Universität Ulm
Zentrum für Chirurgie
Institut für Biomechanik und unfallchirurgische Forschung

Leiter: Pof. Dr. L. E. Claes

Einfluss einer systemischen Faktor XIII-Applikation auf die Kallusregeneration

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin,
Dr. med.,
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm.

Johanna Maria Lieb
geboren in Peißenberg, Oberbayern

2008

Meinen Schirmherren und Freunden -

Marianne Laßmann und

Hubert Gentner.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. K.-M. Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Claes

2. Berichterstatter: PD Dr. B. Friemert

Tag der Promotion: 19.Juni 2009

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung **1**

2. Material und Methoden **3**

2.1 Grundlagen 3

2.1.1 Knochenheilung, Wundheilung, Blutgerinnung 3

2.1.2 Blutgerinnungsfaktor XIII 7

2.1.3 FXIII und Wundheilung 14

2.1.4 FXIII und Knochenheilung 18

2.2 Studiendesign 27

2.3 Ringfixateur externe 27

2.4 Operation 28

2.5 FXIII-Konzentrat 32

2.6 Tierhaltung und Pflege 33

2.7 Versuchsablauf 33

2.8 Auswertung 34

3. Ergebnisse **44**

3.1 Biomechanik und Morphologie 44

3.2 Histologie 47

3.2.1 Durchlichtmikroskopie 47

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie 54

3.2.3 Distanzmessung 57

4. Diskussion **63**

5. Zusammenfassung **77**

6. Literaturverzeichnis **79**

7. Danksagung

8. Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CT	Computertomographie
d	Tag
EKG	Elektrokardiographie
FXIII	Faktor XIII, Blutgerinnungsfaktor
HE	HE-Färbung = Hämatoxylin-Eosin-Färbung
i.E.	internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
ΔL	Verformung
Max	Maximum
mCi	Milli-Curie
Min	Minimum
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
^{99}mTc	Technetium, hergestellt durch Neutronenbeschuss von ^{99}Molybdän, verwendet in der Nuklearmedizin
MW	Mittelwert
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NH_2-Terminus	Aminogruppe
nm	Nanometer
PC	personal computer
S	Symbol für Drucksteifigkeit
s	Strecke
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
t-PA	tissue-Plasminogenactivator, gewebsspezifischer Plasminogenaktivator
v	Geschwindigkeit
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

1. Einleitung

1.1 Hinführung zum Thema und Fragestellung

Der Faktor XIII wurde in den 1940er Jahren erstmalig beschrieben von K. C. Robbins [58] und von K. Laki zusammen mit L. Lorand [35]. Robbins bezeichnete den Faktor XIII als „Serum-Faktor“ und wichtigen Bestandteil der Blutgerinnselstabilisierung.

In das klinische Bewusstsein trat der Faktor XIII erst in den 1960er Jahren, als Berichte von Duckert [21] über eine Familie mit angeborenem Faktor XIII-Mangel und ein parallel hierzu beschriebenes, charakteristisches klinisches Bild von Wundheilungsstörungen die Aufmerksamkeit der Hämostaseologen auf sich zogen.

Im Jahr 1963 nahm das International Commitée on Thrombosis and Haemostasis den sogenannten „Serum-“ oder „Fibrinstabilisierenden Faktor“ offiziell in die Reihe der Blutgerinnungsfaktoren auf, und zwar an 13. und damit letzter Stelle. Hieraus resultiert auch der Name des „Faktor XIII“.

Das Gerinnungssystem besteht aus einer Kaskade nacheinander geschalteter, aktivierbarer, proteolytisch aktiver Faktoren. Am Ende dieser Kaskade steht die Spaltung von Fibrinogen in einzelne Fibrinmonomere, welche wiederum durch nicht kovalente Bindungen untereinander polymerisieren. Im Schritt der Polymerisation übernimmt der Faktor XIII die Induktion und Katalyse von kovalenten Bindungen zwischen den Fibrinmonomeren. Da die Fibrinpolymerisation für die Stabilität des Blutgerinnsels verantwortlich und dieses wiederum Voraussetzung für einen suffizienten Wundverschluss ist, stellt eine effektive Blutgerinnung daher die Grundlage für einen ungestörten Wundheilungsprozess dar. Heute werden dem Faktor XIII weit mehr als nur hämostaseologische Funktionen zugewiesen und der explizite Einfluss des Faktor XIII auf die Wundheilung wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht und als positiv belegt.

Deutlich weniger Untersuchungen gibt es zur Funktion des Faktor XIII auf den Prozess der Frakturheilung, obwohl auch hier bereits ein fördernder Einfluss des Faktor XIII unter zeitlichen, qualitativen und quantitativen Aspekten gezeigt werden konnte, vor allem in Fällen von verzögerter Knochenheilung. Es existieren einige Thesen zum Mechanismus und einige Aussagen zur zeitlichen Beobachtung eines positiven Effekts der FXIII-Applikation im Rahmen der Frakturheilung. Zwar ist der molekulare Wirkungsmechanismus des FXIII im Rahmen der Blutgerinnung sehr genau bekannt, nicht aber der genaue molekulare Mechanismus der FXIII-Wirkung im Rahmen der Knochenheilung.

Ziel dieser Arbeit ist es, für einen bereits biomechanisch belegten positiven Effekt des FXIII auf die Knochenheilung ein histomorphologisches Korrelat zu finden.

Die bisherige Meinung in der Literatur, dass eine FXIII-Therapie im Rahmen der Knochenheilung längerfristig nur bei erniedrigten und nicht bei normalen FXIII-Spiegeln einen Benefit bringt, soll anhand gewonnener Ergebnisse erneut überdacht werden. (Für diese Arbeit untersuchen wir daher den FXIII-Effekt in einem reinen Additionsmodell bei präoperativ suffizienten FXIII-Spiegeln.)

Ausserdem sollen die Ergebnisse dieser Studie im Kontext mit den bislang vorherrschenden Hypothesen, die in anderen Studien zum Thema FXIII und Wund- oder Knochenheilung gewonnen wurden, im Hinblick auf die Frage nach dem bisher nicht genau bekannten Wirkungsmechanismus des FXIII auf die Knochenheilung diskutiert werden.

2. Material und Methoden

Auf den folgenden Seiten sollen zunächst grundlegende Informationen für das Verständnis der Arbeit, der FXIII in seinem biochemischen Profil und Hypothesen zum Wirkungsmechanismus des FXIII im Rahmen der Wund- und Knochenheilung vorgestellt werden.

2.1 Grundlagen

2.1.1 Knochenheilung, Wundheilung, Blutgerinnungssystem

Histologie der Knochenheilung

Der Ablauf der Knochenheilung kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden.
Am Anfang steht die Frakturphase, also die Zeitspanne der Gewalteinwirkung auf den Knochen und der Verletzung von Periost, Kortikalis, Knochenmark und angrenzenden Weichteilen. Eine hieraus resultierende Blutung wird durch die körpereigene Blutgerinnung zum Stillstand gebracht. Das entstandene Hämatom wird im weiteren Verlauf von den vorhandenen Zellen organisiert.
Die ersten zwei bis drei Tage post fractionem befindet sich das Frakturareal in der Entzündungsphase. Hier kommt es zu einem überschießenden Einsprossen von Kapillaren aus den benachbarten Arealen, Havers-Kanälen und Gefäßen des Markraums. Kapillär eingeschwemmte und chemotaktisch rekrutierte Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen proliferieren und beginnen mit der Organisation des Hämatoms. Zusätzlich wandern bereits in dieser Phase osteogene Zellen ein.
Es schließt sich die Granulationsphase an. Hier beginnen vorhandene Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten mit einer Steigerung ihrer Aktivität. Das interfragmentäre Hämatom wird durch Granulationsgewebe ersetzt und es entsteht bereits früh eine weiche Faserknochenmanschette über den Frakturspalt hinaus. Fibroblasten synthetisieren Kollagen und damit ein gefäß- und faserreiches Bindegewebe, Chondroblasten produzieren gefäßarmen Knorpel.
In der Phase der Kallushärtung werden beide Gewebearten schrittweise durch Geflechtknochen ersetzt. Somit entsteht der sogenannte Kallus und damit eine erste knöcherne Verbindung der Frakturenden. Der entstandene Geflechtknochen härtet im Lauf der Zeit durch zunehmende Mineralisation aus. Für den Prozess der Mineralisation sind lokal hohe Calcium-Konzentrationen und eine dem erhöhten Stoffwechsel angepasste Vaskularisation notwendig.

In der Phase des Modelling-Remodelling beginnen die anstehenden Umbauprozesse. Schrittweise wird vorläufiger Geflechtknochen in hochwertigeren Lamellenknochen umgebaut. Circa 3 Wochen post fractionem durchziehen die ersten Osteone den Frakturspalt. Der gesamte Umbau dauert mehrere Jahre.

Durch Modelling wird der Lamellenknochen der späteren mechanischen Beanspruchung angepasst, durch Remodelling werden annähernd ehemalige Knochenkontur und -form wiederhergestellt.
Abbildung 1 zeigt noch einmal schematisch die makroskopischen Stadien der sekundären Frakturheilung.

