor XIII-Aktivität ist, kann mit einem Szintillationszähler gemessen werden. Durch Vergleich mit einer Normalplasma-Verdünnungsreihe (100%, 50%, 25%, 12,5% etc.) kann die Aktivität des Faktor XIII im Testansatz bestimmt werden.

Ziele der vorliegenden Arbeit

1. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Faktor XIII-Aktivität bei 4 gesunden Probanden und bei 6 Patienten mit kongenitalem Faktor XIII-Mangel (4 heterozygote, 1 homozygoter und 1 doppelt

heterozygoter Patient) in plättchenarmem (PPP) und plättchenreichem Plasma (PRP) zu ermitteln und die Ergebnisse auszuwerten.

Dabei soll versucht werden, den Plättchenfaktor XIII durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen aus den Thrombozyten in plättchenreichem sowie auch in plättchenarmem Plasma und in isolierten Thrombozyten freizusetzen und zu erfassen. Da wir auch das PPP fünf Mal eingefroren und aufgetaut haben, wird auch der Plättchenfaktor XIII aus den restlichen Thrombozyten im PPP freigesetzt und mit bestimmt. Hierfür wird in den Substraten die Plättchenzahl bestimmt und mit den gemessenen Faktor XIII-Aktivitäten verglichen. Bei früheren Bestimmungen des Faktor XIII in PRP/PPP/TZK hatten wir nur drei Mal eingefroren und aufgetaut, waren uns aber nie sicher, ob wirklich die gesamte Menge an Faktor XIII aus Thrombozyten zur Bestimmung freigesetzt wurde.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, haben wir die Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität mit der von Loewy und Dvilanski^{23,24} entwickelten und von uns modifizierten Inkorporationsmethode durchgeführt. Hierbei wurde der Einbau von C₁₄-markiertem Putrescin in Casein als Maß für die Faktor XIII-Aktivität erfaßt^{23,35}.

Die notwendigen Untersuchungen wurden von mir im hämatologischen Labor der Philipps-Universität Marburg und am Isotopen-Messplatz im dortigen Forschungsbereich 3 durchgeführt.

2. Wir wollten feststellen, ob bei der forcierten Plättchenfaktor XIII-Freisetzung durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen bei Patienten mit kongenitalem homozygotem Faktor XIII-Mangel in den Plättchen (PPP und PRP) wirklich keine Faktor XIII-Aktivität nachweisbar ist^{30,118,119}.

3. Wir haben untersucht, ob bei heterozygoten Patienten mit $50\% \pm 30\%$ Faktor XIII Aktivität im Plasma der Plättchenfaktor XIII ebenfalls in reduzierter Konzentration gefunden wird, denn die eine Hälfte der Plättchen dürfte bei Heterozygoten Faktor XIII-frei sein.

4. Wir haben geprüft, inwieweit mit einer regelmäßigen 4-wöchentlichen Dauer-Intervall-Substitution von Faktor XIII-Konzentrat bei Patienten mit homozygotem bzw. doppelt heterozygotem Faktor XIII-Mangel die Neigung zu Blutungskomplikationen vermindert werden kann oder ausbleibt und ob bei dreiwöchigen Intervallen weniger Faktor XIII substituiert werden kann.

5. Darüber hinaus haben wir erneut untersucht, ob bei Faktor XIII-Substitution die Plättchen der Faktor XIII-Mangel-Patienten Faktor XIII aufnehmen können.

2. Struktur des Faktor XIII

2.1. Die Biochemie des Faktor XIII

Der Faktor XIII ist das Zymogen eines Gerinnungsfaktors, der im Plasma und im Zellplasma vorkommt. Faktor XIIIa gehört zu einer Gruppe von Ca^{2+} -abhängigen Transglutaminasen, die man auch „Endo- γ -Glutaminase- ϵ -Lysin-Transferasen“ oder „Transglutaminasen“ nennt.

Faktor XIII ist sowohl für die Gerinnung als auch für die Fibrinolyse notwendig.

Das Enzym bewirkt die Fibrinstabilisierung und schützt das Gerinnungsprodukt vor der vorzeitigen Auflösung (Fibrinolyse).

Faktor XIII spielt auch eine generelle, bisher noch nicht zweifelsfrei geklärte Rolle bei verschiedenen Prozessen der Zellproliferation und besonders bei der Wundheilung und Gewebereparation, beim Tumorwachstum und bei der -metastasierung sowie bei der Entstehung der Arteriosklerose, Koronärer Herzkrankheit, cerebrovaskulären Erkrankungen und tiefer Beinvenenthrombose¹¹⁸.

Das Zymogen existiert in zwei Formen, von denen die eine in den Plättchen als Dimer zweier identischer A-Untereinheiten (A₂) gefunden wurde⁶⁸. Das extrazelluläre Zymogen wird nur im Plasma gefunden. Es besteht aus zwei A- und zwei B-Untereinheiten (A₂B₂), die durch nichtkovalente Bindungen verknüpft sind.

Plättchen-Faktor XIII besteht dagegen nur aus Dimeren der Untereinheit A⁶⁸.

Die Untereinheit A (Faktor XIII-A) besteht aus 731 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 83150 Da und zwei Thrombinbindungsstellen. Die erste, die an Position Arginin₃₇-Lysin₃₈ lokalisiert ist, führt über die Abspaltung eines Peptides zum kaskadenartigen Prozess der Aktivierung des Faktor XIII unter physiologischen Bedingungen. Durch Spaltung an der zweiten Thrombinbindungsstelle wird das Enzym inaktiviert. Im aktiven Zentrum der Untereinheit A befindet sich die Aminosäure Cystein₃₁₄³⁸. Coggan, Miloszweski, McDonagh und Schwartz u.a. haben über die Aminosäuresequenz der Untereinheit A wiederholt seit 1971 berichtet^{18,88,119}.

Die Untereinheit B (Faktor XIII-B) besteht aus 641 Aminosäuren¹⁰⁹ und hat ein Molekulargewicht von 73180 Da. Sie zirkuliert im Plasma und enthält

kein aktives Zentrum. Ihr kommt keine spezifische Funktion bei der Fibrinstabilisierung zu, vielmehr erfüllt sie eine Trägerfunktion für die das aktive Zentrum tragende Untereinheit A⁶⁵. Es soll eine positive Korrelation zwischen der Untereinheit B des Faktor XIII und der Insulinresistenz bestehen⁹⁴. Eine genetisch differente Variante der Untereinheit A (Val₃₄-Leu) soll eine protektive Funktion haben und junge Frauen vor tiefen Beinvenenthrombosen¹⁶, Myokardinfarkten und Hirninfarkten schützen^{3,103,114,87}.

Darüber hinaus wird eine stabilisierende Wirkung der Untereinheit B diskutiert; sie schützt anscheinend die Untereinheit A vor einer vorzeitigen Proteolyse⁵⁹.

2.1.1. Die Aktivierung des Faktor XIII

Die Aktivierung von Faktor XIII zu Faktor XIIIa ist eine Reaktion die in mehreren Schritten und unter Beteiligung von Thrombin, Kalzium und Fibrin^{64,96} abläuft und zur Exposition des aktiven Zentrums Cystein₃₁₄ führt^{19,78}. Die Aktivierung kann neben Thrombin auch durch andere Proteasen (z. B. Cathepsin C, Carboxypeptidase oder endogenous platelet acid protease) eingeleitet werden^{70,86}. Faktor XIII benötigt zweiwertige Metallionen (Ca²⁺)

zur Ausbildung der Enzymaktivität. Bei der Aktivierung von Faktor XIII wird ein Aktivierungspeptid von Thrombin aus dem n-terminalen Ende der Faktor XIII-A-Untereinheit abgespalten, wobei in Anwesenheit von Ca^{2+} die Faktor XIII-B-Untereinheit dissoziiert und Faktor XIII-A eine enzymatisch aktive Konfiguration einnimmt⁶⁶.

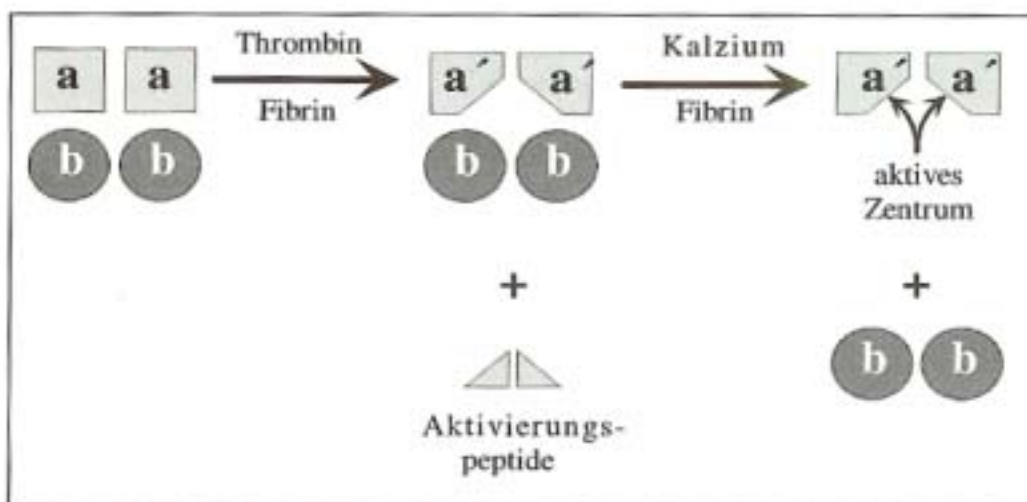


Abbildung 1: Aktivierung des Faktor XIII

Faktor XIIIa verursacht eine (Isopeptid-) Bindung zwischen der γ -Carbonylgruppe von peptidgebundenem Glutamin und der ϵ -Aminogruppe von Lysin. Durch diesen Mechanismus werden zwei Polypeptide kovalent aneinander gebunden. Faktor XIIIa katalysiert so die Übertragung einer Alkylgruppe, bei der die Carboxamidgruppe eines

peptidgebundenen Glutaminrestes als Alkylgruppendonor und ein entsprechendes primäres Amin als Alkylgruppenakzeptor fungiert^{82,98}.

Im ersten Teilschritt dieser modifizierten Verdrängungsreaktion geht der Glutaminrest mit dem aktiven Zentrum Cystein eine Thioesterbindung ein und Ammonium wird freigesetzt. Im zweiten Teilschritt wird die Alkylgruppe auf den Akzeptor, das primäre Amin, übertragen, wobei es mit einer Isopeptidbindung mit der γ -Carboxylgruppe eines Glutaminrestes verbunden wird. Diese γ -Dimerisierung ist ein rasch ablaufender Prozess, der innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist¹¹¹. Darauf folgt eine langsamer ablaufende α -Polymerisierung, die einige Stunden benötigt und die Stabilität und die Elastizität des Gerinnsels erhöht.

Beide Prozesse hängen quantitativ von der Menge des verfügbaren Faktor XIIIa ab, wie bereits McKee⁸⁹, Rasche¹¹⁰ und später Francis⁴⁸ durch Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblotting von Gerinnseln in vitro zeigten. Wie Rasche 1975 zeigte, kommt es erst ab einer Faktor XIII - Konzentration von >30% der Norm zu einer α -Kettenpolymerisierung, darunter - ebenfalls konzentrationsabhängig - nur zu einer γ -Dimerisierung^{112,113}.

Gerinnsel, die nicht ausreichend stabilisiert sind, neigen leichter zur Auflösung durch proteolytische Enzyme wie Plasmin und Elastase sowie *in vitro* durch Harnstoffoxalat und Monochloressigsäure⁴⁸.

Es gibt eine Reihe von Substraten, für die die kovalente Verknüpfung durch Faktor XIIIa eine physiologische oder pathophysiologische Bedeutung haben kann (Tabelle 1). Diese Proteine haben viele Merkmale gemeinsam. Die meisten von ihnen sind große komplexe Proteine, die sowohl im Blut als auch in Thrombozyten vorkommen. Manche dieser Proteine tragen zur Stabilität von Zellmembranen bei und sind Bestandteil der extrazellulären Matrix in terminal differenzierten Geweben⁸³, einige Proteine kommen auch in Monozyten vor. Sie alle beteiligen sich an der Aggregation eines makromolekularen Proteinkomplexes auf einer Oberfläche, wobei die Oberfläche ein Thrombozyt, eine andere Zellmembran, Fibrinpolymere oder Subendothelium sein können. Eine wichtige Konsequenz aus der Vernetzungsreaktion ist, dass das Gleichgewicht in Richtung der Komplexbildung verschoben wird und daher die lokale Konzentration eines vernetzten Proteins hoch ist.

- Fibrin - Fibrin
- Fibrin - Fibrinogen
- Fibrin - α_2 -Plasmin-Inhibitor
- Fibrin - Fibronectin
- Fibronectin - Kollagen
- Fibrin - Von Willebrand Faktor
- Faktor V - Aktin
- Fibrin - Aktin
- Von Willebrand Faktor - Kollagen
- Fibronectin - Myosin
- Aktin - Myosin

Tabelle 1: Substrate für die Vernetzung durch Faktor XIIIa

Die Vernetzung von Fibrin und anderer Proteine an Fibrin, besonders α_2 -Plasmin-Inhibitor⁷, bietet direkte Kontrolle über die Prozesse der Hämostase und der Fibrinolyse. Zusätzlich zu der abnormen Wundheilung, die bei einigen Patienten mit Faktor XIII-Mangel beobachtet wurde, fand man heraus, dass die Proliferation von Fibroblasten in Gewebekulturen in geronnenem Faktor XIII-Mangel-Plasma gegenüber normalem Plasma verzögert ist⁹⁰. Experimente haben gezeigt, dass die Vernetzung von Fibrin notwendig ist, um es in eine günstige Matrix für Fibroblastenproliferation umzuwandeln.

Die Vernetzung von α -Ketten erhöht die Fibroblasten- und erniedrigt die Makrophagen-Migration. Erhöhte Proliferation oder Befestigung von Fibroblasten wurden von Gewebekulturen berichtet, wenn sie auf einer Matrix von vernetztem Fibrin kultiviert wurden. Faktor XIII-Aktivität ermöglicht die Kontrolle über den Prozess der Wundheilung¹¹⁷. Nach großen operativen Eingriffen ist der Plasmafaktor XIII-Spiegel häufig erniedrigt; das Minimum wurde beobachtet, wenn erhöhtes Fibroblastenwachstum seinen Höhepunkt erreichte^{52,53}. Ferner erhöht eine Infusion von Faktor XIII-Konzentrat bei Patienten die Stabilität chirurgischer Wunden, es erhöht die mechanische Resistenz und beschleunigt den Wundheilungsprozess.

2.2. Die Physiologie des Faktor XIII

Faktor XIII ist im menschlichen Körper weit verbreitet. Findet man die Untereinheit A auch in anderen Zellarten (Prostata, Uterus, Plazenta, Endothelzellen, Monozyten, Megakaryozyten), so gelang der Nachweis der Untereinheit B bislang nur in Hepatozyten.

Extrazellulär kommt Faktor XIII ausschließlich im Plasma vor. Hier findet sich Faktor XIII als ein heterotetramerer Komplex aus je 2 A- und 2 B-Untereinheiten (A₂B₂), der als solcher (ohne Aktivierung) keine enzymatische Aktivität aufweist.

Intrazellulär (A₂) kann Faktor XIII als Homodimer im Knochenmark, Monozyten und Megakaryozyten und in deren plasmatischen Abspaltprodukten - Plättchen - nachgewiesen werden, nicht jedoch in Granulozyten, Lymphozyten oder Erythrozyten⁴.

Seine Hauptaufgaben sind die mechanische und chemische Stabilisierung von Fibringerinnseln durch die Knüpfung kovalenter Bindungen des Fibrins untereinander und des Fibrins mit anderen Proteinen des Gerinnsels sowie der Schutz des Gerinnsels vor dem fibrinolytischen System.

Es existieren darüber hinaus noch weitere wichtige physiologische Substrate für den Faktor XIII (Tabelle 1): α_2 -Antiplasmin wird in einer Reaktion, die ähnlich schnell wie die γ -Dimerisierung des Fibrins abläuft, quervernetzt und schützt somit die Gerinnsel vor der unmittelbaren Auflösung durch Plasmin. Dies wird vor allem durch kovalente Bindung von α_2 -Antiplasmin, dem hochpotenten physiologischen Inhibitor von Plasmin, an Fibrin erreicht.

Theoretisch wäre denkbar, dass in Zellen oder Zellprodukten befindlicher Faktor XIII sowohl im Plättchenstroma als auch auf der Zelloberfläche exprimiert oder im Interstitium aktiv sein kann. Dahingehende Experimente haben gezeigt, dass mono-/megakaryozytärer Faktor XIII die extravaskuläre Fibrinstabilisierung^{2,100} und die phagozytäre Aktivität von Monozyten beeinflusst⁹⁷. Die Inaktivierung des Faktor XIII erfolgt durch proteolytische Spaltung durch Thrombin ($\text{Lys}_{513}\text{-Ser}_{514}$).

<u>Hämatopoetische Zellreihe</u> <ul style="list-style-type: none">• Monozyten• Makrophagen• Megakaryozyten• Thrombozyten
<u>Extrahämatopoetische Zellen</u> <ul style="list-style-type: none">• von Kupffersche Sternzellen• Bindegewebshistiozyten• Hepatozyten (nur im Bereich der V. centralis)• Plazenta- und Uterusgewebe

Tabelle 2: Zusammenstellung der Zellen, die die Untereinheit A des Faktor XIII enthalten bzw. synthetisieren

2.3. Die Pathophysiologie des Faktor XIII

Faktor XIII ist notwendig zur Aufrechterhaltung der Blutgerinnung und hierbei insbesondere der Fibrinstabilisierung^{9,83}.

Ausgeprägte Verminderungen der Faktor XIII-Aktivität führen zu einer hämorrhagischen Diathese. Der schwere kongenitale homozygote Faktor XIII-Mangel führt über eine fehlende Vernetzung der α -Ketten des Fibrins zu einer quantitativen Störung der Fibrinstabilisierung. Bei sehr niedriger Faktor XIII-Aktivität (< 30%) werden auch die γ -Ketten nicht mehr vernetzt. Gerinnsel, die nicht ausreichend vernetzt sind, werden leichter durch proteolytische Enzyme wie Plasmin und Elastase, sowie in vitro durch Harnstoffoxalat und Monochloressigsäure aufgelöst⁴⁸.

Bei Mangelzuständen an Faktor XIII können Gerinnsel deswegen leichter durch proteolytische Enzyme abgebaut werden, weil der durch Faktor XIII katalysierte Einbau des fibrinolyse-spezifischen Inhibitors α_2 -Antiplasmin in das Gerinnsel fehlt¹¹⁶.

Wie bereits früher erwähnt, wird zwischen angeborenem und erworbenem Faktor XIII-Mangel unterschieden.

Der angeborene Faktor XIII-Mangel ist mit einer geschätzten Prävalenz von 1:1000.000 bis 1:5000.000 im Vergleich zu den klassischen Hämophilien sehr selten.

Dabei handelt es sich überwiegend um einen sowohl die Zellen als auch das Plasma betreffenden Mangel an der aktiven Untereinheit A.

Im noch selteneren Falle eines Mangels an Untereinheit B fehlt das zum Transport und zur Stabilisierung der Untereinheit A notwendige Protein. Dies führt ebenfalls zu einer Verminderung der Faktor XIII-Aktivität im Plasma, wobei in den Plättchen normale Faktor XIII-Konzentrationen gemessen werden können¹⁵.

Kürzlich wurde über eine Untereinheit A des Faktor XIII berichtet, die einen Aminosäureaustausch ($\text{Val}_{34} \rightarrow \text{Leu}_{34}$) auf der Position 34 des Aktivierungspeptids aufwies. Diese Molekülvariante schützt die Träger offenbar vor arterieller Verschlusskrankheit^{43,74,126,73}.

Eine beeinträchtigte Ausbildung der Tertiärstruktur oder Konformationsänderungen der veränderten Untereinheiten A und/oder B führen zu sowohl intra- als auch extrazellulärer Instabilität, die für den Faktor XIII-Mangel verantwortlich ist.

Patienten mit angeborenem homozygotem Faktor XIII-Mangel zeigen sehr oft ernsthafte Blutungskomplikationen und benötigen oft eine lebenslange Intervall-Substitution von Faktor XIII³⁰.

2.4. Die Klinische Bedeutung des angeborenen Faktor XIII-Mangels

Homozygote Anlageträger eines kongenitalen Faktor XIII Mangels weisen im Plasma lediglich eine Transglutaminaseaktivität von $4\% \pm 3\%$ im Vergleich zur normalen Aktivität auf⁴⁴. Bei diesen Patienten spricht man auch von totalem Faktor XIII Mangel, und es bestehen lebenslang Blutungskomplikationen.

Die Patienten leiden bereits perinatal unter Nabelstumpfblutungen⁶ sowie rezidivierenden Blutungen bei Verletzungen und stumpfen Traumata. Die gefährlichste - wenngleich nicht die häufigste - dieser Komplikationen ist die intrakranielle Blutung⁹⁵. Pathognomonisch und besonders risikoreich ist dabei das blutungsfreie Intervall von 12-36 h nach dem Trauma.

Bei Frauen können intraabdominelle Blutungen nach dem Eisprung aus dem Ovar auftreten¹¹⁵. Ferner besteht bei Frauen eine Neigung zu Spontanaborten

sowie uterinen postpartalen Blutungen. Unter Faktor XIII-Substitution verlaufen Schwangerschaften und Geburten aber normal⁴⁷.

Lange Zeit ging man davon aus, dass bereits sehr niedrige Konzentrationen an Faktor XIII ausreichen, um eine zufrieden stellende Gerinnung zu erreichen.

Oftmals wird eine Blutungsneigung bei Heterozygoten, deren Aktivitätsniveau im unteren Anteil des normalen Streubereiches ($50 \pm 30\%$) liegt, erst dann symptomatisch, wenn Triggermechanismen durch sekundäre Risikofaktoren vorliegen, wie z. B. Traumata, Operationen, Geburten oder Aborte.

Eine individuelle prophylaktische Behandlung mit Faktor XIII-Konzentrat sollte deshalb bei Patienten mit heterozygotem Faktor XIII-Mangel und Blutungsneigung vor schweren Operationen und bei Auftreten von Blutungskomplikationen im Einzelfall erwogen werden, um eine ausreichende Faktor XIII Aktivität zu erreichen.

Bei mischerbigen ist eine Substitution nur bei akuten traumatischen Blutungsepisoden erforderlich.

In den 60er Jahren wurde angenommen, dass heterozygote Anlageträger eines Faktor XIII-

Mangels keine Blutungsneigung aufweisen, obwohl sie teilweise sehr niedrige Aktivitätsspiegel haben (< 20% der Norm)^{21,70}.

Dagegen wurde im Jahre 1988 erstmalig über 34 heterozygote Patienten berichtet, die eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Blutungsneigung aufwiesen³⁷. Einige Patienten bluteten nach Operationen oder kleinen Traumata, einzelne hatten hingegen eine starke Blutungsneigung, die der von homozygoten ähnelte. Auch mischerbige hatten wie homozygote Patienten eine erhöhte Anzahl von Aborten und erhöhte Neigung zu Blutungen nach Aborten und Geburten. Auffällig war hingegen, dass es auch Patienten gab, die trotz niedrigster Faktor XIII-Aktivität keinerlei Blutungskomplikationen aufwiesen^{37,44}.

Es muss demnach im Gegensatz zur allgemein vorherrschenden Lehrmeinung der 60er und 70er Jahre angenommen werden, dass Patienten mit einer heterozygoten Anlage eine bisher nicht zweifelsfrei herleitbare Blutungsneigung besitzen. Wahrscheinlich bluten heterozygote Anlageträger, wenn ihre Faktor XIII-Aktivität unter 30% der Norm liegt und nur eine γ -Dimerisierung erfolgt ist. Bei diesen niedrigen Spiegeln der Untereinheit A des Faktor XIII fehlt die α -Ketten-Vernetzung und der Einbau von α_2 -Antiplasmin bei der

Gerinnselbildung⁹². Beide Faktoren sind für die Blutungsneigung bei diesen Patienten verantwortlich.

Andere Autoren^{29,31,55} berichten über kongenitales oder sekundäres Auftreten von Faktor XIII-Hemmkörpern, die zur Immunglobulinklasse IgG gehören^{81,84,111a}, meist ausgelöst durch Medikamente, z. B. nach Gabe von Isoniazid^{32,75,76,77}, Procainamid^{49,51} und Penicillin^{80,84}.

Allen gemeinsam ist eine ausbleibende Fibrinvernetzung und ein unzureichender Einbau von α_2 -Antiplasmin in das Gerinnsel, was zu schweren - in einigen Fällen tödlichen - intrazerebralen Blutungen geführt hat³².

2.5. Die Diagnostik des Faktor XIII-Mangels

Eine Verminderung des Faktor XIII im Plasma lässt sich nicht mit den herkömmlichen globalen Gerinnungstests nachweisen, da seine Wirkung erst nach Ablauf der „normalen“ Gerinnung beginnt. Seine Funktion, nämlich die Stabilisierung der Gerinnsel, ist deshalb nicht über die Bestimmung von Gerinnungszeiten zu erfassen.

Es sind jedoch andere Verfahren entwickelt worden, mit deren Hilfe die Wirkung von Faktor XIII auch quantitativ ermittelt werden kann. Diese beruhen auf verschiedenen Prinzipien⁴⁰:

- a) Prüfung der mechanischen Stabilität und Festigkeit der Gerinnsel: Blutgerinnsel, bei denen die Quervernetzung durch Faktor XIII nicht stattgefunden hat, sind in Monochloressigsäure oder Harnstoffoxalat löslich (clot-solubility-test). Andere Testverfahren (z. B. Thrombelastographie) bedienen sich der direkten Messung der Festigkeit des Gerinnsels.
- b) Einbau von mit Radioaktivität oder Fluoreszenz markierten Substraten in geeignete,

immobilisierte Empfängermoleküle: Seit Anfang der 70er Jahre wurden markierte Substrate (z. B. Putrescin, Mono-dansyl-cadaverin) unter Faktor XIII-Beteiligung in ein geeignetes Empfängermolekül (z. B. Casein) eingebaut und über die Messung der Emissionen (radioaktive/fluoreszierende Markierung) indirekt quantitative Rückschlüsse auf die Faktor XIII-Aktivität gezogen. Diese Methoden sind mit einem erheblichen organisatorischen, methodischen und personellen Aufwand verbunden und werden deshalb lediglich in spezialisierten Forschungslabors durchgeführt^{79,22,23,24}.

- c) Messung des bei der Quervernetzung von Fibrin freigesetzten Ammoniaks (NH_3): Die zu untersuchende Citratplasmaprobe wird in Gegenwart von Ca^{2+} mit Thrombin versetzt, um den in der Probe enthaltenen Faktor XIII zu aktivieren, während die Fibrinpolymerisierung durch einen niedermolekularen Inhibitor unterdrückt wird⁴⁶. Zwei synthetische Substrate für den aktivierten Faktor XIII setzen bei der katalysierten Reaktion Ammoniak frei¹²⁸, der in einer Nachweisreaktion unter NADH-Verbrauch in α -Ketoglutarat eingebaut wird. In der linearen Phase (ab ca. 5 Minuten nach Reaktionsbeginn) ist die Abnahme der NADH-

Extinktion bei 340 nm proportional der FXIII-Aktivität der Probe.

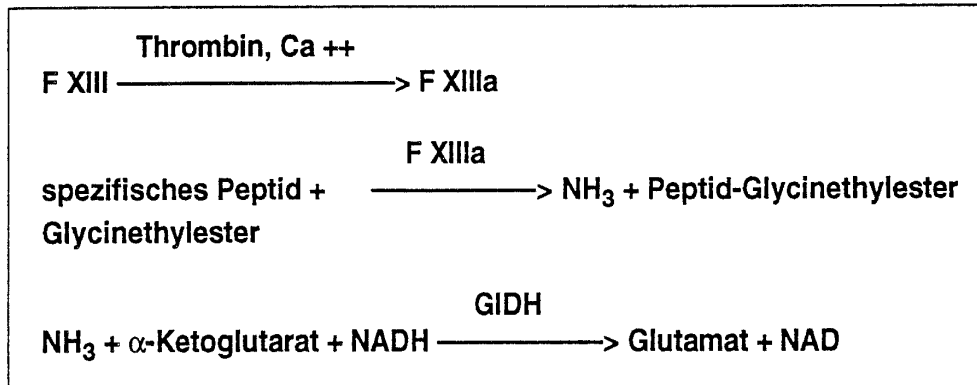


Abbildung 4: Prinzip des meistverwendeten FXIII-Tests (z. B. Berichrom[®] F XIII)

Nachweisgrenzen: Der lineare Messbereich dieser Methode liegt nach Angaben des Herstellers^{7A} bei FXIII-Aktivitäten von 2% bis 150%.

Störfaktoren: Bei hohen Ammoniak- bzw. Ammoniumkonzentrationen (> 0,5 mM) in den Proben kann es zur Unterschätzung des FXIII-Gehaltes kommen. Ggf. kann durch Messung des Ammoniak-/Ammoniumgehaltes, Verdünnung der Probe mit phys. Kochsalzlösung, anschließende erneute Messung der FXIII-Aktivität und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor aber auch in diesen Fällen ein verlässliches Ergebnis erhalten werden.

Dieser Test (z. B. Berichrom[®] F XIII) ist zurzeit die am häufigsten genutzte

Routinemethode, durch die auch die vollautomatisierte Faktor XIII-Bestimmung im Routinelaboratorium durchführbar geworden ist^{45,46}.

- d) Ein neuer one-step-ELISA wurde für die Bestimmung der Untereinheit A des Faktor XIII im Plasma und in Thrombozytenlysaten entwickelt⁶⁷. Hierbei werden für den Essay monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope auf Faktor XIII-A benutzt. Weder durch die Komplexbildung mit Faktor XIII-B noch durch die Assoziation mit Fibrinogen wird die Erreichbarkeit der Untereinheit A durch die Antikörper hierbei nennenswert beeinflusst.
- e) Ebenfalls geeignet für die Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität ist ein Test (Pefakit[®] FXIII) der Schweizer Firma Pentapharm[®], Basel, der von 250% bis unter 5% der normalen Aktivität verlässliche Ergebnisse liefert. Dieser Test basiert auf dem Einbau eines Aminosubstrates (5-Biotinamidopentamin (BAPA)) in gebundenes Fibrinogen durch aktivierten Faktor XIII. Inkorporiertes BAPA wird mit einem Streptavidin-Enzym und einem chromogenen Substrat verknüpft¹⁰⁸.

2.6. Die Therapie des Faktor XIII-Mangels

Faktor XIII-Aktivitäten von 50% sind anscheinend ausreichend¹⁴, weil die γ -Kettenvernetzung abgeschlossen ist und die Gerinnsel teilweise schon α -Ketten-quervernetzt sind. Nach Francis sind die α -Ketten bei 200-500% Faktor XIII-Aktivität hochgradig quervernetzt. Im Blut könnten höhere Faktor XIII-Spiegel nur vorliegen, wenn der Thrombozytenfaktor XIII bei der Fibrinstabilisierung mitwirkt.

Blutungskomplikationen bei heterozygoten Patienten sind selten lebensbedrohlich. Eine Substitution mit humanem Faktor XIII-Konzentrat ist manchmal vor Operationen, nach der Entbindung oder nach schweren Traumata auch bei mischerbigen Anlageträgern notwendig, um Blutungskomplikationen zu verhindern¹⁴.

Abhängig vom Aktivitätsniveau des Faktor XIII und der klinischen Symptomatik ist bei homozygoten bzw. bei doppelt heterozygoten Patienten eine unter Umständen lebenslange Substitutionstherapie mit Faktor XIII-Konzentraten - auch und gerade während der Schwangerschaft - notwendig¹²⁵.

Vereinzelt ist es auch ausreichend, eine intermittierende Substitution bei Blutungsepisoden

und im Zusammenhang mit Operationen durchzuführen^{32,114}.

Zur Substitutionstherapie bei kongenitalem totalem Faktor XIII-Mangel wird in Deutschland humaner Faktor XIII (Fibrogammin®; enthält Plazenta-FXIII oder Plasma-FXIII) verwendet, der bei kongenitalem Mangel alle 4-6 Wochen zur Prophylaxe von Blutungen in Dosen von ca. 30 IE/kg KG i.v. appliziert wird. Falls trotzdem Spontanblutungen auftreten, kann das Intervall auch verkürzt werden. Vor operativen Eingriffen oder bei schweren Blutungen kann die Dosis bis auf 35 IE/kg KG erhöht werden. Dabei wird der Aktivitätsanstieg mit einer Faktor XIII-Bestimmung (z. B. Berichrom® F XIII) überwacht.