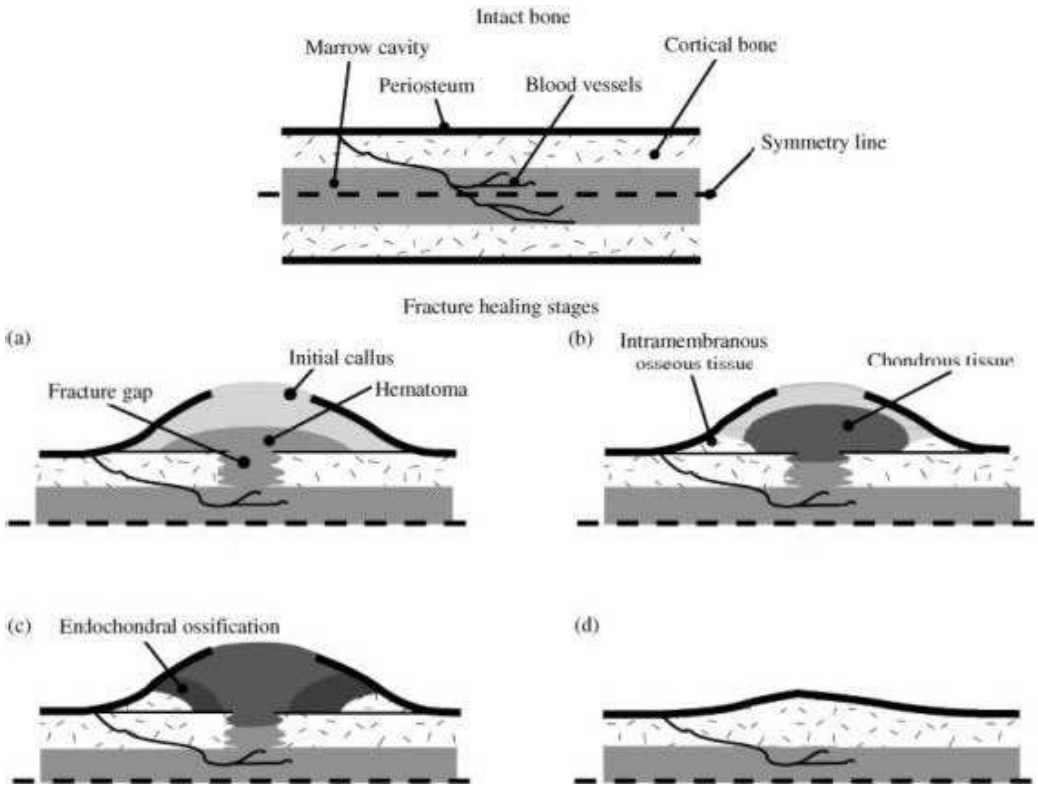


Abb. 1: Verschiedene Stadien der Sekundärheilung; a: Entstehung des initialen Kallus mit Hämatom; b: Bildung von Ersatzgewebe; c: Geflechtknochenbildung; d: Herstellung der originären Struktur durch Lamellenknochen [38]

Wundheilung

Die Wundheilung stellt einen multifaktoriellen Prozess dar, der auf eine möglichst schnelle und suffiziente Wundverschließung abzielt um das Risiko für Blutverluste und Infektionen zu minimieren. Die Wundheilung läuft in verschiedenen Phasen ab, die fließend ineinander übergehen.
In der ersten Phase kommt das Gerinnungssystem zum Tragen und sorgt nach erfolgter Hämostase für die Ausbildung einer provisorischen Fibrinmatrix. Die Dauer dieses Vorgangs liegt im Bereich von ein bis zwei Stunden. Im Anschluss folgt die Entzündungsphase, in der durch Zellfragmente und Aktivierungsprodukte des Gerinnungssystems Entzündungszellen angelockt werden. In dieser Phase werden eingedrungene Keime neutralisiert und Faktoren gebildet, die eine Entzündungsreaktion auslösen sowie die Einwanderung von Fibroblasten und Endothelzellen stimulieren. Die Dauer dieses Abschnitts liegt im Bereich von Tagen. In der folgenden Granulationsphase synthetisieren die eingewanderten Zellen Matrixproteine und bauen ein Granulationsgewebe auf. Gleichzeitig beginnt die Wundkontraktion, die den Wunddurchmesser reduzieren soll. Die Dauer dieses Vorgangs liegt im Bereich von Wochen. Die Phase des Umbaus, in der das synthetisierte Granulationsgewebe zu einem mehr oder weniger funktionell aktiven Narbengewebe konvertiert wird, dauert oft mehrere Jahre.

Blutgerinnung und Fibrinolyse

Das Gerinnungssystem besteht aus einer Kaskade nacheinander geschalteter, aktivierbarer, proteolytisch aktiver Faktoren. Am Ende dieser Kaskade steht die Spaltung von Fibrinogen in Fibrin, die Basis eines stabilen Thrombus.

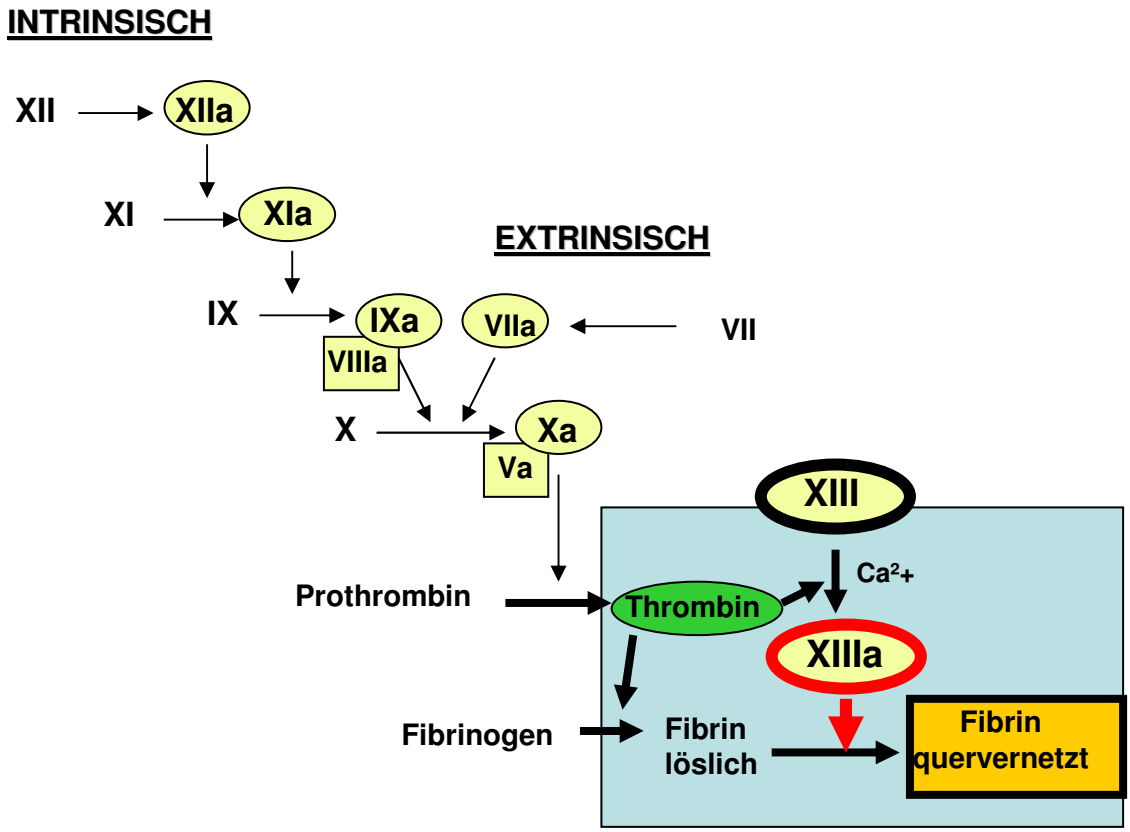


Abb. 2: Gerinnungskaskade (extrinsischer und intrinsischer Aktivierungsweg) mit gemeinsamer Endstrecke.
Blau hinterlegt: Aktivierung und Funktion des FXIII

Potentiell bestehen zwei Möglichkeiten der Aktivierung des Gerinnungssystems: Intrinsisch über den Kontakt zu Fremdoberflächen und Thrombozytenzerfall, extrinsisch über die Gewebsverletzung und daraus resultierendes Gewebsthromboplastin. Beide Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke, die letztendlich über die aktivierten Faktoren Va und Xa zusammen mit Calcium Prothrombin in Thrombin spalten. Thrombin wiederum spaltet Fibrinogen in Fibrinmonomere. Diese Fibrinmonomere sind in der Lage, sich zu Fibrinpolymeren zusammenzulagern. Dennoch bleibt das entstandene Fibrin noch löslich. Erst der Einsatz des aktivierten FXIII ermöglicht zusammen mit Calcium die kovalente Verbindung der einzelnen Monomere im Fibrin. So entsteht ein Thrombus auf der Basis des unslöslichen Fibrins.

Ein zur Blutgerinnung spiegelbildliches System stellt die Fibrinolyse dar. Die physiologische Bedeutung der fibrinolytischen Potenz besteht in der Lösung übermäßiger intravaskulärer Fibrinniederschläge. Zwischen beiden Systemen wird ein dynamisches Gleichgewicht angenommen.

2.1.2 Blutgerinnungsfaktor XIII

Geschichte

Bereits 1923 wiesen Barkan und Gaspar in ihren „Untersuchungen der Fibringerinnung [1]“ auf die Mitwirkung von Kalziumionen bei der Gerinnselstabilisierung hin. Robbins beobachtete 1944, dass Fibringerinnsel aus normalem Vollblut in 5 mol/l Harnstofflösung und in 1%iger Monochloressigsäure unlöslich sind, während Koagula, die aus hochgereinigtem Fibrin und Thrombin in vitro hergestellt werden, sich in den selben Agenzien lösen. Diese Beeinflussung des Lösungsverhaltens von Fibrin führte er auf eine weitere Serumkomponente zurück und beschrieb damit erstmalig den Faktor XIII als „Serum-Faktor“ [58, 28]. Im Jahr 1948 bestätigten Laki und Lorand mit gereinigten Testsystemen Robbins` Beobachtung, gleichzeitig gelang es ihnen, den „Serumfaktor“ – oder auch „L-L-Faktor (Laki-Lorand)“ zu isolieren und zu charakterisieren [35, 28]. Lorand und Jacobsen zeigten 1958 den quantitativen Zusammenhang zwischen Fibrinogen und dem „Fibrinstabilisierenden Faktor (FSF)“ [41]. 1961 bewiesen Loewy et al. den enzymatischen Wirkmechanismus des FSF als den einer Transamidase und nannten ihn „Fibrinase“ [28, 40, 39]. Im Jahr 1963 erkannte das International Committee on Thrombosis and Haemostasis den bis dahin so unterschiedlich bezeichneten Faktor als „Blutgerinnungsfaktor XIII“ an. Matacic und Loewy beschäftigten sich weiterhin mit der Enzymwirkung und ordneten den Faktor XIII 1966 in die Enzymklasse der „Transglutaminasen“ ein [43]. Lorand et al. fügten 1969 noch den Begriff der „Fibrinoligase“ hinzu.