Die langfristige Dauer-Intervall-Substitutions-Prophylaxe erfordert Substitutionsintervalle von etwa drei bis zu sechs Wochen, denn die Halbwertszeit von Faktor XIII im Blut beträgt nur neun Tage. Die kurzfristige Anhebung des Faktor XIII-Spiegels bei Wundheilungsstörungen oder vor geplanten operativen Eingriffen kann mit Kurzinfusionen innerhalb von drei Tagen erfolgen¹⁷.

Tabelle 3 zeigt Erkrankungen⁴⁰, die mit dem erworbenen Mangel an Faktor XIII zusammenhängen. Als Ursache dieser Faktor XIII-Verminderungen kommen sowohl Synthesestörungen, z.B. infolge

eines Aminosäureaustausches (Leu₃₅₄→Pro₃₅₄)⁵ oder bei Lebererkrankungen, als auch ein (passager) erhöhter Umsatz in Frage, so z. B. bei Verlust- oder Verdünnungskoagulopathie, „spezifischem“ Verbrauch (Gerinnungsvorgänge, postoperative Phase) oder „unspezifischem“ Verbrauch (proteolytischer Abbau) oder beim sehr seltenen Vorkommen von Faktor XIII-Hemmkörpern.

In der folgenden Tabelle beziehe ich mich auf die Ergebnisse von Nussbaum und Morse¹⁰² (später fortgeführt durch Egbring, Kailing, Kehl, Seitz, Havemann, Klingemann und Gramse u.a.)^{27,28,54}, die seit den 70er Jahren Erkrankungen zusammengestellt haben, die auf einen engen Zusammenhang von erniedrigten Faktor XIII-Spiegeln mit einer Reihe von Erkrankungen hinweisen. Da die Pathophysiologie der Gerinnungsdefekte z.T. komplex ist, können bei Bedarf neben Faktor XIII-Konzentrat noch weitere Plasmaderivate, z. B. fresh frozen plasma (FFP) verwendet werden^{27,28}.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Blutungskomplikationen bei Leberzirrhose^{25,102} • Akute und chronische Hepatitis^{8,41} • postoperative Phase und
Wundheilungsstörungen^{20,52,124} • Verbrennungen, schwere Traumata¹³ • DIC^{4,122} |
|--|

- schwere Infektionen, z. B. Malaria u. Sepsis^{26,33,102,120,11}
- Malignome, insbesondere akute Leukämien^{12,42}
- chronisch-entzündliche Darmerkrankungen^{66,85,105,107,113,121,123}
- Morbus Henoch-Schoenlein^{32,36,50,56,57,58}
- Hemmkörper gegen Faktor XIII³¹
- Atherosklerosis obliterans⁷²
- Erosive Gastritis¹⁰²
- diabetische Angiopathie⁷¹
- Sichelzellanämie⁶³
- Kollagenosen²⁷
- medikamenten-/drogenassoziiert⁸⁵

Tabelle 3: Krankheiten, bei denen ein erworbener Faktor XIII-Aktivitätsmangel nachgewiesen werden kann

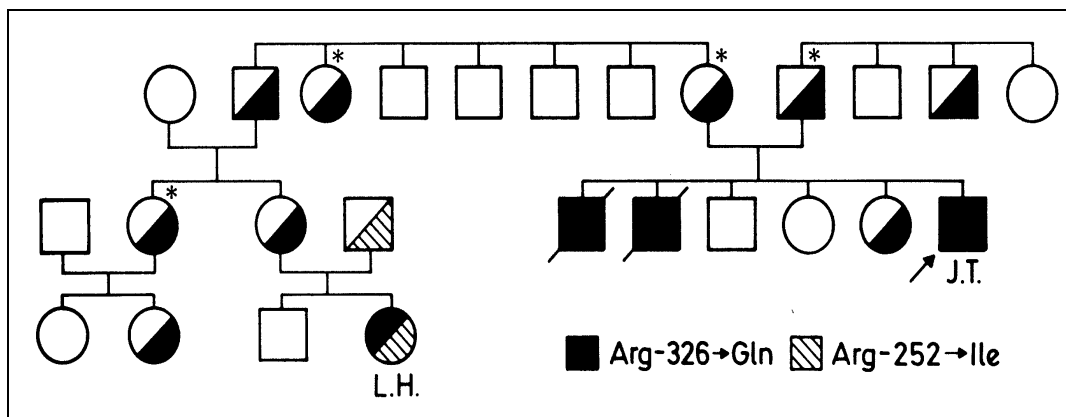
3. Probanden, Material und Methoden

3.1. Die Probanden

Für unsere Untersuchungen wurden Blutproben eines in der Universitäts-Kinderklinik Marburg seit 1970 bekannten Patienten (J.T.) mit homozygotem Mangel an Faktor XIII verwendet. Wie Mikkola (Finnland) herausfand, hat dieser Patient einen Defekt bei Aminosäure 326: Arg326Glu^{91,93}. Er kann kein Untereinheit A-Protein synthetisieren³⁴. Bei ihm besteht eine lebenslange Blutungsneigung^{39,29}.

Im Jahre 1988 wurde eine Cousine von J.T. von einem Mädchen (L.H.) entbunden, das ebenfalls eine starke Nabelschnurstumpfb Blutung hatte. Auch bei ihr fand man eine totale Verminderung der Untereinheit A und der Faktor XIII-Aktivität, wenngleich sie - wie die gentechnische Untersuchung ergeben hat - nicht homozygot, sondern doppelt heterozygot ist. Der vom Vater übertragene Defekt besteht bei der Aminosäure 252, bei der Arginin durch Isoleuzin ersetzt ist. Von ihrer Mutter hat L.H. eine Mutation geerbt, bei der ebenfalls die Aminosäure 326 Arginin durch Glutamin substituiert ist (siehe Abbildung 3).

Wegen ihres Faktor XIII-Mangels werden beide Patienten, J.T. seit 1971 und L.H. seit 1989, alle 4 Wochen mit Faktor XIII-Konzentraten behandelt. Bis 1993 erhielten beide Patienten Plazentafaktor XIII, danach wurde die Behandlung mit einem humanen Plasmakonzentrat weitergeführt.



* Blutungsneigung bei heterozygoten Anlageträgern.

Abbildung 3: Vererbungsschema: Die Familie von J.T. weist die Variante Arg-326→Gln auf, die Familie von L.H. daneben noch die Variante Arg-252→Ile.

Darüber hinaus bestimmten wir die Faktor XIII-Aktivität in Blutproben von 4 weiteren, heterozygoten Patienten. Drei dieser heterozygoten Patienten (U.J., M.J., S.J.) entstammen einer Familie, über die bisher noch nicht berichtet

wurde und bei der bisher keine gentechnische Untersuchung stattgefunden hat.

Als Kontrollgruppe konnten wir 4 Probanden mit normaler Faktor XIII-Aktivität (R.S., R.E., A.D., A.I.) gewinnen.

<p><u>Homozygoter/doppelt heterozygoter F XIII-Mangel</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • L.H. • J.T.
<p><u>Heterozygoter Mangel an Faktor XIII</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • H.S. (mit Blutungsneigung; Schwester der Mutter von J.T.) • U.J. (mit gelegentlicher Blutungsneigung) • M.J. (ohne Blutungsneigung) • S.J. (ohne Blutungsneigung)
<p><u>Normale Werte für Faktor XIII-Aktivität</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • R.S. • R.E. • A.D. • A.I.

Tabelle 4: Auflistung der Probanden

3.2. Material, Reagenzien und Geräte

3.2.1. Für die radiologische Methode der Bestimmung der Aktivität des Faktor XIII:

1. Casein (vitaminfrei), gelöst in 0,3 M Trispuffer (pH 7,5), Konzentration: 10 mg/ml; Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, Präparat Nr. 55346
2. 150 Nec Putrescin-1,4-C₁₄-dihydrochlorid, spezifische Aktivität 107,1 mCi/mM, Konzentration: 0,38 mg in 2,5 ml; NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain
3. 2-Mercaptoäthanol zur Synthese, Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Art.Nr. 805740
4. Thrombin, „Test-Thrombin 30 IU/ml vom Rind“, Behringwerke, Marburg
5. Zellulosefilterschichten, aschefrei, Fabrikat Nr. 5989, Durchmesser 2,3 cm, Schleicher & Schüll, Dassel/Kr. Einbeck
6. CaCl₂, 0,1 M
7. Trichloressigsäure, 10%ig und 5%ig
8. isotone NaCl-Lösung
9. Aqua dest.
10. Äthanol-Eisessig-NaOH-Waschlösung, in folgender Zusammensetzung: 1200 ml Äthanol, 30 ml Eisessig und 5 ml 10%ige NaOH-Lösung

11. Szintillationsflüssigkeit, 2,5 l Toluol, Riedel de Haen AG, Seelze + 10 g Omnifluor, NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain, Kat.Nr. NEF 906
12. Trispuffer, 0,3 M, pH 7,5
13. Plasmaprobe, Citratplasma, 3 Minuten bei 53 °C hitzedefibriniert
14. Standardplasma, zu gleichen Teilen gepooltes Citratplasma von 6 gesunden Personen der Kontrollgruppe, 3 Minuten bei 53 °C hitzedefibriniert
15. Szintillationszähler, Packard Tri Carb, Liquid Scintillation Spectrometer

3.2.2. Für die Herstellung der Thrombozytenkonzentrate:

1. Gaintner Puffer (Gaintner et al., 1962)

	A	B
Natriumchlorid	12,04 g	10,4 g
Natriumdihydrogensulfat	11,04 g	11,04 g
Kaliumdihydrogensulfat	1,28 g	1,28 g
Glucose-Monohydrat	1,8 g	1,8 g
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	7,6 g	15,17 g

Gaintner I Konzentriert (pH 6,4; 10 x konz.):

Die unter Spalte A angegebenen Mengen werden abgewogen und mit bidest. Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Ein pH von 6,4 wird mit 2 M NaOH eingestellt.

Gaintner II Original (pH 6,4):

Die unter Spalte A angegebenen Mengen werden abgewogen und mit bidest. Wasser auf 2000 ml aufgefüllt. Ein pH von 6,4 wird mit 2 M NaOH eingestellt.

Gaintner III Waschpuffer (pH 6,4):

Die unter Spalte B angegebenen Mengen werden abgewogen und mit bidest. Wasser auf 2000 ml

aufgefüllt. Ein pH von 6,4 wird mit 2 M NaOH eingestellt.

2. Tyrode Puffer (Vickers et al., 1982)

Natriumchlorid	8,0 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Natriumhydrogencarbonat	1,0 g
Natriumdihydrogenphosphat- Dihydrat	0,05 g
Glucose-Monohydrat	1,0 g

Die angegebenen Mengen werden abgewogen und mit bidest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Ein pH von 7,35 wird mit 2 M NaOH eingestellt.

3.3. Methoden

3.3.1. Versuchssystematik

Bei den Probanden führen wir eine venöse Blutentnahme durch und stellen dann durch Zentrifugation und andere geeignete Trennverfahren von jedem Probanden

- plättchenreiches Plasma
- plättchenarmes Plasma und
- Thrombozytenkonzentrat her.

Die so hergestellten Plasmen (PRP und PPP) und die Thrombozytenkonzentrate (TZK) werden frisch auf ihre Faktor XIII-Aktivität untersucht. Gleichzeitig wird im Labor die Bestimmung der jeweiligen Thrombozytenzahl durchgeführt.

Anschließend werden die Proben jeweils fünf Mal eingefroren und wieder aufgetaut und sodann erneut auf ihre Faktor XIII-Aktivität hin untersucht. Dadurch kann sowohl ihre plasmatische als auch die in den Plättchen enthaltene Aktivität bestimmt werden, weil durch das fünfmalige Einfrieren und Auftauen die Membranen der Thrombozyten zerstört wird und der im Plättchenstroma enthaltene Faktor XIII freigesetzt wird.

Nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen wird erneut die Thrombozytenzahl in den Proben gemessen.

3.3.2. Die Herstellung der Thrombozytenkonzentrate (TZK) und der plättchenreichen (PRP) bzw. -armen Plasmen (PPP)

Für die Herstellung der Thrombozytenkonzentrate werden nach den oben angegebenen Rezepturen zunächst die drei benötigten Gaintner-Puffer hergestellt, da sie nicht über den Großhandel zu beziehen sind.

Zur Gewinnung von PRP werden die Blutproben bei 1280 Umdrehungen/min für 15 Min zentrifugiert. 1 ml PRP wird danach in ein kleines Probenröhrchen abgefüllt und aufbewahrt, der Rest PRP in ein RG gegeben.

In 6 weitere RG werden die Gaintner-Puffer gegeben: 4 ml Gaintner I, dann werden darüber langsam 4 ml Gaintner II geschichtet. Der Rest PRP wird nun langsam mit Hilfe einer spitzen Pipette am RG-Rand herab über den 2-Phasen-Puffer geschichtet. Die entstandenen drei Phasen werden danach bei 4000 Umdrehungen/min für 15 Min zentrifugiert, um das Thrombozytenkonzentrat zu gewinnen.

Der Überstand aus dieser Zentrifugation ist PPP und wird getrennt eingefroren.

Die bei der Zentrifugation entstandene Thrombozytenphase wird mit einer breiten Pipette abgenommen und auf 2 Falcon-Röhrchen verteilt, die jeweils mit Gaintner III-Waschpuffer ad 50 ml aufgefüllt und anschließend bei 2700 Umdrehungen/min für 15 Min zentrifugiert werden.

Bis auf einen kleinen Rest wird der Überstand der beiden Falcon-Röhrchen abgesaugt und die Thrombozytenphase anschließend mit einer Eppendorf-Pipette im verbliebenen Waschpufferrest resuspendiert.

Der Inhalt beider Falcon-Röhrchen wird in eines überführt und erneut bei 2700 Umdrehungen/min für 15 Min zentrifugiert. Danach wird der Überstand komplett abgesaugt und der Rest mit 1 ml Tyrode-Puffer resuspendiert.

20 μ l des resuspendierten Thrombozytenkonzentrates werden dann mit 180 μ l NaCl versetzt und somit auf 1:10 verdünnt.

Wir erhalten drei Proben (PRP, PPP und Thrombozytenkonzentrat) aus jeder Probanden-Blutprobe.

Anschließend werden in jeder Probe die Plättchen gezählt.

3.3.3. Die Bestimmung der Aktivität des Faktor XIII mit der vereinfachten radiologischen Methode nach Loewy^{35,101}:

Der Gerinnungsfaktor XIII ist seiner chemischen Struktur nach eine SH-Transglutaminase und baut z. B. Amine in das glutaminhaltige Casein ein. Deshalb kann die Faktor XIII-Aktivität mit der radiologischen Methode nach Loewy in der modifizierten Form von Egbring direkt bestimmt werden.

In Gegenwart von Faktor XIII, der durch Ca^{2+} -Ionen und Thrombin aktiviert wurde, erfolgt der Einbau von C_{14} -markiertem Putrescin als Amidonator in Casein. Mit Hilfe eines Szintillationszählers kann die Einbaurate pro Zeit gemessen werden, die proportional der Faktor XIII-Aktivität in der Probe ist. Durch Vergleich mit einer Normalplasma-Verdünnungsreihe erfolgt die Bestimmung der Aktivität des Faktor XIII im Testansatz.

Vorbereitung der Reagenzien:

a) Verdünnung des Standardplasmas: Das hitzedefibrinierte Standardplasma wird 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt. Mit dem unverdünnten Standardplasma erhält man somit eine

Plasmaverdünnungsreihe entsprechend 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% und 3% der Norm. Im Folgenden werden die einzelnen Verdünnungen des Standardplasmas wie Testplasma behandelt.

- b) 0,1 ml Mercaptoäthanol werden in 2,5 ml Aqua dest. gelöst.
- c) Je 1 ml C₁₄-Putrescin werden mit 0,8 ml 0,3 M Trispuffer pH 7,5 versetzt.
- d) Zu jedem Fläschchen Thrombin-Trockensubstanz werden 1,2 ml Aqua dest. pipettiert.

Durchführung der Bestimmung:

Im Eisbad werden in jedes Ansatzröhrchen pipettiert:

0,3 ml	Casein
0,1 ml	hitzedefibriniertes Testplasma
0,03 ml	Mercaptoäthanol in Aqua dest. gelöst
0,15 ml	150 Nec Putrescin-1,4-C ₁₄ -dihydrochlorid
0,15 ml	Thrombin (Konzentration: 25 IU/ml)
0,15 ml	CaCl ₂ 0,1 M

Vor Zugabe von 0,15 ml Thrombin und 0,15 ml CaCl₂ wird vom Testansatz 0,1 ml abpipettiert und als Leerwert so behandelt wie die späteren Proben. Nach Zusatz des CaCl₂ werden die Röhrchen des

Testansatzes aus dem Eisbad genommen und bei 30 °C im Wasserbad inkubiert.