Tab. 1: Synonyma des Blutgerinnungsfaktors XIII (nach Rasche [57])

Autor	**Bezeichnung**
Robbins, 1944	Serumfaktor
Loewy und Edsall, 1954	Laki-Lorand-Faktor (L-L-Faktor)
Lorand und Dickenmann, 1955	Fibrinstabilisierender Faktor (FSF)
Loewy et al., 1961	Fibrinase
International Committee on Thrombosis and Haemostasis, 1963	Blutgerinnungsfaktor XIII
Lorand und Konishi, 1964	Plasmapolymerase
Loewy et al., 1964	Plasmatransamidase
Matacic und Loewy, 1966	Plasmatransglutaminase
Lorand et al., 1969	Fibrinoligase

Biochemie und Funktion

Bei dem Faktor XIII handelt es sich aus biochemischer Sicht um ein Globulin vom Enzymtyp einer Transglutaminase, während sich die weiteren Blutgerinnungsfaktoren durch eine Serinprotease-Aktivität charakterisieren lassen.

Die zymogene Form des FXIII zeichnet sich durch ein extrazelluläres Vorkommen im Blutplasma, durch ein gewebeständiges Vorkommen in der Plazenta und durch ein intrazelluläres Vorkommen in Thrombozyten, Megakaryozyten und Monozyten aus. Während die extrazelluläre Form des Faktor XIII als heterotetramerer Komplex aus zwei a- und zwei b-Untereinheiten in nicht-kovalenter Bindung zirkuliert, handelt es sich bei der intrazellulären und gewebeständigen Form lediglich um Dimere aus zwei nicht-kovalent gebundenen a-Untereinheiten [52].
Die a- und b-Untereinheiten unterscheiden sich nicht nur in ihrem Vorkommen, sondern auch in ihrer Konzentration, Form, Größe, Gewicht, Aufbau, Halbwertszeit und Funktion. Während die nur extrazellulär vorkommende b-Untereinheit in einer durchschnittlichen Plasmakonzentration von 21µg/ml mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 5h Stunden gefunden wird, liegt die intra- sowie extrazellulär präsente a-Untereinheit mit einer Plasmakonzentration von 11µg/ml bei einer Halbwertszeit von 5 bis 12 Tagen vor.
Die b-Untereinheit besitzt bei einer Struktur aus 641 Aminosäuren ein Gewicht von 73,18 kDa, die a-Untereinheit bei 731 Aminosäuren ein Gewicht von 83,15 kDa. Die dreidimensionale Form der b-Untereinheit wird als lang gestreckt und flexibel beschrieben, die der a-Untereinheit als

asymmetrisch und kugelförmig [52]. Das aktive Zentrum des Enzyms Faktor XIII ist auf der a-Untereinheit lokalisiert, während die b-Untereinheit die Funktion eines Carrierproteins und die Stabilisierung der a-Untereinheiten übernimmt.

In der folgenden Tabelle sind noch einmal die spezifischen strukturellen Unterschiede der beiden Untereinheiten gegenübergestellt:

Tab. 2: Strukturelle Unterschiede der FXIII a- und b-Untereinheit

	a-Untereinheit	**b-Untereinheit**
Plasmakonzentration	11µg/ml	21µg/ml
Halbwertszeit	5-12 Tage	5 Stunden
Aminosäuren	731	641
Molekulargewicht	83,15 kDa	73,18 kDa
Thrombinspaltungsstellen	Aktivierung Arg37-Gly38, Inaktivierung Lys513-Ser oder Arg515-Ser	-
Aktives Zentrum	Cystein314	-
Ca^{2+}-Bindungsstellen	Position 251 und 473	-
Disulfidbrücken	-	20 (10 Tandems, sog. „Sushi-Domänen“)
Glykosilierungen, KH-Anteil	-	5%
Gen, Chromosomlokalisation	6p24-25, 14 Exons	1q32
„Leader-Sequenz“	-	+
Vorkommen	Intrazellulär, extrazellulär (Thrombozyten, Monozyten, Plazenta)	Extrazellulär
3D-Form	Asymmetrisch kugelförmig	lang gestreckt, flexibel

Die intrazelluläre a-Untereinheit kann aber jederzeit mit der im Plasma zirkulierenden b-Untereinheit einen Komplex bilden, der sich vom extrazellulären Faktor XIII nicht unterscheidet [6]. In dieser Weise reagierte der Faktor XIII, der aus der humanen Plazenta gewonnen wurde und von 1970 bis zum Anfang der 90er Jahre kommerziell erhältlich war unter dem Namen FibrogamminR (Behring). Seit den 90er Jahren findet der Faktor XIII als humanes Plasmakonzentrat klinische Anwendung in der Substitutionstherapie bei angeborenem als auch erworbenem Faktor XIII-Mangel.

Die Durchschnittskonzentration im Plasma beträgt 21µg/ml und wird in der Klinik mit 90 – 150% der Normkonzentration eines gepoolten Plasmas von mindestens 10 Normalspendern angegeben.

Die Faktor XIII a-Untereinheit kann zwar in vielen Geweben und Zellen nachgewiesen werden, dennoch ist ihre Herkunft nicht eindeutig geklärt. In Thrombozyten liegt die a-Untereinheit im Zytoplasma gelöst vor, während der Aktivierung der Thrombozyten findet allerdings keine Sekretion statt. Bei Monozyten findet sich die a-Untereinheit zytoplasmatisch gelöst als auch membranständig, aber auch hier kann eine Sekretion ausgeschlossen werden. Hepatozyten kommen für die Synthese der plasmatischen a-Untereinheit eher unwahrscheinlich in Frage, da Faktor XIII in den Leberzellen nur in sehr geringem Ausmaß nachweisbar ist. Untersuchungen an knochenmarktransplantierten Patienten zeigen, dass nach erfolgreicher Transplantation bei vorhandenem Chimärismus beim Empfänger die phänotypische a-Untereinheit des Spenders nachweisbar ist. Dies lässt die Folgerung zu, dass das hämatopoetische System zumindest zu einem Teil für die Synthese der Faktor XIII a-Untereinheit verantwortlich ist. [52]
Für die Synthese der b-Untereinheit kann eindeutig die Leber indentifiziert werden. Hepatozyten sind in vitro in der Lage, die b-Untereinheit zu synthetisieren. Ebenso weisen lebertransplantierte Patienten die phänotypische b-Untereinheit des Spenders vor. [52]

Der Gerinnungsfaktor XIII liegt im Plasma als Vorstufe in zymogener Form vor. Bei seiner Aktivierung handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, für den die Präsenz von Calciumionen und Fibrin(ogen) essentiell sind. Diese Aktivierungskaskade beginnt im ersten Schritt mit der proteolytischen Abspaltung eines Aktivierungspeptids am jeweiligen NH_2-Terminus der a-Untereinheiten, vermittelt durch die Serinprotease Thrombin (aktivierter Faktor II).
Da dieser Vorgang durch die Anwesenheit von Fibrin beschleunigt wird, besitzt Fibrin für den Faktor XIII nicht nur Substrat-Charakter, sondern auch Kofaktor-Aktivität. Das aktive Zentrum, befindlich auf der a-Untereinheit, wird aber trotz dieses ersten Schritts noch durch die Komplexbildung mit der b-Untereinheit blockiert. Die Anwesenheit von Calcium und ebenso von Substrat Fibrin ermöglicht nun die Dissoziation des 2a2b-Heterotetramers in zwei Dimere, 2a und 2b. Für diesen Prozess sind in vitro unphysiologisch hohe Calciumkonzentrationen notwendig. In vivo erleichtert das Vorhandensein von Faktor XIII-Substrat (Fibrin) diesen Vorgang, sowie die Vermutung, dass Faktor XIII im Komplex mit Fibrinogen und Calcium zirkuliert. [9, 52]

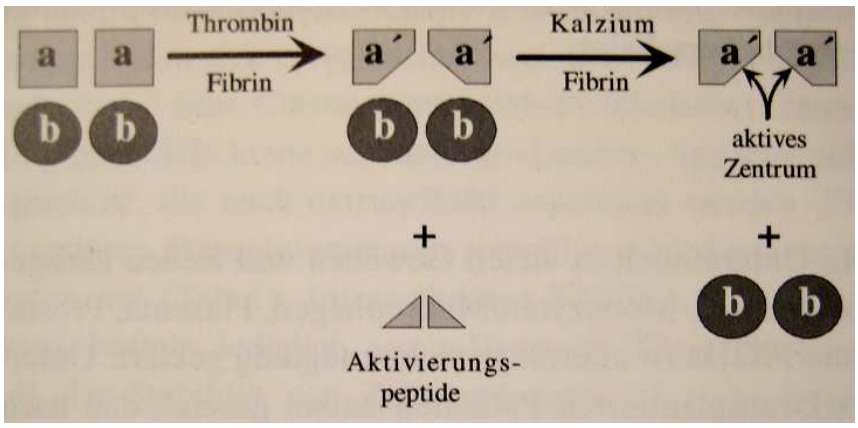


Abb. 3: FXIII-Aktivierungsmechanismus [52]

Die Inaktivierung von FXIII geschieht durch die proteolytische Spaltung durch Thrombin zwischen Lysin513 – Serin314.

Die wesentliche Funktion des Faktor XIII besteht in der Stabilisierung des Fibringerinnsels durch die Knüpfung kovalenter Bindungen zwischen einzelnen Fibrinmonomeren, zwischen Fibrin und weiteren Proteinen sowie zwischen weiteren Proteinen untereinander:

Tab. 3: Verbindungen, die durch FXIII katalysiert werden [44]

FIBRIN – FIBRIN
FIBRIN – FIBRINOGEN
FIBRIN – α2-PLASMIN-INHIBITOR
FIBRIN – FIBRONEKTIN
FIBRONEKTIN – KOLLAGEN
FIBRIN – VON WILLEBRAND FAKTOR
THROMBOSPONDIN – THROMBOSPONDIN
FAKTOR V – AKTIN
VON WILLEBRAND FAKTOR – KOLLAGEN
FIBRONEKTIN – MYOSIN
AKTIN – MYOSIN
GELSOLIN – FIBRIN / GELSOLIN
VINKULIN – FIBRIN
VITRONECTIN

Der Faktor XIII katalysiert hierbei die kovalente Amidbindung zwischen der γ-Carboxylgruppe eines proteingebundenen Glutamins und der ε-Aminogruppe eines Lysins.

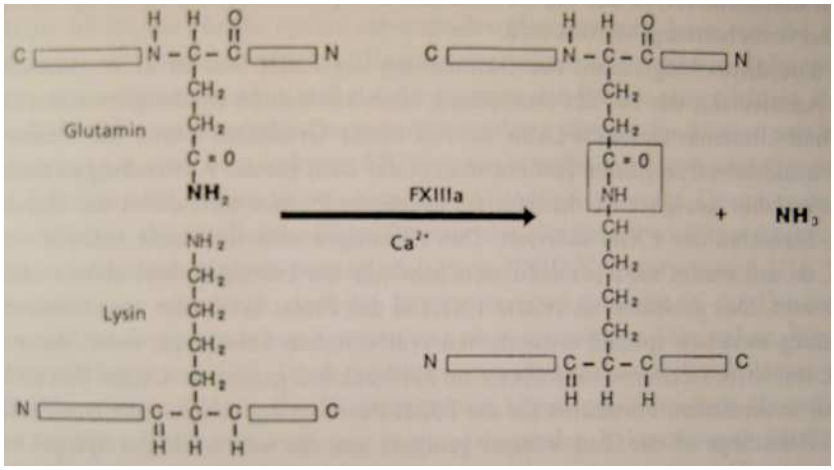


Abb. 4: Katalyse einer kovalenten Amidbindung zwischen der γ-Carboxylgruppe eines Glutamins und der ε-Aminogruppe eines Lysins durch aktivierten FXIII (= FXIIIa) [27]

FXIII interagiert auf zwei charakteristische Weisen mit Fibrin. Zum einen katalysiert er die Quervernetzung von Fibrin-γ-Ketten untereinander via Amidbindung zwischen der γ-Carboxyl-Gruppe des Glutamin398 und der ε-Amino-Gruppe des Lysin406 der nächsten γ-Kette. Diesem innerhalb weniger Minuten ablaufenden Prozess der γ-Dimersierung folgt eine wesentlich langsamer ablaufendere α-Dimerisierung über mehrere Stunden. [52]

Die Quervernetzung der einzelnen Fibrinmonomere durch FXIII dient der Verfestigung und Stabilisierung eines Fibringerinnsels. Physiologischer Weise läuft dieser Prozess in enger räumlicher Nähe zu Gefäßverletzungen ab. Dabei werden Strukturen der extrazellulären Matrix (Kollagen, Fibronektin) freigesetzt. Die Quervernetzung von Fibronektin und Kollagen mit Fibrin wird ebenso durch den FXIII katalysiert und dient sowohl der Anheftung des Fibringerinnsels an die Wundränder, als auch der Formation geeigneter Einwanderungspforten für Fibroblasten, die für die zelluläre und extrazelluläre Reorganisation im Rahmen der Wundheilung einen hohen Stellenwert besitzen [52]. Da Fibronektin zu den Gerüstsubstanzen der Fibroblastenzellmembran gehört, ermöglicht die FXIII-katalysierte Vernetzung von Fibrin und Fibronektin eine stabile Fixierung der Fibroblasten im Fibringerinnsel.

Eine weitere wichtige Quervernetzung durch den FXIII ist die Vernetzung von Fibrin und α2-Plasmin-Inhibitor, die ähnlich schnell abläuft, wie die γ-Dimerisierung, und für den Schutz des Gerinnsels vor einer zu raschen Auflösung durch Plasmin verantwortlich ist [52].

Abgebaut wird der FXIII durch die Leukozytenenzyme Elastase Like Protease (ELP) und Chymotrypsin Like Protease (CLP). Damit führt ein Leukozytenanstieg (z.B. bei Leukämien, in Entzündungsgebieten) folglich zu einer entsprechenden Erniedrigung des FXIII-Spiegels.

FXIII-assoziierte Pathologien im Überblick

Zu den mit dem Faktor XIII assoziierten Pathologien gehört in erster Linie der FXIII-Mangel in seinem breiten Spektrum von kongenital bis erworben. Der angeborene FXIII-Mangel wird als homozygot und heterozygot vorkommend mit den unterschiedlichsten genetischen Defekten beschrieben. Allen homozygoten Trägern gemeinsam ist das vollständige Fehlen einer FXIII-Aktivität sowohl im Plasma, als auch in allen Zelltypen, die normalerweise die a-Untereinheit enthalten (Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Megakaryozyten). [19, 23]
Der erworbene Faktor XIII-Mangel kommt bei internistischen und chirurgischen Patienten häufiger komplex mit anderen Defekten, seltener isoliert vor. Die nachfolgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über Krankheiten, die mit einem erworbenen FXIII-Mangel beschrieben wurden.

Tab. 4: Krankheiten mit einem nachgewiesenen erworbenen FXIII-Aktivitätsmangel (nach Egbring et al [23])

Akute/chronische Hepatitis und andere Lebererkrankungen
Erosive Gastritis
Akute/chronische myeloische Leukämie und andere knochenmarksinfiltrierende Prozesse
Disseminierte intravasale Gerinnung (DIC)
Schwere septische Infektionen
Sichelzellanämie
Morbus Crohn, Colitis ulcerosa
Kollagenosen
Verbrennungen
Postoperative Zustände

Sowohl der kongenitale als auch der erworbene FXIII-Mangel geht durch die graduelle Störung der Fibrinstabilisierung mit einer erhöhten Blutungsneigung einher. Seit 1970 können Patienten gezielt durch die spezifische FXIII-Substitution behandelt werden.

Pharmazie

Erstmalig auf dem Markt verfügbar waren FXIII-Konzentrate, gewonnen aus humanen Plazentazellen, im Jahr 1972. Aus humanen Plazentazellen gewonnene Faktor XIII a-Untereinheiten reagierten in vitro mit von Hepatozyten hergestellten b-Untereinheiten. Seit 1978 liegen Herstellung und Vertrieb des FXIII unter dem Namen Fibrogammin® in den Händen der Firma Behring in Marburg. 1984 wurde das Herstellungsverfahren erweitert durch die Hitzesterilisierung / Pasteurisierung. Dies signalisierte der Namenszusatz Fibrogammin® „HS“. Im Jahr 1993 wurde das aus Plazentazellen gewonnene FXIII-Konzentrat abgelöst durch FXIII, der nach den gängigen Methoden der Plasmaprodukt-Herstellung im Verfahren der Cohn-Fraktionierung mit anschließender Pasteurisierung, Virusabreicherung und Aufreinigung aus humanem Plasma gewonnen wird.
FXIII liegt heute in der Handelsform Fibrogammin® HS P 250/1250 als Lyophilisat-Trockensubstanz vor und muss für Infusionszwecke in Lösung gebracht werden.
Eine Einheit (1 I.E.) enstpricht dabei der Faktor XIII-Aktivität von 1ml frischem Zitratplasma gesunder Patienten.
Zugelassen ist Fibrogammin® HS P derzeit zur Therapie des kongenitalen und erworbenen FXIII-Mangels, damit verbundenen Blutungsneigungen und Wundheilungsstörungen, außerdem topisch zur supportiven Therapie des Ulcus cruris venosum.

2.1.3 FXIII und Wundheilung

Zahlreiche experimentelle Untersuchungen zeigten, dass der FXIII nicht nur hämostaseologische Funktion hat, sondern darüber hinaus auch an einem ungestörten Wundheilungsprozess beteiligt ist.
Betrachtet man die verschiedenen Wundheilungsphasen parallel zu den Faktor XIII-Substraten, so liegt nahe, dass der Faktor XIII seine wesentliche Wirkung in der frühen Phase der Wundheilung entfaltet. Hier steht die Ausbildung einer geeigneten provisorischen Matrix als Grundlage für die Synthese von Granulationsgewebe im Vordergrund.
Klinische Daten zeigen, dass bei Patienten mit angeborenem oder erworbenem FXIII-Mangel Wundheilungsstörungen häufiger auftreten als bei einem Normalkollektiv und, dass diese Situation durch die Substitution von FXIII verbessert werden kann. Speziell bei angeborenem FXIII-Mangel werden etwa bei einem Drittel der Patienten Wundheilungsstörungen beschrieben [45].