Wie schon beim Leerwert werden nun nach genau 30, 60 und 120 Minuten vom Testansatz 0,1 ml entnommen und auf aschefreie Zellulose-Filterplättchen aufgetragen. Nachdem die Flüssigkeit vollständig in die Filterplättchen aufgesogen wurde, werden diese für mindestens 30 Minuten in 10%ige Trichloressigsäure gelegt, damit das aufgesogene Eiweiß in den Filterplättchen fixiert wird. Dies erfolgt im Eisbad. Die Plättchen sollten nicht länger als 2 Stunden in der 10%igen Trichloressigsäure verbleiben.

Anschließend werden die Plättchen drei Mal in 5%iger Trichloressigsäure und zweimal in der Äthanol, Eisessig und NaOH enthaltenden Waschlösung für jeweils fünf Minuten gewaschen. Danach werden die Plättchen luftgetrocknet.

Dem Trocknen schließt sich der Zählvorgang im Szintillationszähler an. Dazu wird jedes einzelne Filterplättchen in ein Szintillationsgefäß gegeben, in das anschließend 5 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert werden.

Im Anschluss an den Zählvorgang können jeder Testprobe Counts für den Leerwert sowie für die 30, 60 und 120 Minuten-Abnahmen zugeordnet werden. Mit Hilfe der Verdünnungsstufen des Eichplasmas lassen sich nun am PC sehr einfach Eichkurven für

jeden Zeitwert (30, 60, 120 Minuten) errechnen und grafisch darstellen (Abbildung 4). Daran lassen sich die Aktivitäten der einzelnen Testproben in Prozent ablesen. Hierbei empfiehlt es sich, die Prozentwerte an Faktor XIII-Aktivität einer Probe jeweils an der 30-, 60- und 120-Minuten-Eichkurve zu ermitteln und den Mittelwert der drei Messwerte als endgültigen Prozentsatz der Probe an Faktor XIII-Aktivität zu nehmen.

Erstellung der Standardkurven aus den Aktivitätsergebnissen der 18 Standardproben:

Es existieren insgesamt 18 Standardproben, deren Counts gemessen werden, nämlich jeweils eine durch Verdünnung entstandene, bekannte, Aktivitätsstufe (3%, 6%, 12%, 25%, 50% und 100%) zu den drei verschiedenen Inkubationszeitpunkten (30, 60 und 120 Minuten).

Aus den gemessenen Countzahlen und der bekannten Aktivität der Standardproben kann man so drei Standardkurven erstellen, die die Aktivität zu drei bestimmten Zeitpunkten beschreiben.

So ergibt sich die in der folgenden Abbildung 4 untere Kurve aus der Aktivität der 6 Standardproben zum Zeitpunkt 30 Minuten.

Die mittlere Kurve ergibt sich aus der Aktivität zum Zeitpunkt 60 Minuten und die obere Kurve aus der Aktivität zum Zeitpunkt 120 Minuten.

Ablesung der Werte der zu untersuchenden Proben:

An der 30-Minuten-Standardkurve kann nun für jede zu untersuchende Probe über die auf der Y-Achse aufgetragene Countzahl der entsprechende Aktivitätswert auf der X-Achse zum Zeitpunkt 30 Minuten abgelesen werden.

Analog können an der 60-Minuten-Kurve die Aktivitäten der Proben nach 60-minütiger Inkubationszeit abgelesen werden, ebenso nach 120 Minuten.

Diese Ablesung der Countzahl zu drei Zeitpunkten erhöht die Genauigkeit der ermittelten Aktivitätswerte, weil sie funktionell unabhängig sind von zeitlichen Schwankungen in der Einbaurrate. Außerdem werden unterschiedlich hohe Reaktionsdynamik und evtl. vorhandene Messfehler ausgeglichen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Mittelwerte der jeweils drei Aktivitätsmessungen pro Probe (30, 60 und 120 Minuten; n=3) in den folgenden Tabellen 5-10 zusammengefasst.

Die detaillierten Ergebnisse mit den Countzahlen der einzelnen Proben sind in den Tabellen 15 bis 17 im Anhang ab Seite 116 aufgeführt.

3.3.4. Die Durchführung der Auftauvorgänge

Um die in den Thrombozyten enthaltene Faktor XIII-Aktivität freisetzen und messen zu können, müssen die Plättchen zerstört werden.

Dies ist einfach durch Einfrieren der Plättchen zu erreichen. Um möglichst alle Plättchen zu lysieren, werden die Plasmaproben und die Thrombozytenkonzentrate fünf Mal in Folge für mindestens 48 Stunden auf -80°C abgekühlt und anschließend wieder aufgetaut. In Vorversuchen hatte sich herausgestellt, dass dreimaliges Einfrieren und Auftauen nicht ausreicht, um den Faktor XIII aus den Plättchen freizusetzen.

Die Messungen wurden also mit jeder zu untersuchenden Probe zweimal durchgeführt. Einmal vor (Zeitpunkt 0) und nach (Zeitpunkt 1) dem fünfmaligen Einfrieren für mindestens 48 Stunden bei -80°C .

In der folgenden Tabelle 5 habe ich die Termine der durchgeführten Einfrier- und Auftauvorgänge dargestellt.

Probennahme	25.07.1995	1. Untersuchung zum Zeitpunkt 0
1. Einfrieren	25.07.1995	
1. Auftauen	28.07.1995	
2. Einfrieren	28.07.1995	
2. Auftauen	01.08.1995	
3. Einfrieren	01.08.1995	
3. Auftauen	04.08.1995	
4. Einfrieren	04.08.1995	
4. Auftauen	07.08.1995	
5. Einfrieren	07.08.1995	
5. Auftauen	10.08.1995	2. Untersuchung zum Zeitpunkt 1

Tabelle 5: Protokoll der Ein- und Auftauvorgänge
und der jeweiligen Untersuchungen

4. Ergebnisse

4.1. Die Durchführung des Ablesevorganges bei der Faktor XIII-Aktivitätsbestimmung:

Mit den im Anhang aufgelisteten Counter-Werten, die für jede Probanden-Probe ermittelt wurden, kann an der entsprechenden Minutenkurve für jede Probe ein Aktivitätswert abgelesen werden.

Beispiel eines Ablesevorganges für die 60-Minuten-Probe PPP 0 von U. J.:

Im Counter wurden 37.759 Counts gezählt. Bei diesem Wert auf der Y-Achse ziehen wir eine horizontale Linie. Durch den Schnittpunkt dieser Linie mit der 60-Minuten-Kurve fällen wir das Lot auf die X-Achse.

Dort erhalten wir den entsprechenden Faktor XIII-Aktivitätswert der Probe in Prozent, der in diesem Fall 28% beträgt.

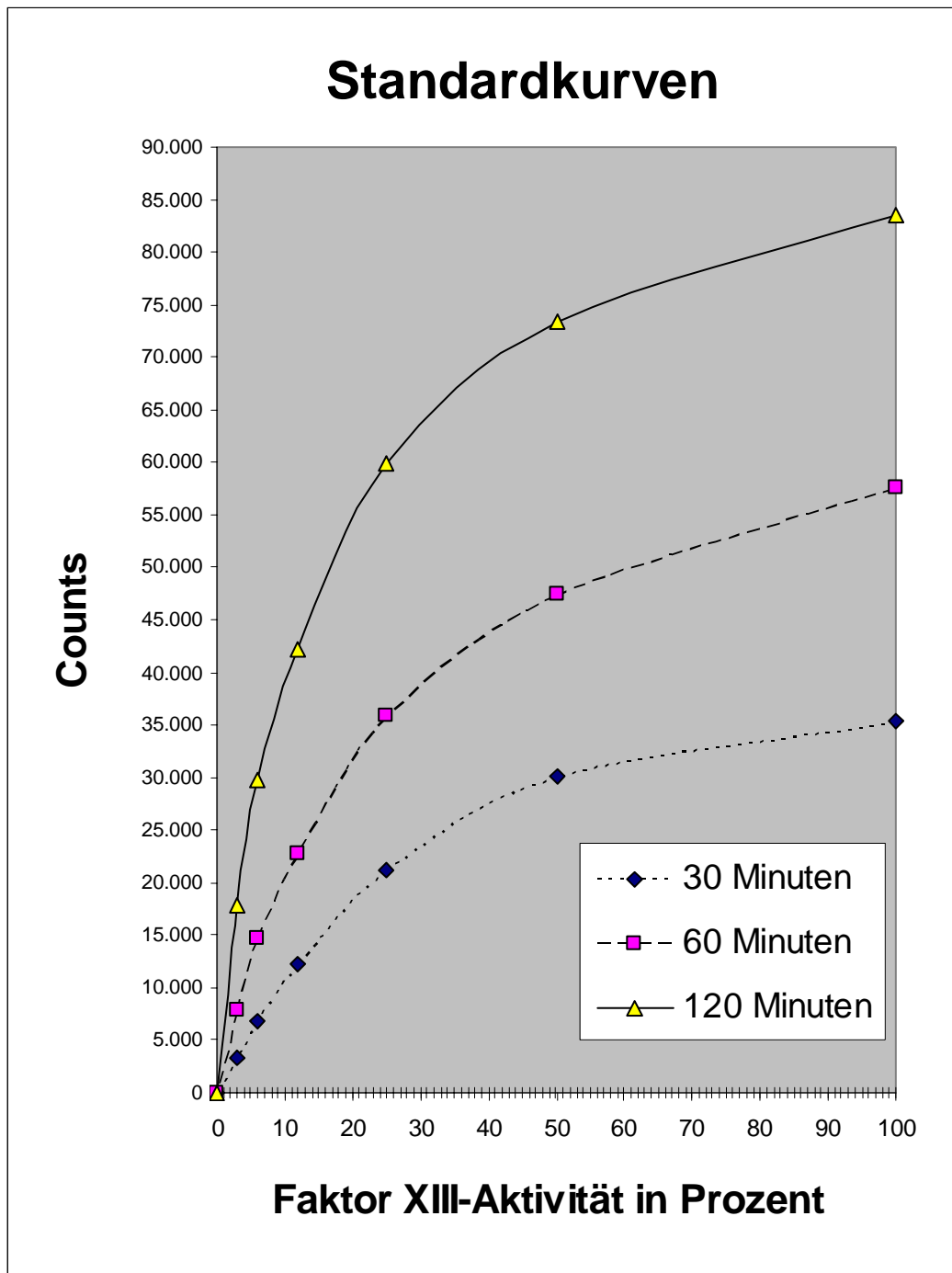


Abbildung 4: Aktivitäts-Prozentwerte (X-Achse) und Counts (Y-Achse) der gepoolten PPP-Plasmaproben (Standardproben) der gesunden Probanden bei 30,60 und 120 Minuten

4.2. Ergebnisse im PPP und im PRP

4.2.1. Ergebnisse der gesunden Probanden

Proband	Probe	Thrombozytenzahl $\times 10^3 / \mu\text{l}$	Faktor XIII- Aktivität in %
R. S.	PPP 0	6	108
	PPP 1	0	115
	PRP 0	553	171
	PRP 1	22	204
R. E.	PPP 0	6	110
	PPP 1	1	120
	PRP 0	410	164
	PRP 1	35	191
A. D.	PPP 0	7	96
	PPP 1	0	104
	PRP 0	397	159
	PRP 1	16	188
A. I.	PPP 0	5	103
	PPP 1	0	112
	PRP 0	382	165
	PRP 1	8	199

Tabelle 6: Aus den jeweils 3 Werten (30, 60 und 120 Minuten) gemittelt
Durchschnitts-Aktivitätsergebnis der gesunden Probanden in % der Aktivität
des gepoolten Standards (ausführliche Tabelle im Anhang)

PRP 0 und PPP 0: Proben vor dem Einfriervorgang

PRP 1 und PPP 1: Proben nach dem Einfriervorgang

Die hervorgehobenen Werte zeigen, dass bei den gesunden Probanden nach
Freisetzung im PRP ungefähr doppelt so viel Faktor XIII-Aktivität vorhanden ist,
wie im PPP

4.2.2. Ergebnisse der heterozygoten Probanden

Proband	Probe	Thrombozytenzahl $\times 10^3 / \mu\text{l}$	Faktor XIII- Aktivität in %
H. S.	PPP 0	4	34
	PPP 1	0	38
	PRP 0	451	84
	PRP 1	19	103
U. J.	PPP 0	6	29
	PPP 1	1	32
	PRP 0	430	80
	PRP 1	28	95
M. J.	PPP 0	5	32
	PPP 1	0	35
	PRP 0	510	92
	PRP 1	6	105
S. J.	PPP 0	6	25
	PPP 1	0	27
	PRP 0	503	79
	PRP 1	18	88

Tabelle 7: Aus den jeweils 3 Werten (30, 60 und 120 Minuten) gemitteltetes Durchschnitts-Aktivitätsergebnis der heterozygoten Probanden in % der Aktivität des gepoolten Standards (ausführliche Tabelle im Anhang)

PRP 0 und PPP 0: Proben vor dem Einfriervorgang

PRP 1 und PPP 1: Proben nach dem Einfriervorgang

Die hervorgehobenen Werte zeigen, dass bei den heterozygoten Probanden nach Freisetzung im PRP ungefähr drei Mal so viel Faktor XIII-Aktivität vorhanden ist, wie im PPP

4.2.3. Ergebnisse der homozygoten bzw. doppelt heterozygoten Probanden

Proband	Probe	Thrombozytenzahl $\times 10^3 / \mu\text{l}$	Faktor XIII- Aktivität in %
L. H.	PPP 0	5	2
	PPP 1	0	2
	PRP 0	472	3
	PRP 1	11	3
J. T. vor*	PPP 0	3	2
	PPP 1	0	2
	PRP 0	420	2
	PRP 1	23	2
J. T. nach*	PPP 0	5	32
	PPP 1	0	32
	PRP 0	404	37
	PRP 1	14	38

Tabelle 8: Aus den jeweils 3 Werten (30, 60 und 120 Minuten) gemitteltetes Durchschnitts-Aktivitätsergebnis der homozygoten bzw. doppelt heterozygoten Probanden in % der Aktivität des gepoolten Standards (ausführliche Tabelle im Anhang)

PRP 0 und PPP 0: Proben vor dem Einfriervorgang

PRP 1 und PPP 1: Proben nach dem Einfriervorgang

vor*/nach*: vor bzw. nach Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat

Die hervorgehobenen Werte zeigen, dass bei den homozygoten bzw. doppelt heterozygoten Probanden nach Freisetzung im PRP ungefähr gleich viel Faktor XIII-Aktivität vorhanden ist, wie im PPP

4.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse im plättchenarmen Plasma (PPP)

Im plättchenarmen Plasma vor dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen (PPP 0)

- erreichen die vier gesunden Probanden Aktivitätswerte zwischen 96% und 110% (Mittelwert \approx 104).
- erreichen die vier heterozygoten Probanden Aktivitätswerte zwischen 25% und 34% (Mittelwert \approx 30).
- erreichen sowohl der doppelt heterozygote als auch der homozygote Proband Aktivitätswerte von 2%.
- erreicht der homozygote Proband nach der Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat einen Aktivitätswert von 32%.

Im plättchenarmen Plasma nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen (PPP 1)

- erreichen die vier gesunden Probanden Aktivitätswerte zwischen 104% und 120% (Mittelwert \approx 113).
- erreichen die vier heterozygoten Probanden Aktivitätswerte zwischen 27% und 38% (Mittelwert \approx 33).

- erreichen sowohl der doppelt heterozygote als auch der homozygote Proband Aktivitätswerte von 2%.
- erreicht der homozygote Proband nach der Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat einen Aktivitätswert von 32%.

4.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse im plättchenreichen Plasma (PRP)

Im plättchenreichen Plasma vor dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen (PRP 0)

- erreichen die vier gesunden Probanden Aktivitätswerte zwischen 159% und 171% (Mittelwert \approx 165).
- erreichen die vier heterozygoten Probanden Aktivitätswerte zwischen 79% und 92% (Mittelwert \approx 84).
- erreichen sowohl der doppelt heterozygote als auch der homozygote Proband Aktivitätswerte zwischen 2 und 3% (Mittelwert \approx 3).
- erreicht der homozygote Proband nach der Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat einen Aktivitätswert von 37%.

Im plättchenreichen Plasma nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen (PRP 1)

- erreichen die vier gesunden Probanden Aktivitätswerte zwischen 188% und 204% (Mittelwert \approx 196).
- erreichen die vier heterozygoten Probanden Aktivitätswerte zwischen 88% und 105% (Mittelwert \approx 98).

- erreichen sowohl der doppelt heterozygote als auch der homozygote Proband Aktivitätswerte zwischen 2 und 3% (Mittelwert ≈ 3).
- erreicht der homozygote Proband nach der Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat einen Aktivitätswert von 38%.

4.3. Ergebnisse in den TZK

4.3.1. Ergebnisse der gesunden Probanden

Proband	Probe	Thrombozytenzahl $\times 10^3 / \mu\text{l}$	Faktor XIII- Aktivität in %
R. S.	TZK 0	842	53
	TZK 1	24	59
R. E.	TZK 0	898	58
	TZK 1	15	63
A. D.	TZK 0	794	51
	TZK 1	32	56
A. I.	TZK 0	763	56
	TZK 1	17	62

Tabelle 9: Aus den jeweils 3 Werten (30, 60 und 120 Minuten) gemitteltes Durchschnitts-Aktivitätsergebnis der gesunden Probanden in % der Aktivität des gepoolten Standards (ausführliche Tabelle im Anhang)

TZK 0: Proben vor dem Einfriervorgang

TZK 1: Proben nach dem Einfriervorgang

4.3.2. Ergebnisse der heterozygoten Probanden

Proband	Probe	Thrombozytenzahl x 10 ³ / μ l	Faktor XIII- Aktivität in %
H. S.	TZK 0	786	17
	TZK 1	26	20
U. J.	TZK 0	825	15
	TZK 1	24	17
M. J.	TZK 0	751	17
	TZK 1	11	19
S. J.	TZK 0	734	12
	TZK 1	34	15

Tabelle 10: Aus den jeweils 3 Werten (30, 60 und 120 Minuten) gemittelt
Durchschnitts-Aktivitätsergebnis der heterozygoten Probanden in % der
Aktivität des gepoolten Standards (ausführliche Tabelle im Anhang)

TZK 0: Proben vor dem Einfriervorgang

TZK 1: Proben nach dem Einfriervorgang

4.3.3. Ergebnisse der homozygoten bzw. doppelt heterozygoten Probanden

Proband	Probe	Thrombozytenzahl x 10 ³ / μ l	Faktor XIII- Aktivität in %
L. H.	TZK 0	819	2
	TZK 1	28	2
J. T. vor*	TZK 0	798	2
	TZK 1	28	2
J. T. nach*	TZK 0	834	2
	TZK 1	21	2

Tabelle 11: Aus den jeweils 3 Werten (30, 60 und 120 Minuten) gemittelt
Durchschnitts-Aktivitätsergebnis der homozygoten bzw. doppelt
heterozygoten Probanden in % der Aktivität des gepoolten Standards
(ausführliche Tabelle im Anhang)

TZK 0: Proben vor dem Einfriervorgang

TZK 1: Proben nach dem Einfriervorgang

vor*/nach*: vor bzw. nach Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat

4.3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse in den Thrombozytenkonzentraten (TZK)

Im Thrombozytenkonzentrat vor dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen (TZK 0)

- erreichen die vier gesunden Probanden Aktivitätswerte zwischen 51% und 58% (Mittelwert \approx 55).
- erreichen die vier heterozygoten Probanden Aktivitätswerte zwischen 12% und 17% (Mittelwert \approx 16).
- erreichen sowohl der doppelt heterozygote als auch der homozygote Proband Aktivitätswerte von 2%.
- erreicht der homozygote Proband nach der Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat einen Aktivitätswert von 2%.

Im Thrombozytenkonzentrat nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen (TZK 1)

- erreichen die vier gesunden Probanden Aktivitätswerte zwischen 56% und 63% (Mittelwert \approx 60).
- erreichen die vier heterozygoten Probanden Aktivitätswerte zwischen 15% und 20% (Mittelwert \approx 18).

- erreichen sowohl der doppelt heterozygote als auch der homozygote Proband Aktivitätswerte von 2%.
- erreicht der homozygote Proband nach der Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat einen Aktivitätswert von 2%.

4.4. Ergebnisse der Thrombozytenzählungen im PPP, PRP und TZK vor und nach den fünf Einfriervorgängen:

Vor den fünf Einfriervorgängen konnten in den

- plättchenreichen Plasmen (PRP 0) Konzentrationen von 382.000 bis 553.000 Thrombozyten/mm³ gemessen werden.
- plättchenarmen Plasmen (PPP 0) Konzentrationen von 3.000 bis 7.000 Thrombozyten/mm³ gemessen werden.
- Thrombozytenkonzentraten (TZK 0) Konzentrationen von 734.000 bis 898.000 Thrombozyten/mm³ gemessen werden.

Nach den fünf Einfriervorgängen konnten in den

- plättchenreichen Plasmen (PRP 1) Konzentrationen von 6.000 bis 35.000 Thrombozyten/mm³ gemessen werden.
- plättchenarmen Plasmen (PPP 1) Konzentrationen von 0 bis 1.000 Thrombozyten/mm³ gemessen werden.
- Thrombozytenkonzentraten (TZK 1) Konzentrationen von 11.000 bis 34.000 Thrombozyten/mm³ gemessen werden.

4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse bezogen auf die drei Probandengruppen

Gruppe	PPP 0	PPP 1	PRP 0	PRP 1	TZK 0	TZK 1
gesunde Probanden	104%	112%	165%	196%	55%	60%
heterozygote Probanden	30%	33%	84%	98%	16%	18%
homozygote / dopp. heterozygote Probanden	2%	2%	3%	3%	2%	2%

Tabelle 12: Durchschnitts-Aktivitätswerte der verschiedenen Probandengruppen vor (Zeitpunkt 0) und nach der Freisetzung (Zeitpunkt 1)

Gruppe	PPP 0 ↓ PRP 0	PPP 1 ↓ PRP 1	PPP 0 ↓ PPP 1	PRP 0 ↓ PRP 1	TZK 0 ↓ TZK 1
gesunde Probanden	+ 61%	+ 83%	+ 9%	+ 31%	+ 5%
heterozygote Probanden	+ 54%	+ 65%	+ 3%	+ 14%	+ 2%
homozygote / dopp. heterozygote Probanden	+ 1%	+ 1%	+ 0%	+ 0%	+ 0%

Tabelle 13: Vergleich der durchschnittlichen Gruppen-Ergebnisse der Faktor XIII-Aktivitätsbestimmungen in den verschiedenen Proben vor und nach der Freisetzung

Vergleich von PPP 0 und PRP 0 (vor Freisetzung)

Der Aktivitätswert PRP 0 liegt in der Gruppe

- der gesunden Probanden durchschnittlich 61% höher (104% → 165%) als der Wert PPP 0.
- der heterozygoten Probanden durchschnittlich 54% höher (30% → 84%) als der Wert PPP 0.
- der homozygoten bzw. dopp. heterozygoten Probanden durchschnittlich 1% höher (2% → 3%) als der Wert PPP 0.

Vergleich von PPP 1 und PRP 1 (nach Freisetzung)

Der Aktivitätswert PRP 1 liegt in der Gruppe

- der gesunden Probanden durchschnittlich 83% höher (112% → 196%) als der Wert PPP 1.
- der heterozygoten Probanden durchschnittlich 65% höher (33% → 98%) als der Wert PPP 1.
- der homozygoten bzw. dopp. heterozygoten Probanden durchschnittlich 1% (2% → 3%) höher als der Wert PPP 1.

Vergleich von PPP 0 und PPP 1

Der Aktivitätswert PPP 1 liegt in der Gruppe

- der gesunden Probanden durchschnittlich 9% höher (104% → 112%) als der Wert PPP 0.
- der heterozygoten Probanden durchschnittlich 3% höher (30% → 33%) als der Wert PPP 0.
- der homozygoten bzw. dopp. heterozygoten Probanden durchschnittlich 0% höher (2% → 2%) als der Wert PPP 0.

Vergleich von PRP 0 und PRP 1

Der Aktivitätswert PRP 1 liegt in der Gruppe

- der gesunden Probanden durchschnittlich 31% höher (165% → 196%) als der Wert PRP 0.
- der heterozygoten Probanden durchschnittlich 14% höher (84% → 98%) als der Wert PRP 0.
- der homozygoten bzw. dopp. heterozygoten Probanden durchschnittlich 0% höher (3% → 3%) als der Wert PRP 0.

Vergleich von TZK 0 und TZK 1

Der Aktivitätswert TZK 1 liegt in der Gruppe

- der gesunden Probanden durchschnittlich 5% höher (55% → 60%) als der Wert TZK 0.

- der heterozygoten Probanden durchschnittlich 2% höher (16% → 18%) als der Wert TZK 0.
- der homozygoten bzw. dopp. heterozygoten Probanden durchschnittlich 0% höher (2% → 2%) als der Wert TZK 0.

5. Diskussion

Vergleich PRP und PPP

Wir fanden bei allen Proben der gesunden Probanden erheblich höhere - oft mehr als doppelt so hohe - Faktor XIII-Aktivitätswerte als bei den heterozygoten, und hier wiederum erheblich höhere Werte als bei dem doppelt heterozygoten und dem homozygoten Probanden.

Im Durchschnitt fanden wir im plättchenarmen Plasma der Gesunden Aktivitäten von 104%, bei den heterozygoten Probanden Aktivitäten von 30% und bei dem doppelt heterozygoten und dem homozygoten Probanden Aktivitäten von 2%, während im plättchenreichen Plasma Werte von 165%, 84% und 3% gefunden wurden.

Bei dem homozygoten und dem doppelt heterozygoten Probanden ist die Angabe einer Aktivität von 2 oder 3% methodisch bedingt und bedeutet wahrscheinlich, dass die Aktivität annähernd null ist.

Untersuchungen des PPP des homozygoten Probanden J. T. ca. vier Wochen nach erfolgter bzw. unmittelbar vor der nächsten prophylaktischen Substitution von 2500 IE Faktor XIII-Konzentrat ergab Werte von 1% Aktivität.

Mit dem von uns durchgeführten C_{14} -Putrescin-Inkorporationstest kann man ebenso wie mit dem Pentapharm[®]-Test und dem gebräuchlicheren Berichrom[®] F XIII-Test auch Aktivitätswerte unter 10% erfassen. In den vielen Arbeiten über die Faktor XIII-Aktivität bei Homozygoten geht man eigentlich immer davon aus, dass diese Patienten weder im Plasma noch in Thrombozyten eine Faktor XIII-Aktivität aufweisen. Selbst nach der Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat liegen die gemessenen Aktivitätswerte im Plasma des Patienten mit angeborenem homozygoten Faktor XIII-Mangel weit unterhalb - bei etwa einem Drittel - der Dimensionen, die die gesunden Probanden aufweisen.

Das Verhältnis der Aktivitätswerte eines Probanden zueinander, also das Verhältnis von PRP zu PPP bzw. TZK desselben Probanden liegt in der gleichen Größenordnung, unabhängig davon, ob er nach der Faktor XIII-Aktivität gesund, heterozygot oder homozygot bzw. doppelt heterozygot ist: Legt man die gemessene Aktivität bei PPP mit eins zugrunde, so ist die Aktivität bei PRP ungefähr doppelt so hoch.

Dies lässt den Schluss zu, dass die vorhandene Aktivität von Faktor XIII in den Plättchen eines Probanden gleich hoch sein könnte: bei gesunden Probanden finden wir Aktivitäten von $100\% \pm 30\%$,

bei heterozygoten Patienten individuell unterschiedlich stark herabgesetzte Aktivitäten von $50\% \pm 30\%$, bei homozygoten oder doppelt heterozygoten Patienten Aktivität nahe 0.

Weil im PPP der an die Thrombozyten gebundene Teil der Faktor XIII-Aktivität (platelet associated activity) weitestgehend nicht in die Bestimmung mit eingeht, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Die PPP-Werte stehen somit in erster Linie für den plasmatischen Anteil der Faktor XIII-Aktivität. Diese Art der Bestimmung im plättchenarmen Plasma wird üblicherweise auch für klinische Untersuchungen verwendet.

Im plättchenreichen Plasma (PRP) sind viele Plättchen vorhanden, deren Membranen intakt sind. Die innerhalb der Plättchen enthaltene Faktor XIII-Aktivität, d. h. die nicht ins Plasma freigesetzte Plättchenaktivität, kann aus diesem Grunde nicht in die Bestimmung eingehen. Die PRP-Werte vor dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen entsprechen in unserer Versuchssystematik deshalb überwiegend der auf der Oberfläche der Thrombozyten befindlichen Aktivität des Faktor XIII (platelet associated activity). Hinzu kommt die plasmatische Faktor XIII-Aktivität (plasma derived activity).

Durch das fünfmalige Einfrieren und Auftauen der Thrombozyten im PRP werden die Membranen zerstört, so dass die möglicherweise im Plättchenstroma enthaltene Faktor XIII-Aktivität zusätzlich freigesetzt wird. Die PRP-Werte nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen entsprechen demnach der Summe aller drei Aktivitäten: der Plättchenoberflächenaktivität und der Plättchenstromaaktivität des Faktor XIII und der plasmatischen Faktor XIII-Aktivität.

Bei den gesunden und den heterozygoten Probanden führen die Auftauvorgänge zu Steigerungen der Aktivitätswerte:

Bei der Untersuchung des plättchenreichen Plasmas steigt die Aktivität durch das fünfmalige Einfrieren/Auftauen bei den Gesunden durchschnittlich um 31%, bei den Heterozygoten um 14% und bei dem doppelt heterozygoten und dem homozygoten Patienten um 0%.

Bei der Untersuchung des plättchenarmen Plasmas steigt die Aktivität durch das fünfmalige Einfrieren/Auftauen bei den Gesunden durchschnittlich um 9%, bei den Heterozygoten um 3% und bei dem doppelt heterozygoten und dem homozygoten Patienten um 0%.

Bei den TZK steigt die Aktivität durch das fünfmalige Einfrieren/Auftauen bei den Gesunden

durchschnittlich um 5%, bei den Heterozygoten um 2% und bei dem doppelt heterozygoten und dem homozygoten Patienten um 0%.

Bei allen Probanden außer dem doppelt heterozygoten und dem homozygoten Patienten ist durch die Auftauvorgänge aus dem Inneren der Thrombozyten eine Rest-Aktivität hinzugekommen.

Bei dem doppelt heterozygoten und dem homozygoten Patienten ist durch die Auftauvorgänge keine Aktivität hinzugekommen.

Das bedeutet, dass durch das fünfmalige Einfrieren/Auftauen der PRP/PPP die restliche, vorher in den Thrombozyten enthaltene Aktivität freigesetzt worden ist.

Bei den heterozygoten Probanden kam durch die Einfrier-/Auftauvorgänge etwa halb so viel Aktivität wie bei den Gesunden Probanden hinzu. Diese Feststellung spricht dafür, dass die insgesamt im Stroma der Plättchen enthaltene Faktor XIII-Aktivität bei Heterozygoten im Vergleich zu Gesunden etwa halb so groß ist.

Bei heterozygoten Anlageträgern könnte sich einerseits in jedem Plättchen die Hälfte der normalen Aktivität befinden, andererseits könnte aber auch in z. B. der Hälfte der Plättchen die volle Aktivität vorhanden sein und in dem

verbleibenden Teil der Plättchen gar keine Aktivität.

Bei dem homozygoten und dem doppelt heterozygoten Patienten ist der Gehalt an Faktor XIII-Aktivität in allen Plättchen gleich Null, weil durch das fünfmalige Einfrieren/Auftauen keine Aktivität freigesetzt worden ist.

Wäre Faktor XIII-Aktivität in den Plättchen des homozygoten und des doppelt heterozygoten Patienten enthalten gewesen, hätte bei den beiden kranken Probanden nach dem Einfrieren/Auftauen ebenfalls Aktivität hinzukommen müssen.

Thrombozytenkonzentrate

Die Aktivitätswerte im TZK eines Probanden sind immer deutlich niedriger als die Werte im jeweiligen plättchenreichen Plasma (PRP) und im plättchenarmen Plasma (PPP).

In den Thrombozytenkonzentraten befindet sich im Idealfall kein Plasma mehr. Der Aktivitätswert in den TZK vor dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen (TZK 0) entspricht deshalb der auf der Oberfläche der Thrombozyten befindlichen Aktivität des Faktor XIII.

Der Aktivitätswert in den TZK nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen (TZK 1) repräsentiert zusätzlich dazu die im Plättchenstroma enthaltene Faktor XIII-Aktivität, da zu diesem Zeitpunkt die Thrombozytenmembranen durch das Einfrieren und Auftauen zerstört worden sind und die im Plättchenstroma enthaltene Faktor XIII-Aktivität ebenfalls freigesetzt worden ist. Die Aktivität in den Thrombozytenkonzentraten nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen stellt daher die gesamte in den Thrombozyten enthaltene Aktivität der Plättchen dar.