In vitro präklinisch

Die Arbeitsgruppe um Duckert beschrieb bereits sehr früh, dass Fibroblasten in einer FXIII-quervernetzten Matrix besser migrieren und proliferieren [45, 2]. In neueren Arbeiten zeigten Miyachi et al. mittels des ^{3}H-Thymidin-Einbaus, dass plazentare und plasmatische FXIII-Präparate in gleicher Weise die Fibroblastenproliferation stimulieren. Im Gegenversuch ließ sich dieser Effekt durch polyklonale Antikörper gegen Faktor XIII inhibieren [45]. Bruhn et al. gelangten zu ähnlichen Ergebnissen bei den Untersuchungen zum Effekt von FXIII-Konzentraten in An- oder Abwesenheit von Thrombin auf freie Fibroblasten und transformierte Zellen. Während FXIII den ^{3}H-Thymidin-Einbau in Fibroblasten stimulierte, mussten bei transformierten Zellen deutlich höhere FXIII-Konzentrationen eingesetzt werden, um ähnliche Effekte zu erzielen [45, 9, 10, 4].

Ueki et al. beschrieben eine direkte Verstärkung der Fibroblasten-Adhäsion an eine FXIII-beschichtete Oberfläche [46, 65] und Brown et al. konnten zeigen, dass die Wirkung von FXIII auf Zellen auch indirekt durch die Matrix vermittelt sein kann [45, 8], d.h. die Fibroblastenmigration ist in einer FXIII-quervernetzten-Matrix gegenüber einer nicht quervernetzten erhöht.

Paye et al. wiederum wiesen nach, dass die FXIII-Quervernetzung einer Fibrin-Fibronectin-Matrix zum einen die Adhäsion der Fibroblasten verbessert und zum anderen deren Kollagensynthese stimuliert und deren Syntheseleistung erhöht [45, 54].

Neben seiner Wirkung auf Fibroblasten wurden dem Faktor XIII immer wieder auch Effekte auf andere Zellen, wie Endothel, glatte Muskulatur, epidermale und epitheliale Zellen sowie Makrophagen zugeschrieben.

Tabelle 5 zeigt in einer Zusammenstellung die unterschiedlichen Wirkungen von Faktor XIII auf die genannten Zellen.

Tab. 5: Effekte von FXIII auf unterschiedliche Zellen in vitro [45, 48, 4, 65, 8, 54, 68, 30, 11]

Zelltyp	Adhäsion	Migration	Proliferation	DNA-Synthese
Fibroblasten	+	+*	+	+
Epithelzellen** Intestinal Embryo/Lunge	 +***	+	+/-	
Glatte Muskelzellen				+
Osteoblasten			+	
Makrophagen		-*		
Endotheliale Zellen				+
Epidermale Zellen		-	-	

* in Fibringelen ** Ratte *** mit Fibronectin

Vor allem die Beeinflussung der Durchlässigkeit von Endothelzellen sowie die Modifizierung der Genexpression bei Wundheilungsvorgängen durch den Faktor XIII ergaben neue Ansätze zum besseren Verständnis der klinisch beobachteten Effekte des FXIII auf die Wundheilung [45, 68, 30]. Wozniak et al. beleuchteten den Einfluss des FXIII auf das Endothel und zeigten eine Senkung der Endothelpermeabilität im Monolayer durch aktivierten FXIII um 30 +/- 7%. Dafür verantwortlich gemacht wird die FXIII a-Untereinheit mit ihrem aktiven Zentrum. Die Hypothese des Eindringens von aktiviertem FXIII in die Spalträume für parazellulären Makromolekültransport im Endothel und die dortige Vernetzung von Matrixproteinen konnte experimentell durch eine vermehrte Anreicherung des FXIII (Nachweis mittels Antikörper, Immunfluoreszenz) in den endothelialen Spalträumen bei induzierter reaktiver Hyperpermeabilität bestätigt werden. Inaktiver FXIII zeigte keinen Einfluss auf die Permeabilität des Endothels.

Ein entsprechendes klinisches Äquivalent wurde anhand verbesserter Granulation und verminderter Wundsekretion nach lokaler Applikation von FXIII bei chronisch venösen Ulzera beobachtet [68].

Calatzis et al. untersuchten in vitro den Einfluss von FXIII auf die Gerinnselfestigkeit. Die durchschnittliche Zunahme der Gerinnselfestigkeit betrug 34 ± 15% bei einer initialen FXIII-Aktivität < 75%, 12 ± 8% bei einer initialen FXIII-Aktivität > 75% [11].

Carmassi et al. untersuchten den Einfluss der FXIII-katalysierten Quervernetzung auf die Fibrinolysezeit in vitro und in vivo und kamen hierbei zum Ergebnis, dass Fibrin von FXIII-Mangel-Plasma doppelt so schnell durch die Leukozyten-Elastase aufgelöst wurde, wie Fibrin von normalem Plasma. Vollständig quervernetztes Fibrin (komplett γ-dimerisiert, umfassend α-dimerisiert) durch die Gegenwart hoher FXIII-Konzentrationen imponierte mit einer doppelt so langen Lysezeit, wie nichtquervernetztes Fibrin (ohne FXIII) oder zwar vollständig γ –dimerisiertes, aber nur teilweise α-dimerisiertes Fibrin (in Gegenwart niedriger FXIII-Konzentration) [13]. Dadurch wiesen sie eindrücklich auf den extravaskulären Lyseschutzcharakter der FXIII-vermittelten α-Dimerisierung im Fibringerinnsel hin. Ähnliche Ergebnisse für FXIII-quervernetztes Fibrin bezüglich FXIII-dosisabhängiger Resistenz gegenüber Lyse durch t-PA/Plasminogen und Leukozyten-Elastase finden sich auch bei Edwards et al. [22].

In vivo präklinisch

Zur Beurteilung der Wirkung des FXIII auf die Wundheilung in vivo wurden zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen gemacht.

Biehl et al. untersuchten 1971 die Reißfestigkeit von Inzisionswunden an der Bauchhaut von Meerschweinchen mit dem Ergebnis einer durch prä- und postoperative FXIII-Behandlung erhöhten Wundfestigkeit und vermindert auftretenden Heilungsstörungen [5].
Tauber et al. untersuchten die Reißfestigkeit von abdominalen Faszienwunden am Kaninchen, konnten aber durch prä- und postoperative FXIII-Behandlung keine signifikanten Unterschiede feststellen [63], während Metzner et al. durch FXIII-Behandlung eine dosisabhängige signifikant erhöhte Reißfestigkeit von Schnittwunden im Rattenmodell zeigen konnten [45].
Isogai et al. entwickelten Tiermodelle mit reduzierter FXIII-Plasmakonzentration (FXIII-Abfall durch Schädigung der Rattenleber mit Tetrachlorkohlenstoff). Diese Tiere wiesen eine verzögerte Heilung von mikrovaskulären Anastomosen auf, welche durch FXIII-Substitution wieder normalisiert werden konnte [31].
Ebenso konnten Ogawa et al. an mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Ratten einen FXIII-Abfall und eine verzögerte Heilung von Brandwunden induzieren [51]. Auch hier konnte die Heilung durch eine FXIII-Substitution normalisiert werden.
Diehl et al. vermochten eine durch Corticosteroide ausgelöste Wundheilungsstörung durch FXIII Gabe zu relativieren [20].

Klinisch

Es existieren Studien, die den postoperativen Abfall des FXIII-Plasmaspiegels, zurückzuführen auf die vermehrte Gerinnungsaktivität, aufzeigen konnten. Zu erwähnen sind hierzu Studien von Schwab et al. [60].
Muto et al. untersuchten in einer Multicenterstudie, die 1997 veröffentlicht wurde, die Effekte von postoperativem FXIII-Mangel auf die mögliche Entstehung von Wundheilungsstörungen [49].
Meyer et al. stellten die Resultate in Ergänzung eigener klinischer Daten zu einer abgeleiteten Fragestellung dar. Zusammenfassend zeigte die Muto-Studie, dass ein „Anstieg der FXIII-Aktivität unter Substitution von signifikant höheren Besserungsraten bezüglich Ausheilung chronischer Wund- und Fistelverläufe begleitet wurde“ [46]. Ähnlich die Beobachtungen von Schwab et al. [60], die in der Wunheilungskomplikations-Gruppe systemisch einen signifikant höheren Faktor-XIII-Mangel darlegten.
Eine Fallbeschreibung von Jokiel et al. lässt einen direkten Zusammenhang zwischen einem nachgewiesenen ausgeprägten Faktor-XIII-Mangel und einer zeitlichen Übereinstimmung zwischen FXIII-Substitution und lokalem Heilungsfortschritt sehr wahrscheinlich erscheinen [32].

Studien von Brockmeier et al. [7] und Davids et al. [18] sprechen sich positiv für eine FXIII-Substitution bei HNO-Tumorpatienten nach Resektion mit konsekutiver Wundheilungsstörung aus. Diese These im Sinne einer prophylaktischen Anwendung bei Tumorresektionen im Kopf-Hals-Bereich stützen auch Chaoui et al. [14].

Die Effekte einer FXIII-Substitution bei therapierefraktärer Colitis ulcerosa wurde ebenso in zahlreichen Studien untersucht [42, 53, 52, 55, 12, 62, 19]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den meisten Patienten vor der Behandlung eine FXIII-Aktivität unterhalb des Normbereichs angetroffen wurde, die durch eine FXIII-Substiution angehoben werden konnte. Erstmalige Erfolge im Sinne eines Sistierens von intestinalen Blutungen durch den substituierten Ausgleich des FXIII-Defizits beschrieben Suzuki et al. [62] und Dempfle et al. [19]. Eine eindrucksvolle Besserung der klinischen Symptomatik und des koloskopischen Befundes erzielten die Studien von Lorenz [42] und Päge et al. [53]. Keinen nennenswerten Einfluss der FXIII-Substiution auf Entzündungsparameter oder Aktivierungsparameter der Gerinnung fand Ostermann [52]. Die Studien von Preuss et al. [55] mussten aufgrund niedriger Patientenzahlen abgebrochen werden.

Die topische Anwendung des FXIII wurde im Wundheilungsprozess von Ulcus cruris venosum-Patienten untersucht [67, 30, 66].

Wozniak et al. [67] konnten eine Stabilisierung des Wundverschlusses durch topische FXIII-Anwendung bei Ulcera cruris zeigen, ebenso führte die zusätzliche FXIII-Applikation zur Heparin-Standard-Behandlung im Fallbericht von Wigbels et al. [66] zu einer zügigen Abheilung des Ulcus cruris venosum. Ebenso berichtet ein Fallbeispiel von Knab et al. von der erfolgreichen Therapie eines erosiven gramnegativen Fußinfektes durch die Erweiterung der systemischen Therapie mit Faktor XIII [33]. Herouy et al. [30] konnten ergänzend eine positive Beeinflussung auf genetischer Ebene durch eine FXIII-Anwendung bei Ulkus-Patienten nachweisen. Hier vermochte der Faktor XIII durch noch nicht geklärte Mechanismen eine vorherrschende Imbalance zugunsten der Gewebsdegradation durch Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität auszugleichen.

2.1.4 FXIII und Frakturheilung

In vitro präklinisch

Kuglmeier untersuchte den Einfluss des FXIII auf die Proliferation von Osteoblasten in vitro [34]. Im Vergleich zu einer Kontroll-Zellkultur ließ sich ein Proliferationsanstieg um 22% in der Osteoblastenkultur unter Zugabe von 1 I.E. aktiviertem FXIII und ein Anstieg um 61% bei der

Applikation von 3 I.E. aktiviertem FXIII feststellen. Ebenso wurde hierbei ein signifikanter Anstieg des mineralisationsspezifischen Enzyms Alkalische Phosphatase beobachtet.

Meyer et al. untersuchten die Beeinflussung der In-vitro-Züchtung humaner Knochenzellkolonien durch den Faktor XIII [47]. Grundlage dieses Experiments war die Intention, minimalinvasiv und möglichst einfach knochenpotente Zellen zur autogenen Transplantation zu züchten. Verwendet wurde hierfür Patientenblut, das bei Spongiosaentnahmen abgesaugt wurde, in der Vorstellung, dass darin Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark enthalten seien. Mittels Dichtezentrifugation wurden die Zielzellen gewonnen und zusammen mit 50µg Vitamin C/ml und unterschiedlichen Medien im Brutschrank inkubiert. 100 ml Medium bestanden aus 87 ml Basismedium (minimal essential eagle medium), 10ml fetalem Kälberserum, 2 ml Glutamin, 1ml Antibiotikum/Antimykotikum und 0,6g Betaglycerophosphat. Vitamin C und die Phosphatkomponente wurden vor dem gesicherten Hintergrund ihrer Potenz, koloniebildende Fibroblasten (CFU-C, colony-forming unit fibroblast) in die osteogene Reihe zu verändern, appliziert. Als variable Zusätze wurden 125 I.E. Fibrogammin® HS (FXIII-Konzentrat) aktiviert mit 60 I.E. Thrombin, oder 100 ng TGF-ß1 oder beides in Kombination hinzugefügt. So entstanden für jede Probe vier Ansätze. Ausgewertet wurde nach sichtbaren Kolonien, Alkalische-Phosphatase-positiven Kolonien, bewachsener Grundfläche und dazugehöriger Alkalische-Phosphatase-positiver Fläche jeweils zu drei verschiedenen Zeitpunkten (nach 2, 3 und 4 Wochen). Zusammenfassend kam diese Studie zu dem Ergebnis, dass FXIII im genannten Versuchsaufbau zu einer signifikanten Minderung der koloniebildenden Wachstumseffizienz bei gleichzeitig erhöhter Aktivität an Alkalischer Phosphatase führte. Diese Steigerung der Aktivität der Alkalischen Phophatase durch Faktor XIII zeigte bei der weiteren Untersuchung ein signifikantes Niveau. Am deutlichsten war dieser Anstieg bei den Proben nach 2 Wochen und glich sich im Zeitverlauf und mit Zunahme des relativen Gesamtbewuchses der einzelnen Wachstumsfelder wieder dem der Kontrollgruppe an. Meyer et al. betrachteten die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als Parameter der Mineralisation und Differenzierung in die osteogene Reihe kritisch. Zwar existierte zum Zeitpunkt des Experiments kein wissenschaftlicher Beweis hierfür, doch Nijweide et al. [50] zeigten in einem Hemmversuch, dass ohne Alkalische Phophatase keine Mineralisation eintritt. Ebenso konnten Meyer et al. in vitro ausschließen, dass die Aktivität der Alkalischen Phophatase auch in nicht direkt an der Mineralisation beteiligten Zellen des Weichteilgewebes und in Fibrozyten ansteigt. So kamen sie zu dem Schluss, dass „in Knochenkulturen nahezu ausschließlich Osteoblasten, deren Vorläuferzellen und die an der enchondralen Ossifikation beteiligten Chondrozyten für die Freisetzung der Alkalischen Phophatase verantwortlich zu machen sind“ [47], und der Nachweis der Alkalischen Phosphatase als hinreichend

spezifisch gilt. Beim Vergleich der verschiedenen Ergebnisse hinsichtlich der Aktivität der Alkalischen Phophatase konnten Meyer et al. dem FXIII (in vitro) einen deutlichen osteoinduktiven Effekt zuweisen. Weiterhin offen blieb allerdings die Frage, ob FXIII spezifisch die Vorläufer- und Stammzellen beeinflusst oder nur zu einer allgemeinen Steigerung der Syntheseleistung einzelner Zellen führt.

In vivo präklinisch

Da Wundheilung und Frakturheilung in ähnlichen Phasen ablaufen und an dieselben Grundprozesse gekoppelt sind, lag es Nahe, den Einfluss des FXIII auf die Frakturheilung zu untersuchen. Benfer und Struck [3] unternahmen dies in folgendem Versuchsmodell: Sie osteotomierten die rechte Tibia der Hinterbeine von 180 Ratten und fixierten diese Osteotomie durch einen Zirkulargips in leichter Beugestellung. Von Tag 0 bis Tag 6 postoperativ erhielten 90 dieser Tiere intravenös 0,2 ml/d Faktor XIII-Konzentrat (Einzeldosis ca. 50 I.E/kgKG, Gesamtdosis ca. 350 I.E./kgKG), die anderen 90 Tiere erhielten nur das Lösungsmittel. Jeweils 5 Tiere wurden wöchentlich von Woche 1 bis Woche 6 postoperativ der Auswertung zugeführt. Eine klinische Frakturstabilisierung (manuelle Prüfung) existierte in beiden Gruppen ab der 3. postoperativen Woche. Die gemessene Kallusstabilität (Bruchfestigkeit) zeigte bereits in den ersten 3 postoperativen Wochen statistisch signifikante Unterschiede zugunsten der FXIII-behandelten Tiere. In dieser anfänglichen Phase kommt der Großteil der Stabilität nur geringfügig durch den langsam wachsenden Kallus zustande, als vielmehr durch die unmittelbare und quantitative Anhäufung an stabilisierendem Bindegewebe zwischen den Knochenfragmenten. Die ausgeprägteste Stabilitätssteigerung in beiden Gruppen konnte in der 4. Woche postoperativ beobachtet werden. Auch hier überstieg die Kallusstabilität der FXIII-Tiere die der Kontrolltiere. Hierfür halten Benfer und Struck eine früher einsetzende Mineralisation durch einen insgesamt fortgeschritteneren Heilungsprozess für wahrscheinlich. Die Tendenz zu einer höheren Kallusstabilität der FXIII-Gruppe blieb während des ganzen Experiments erhalten und zeigte auch in der 6.postoperativen Woche nochmals einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein Vergleich der Messwerte verdeutlicht, dass mit zunehmender Heilungsdauer der positive Einfluss des FXIII geringer wird.
Die Röntgenologischen Untersuchen ergaben in beiden Guppen 2 Wochen postoperativ eine Zunahme der Dichte im Frakturspalt und eine beginnende Überbrückung des Frakturspalts durch Kallusformation. Röntgenologisch konnten im Verlauf keine spezifischen qualitativen Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Benfer und Struck erwarteten radiologisch greifbare

Unterschiede erst in der finalen Phase des Heilungsprozesses. 6 Wochen postoperativ zeigten alle FXIII-Tiere eine vollständige Überbrückung des Frakturspalts ohne Resorptionsareale, während einzelne Kontrollgruppen-Tiere diesbezüglich noch Defizite vorwiesen. Ebenso imponierte 6 Wochen postoperativ der gesamte Frakturbereich bei den FXIII-Tieren kleiner im Vergleich zur Kontrollgruppe, was Benfer und Struck auf die bereits induzierte funktionelle Reduktion des periostalen Kallus zurückführen.

Die histologische Auswertung fand ab dem 2. postoperativen Tag statt und bereits hier zeigten die FXIII-Tiere ein ausgeprägtes Blutgerinnsel mit massivem Fibrinfaseranteil im nahezu gesamten Frakturspalt, während Kontroll-Tiere nur ein mäßiges Gerinnsel mit einwandernden Leukozyten beobachten ließen. 2 Wochen postoperativ zeigten die FXIII-Tiere eine hochgradige zelluläre Infiltration mit ausgeprägtem Faseranteil, Zeichen peripherer Resorption durch Osteoklasten, bindegewebiges Füllgewebe übergehend in die knöcherne Substanz und eine beginnende Ausbildung des primären Kallus. Im Gegensatz hierzu waren in Präparaten der Kontrollgruppe noch ausgeprägte, nur unvollständig organisierte Hämatome zu finden ohne osteoklastäre Resorptionsareale. In der 5. postoperativen Woche imponierten die Frakturen der FXIII-Gruppe histologisch als komplett geheilt. Die Markhöhle war bereits mit Spongiosa gefüllt, nur Kallusrückstände ließen auf das vorausgegangene Procedere schließen. Zur selben Zeit wiesen die Kontroll-Tiere noch knorpelige Areale, eine starke periostale Reaktion und eine primäres Kallusgewebe in der Markhöhle vor. In der folgenden Tabelle sind die histologisch beobachteten Unterschiede beider Gruppen in zeitlicher Abhängigkeit noch einmal zusammenfassend gegenübergestellt.