Legt man die gemessene Aktivität bei den PPP mit eins zugrunde, so ist die Aktivität bei den PRP

etwa doppelt so hoch und bei den TZK ungefähr halb so hoch.

Da in den TZK nahezu kein Plasma enthalten ist, fällt der plasmatische Anteil der Gesamtaktivität bei der Messung vor dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen nicht ins Gewicht. Weil weniger Ausgangsaktivität vorhanden ist, steigt die Aktivität in den Konzentraten erwartungsgemäß durch die Auftauvorgänge relativ deutlicher an.

Die Faktor XIII-Aktivität der Thrombozyten spielt für die Faktor XIII-Gesamtaktivität im Blut eine nicht bekannte Rolle. Sie kann in vivo wegen der Stromamembran der Thrombozyten ohnehin nicht in vollem Umfang in die Gesamtaktivität eingehen.

Dennoch zeigen unsere Ergebnisse, dass die Betrachtung von in vivo wirkender Faktor XIII-Gesamtaktivität nicht allein auf die plasmatischen Anteile beschränkt werden kann.

Vielmehr ist zu vermuten, dass die auf der Oberfläche und/oder die innerhalb der Thrombozyten befindliche Aktivität hierbei ebenfalls zur Verfügung stehen könnte.

Die insgesamt verfügbare Faktor XIII-Aktivität besteht demnach aus drei Komponenten:

- A. einem plasmatischen Anteil der Aktivität
- B. einem auf der Oberfläche der Thrombozyten lokalisierten Anteil der Aktivität
- C. einem innerhalb der Thrombozyten lokalisierten Anteil der Aktivität, der erst nach Thrombozytolyse freigesetzt wird

Diese drei Komponenten konnten mit unserer Versuchssystematik erfasst werden, da die verschiedenen Proben stellvertretend für verschiedene Parameter stehen:

Probe	steht für	Mittelwert	
		absolut	relativ
PRP 0	B + A	165	95
PRP 1	B + C + A	196	100
PPP 0	A (+ B)	104	60
PPP 1	A + C (+ B)	113	65
TZK 0	B	55	35
TZK 1	B + C	60	40

Tabelle 14: Zuordnung der Probenaktivitäten zu verschiedenen Fraktionen der Faktor XIII-Gesamt-Aktivität

Aus den Durchschnittswerten der gesunden Probanden kann man auch versuchen, die in-vivo-Bedeutung der einzelnen Aktivitätssegmente zu quantifizieren:

Dem plasmatischen Anteil (A) der Aktivität scheint in vivo mit 60% der Gesamtaktivität quantitativ und wegen der schnellen Verfügbarkeit die größte Bedeutung zuzukommen.

Der auf der Oberfläche der Thrombozyten befindliche Anteil (B) der Aktivität liegt bei unseren Untersuchungsergebnissen mit 35% an zweiter Stelle.

Daneben existiert innerhalb der Thrombozyten Aktivität (C), die bei unserer Versuchsreihe mit 5% der Gesamtaktivität beziffert werden kann. Sie tritt jedoch in vivo wegen der Stromamembran der Thrombozyten wahrscheinlich nicht in Erscheinung.

Mit diesem eher untergeordneten Anteil an der Gesamtaktivität lässt sich auch erklären, dass wir bei allen untersuchten Plasmaproben jeweils vor und nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen Aktivitätswerte finden, die in ähnlichen Größenordnungen liegen. Dieser Umstand lässt ebenfalls den Schluss zu, dass intra- und extrazelluläre Konzentrationen an Faktor XIII in der gleichen Größenordnung liegen.

Die Ergebnisse der Proben des homozygoten Patienten (J.T.) und der doppelt heterozygoten Patientin (L.H.):

Die Ergebnisse aller Proben des homozygoten Patienten (J.T.) und der doppelt heterozygoten Patientin (L.H.) zeigen, dass bei Faktor XIII-Mangel die abgesunkene Faktor XIII-Konzentration im Plasma nicht durch im Plättchenstroma enthaltene Faktor XIII-Aktivität ausgeglichen werden kann. Dies wird deutlich, wenn man die Aktivität der Proben vor und nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen betrachtet. Hierbei findet sich keine Steigerung der Faktor XIII-Aktivität. Dies bedeutet, dass weder im Plasma noch in den Thrombozyten dieser beiden Probanden eine nennenswerte Faktor XIII-Aktivität vorhanden ist. Ein Aktivitätszuwachs durch die Auftauvorgänge bei den Thrombozytenkonzentraten des J.T. nach Substitution ist ebenfalls nicht festzustellen. Hieraus wird deutlich, dass kein Austausch von Aktivität durch die Stromamembran der Thrombozyten stattfindet, da ansonsten die Aktivität nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen wegen vorher eingelagerter Faktor XIII-Aktivität hätte ansteigen müssen.

Die Tatsache, dass auch nach Substitution von 2500 IE Faktor XIII-Konzentrat im

Thrombozytenkonzentrat des Probanden J.T. gleich niedrige Aktivitätswerte wie vor der Substitution gemessen werden, ist ebenfalls Beleg dafür, dass nicht nur die Megakaryozyten und die aus den Megakaryozyten abgespaltenen Plättchen keinen Faktor XIII enthalten, sondern dass auch nach der Abspaltung des Plättchenstromas von den Megakaryozyten keinerlei Aufnahme von Faktor XIII in die Thrombozyten mehr stattfindet.

Nach der Substitution steigt die Faktor XIII-Aktivität im PRP leicht an. Hier findet sich nur eine geringfügige Steigerung von 37% auf 38%, die zu vernachlässigen sein dürfte, weil sie auf methodische Umstände zurückzuführen ist.

Bei den TZK finden sich weder vor noch nach der Substitution nennenswerte Aktivitäten (2%). Auch nach dem fünfmaligen Einfrieren und Auftauen finden wir keinen Anstieg der Aktivität, die auf einen vorherigen Übertritt von Faktor XIII aus dem Plasma in die Thrombozyten hinweisen würde (2%).

Da bei Faktor XIII-Mangel die Konzentration des Faktor XIII in den Thrombozyten und außerhalb gleich niedrig sind, kann auch nicht davon ausgegangen werden, dass bei Faktor XIII-Mangel die abgesunkene Faktor XIII-Konzentration durch im

Plättchenstroma enthaltene Faktor XIII-Aktivität ersetzt werden kann.

Der Vergleich der Aktivitäts-Werte von J.T. vor und nach der Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat ergibt zunächst eine Anhebung der Plasmaaktivität von 2% auf 37%. Dies entspricht einer Anhebung in eine klinisch ausreichende Aktivitäts-Größenordnung⁴⁸.

Der Aktivitätsanstieg durch die Substitution ist im plättchenreichen Plasma PRP geringfügig höher (2% → 37%) als im plättchenarmen Plasma PPP (2% → 32%). Dieser Umstand könnte auf methodische Gründe zurückzuführen zu sein; er könnte aber auch darauf hindeuten, dass Plättchen eine schützende oder stabilisierende Funktion auf Faktor XIII ausüben.

Durch die jahrelangen Verlaufsbeobachtungen der Blutungsneigung des Patienten J.T. durch die betreuende hämatologische Abteilung des Klinikums der Philipps-Universität Marburg konnte die Dosis von substituiertem Faktor XIII so gewählt werden, dass eine verstärkte Blutungsneigung durch allgemeine Lebenseinflüsse bei dem Patienten klinisch nicht mehr in Erscheinung trat.

Später wurden die hierbei gewonnenen Erkenntnisse auch bei der Substitutionstherapie der Patientin L.H., einer Nichte des Patienten J.T., - angepasst

für die Anwendung am jungen Menschen - umgesetzt. Durch die Tatsache, dass die Plasmaspiegel nach einer Substitution in klinisch bedeutsame Dimensionen angehoben werden konnten, ist bewiesen worden, dass mit einer regelmäßigen Substitution von Faktor XIII-Konzentrat bei homozygotem bzw. doppelt heterozygotem Faktor XIII-Mangel zu einer Normalisierung der Blutungsneigung beigetragen werden kann.

Dabei könnte die Möglichkeit bestehen, das ursprünglich durchgeführte Therapieregime mit Gaben von 2500 IE Faktor XIII-Konzentrat alle vier Wochen dahingehend abzuändern, alle drei Wochen die halbe Dosis von 1250 IE zu verabreichen. Zu prüfen wäre jedoch, ob dies ohne eine nennenswerte Verschlechterung der Blutungsneigung möglich ist. Auf diese Weise wäre es möglich, die Jahresdosis um ein Drittel von $12 \times 2500 \text{ IE} = 30.000 \text{ IE}$ auf $16 \times 1250 \text{ IE} = 20.000 \text{ IE}$ zu reduzieren, ohne den Patienten einer höheren Blutungsgefahr auszusetzen.

Die Ergebnisse der Proben der heterozygoten Patienten (H.S., U.J., M.J., S.J.):

Bei der heterozygoten Patientin H.S. besteht eine stark ausgeprägte Blutungsneigung, obwohl sie mit einem Aktivitätswert von 34% eine relativ hohe Faktor XIII-Aktivität besitzt.

Auch die Familie J. befindet sich seit Mitte der 80er Jahre in der Betreuung durch die hämatologische Abteilung des Klinikums der Philipps-Universität Marburg. Durch klinische Beobachtungen und regelmäßige anamnestische Erhebungen der Faktor XIII-heterozygoten Mitglieder der Familie J. konnte die klinische Relevanz des Faktor XIII-Mangels der tatsächlichen Aktivität des Faktor XIII gegenübergestellt werden.

Alle drei getesteten Mitglieder der Familie J. (Mutter, Tochter, Sohn) weisen niedrige Faktor XIII-Aktivitäten zwischen 25 und 32% auf (Mittelwert \approx 28).

Dabei weist der Sohn S.J. mit 25% die niedrigsten Aktivitätswerte auf, eine Blutungsneigung bei ihm ist jedoch (noch) nicht beobachtet worden.

Die bisher einzige Patientin der Familie J. mit klinisch bedeutsamer Blutungsneigung ist die Tochter U.J., die mit hier gemessenen Werten von 29% allerdings eine höhere Faktor XIII-Aktivität aufweist als ihr Bruder S.J.

Wir konnten bei einer Gegenüberstellung von Aktivität und Klinik bei heterozygoten Patienten erkennen, dass nicht allein das absolute Ergebnis der Faktor XIII-Aktivität entscheidend ist für die Ausbildung einer klinisch apparenten hämorrhagischen Diathese bei Faktor XIII-Mangel. Vielmehr müssen noch andere Faktoren und Parameter, z. B. plättchenassoziierte Aktivität und Faktor XIII aus dem Plättchenstroma, gestörte α -Kettenvernetzung oder γ -Dimerisierung, andere angeborene oder erworbene Gerinnungsdefekte, in diesen komplexen Prozess eingreifen²⁶.

So kann man bei der Entstehung von Blutungen primäre und sekundäre Risikofaktoren unterscheiden.

Die Blutungsneigung ist erhöht, sofern als primärer Risikofaktor ein angeborener genetischer Defekt vorliegt (Disposition).

Weiterhin ist sekundär für eine Blutung ein Trauma, Operation, o.ä. (Exposition) als Triggermechanismus notwendig.

Daneben existieren offenbar große intra- und interindividuelle Schwankungen der hinreichenden Aktivität des Faktor XIII für die Aufrechterhaltung einer klinisch unauffälligen Gerinnselstabilisierung („proper Haemostasis“).

Gerinnselstabilität⁴⁸, Plättchenaktivierung⁶⁰, Interaktionen von Plättchen mit Endothelzellen und die Stabilisierung von Plättchenmembranen¹⁷ werden durch die o.g. Faktoren beeinflusst. Die Bestimmung der plasmatischen Aktivität im plättchenarmen Plasma erfasst lediglich einen Teil der tatsächlichen Bedeutung.

Daraus ist abzuleiten, dass die Messung der Faktor XIII-Aktivität in nativem sowie dem durch Einfrieren lysierten PPP, PRP und TZK zur Beurteilung der Gerinnselstabilisierung im Blut sehr gute Aussagen zulässt und für die Therapiekontrolle bei Substitution von Faktor XIII bei Patienten mit erworbenem oder hereditärem Faktor XIII-Mangel verwendet werden kann.

6. Zusammenfassung

Aus Blutproben von vier Probanden mit normaler Faktor XIII-Aktivität sowie von vier heterozygoten, einem doppelt heterozygoten und einem homozygoten Probanden wurden plättchenarmes Plasma, plättchenreiches Plasma und Thrombozytenkonzentrate hergestellt.

Mit der modifizierten Form von Loewys vereinfachter radiologischer Inkorporations-Methode zur Bestimmung der Aktivität des Faktor XIII (Einbau von C_{14} -markiertem Putrescin in Casein) wurde zunächst die Aktivität in den Proben vor dem Einfrieren gemessen. Nach der Zerstörung der Plättchen durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen der Proben und erneute Aktivitätsbestimmung konnte gezeigt werden, in welche Anteile die Faktor XIII-Gesamtaktivität aufgegliedert ist und wie sich diese Anteile quantitativ zueinander verhalten: der plasmatische Anteil beträgt ca. 60%, der auf der Oberfläche der Thrombozyten befindliche Anteil ca. 35% und der restliche, innerhalb der Thrombozyten lokalisierte Anteil der Aktivität ca. 5%.

Plättchen geben bei Patienten mit kongenitalem vollständigen Faktor XIII-Mangel keinen Faktor XIII ins Blut ab, noch können sie ihn bei Faktor XIII-Substitution ins Plättchenstroma aufnehmen.

Gesunde Probanden besitzen eine höhere Faktor XIII-Aktivität ($100\% \pm 30\%$) als heterozygote Patienten ($50\% \pm 25\%$), während homozygote und doppelt heterozygote Patienten keine Faktor XIII-Aktivität im Plasma oder in Thrombozyten aufweisen (0%-5%). Heterozygote Patienten haben - anders als homozygote bzw. doppelt heterozygote Patienten - nur manchmal eine Blutungsneigung, deren Ausprägung nicht mit der tatsächlich messbaren Faktor XIII-Aktivität korreliert, sondern auch von sekundären Risikofaktoren abhängig ist.

Bei der Entstehung von Blutungen werden primäre und sekundäre Risikofaktoren unterschieden. Die Blutungsneigung ist erhöht, sofern als primärer Risikofaktor ein angeborener genetischer Defekt vorliegt (Disposition), während sekundär für die Entstehung einer Blutung ein Trauma o.ä. (Exposition) als Triggermechanismus notwendig ist. Durch eine Dauerintervallbehandlung mit 2500 IE Faktor XIII-Konzentrat in Abständen von ca. 4 Wochen werden spontane Blutungen zuverlässig verhindert. So kann dem Patienten ein nahezu normales Leben - sogar in gefährdungsintensiven Berufen wie z. B. als Tischler - ermöglicht werden.

Sowohl bei angeborenem als auch bei erworbenem Faktor XIII-Mangel mit schweren

Blutungskomplikationen kann eine Faktor XIII-Substitution lebensrettend sein.

7. Literatur

- 1 Adány R, Belkin A, Vasilevskaya T, Muszbek L: Eur. J. Cell Biol 1985; 38:171.
- 2 Adány R, Szegedi A, Ablin RJ, Muszbek L: Thromb Hemost 1988; 60:293.
- 3 Aleksic N, Ahn C, Wang YW, Juneja H, Folsom AR, Boerwinkle E, Wu K K: Factor XIII-A Val34Leu polymorphism does not predict risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Feb 1;22(2):348-52
- 4 Alkjaersig N, Fleicher A, Lewis M, Ittyerah R: Reduction of coagulation factor XIII concentration in patients with myocardial infarction, cerebral infarction, and other thromboembolic disorder. Thromb Haemost 1977; 38; 863-873
- 5 Anwar R, Gallivan L, Trinh C, Hill F, Markham A: Identification of a new Leu354Pro mutation responsible for factor XIII deficiency. Eur J Haematol. 2001 Feb;66(2):123-6
- 6 Anwar R, Minford A, Gallivan L, Trinh CH, Markham AF: Delayed umbilical bleeding-a presenting feature for factor XIII deficiency: clinical features, genetics, and management. Pediatrics. 2002 Feb;109(2):E32

- 7 Aoki N: Clot retraction increases clot resistance to fibrinolysis by condensing alpha 2-plasmin inhibitor crosslinked to fibrin. Thromb Haemost. 1993 Aug 2;70(2):376
- 7A Behringwerke AG, Marburg/Lahn, Produktinformation zu „Berichrom® F XIII“
- 8 Biland L, Duckert F, Prisender S, Nyman D: Quantitative estimation of coagulation factors in liver disease. The diagnostic and prognostic value of factor XIII, factor V and plasminogen. Thromb Haemost. 1978 Jun 30;39(3):646-56.
- 9 Board PG: Genetic polymorphism of the A subunit of human coagulation factor XIII. Am J Hum Genet 1979; 31:116-124
- 10 Board PG: Genetic polymorphism of the B subunit of human coagulation factor XIII. Am J Hum Genet 1980; 32:348-353
- 11 Board PG, Reid M, Serjeantson S: The gene for coagulation factor XIII a subunit (F12A) is distal to HLA on chromosome 6. Hum Genet. 1984;67(4):406-8.
- 12 Born P, Lippl F, Ulm K, Gerein P, Lersch C, Eckel F, Fischer G, Sandschin W, Dlaska U, Classen M: Faktor XIII-Erniedrigung bei Tumorpatienten. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 104-110.
- 13 Burghardt H, Zellner PR, Möller I: Faktor XIII-Mangel bei Verbrennungen. Chirurg 1977; 48: 520-523
- 14 Burrows RF, Ray JG, Burrows EA: Bleeding

- risk and reproductive capacity among patients with factor XIII deficiency: a case presentation and review of the literature. *Obstet Gynecol Surv.* 2000 Feb;55(2):103-8
- 15 Capellato M G, Lazzaro A R, Marafioti F, Polato G, Girolami A: A new family with congenital factor XIII deficiency showing a deficit of both subunit A and B. Type I factor XIII deficiency. *Haematologia (Budap).* 1987;20(3):179-87.
- 16 Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ: Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood.* 1999 Feb 1; 93(3): 906-8
- 17 Chaoui K, Ziemer S, Lammert H, Lammert I: Faktor XIII-Prophylaxe und deren Einfluß auf Wundheilungsstörungen nach Tumorsektionen im Kopf-Hals-Bereich. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 158-166
- 18 Coggan M, Baker R, Miloszweski K, Woodfield G, Board P: Mutations causing coagulation factor XIII subunit A deficiency: Characterization of the mutant proteins after expression in yeast. *Blood* 1995; 85:2455-2460
- 19 Curtis CG, Brown KL, Credo RB, Domanik RA, Gray A, Stenberg P, Lorand L: Calciumdependent unmasking of active-center cysteine during activation of fibrin stabilizing factor. *Biochemistry* 1974; 13:3774-3780
- 20 Davids H, Hodel D: Faktor XIII-Einsatz bei Wundheilungsstörungen nach ausgedehnten

- Tumorresektionen im Kopf-Hals-Bereich. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 155-157.
- 21 Duckert F et al: A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency. Thromb Diath Haemorrh 1960; 5:179-186
- 22 Dupin A, Immel A, Rohner I, Dobrkovska A (Marburg), Seitz R (Langen), Egbring R (Marburg): Bestimmung von Faktor XIII-Aktivität und Untereinheit A im thrombozytenarmen und -reichen Plasma bei Patienten mit homo- und heterozygotem angeborenen Faktor XIII-Mangel. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 30-33.
- 23 Dvilansky A, Britten AF, Loewy AG: Factor XIII assay by an isotope method. II. Heparin inhibition of factor XIII activation. Thromb Diath Haemorrh. 1970 Oct 31;24(1):256-64.
- 24 Dvilansky A, Britten AF, Loewy AG: Factor XIII assay by an isotope method. I. Factor XIII (transamidase) in plasma, serum, leucocytes, erythrocytes and platelets and evaluation of screening tests of clot solubility. Br J Haematol. 1970 Apr;18(4):399-410.
- 25 Egbring R et al: Disorders with severe acquired factor XIII deficiency; lack of synthesis or increased consumption (DIC). Efficacy of factor XIII replacement in bleeding complications. In: McDonagh, Seitz, Egbring (eds): Factor XIII, Schattauer Verlag, Stuttgart, New York

1993; p. 216

- 26 Egbring R et al: Factor XIII deficiency in patients with septicemia. In: Egbring R, Klingemann HG (eds): Factor XIII and fibronectin. Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg 1983; p. 91
- 27 Egbring R, Kailing A, Kehl HG, Seitz R, Massberg M, Holst F, Fuchs G, Wallin R, Saldeen T: Disorders with severe acquired factor XIII deficiency; lack of synthesis or increased consumption (DIC). Efficacy of factor XIII replacement in bleeding complications; in Mc Donagh J, Seitz R, Egbring R (eds): Faktor XIII. 2nd International Conference, Marburg 1991. Stuttgart, Schattauer, 1993, 216-240
- 28 Egbring R, Klingemann HG, Gramse M, Havemann K: Factor XIII deficiency in patients with septicemia; in Egbring R, Klingemann HG (eds): Factor XIII and Fibronectin. Marburg, Medizinische Verlagsgesellschaft, 1982, pp 91-105
- 29 Egbring R, Kröniger A, Dupin A, Heidtmann HH, Seitz R, Mikkola H, Rohner I, Immel A, Palotie A: Die Pathophysiologie des angeborenen und erworbenen Faktor XIII-Mangels und bei Immundefekten. Vortrag XXXVIII. Hamburger Symposion für Blutgerinnung
- 30 Egbring R, Andrassy K, Havemann K, Fuchs G, Ruf B, Schander K, Trobisch H: Longtime therapy of congenital factor XIII deficiency using factor XIII concentrate. Blut. 1976 Dec;33(6):367-76
- 31 Egbring R, Kröniger A, Seitz R: Erworbene Inhibitoren gegen Faktor XIII.

Hämostaseologie 1996; 16:174-9

- 32 Egbring R, Kröniger A, Seitz R: Factor XIII deficiency: Pathogenic mechanisms and clinical significance. *Sem Thromb Haemost* 1996; 22
- 33 Egbring R, Schmidt W, Fuchs G, Havemann K: Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood*. 1977 Feb; 49(2): 219-231.
- 34 Egbring R, Schmidt W, Havemann K: 2 Patients with congenital factor XIII deficiency. Contribution to the problem of factor XIII determination. *Thromb Diath Haemorrh* 1970; 23:313
- 35 Egbring R, Schmidt W, Havemann K: Die vereinfachte radiologische Faktor XIII-Bestimmung und ihre klinische Anwendung bei kongenitalem Faktor XIII-Mangel. *Blut* 1973, 37:6-19.
- 36 Egbring R, Schwerk WB, Kröniger A, Immel A, Feddersen O, Seitz R: Elevated activation marker; factor XIII deficiency and severe intestinal heamorrhage in three patients with Morbus Henoch-Schoenlein (MSH). *Thromb Haemost* 1995; 73: 1432
- 37 Egbring R, Seitz R, Gürten GV, Köther M, Barthels M, Fuchs G, Lerch L, Kröniger A: Bleeding complications in heterozygotes with congenital factor XIII deficiency. In Mossesson MW, Amrani DI, Siebenlist KR, Diorio JP (eds): *Fibrinogen 3. Biochemistry, biological functions, gene regulation and expression*. Amsterdam, Elsevier 1988; pp. 341-346

- 38 Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg.): Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 1-6.
- 39 Egbring R, Kröniger A, Emrich G, Kailing A, Gürten E V, Seitz R: Faktor XIII-Substitution zur Prophylaxe und bei Blutungen infolge eines angeborenen und erworbenen Faktor XIII-Mangels. Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 34-55.
- 40 Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg.): Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 7-15.
- 41 Egbring R, Seitz R: Improved prognosis of fulminant hepatic failure (FHF) after plasma derivative replacement therapy. Enhanced proteolysis of hemostatic proteins confirmed by proteinase-inhibitor complexes determination. Z Gastroenterol. 1990 Feb;28(2):104-109.
- 42 Egbring R, Trobisch H, Havemann K, Malchow H: Untersuchungen zur Blutungsneigung bei akuten Leukämien; in Gross R, van de Loo J (Hrsg): Leukämie. Berlin, Springer, 1972, pp. 443-447
- 43 Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. Blood 2000;95:586-591
- 44 Emrich HG et al: Longterm interval factor XIII substitution in congenital (homozygote) factor XIII deficiency. Factor

- XIII increase and recovery studies in homozygous patients after substitution with factor XIII concentrate. Second internat. Factor XIII conference. Ed. McDonagh, Schattauer Verlag 1993; ISBN 3-7945-1543-9
- 45 Fickenscher K, Aab A, Stuber W: A photometric assay for blood coagulation factor XIII. Thromb Haemost. 1991 May 6;65(5):535-40
- 46 Fickenscher K: Berichrom[®] F XIII: test procedure and the biochemical basis of this kinetic assay. Second international conference on factor XIII; Ed.: McDonagh J, Seitz R, Egbring R; Schattauer Verlag 1993: 122-127
- 47 Fisher S, Rikover M, Naor S: Factor 13 deficiency with severe hemorrhagic diathesis. Blood. 1966 Jul;28(1):34-9.
- 48 Francis W, Marder F, Marder VJ: Increased resistance to plasmin degradation of fibrin with highly crosslinked polymer chains formed at high factor XIII concentrations. Blood 1988, 71:1361-1365.
- 49 Fukue H, Anderson K, McPhedran P et al. A unique factor XIII inhibitor to a fibrin-binding site on factor XIIIa. Blood 1992; 79:65-74
- 50 Fukui H, Kamitsuji H, Nagao T, Yamada K, Akatsuka J, Inagaki M, Shike S, Kobayashi Y, Yoshioka K, Maki S, et al: Clinical evaluation of a pasteurized factor XIII concentrate administration in Henoch-Schonlein purpura. Japanese Pediatric Group. Thromb Res Suppl. 1989 Dec 15;56(6):667-75.

- 51 Gailani D: An IgG inhibitor against factor XIII: resolution of bleeding after plasma immune adsorption with staphylococcal protein A. *Am J Med* 1992; 92:110-2
- 52 Gerlach R, Raabe A, Zimmermann M, Siegemund A, Seifert V: Factor XIII deficiency and postoperative hemorrhage after neurosurgical procedures. *Surg Neurol.* 2000 Sep;54(3):260-4; discussion 264-5
- 53 Gerlach R, Raabe A, Zimmermann M, Siegemund A, Seifert V: Faktor XIII-Mangel und postoperative Nachblutungen nach neurochirurgischen Eingriffen. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 100-103.
- 54 Havemann K, Egbring R, Group C: FXIII deficiency in adults with acute leukemia: Results of a substitution with FXIII. *Klin Wochenschr* 1977; 55; 801-809
- 55 Henriksson P et al: Typ I autoimmuno inhibitor of factor XIII in a patient with congenital factor XIII deficiency. *Thromb Haemost* 1983; 50:272
- 56 Henriksson P, Becker S, Lynch G, Mc Donagh J: Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest* 1985; 76:528-534.
- 57 Henriksson P, Hedner U, Nilsson IM: Factor XIII (fibrin stabilising factor) in Henoch-Schonlein's purpura. *Acta Paediatr Scand.* 1977 May;66(3):273-7
- 58 Henriksson P: Clinical and laboratory

- aspects of FXIII (fibrin stabilizing factor) and conditions with abnormal proteolysis. Dissertation, University of Lund, Malmö, Sweden, 1979
- 59 Hornyak TJ, Shafer JA: Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry* 1992; 31:423-429.
- 60 Ichinose A, Sourì M, Izumi T, Takahashi N: Molecular and genetic mechanisms of factor XIII A subunit deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26 (1): 5-10
- 61 Ikkala E: Transfusion therapy in congenital deficiencies of plasma factor XIII. *Ann N Y Acad Sci.* 1972 Dec 8;202:200-3
- 62 Ikkala E, Myllyla G, Nevalinna HR: Transfusionstherapy in Factor XIII (FSF) deficiency. *Scand. J. Haemat.* 1964; 1: 308
- 63 Ittyerah R, Alkjaersig N, Fleicher A, Chaplin H Jr: Coagulation factor XIII concentration in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 1976; 88: 546
- 64 Janus TJ, Lewis SD, Lorand L, Shafer JA: Promotion of thrombincatalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry* 1983; 22:6269-6272
- 65 Kailing A: Der erworbene Faktor XIII-Mangel bei internistischen Erkrankungen mit Synthesestörungen und Umsatzsteigerungen. Diskussion zur Substitutionstherapie bei Blutungen und schwerem Mangel. Dissertation A, Marburg, 1995
- 66 Karpati L, Penke B, Katona E, Balogh I, Vamosi G, Muszbek L.: A modified, optimized

- kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. Clin Chem. 2000 Dec;46(12):1946-55
- 67 Katona E E, Ajzner E, Toth K, Karpati L, Muszbek L: Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. J Immunol Methods. 2001 Dec 1;258(1-2):127-35
- 68 Kiesselbach TH, Wagner RH: Demonstration of factor XIII in human megacaryocytes by a fluorescent antibody technique. Ann N Y Acad Sci 1972, 202:318
- 69 Kim SY, Jeitner TM, Steinert PM: Transglutaminases in disease. Neurochem Int. 2002 Jan;40(1): 85-103
- 70 Kitchens CS, Newcomb TF: Factor XIII. Medicine 1979; 58:413-429
- 71 Kloczko J, Wojtukiewicz M, Bielawiec M, Zarzycka B, Kinalska I. Plasma factor XIII and some other haemostasis parameters in patients with diabetic angiopathy. Acta Haematol 1986;76:81-85
- 72 Kloczko J, Wojtukiewicz M, Bielawiec M, Zuch A. Alterations of haemostasis parameters with special reference to fibrin stabilization, factor XIII and fibronectin in patients with obliterative atherosclerosis. Thromb Res 1988;51:575-581
- 73 Kohler HP, Ariens RA, Whitaker P, Grant PJ: A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIIIVal34Leu) affects cross-linking activity. Thromb Haemost. 1998 Oct;80(4):704.

- 74 Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1998;79:8-13
- 75 Krumdick R, Shaw DR, Huang ST et al. Hemorrhagic disorder due to an isoniazid-associated acquired factor XIII inhibitor in a patient with macroglubulinemia. *Am J Med* 1991; 90 (5): 639-45.
- 76 Lewis JH, Szeto ILF, Ellis LD, Bayer WL. An acquired inhibitor to coagulation factor XIII. *Johns Hopkins Med J* 1967; 120:401
- 77 Lewis JH. Hemorrhagic disease associated with inhibitors of fibrin cross-linkage. *Ann NY Acad Sci* 1972; 202:213-9
- 78 Lewis SD, Janus TJ, Lorand L, Shafer JA: Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates. *Biochemistry* 1985; 24:6772-6777
- 79 Loewy AG: Überlassung der Laboranweisung für die Bestimmung des Faktor XIII und der Einbaurrate von C¹⁴ markiertem Putrescin in Casein. 1968.
- 80 Lopaciuk S, Bykowska K, McDonagh JM et al. Differences between type I autoimmune inhibitors of fibrin stabilisation in two patients with severe hemorrhagic disorder. *J Clin Invest* 1978; 61:1196-203
- 81 Lorand L et al: A pathological inhibitor of fibrin cross-linking. *J Clin Invest* 1968; 47:268-273
- 82 Lorand L, Conrad SM. Transglutaminases.

Mol Cell Biochem 1984;58:9-35

- 83 Lorand L, Losowski MS, Miloszewksi KJM: Human factor XIII: Fibrin-stabilizing factor. Prog Hemost Thromb 1980; 5:245-290
- 84 Lorand L, Velasco PT Rinne JR et al. Autoimmune antibody (IgG Kansas) against Thera-Vital fibrin stabilizing factor (factor XIII) system. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:232-6
- 85 Lorenz R, Clemens R, Karl M, Classen M: Substitution of F XIII concentrate in ulcerative colitis. Z Gastroenterol. 1989 Feb;27(2):87-90.
- 86 Lynch GW, Pfueller SL: Thrombin-independent activation of platelet factor XIII by endogenous platelet acid protease. Thromb Haemost. 1988 Jun 16;59(3):372-7.
- 87 McCormack LJ, Kain K, Catto AJ, Kohler HP, Stickland MH, Grant PJ: Prevalence of FXIII V34L in populations with different cardiovascular risk. Thromb Haemost. 1998 Sep; 80(3): 523-4
- 88 McDonagh J: Biochemistry of fibrin-stabilizing factor (Faktor XIII). Second international conference on factor XIII; Ed.: McDonagh J, Seitz R, Egbring R; Schattauer Verlag 1993
- 89 McKee PA, Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL: Crosslinking of fibrin by fibrin-stabilizing factor. Ann NY Acad Sci 1972, 202:127.
- 90 Metzner H J, Dickneite G, Diehl K H: Faktor XIII und Wundheilung - präklinische Untersuchungen. Diagnostik, klinische

Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 111-118.