Tab. 6: Histologie (nach Benfer und Struck [3])

Postoperativ	FXIII	Kontrollgruppe
2 Tage	massives Blutgerinnsel, fibrinöses Gewebe im nahezu gesamten Frakturspalt	dürftiges Blutgerinnsel, Leukozyten
2 Wochen	zellulär. Infiltration, Kollagensynthese, Bindegewebe, osteoklastäre Resorption, Bildung primärer Kallus	dürftig organisiertes Hämatom, keine Resorptionsflächen
5 Wochen	vollständig geheilte Fraktur, Restbestand eines periostalen Kallus sichtbar, Spongiosa im Markraum	Knorpelzonen vorhanden, ausgeprägte periostale Reaktion, primäres Kallusgewebe im Markraum

Hellerer et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss von FXIII auf die Frakturheilung im Rattenmodell [29]. Sie experimentierten mit insgesamt 120 Ratten zu je 3 Versuchsgruppen à 40 Tieren. Gruppe I erhielt eine komplette Osteotomie der Tibia zum Studium der sekundären Frakturheilung, Gruppe II erhielt eine partielle Osteotomie der Tibia zum Studium der primären Frakturheilung und Gruppe III erhielt nur eine Schein-Operation ohne Osteotomie zum Studium des Weichteilschadens und der damit verbundenen Reparaturvorgänge. Jeweils 20 Tiere jeder Gruppe erfuhren eine tägliche FXIII-Applikation in die Schwanzvene (0,2 ml/d Tag 0 bis Tag 20). Nach drei Wochen erhielten die Tiere 0,5 mCi Osteoscan 99mTc und wurden der Auswertung zugeführt.

Hellerer et al. fanden weder in den röntgenologischen (entsprechend der Radiologie-Auswertung bei Benfer und Struck [3]) noch in den szintigraphischen Messungen, noch in den Aktivitätsmessungen mittels Bohrlochkristallzähler (im Vergleich rechte/linke Tibia) signifikante Unterschiede zwischen FXIII- und Kontrollgruppentieren. Sie schlossen daraus, dass im Falle einer suffizienten endogenen FXIII-Produktion im Anfangsstadium der Frakturheilung durch eine zusätzliche exogene FXIII-Substitution kein Benefit im Sinne einer Knochen“neoformation“ erreicht wird. Hellerer et al. unterstützten in Anlehnung an klinische Fallberichte die These, dass eine FXIII-Substitution im Rahmen der Frakturheilung nur bei Hochrisikopatienten mit insuffizientem FXIII-Plasmaspiegel sowie bei verzögerter Wundheilung indiziert ist.

El-Hakim (Faculty for Dental Medicine, Shams University Cairo) studierte den FXIII-Effekt auf die Knochendefektheilung bei diabetischen im Vergleich zu nicht diabetischen Ratten. Hierfür erzeugte er Knochendefekte an der Mandibula der Ratten und applizierte jeweils FXIII in den Versuchs- und NaCl in den Kontrollgruppen. In unterschiedlichen zeitlichen Abständen wurden die Tiere getötet und histologisch aufgearbeitet (HE, Eosin- und Van-Gieson-Färbung). Auch El-Hakim konnte zeigen, dass der FXIII die Knochenheilung in der gesunden, nichtdiabetischen Gruppe nicht signifikant beeinflusste, während in der diabetischen FXIII-Gruppe eine wesentlich bessere Kollagenverteilung im Defektareal und frühere Anzeichen für eine Knochenneubildung zu sehen waren.

Ebenso wie Hellerer et al. äußersten Benfer und Struck in Anlehnung an klinische Fallberichte die Vermutung, dass eher Risikopatienten oder Patienten mit verzögerter Heilung von einer FXIII-Applikation profitieren. Sie sprachen sich für weitere klinische Studien aus, um die Wirkung einer FXIII-Substitution bei Patienten zu untersuchen, deren Allgemeinzustand eine verzögerte Frakturheilung erwarten ließ [3].

Gerngroß et al. untersuchten den Einfluss des FXIII auf die Knochenheilung im Rahmen der autologen Spongiosaplastik im Schafsmodell [25]. Hierfür wurden Bohrlöcher in die Tibiadiaphysen der Schafe gefräst, die mit vom Beckenkamm entnommener Spongiosa gefüllt wurden. Die FXIII-Gruppe erhielt 1250 I.E. FXIII/d intravenös über 7 Tage. Nach einer Heilungsphase von 9 Wochen wurden die Tiere getötet und die Knochenproben quantitativ-morphologisch, röntgenologisch und fluoreszenzoptisch ausgewertet. Die FXIII-Gruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Knochenmengen im Transplantatlager und eine dadurch deutlich verbesserte Einheilung.

Ein weiteres Tierexperiment von Claes et al. [15] an osteotomierten Schafsmetatarsae (Querosteotomie, Plattenosteosynthese, keine Immobilisation) führte unter FXIII-Substitution (jeweils 1250 I.E. Fibrogammin® Behring, prä- und postoperativ, Tag 1, 3, 5, 9) zu einer signifikant erhöhten Knochenbruchfestigkeit um 44% in der FXIII-Gruppe. Als histologisches Äquivalent (entsprechend den Ergebnissen bei Benfer und Struck) wiesen die FXIII-Tiere deutlich mehr längsgerichtete Osteone auf, die den Frakturspalt kreuzten und damit eine mechanische Verbindung zwischen den beiden Osteotomieflächen herstellten. Interessant hierbei war das Ergebnis der Hydroxylapatit-Dichtemessung, die in der FXIII-Gruppe trotz 44% höherer Festigkeit nur 7,3% höher lag, als bei der Kontrollgruppe. Für die Festigkeitszunahme wurde demnach die Zunahme der den Frakturspalt überbrückenden Osteonenzahl verantwortlich gemacht.

Eine weitere Arbeit von Claes, Gerngroß und Kuglmeier konnte im Rahmen tierexperimenteller und proliferationskinetischer Untersuchungen der Wirkung des FXIII auf das Knochenwachstum [17] im

Rattenmodell einen mitogenen Einfluss auf die osteogenen Zellen belegen. Bohrlöcher in Rattentibiae zeigten nach viertägiger Behandlung mit FXIII (100 I.E. FXIII/kgKG/d) in der quantitativen Auswertung am 10. postoperativen Tag 54,8% mehr Osteoblasten und 33,5% mehr neugebildeten Knochen als in der Kontrollgruppe.

In einem nächsten Rattenversuchsmodell untersuchten Claes et al. den Einfluss der FXIII-Dosis auf die Kallusheilung unter flexibler Frakturfixation [16]. Ausgewählt wurde ein Verfahren mit einer Zweidrittel-Osteotomie der Tibia, die dann manuell vollständig gebrochen wurde, um eine gewisse Verzahnung zur Rotationssicherung zu erhalten. Eine Fixation mit Kirschner-Drähten ermöglichte den Versuchstieren freie Beweglichkeit. Jeweils 10 Tiere bildeten eine Dosisgruppe und erhielten täglich 0, 5, 10, 50 und 100 I.E./kgKG FXIII (Fibrogammin® HS, Centeon Pharma Marburg) in die Schwanzvene injiziert über eine Dauer von 10 Tagen. 3 Wochen postoperativ wurden die Tiere der röntgenologischen, biomechanischen und histologischen Auswertung zugeführt. Die größten Biegebruchmomente und signifikant großen Kallusflächen waren in den Behandlungsgruppen mit 10 und 50 I.E. FXIII zu beobachten. Die histologische Auswertung zeigte für alle Behandlungsgruppen gute und verzögert geheilte Frakturspalte. Der größte Anteil vollkommen knöchern durchbauter Frakturareale war in der 10 I.E. FXIII-Gruppe zu finden. Ein interessanter Aspekt der Ergebnisse ergab sich durch die Differenzierung der histologischen Schnitte in knöchern überbrückte „Schnellheiler“ und verzögert heilende Tibiae. Der Unterschied der beiden beobachteten Heilungsgeschwindigkeiten ist dabei wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass jeweils einige Tiere jeder Gruppe zusätzlich zur Tibiafraktur eine Fibulafraktur aufwiesen (Claes; persönliche Mitteilung). Diese instabileren Osteosynthesen heilen langsamer, wie spätere vergleichende Studien zeigten (Beck, Claes). In der Gruppe der knöchern durchbauten „Schnellheiler“ ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen FXIII-Tieren und Kontrolltieren feststellen. Jedoch in der Gruppe der verzögert geheilten Tibiae fanden sich signifikant höhere Biegebruchfestigkeiten in den Behandlungsgruppen mit 10 und 50 I.E. FXIII.