- 91 Mikkola H, Palotie A: Gene defects in congenital factor XIII deficiency. *Sem Thromb Hemost* 1996; 22:393-398
- 92 Mikkola H, Syrjälä M, Rasi V, Vahtera E, Hamalainen E, Peltonen L, Palotie A. Deficiency in the A subunit of human coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* 1994;84:517-525
- 93 Mikkola H, Yee V, Syrjälä M, Seitz R, Egbring R, Petrini P, Ljung R, Ingerslev J, Teller DC, Peltonen L, Palotie A: Four novel mutations in deficiency of coagulation factor XIII: consequences to expression and structure of the A-subunit. *Blood* 1996; 87:141-151
- 94 Mills JD, Mansfield MW, Grant PJ: Factor XIII-circulating levels and the Val34Leu polymorphism in the healthy male relatives of patients with severe coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2002 Mar;87(3):409-14
- 95 Miloszewski K, Losowsky M: The clinical consequences of inherited and acquired factor XIII deficiency; in Egbring R, Klingermann HG (eds): *Factor XIII and Fibronectin.* Marburg, Medizinische Verlagsgesellschaft, 1983, pp. 31-39.
- 96 Mosesson MW: Fibrinogen and fibrin polymerisation: Appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 8:257-267

- 97 Muszbek L, Adány R, Lopaciuk S, Karges H, Egbring R, Boda Z, Kávai M: Thromb Haemost 1989; 62:52a.
- 98 Muszbek L, Adany R, Mikkola H: Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. Crit Rev Clin Lab Sci. 1996 Oct;33(5):357-421
- 99 Muszbek L, Adány R, Szegedi G, Polgár J, Kávai M: Thrombos Res 1985; 37:401.
- 100 Muszbek L, Adány R: In: Eicosanoids, Lipid Peroxidation and Cancer, Nigam S et al., Springer Verlag, Berlin, 1988; p. 339.
- 101 Muszbek L, Polgar J, Fesus L: Kinetic determination of blood coagulation Factor XIII in plasma. Clin Chem. 1985 Jan;31(1):35-40
- 102 Nußbaum M et al: Plasma fibrin stabilizing factor activity in various diseases. Blood 1964; 5:23
- 103 Nussbaum M, Morse BS: Plasma fibrin stabilizing factor activity in various diseases. Blood 1964; 23; 69-77
- 104 Olaisen B, Gedde-Dahl T Jr, Teisberg P, Thorsby E, Siverts A, Jonassen R, Wilhelmy MC: A structural locus for coagulation factor XIII_A (F13A) is located distal to the HLA region on chromosome 6p in man. Am J Hum Genet. 1985 Jan;37(1):215-20.
- 105 Ostermann H: FaktorXIII-Plasmawerte bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Diagnostische Ergebnisse der Colitis-ulcerosa-Studien. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel,

Karger, 1999, pp. 207-212.

- 106 Ostermann H: Biochemie und Funktion des Faktors XIII. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 1-6.
- 107 Päge S, Schwenke E: Substitution mit Faktor XIII-Konzentrat - eine adjuvante Behandlung bei therapieresistenter aktiver Colitis ulcerosa? Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 202-206.
- 108 <http://www.Pentapharm.com>
- 109 Pötzsch B: Factor XIII: Biochemistry, molecular biology and physiology. Second international conference on factor XIII; Ed.: McDonagh J, Seitz R, Egbring R; Schattauer Verlag 1993
- 110 Rasche H, Dietrich M, Gaus W, Schleyer M: Factor XIII activity and fibrin subunit structure in acute leukemia. Biomedicine 1974, 21:61.
- 111 Rasche H, Dietrich M, Hiemeier V: Untersuchungen über die Faktor XIII-Aktivität im Plasma bei akuter Leukämie. Klin Wochenschr 1972, 50:1017
- 112 Rasche H, Schleyer M, Dietrich M: Die Anwendung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur quantitativen Fibrinanalyse. Klin Wochenschr 1974, 52:233
- 113 Rasche H: Blutgerinnungsfaktor XIII und Fibrinstabilisierung. Klin Wochenschr 1975, 53:1137
- 114 Reiner AP, Frank MB, Schwartz SM,

- Linenberger ML, Longstreth WT, Teramura G, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS: Coagulation factor XIII polymorphisms and the risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women. *Br J Haematol.* 2002 Feb;116(2):376-82
- 115 Rodeghiero F, Castaman GC, Di Bona E, Ruggeri M, Dini E: Successful pregnancy in a woman with congenital factor XIII deficiency treated with substitutive therapy. Report of a second case. *Blut.* 1987 Jul;55(1):45-8
- 116 Sakata Y et al: Cross-linking of plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest* 1980; 65:290
- 117 Schwab R, Willy C, Prust R, Gerngroß H: Postoperativer Faktor XIII-Mangel - biochemisches Wundmonitoring nach großen Weichteileingriffen. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp. 129-134.
- 118 Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA: Human factor XIII from plasma and platelets. *J Biol Chem* 1973; 248:1395-1407
- 119 Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA: The subunit structure of human plasma and platelet factor XIII (fibrin stabilizing factor). *J Biol Chem* 1971; 246:5851
- 120 Seitz R et al: Pathogenetic causes of acquired factor XIII deficiency. Second internat. factor XIII conference. Ed. McDonagh, Schattauer Verlag 1993; ISBN 3-7945-1543-9
- 121 Seitz R, Leugner F, Katschinski M, Immel A, Kraus M, Egbring R, Goke B: Ulcerative

- colitis and Crohn's disease: factor XIII, inflammation and haemostasis. Digestion. 1994;55(6):361-7.
- 122 Seitz R, Wolf M, Egbring R, Havemann K: The disturbance of hemostasis in septic shock: role of neutrophil elastase and thrombin, effects of antithrombin III and plasma substitution. Eur J Haematol. 1989 Jul;43(1):22-8
- 123 Suzuki R, Toda H, Takamura Y: Dynamics of blood coagulation factor XIII in ulcerative colitis and preliminary study of the factor XIII concentrate. Blut. 1989 Aug;59(2):162-4.
- 124 Thies HA, Kuder E: Bedeutung, Diagnostik und Substitution erworbener Faktor XIII-Mängel im postoperativen Verlauf. Folia Haematol 1975; 102: 201
- 125 Waks D, Arnout J, Demulder A, Ferster A, Fondu P: Inherited factor XIII deficiency. Acta Clin Belg. 1989;44(1):52-7
- 126 Wartiovaara U, Perola M, Mikkola H, Totterman K, Savolainen V, Penttila A, et al. Association of Faktor XIII Val34Leu with decreased risk of myocardial infarction in Finnish males. Atherosclerosis 1999;142:295-300
- 127 Webb GC, Coggan M, Ichinose A, Board PG: Localization of the coagulation factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus. Hum Genet. 1989 Jan; 81(2):157-60.
- 128 Wilmer M, Rudin K, Kolde H, Poetzsch B, Lenz W, Moessmer G, Meili E, Egbring R,

Gempeler-Messina P, Gempeler M, Bastian S, Kohler H: Evaluation of a sensitive colorimetric Faktor XIII incorporation assay. Effects of Faktor XIII Val34Leu, plasma fibrinogen concentration and congenital Faktor XIII deficiency. *Thromb Res.* 2001 Apr 1;102(1):81-91

- 129 Yee VC, Le Trong I, Bishop PD, Pedersen LC, Stenkamp RE, Teller DC: Structure and function studies of factor XIIIa by x-ray crystallography. *Semin Thromb Hemost.* 1996;22(5):377-84

8. Anhang

Es folgt eine Aufstellung der detaillierten Ergebnisse der mit Hilfe der Standardkurven (Abbildung 4) errechneten und in den Tabellen 6-8 zusammengefassten Faktor XIII-Aktivitätsbestimmungen im PRP, PPP und TZK bei gesunden, heterozygoten, doppelt heterozygoten und homozygoten Probanden.

Die Angaben erfolgen in absoluten Zahlen (Counts) und in Prozent der Aktivität des gepoolten Standardplasmas nach Inkubationszeiten von 30, 60 und 120 Minuten:

Faktor XIII-Aktivität des Probanden	Probe	Thrombozyten /mm ³ Blut x 10 ³	Aktivität des Faktor XIII bzw. Einbaurate des C ¹⁴ -markierten Putrescin in Casein						Aktivitäts-Mittelwert der jeweils 3 Messungen pro Proband in %
			nach 30 Minuten		nach 60 Minuten		nach 120 Minuten		
			in Counts	in %	in Counts	in %	in Counts	in %	
Gesund 1	R.S. PRP 0	553	41.747	179	69.208	174	91.274	160	171
	R.S. PRP 1	22	43.122	198	75.219	215	95.882	199	204
	R.S. PPP 0	6	35.372	100	60.212	115	85.072	109	108
	R.S. PPP 1	0	35.991	110	61.647	121	86.175	114	115
	R.S. TZK 0	842	29.213	46	49.726	58	74.957	55	53
	R.S. TZK 1	24	31.470	59	50.180	60	75.882	58	59
Gesund 2	R.E. PRP 0	410	39.824	156	70.006	178	90.828	158	164
	R.E. PRP 1	35	42.062	186	73.752	203	93.926	184	191
	R.E. PPP 0	6	36.278	114	58.092	104	85.526	112	110
	R.E. PPP 1	1	36.542	123	60.198	115	87.413	122	120
	R.E. TZK 0	898	31.343	58	48.714	55	76.232	61	58
	R.E. TZK 1	15	32.107	66	49.685	58	77.250	65	63
Gesund 3	A.D. PRP 0	397	40.726	164	65.220	150	91.837	163	159
	A.D. PRP 1	16	41.938	185	70.963	183	95.028	196	188
	A.D. PPP 0	7	34.860	94	56.546	94	83.385	100	96
	A.D. PPP 1	0	35.813	104	57.033	98	85.362	110	104
	A.D. TZK 0	794	29.825	48	47.389	50	75.108	55	51
	A.D. TZK 1	32	30.751	53	48.072	54	76.341	61	56
Gesund 4	A.I. PRP 0	382	39.147	149	69.187	174	92.806	172	165
	A.I. PRP 1	8	43.846	208	71.124	188	96.249	201	199
	A.I. PPP 0	5	35.661	102	57.807	101	84.644	106	103
	A.I. PPP 1	0	35.955	109	59.315	109	86.628	118	112
	A.I. TZK 0	763	29.811	48	49.748	58	76.543	62	56
	A.I. TZK 1	17	31.890	60	50.212	60	77.462	66	62

Tabelle 15: Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen bei gesunden Probanden

Faktor XIII-Aktivität des Probanden	Probe	Thrombozyten /mm ³ Blut x 10 ³	Aktivität des Faktor XIII bzw. Einbaurate des C ¹⁴ -markierten Putrescin in Casein						Aktivitäts-Mittelwert der jeweils 3 Messungen pro Proband in %
			nach 30 Minuten		nach 60 Minuten		nach 120 Minuten		
			in Counts	in %	in Counts	in %	in Counts	in %	
Heterozygot 1	H.S. PRP 0	451	33.414	78	55.964	90	80.221	84	84
	H.S. PRP 1	19	34.971	94	58.821	109	84.524	106	103
	H.S. PPP 0	4	22.404	28	42.364	37	68.119	37	34
	H.S. PPP 1	0	24.156	32	44.876	40	70.843	42	38
	H.S. TZK 0	786	18.008	20	25.051	14	52.108	17	17
	H.S. TZK 1	26	16.759	18	30.613	19	58.314	23	20
Heterozygot 2	U.J. PRP 0	430	34.348	86	53.146	76	79.206	78	80
	U.J. PRP 1	28	35.101	96	57.257	99	81.731	90	95
	U.J. PPP 0	6	21.328	26	37.759	28	65.806	33	29
	U.J. PPP 1	1	21.292	26	39.936	32	68.496	38	32
	U.J. TZK 0	825	16.102	17	22.670	12	48.224	16	15
	U.J. TZK 1	24	16.807	18	25.112	14	53.850	19	17
Heterozygot 3	M.J. PRP 0	510	34.500	90	54.976	85	83.750	101	92
	M.J. PRP 1	6	36.167	113	57.199	99	84.366	103	105
	M.J. PPP 0	5	24.182	32	41.718	35	63.207	29	32
	M.J. PPP 1	0	24.950	33	43.057	38	66.214	34	35
	M.J. TZK 0	751	11.124	11	30.582	19	55.419	21	17
	M.J. TZK 1	11	11.248	11	33.157	22	59.102	24	19
Heterozygot 4	S.J. PRP 0	503	33.062	75	53.437	77	80.885	85	79
	S.J. PRP 1	18	33.395	78	56.288	92	82.292	94	88
	S.J. PPP 0	6	22.059	27	33.844	22	60.754	26	25
	S.J. PPP 1	0	22.042	27	34.423	23	64.329	31	27
	S.J. TZK 0	734	12.862	13	21.075	11	47.012	15	13
	S.J. TZK 1	34	13.753	14	21.983	12	53.819	19	15

Tabelle 16: Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen bei heterozygoten Probanden

Faktor XIII-Aktivität des Probanden	Probe	Thrombozyten /mm ³ Blut x 10 ³	Aktivität des Faktor XIII bzw. Einbaurate des C ₁₄ -markierten Putrescin in Casein						Aktivitäts-Mittelwert der jeweils 3 Messungen pro Proband in %
			nach 30 Minuten		nach 60 Minuten		nach 120 Minuten		
			in Counts	in %	in Counts	in %	in Counts	in %	
dopp. Heterozyg.	L.H. PRP 0	472	3.252	3	7.812	3	17.651	3	3
	L.H. PRP 1	11	3.468	3	7.984	3	14.508	2	3
	L.H. PPP 0	5	3.228	3	5.121	2	11.665	2	2
	L.H. PPP 1	0	2.247	2	4.992	2	12.218	2	2
	L.H. TZK 0	819	2.615	2	4.256	2	18.024	3	2
	L.H. TZK 1	28	2.701	2	4.452	2	18.841	3	2
Homozygot 1	J.T. vor* PRP 0	420	2.143	2	4.371	2	12.537	2	2
	J.T. vor* PRP 1	23	2.456	2	4.770	2	17.552	3	2
	J.T. vor* PPP 0	3	2.353	2	4.952	2	12.153	2	2
	J.T. vor* PPP 1	0	2.369	2	5.017	2	15.502	3	2
	J.T. vor* TZK 0	798	2.667	2	4.577	2	13.167	2	2
	J.T. vor* TZK 1	28	2.779	2	4.803	2	13.844	2	2
Homozygot 2	J.T. nach* PRP 0	404	25.975	35	42.952	38	69.452	39	37
	J.T. nach* PRP 1	14	26.751	36	43.207	38	70.263	40	38
	J.T. nach* PPP 0	5	23.712	31	41.009	34	63.884	30	32
	J.T. nach* PPP 1	0	23.808	31	41.732	35	63.922	30	32
	J.T. nach* TZK 0	834	2.542	2	4.820	2	12.815	2	2
	J.T. nach* TZK 1	21	3.213	3	5.107	2	13.258	2	2
gepooltes Plasma	Standard 100 %	7	35.412	100	57.556	100	83.471	100	100
	Standard 50 %	5	30.136	50	47.423	50	73.442	50	50
	Standard 25 %	4	21.204	25	35.878	25	59.963	25	25
	Standard 12 %	3	12.304	12	22.839	12	42.129	12	12
	Standard 6 %	3	6.772	6	14.711	6	29.714	6	6
	Standard 3 %	2	3.370	3	7.908	3	17.790	3	3

Tabelle 17: Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen bei doppelt heterozygoten und homozygoten Probanden und bei dem gepooltem Standardplasma vor*/nach*: vor bzw. nach Substitution von 2.500 IE Faktor XIII-Konzentrat

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Egbring,
Engel, Eschenbach, Ganz, Geus, Golenhofen, Gotzen,
Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Havemann,
Huffmann, Kern, Kleinsasser, Klenk, von Kraft,
Krieg, Lennartz, Lührmann, Mannheim, Masarat,
Pohlen, Prinz, Riedmiller, Rothmund, Schüffel,
Schulz, Schwerk, Seitz, Thomas, Unsicker, Vohland,
von Wichert, Zelder,

Danksagung

Ganz besonders herzlichen Dank sagen möchte ich Herrn Professor Dr. med. R. Egbring für die Überlassung des Themas und seine freundliche und immer hilfsbereite und geduldige Führung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Gerinnungslabors, speziell bei Iris, Barbara und Lydia, sowie bei allen, die mich bei dieser Aufgabe unterstützt haben, herzlich bedanken.