Claes et al. benutzten die gewonnenen Erkenntnisse zur FXIII-Dosierung für eine weitere tierexperimentelle Untersuchung an Schafen [16]. Hierfür fand ein Modell mit Kallusreifung unter FXIII-Einfluss nach Segmenttransport und Kallusdistraktion am Schafsmetatarsus Anwendung. Die röntgenologischen und biomechanischen Auswertungen führten zu folgenden Ergebnissen: Die Knochendichte und Querschnittsfläche (im Verhältnis zur individuellen Diaphysenfläche) waren in der FXIII-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöht. Die axiale Steifigkeit des Kallus lag in der FXIII-Gruppe um 22% höher als in der Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich in den Untersuchungen zur Eindrücksteifigkeit, die in der Mitte des Kallusregenerates

bei der FXIII-Gruppe 163% höhere Werte erzielte, als in der Kontrollgruppe. Der Versuchsaufbau, sowie Material und Methodik entsprechen dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit und werden im Kapitel Material und Methoden genauer vorgestellt. Ebenso wird im Kapitel Ergebnisse der vorliegenden Arbeit noch genauer auf die Ergebnisse der oben zitierten Arbeit eingegangen. Zusammenfassend beurteilten Claes et al. die in zahlreichen tierexperimentellen Studien erwirtschafteten Ergebnisse in folgender Weise: Eine exogene Zufuhr von Faktor XIII sei für eine normale Knochenheilung durch seine beschleunigende Wirkung in der frühen Heilungsphase ohne größeren Belang, könnte aber in Fällen von verzögerter Frakturheilung eine zentrale Stellung bei der Senkung von Behandlungszeit, -aufwand und damit auch Behandlungskosten einnehmen [15, 16]. Damit stützten sie mehr und mehr bereits erwähnte Hypothesen von Benfer und Struck [3], Hellerer [29] und klinikorientierter Forscher, deren Ergebnisse im nächsten Abschnitt dargestellt werden sollen.

Klinische Ergebnisse

Klinische Studien von Thies et al. im Rahmen von hämatologischen Kontrollen der Knochenbruchheilung [64] zeigten, dass eine stärkere und anhaltende Verminderung der Faktor XIII-Aktivität eine verzögerte Knochenheilung erwarten lässt.

Lang berichtete von zwei klinischen Fällen, in denen nach wiederholt verzögerten Frakturheilungen und wiederholt chirurgischer Intervention erst eine zweiwöchige Behandlung mit 1500 I.E./d FXIII zu einer komplikationslosen Heilung führte [36].

Salzmann publizierte einen Fallbericht eines 70-jährigen Verkehrsunfall-Opfers mit mehreren Frakturen beider Beine und damit verbundenen, nicht-infizierten Heilungsstörungen durch Ausbleiben der Kallusbildung [59]. Nach chirurgischer Intervention, autologer Spongiosaplastik und Plattenosteosynthese wurde trotz einer FXIII-Aktivität im Normbereich eine adjuvante, zweiwöchige FXIII-Substitution mit 1440 I.E./d versucht. Gegen Ende der FXIII-Therapie konnte erstmals röntgenologisch eine Kallusbildung nachgewiesen werden und 10 Wochen postoperativ wurde das Bein bereits mit 20kg teilbelastet.

Gerngroß et al. untersuchten in einer prospektiven, randomisierten Studie den Effekt einer postoperativen adjuvanten FXIII-Therapie auf die sekundäre Frakturheilung an 23 Problempatienten mit Defektpseudarthrosen an langen Röhrenknochen [26]. Die Patienten wurden prospektiv offen, kontrolliert und randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. Die 13 Patienten der Verumgruppe erhielten intravenös 2x1250 I.E. FXIII/d (Fibrogammin® HS, Centeon Pharma Marburg) vom ersten

präoperativen bis zum 7. postoperativen Tag. Die Kontrollgruppe wurde identisch mit einem Placebo behandelt. Bei allen Patienten wurde täglich die FXIII-Aktivität im Blut bestimmt und alle Patienten erhielten eine standardisierte chirurgische Intervention mit Ausräumung des Defektbezirks, interner oder externer Stabilisierung der Pseudarthrose mittels Osteosynthese und autologer Spongiosaplastik zur Defektfüllung. Die Auswertung dieser Studie erfolgte röntgenologisch und anhand des klinischen Verlaufs (Zeitpunkt der Vollbelastung, Persistieren der Pseudarthrose, erforderliche Reoperationen).

Der positive Einfluss des FXIII zeigte sich in dieser Studie durch eine früher mögliche Vollbelastung der Extremität (nach 15,5 Wochen) als in der Kontrollgruppe (nach 19,8 Wochen), einer Verkürzung der Zeit für den knöchernen Durchbau (17,5 Wochen FXIII, 22,7 Wochen Placebo), weniger Reoperationen (1/13 FXIII, 3/10 Placebo), weniger Implantatversagen (1/13 FXIII, 3/13 Placebo) und 0/13 gegenüber 2/10 persistierenden Pseudarthrosen in der Kontrollgruppe.

Die Durchführung des Tierversuchs wurde von der Ethik-Komission des Regierungspräsidiums Tübingen mit der Nr. 485 genehmigt.

2.2 Studiendesign

18 weibliche Merinoschafe mit einem mittleren Körpergewicht von 88 kg und einem Alter von 3 Jahren wurden in zwei Gruppen unterteilt. 10 Tiere fanden Eingang in die FXIII- oder Versuchsgruppe, die restlichen 8 Tiere in die Kontrollgruppe. Beide Gruppen gehören zwei unabhängigen Studien an. Jedoch erfuhren alle 18 Tiere ein standardisiertes, identisches Operations- und Kallusdistraktionsverfahren mittels Ringfixateur externe und Segmenttransport. Die Tiere der Versuchsgruppe erhielten zusätzlich unmittelbar nach Distraktionsende 2500 I.E. FXIII intravenös, sowie 1250 I.E. jeweils an 4 weiteren Tagen. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten diese Behandlung nicht. Alle Tiere erhielten zweimalig eine Fluoreszenzmarkierung (Calceingrün und Tetrazyklin (=gelb)). 12 Wochen postoperativ wurden die Tiere der Auswertung zugeführt. Nach biomechanischer und röntgenologischer Auswertung der Metatarsae wurden histologische Präparate angefertigt. Diese histologischen Präparate wurden zwei Auswerteverfahren unterzogen. In der Durchlichtmikroskopie fand eine qualitativ-quantitative Beurteilung der Gewebearten im Defektareal sowie im periostalen Bereich statt, welche dem status-quo 12 Wochen postoperativ entspricht. In der Fluoreszenzmikroskopie wurde quantitativ die Knochenanbaudynamik zu den Zeitpunkten 3 bzw. 6 Wochen postoperativ beurteilt. Durch die Messung der Distanz zwischen den unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen konnte die Knochenwachstumsgeschwindigkeit für die einzelnen Tiere bestimmt werden.

2.3 Ringfixateur externe

Zur Stabilisierung der erwünschten Defektsituation wurde in diesem tierexperimentellen Versuch ein speziell für den Schafsmetatarsus entwickelter Ringfixateur externe verwendet. Die einzelnen Metatarsusfragmente wurden hierbei durch eingebrachte Steinmann-Nägel in ihrer Position gehalten. Diese Art der Fixation ermöglichte den vorgesehenen Segmenttransport bei gleichzeitig uneingeschränkter Beweglichkeit der Versuchstiere und Belastung des Defektes.

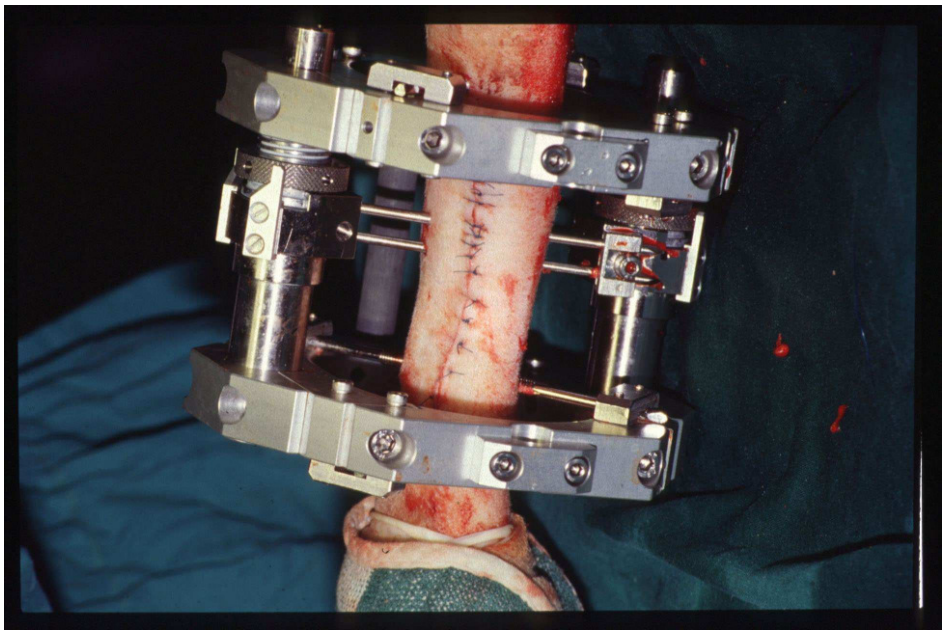


Abb. 5: Ringfixateur externe am Schafsmetatarsus postoperativ

2.4 Operation

2.4.1 Narkose

Nach 24 stündiger Nahrungskarenz erfolgte eine Narkose. Zur präoperativen Sedierung erhielten die Tiere 1,2 ml Vetranquil und 1 ml Atropin in der Mischspritze i.m.. Nach Punktion der Vena jugularis externa und Einbringen eines Venenkatheters erfolgte die Injektion einer 5 % Natrium-Barbital-Lösung zur Narkose-Einleitung. Nach Erschlaffen der Unterkiefermuskulatur folgte die Intubation und daraufhin eine Inhalationsnarkose mit einem Sauerstoff-Halothan-Gasgemisch. EKG und Puls wurden kontinuierlich überwacht. Das Legen einer Magensonde verhinderte das Aufgasen des Pansens.

Die Narkoseausleitung begann mit der Hautnaht, die Extubation erfolgte nach der postoperativen Röntgenkontrolle.

Narkosezwischenfälle waren nicht zu verzeichnen.

2.4.2 Operationsverfahren

Nach erfolgter Hautdesinfektion und steriler Abdeckung des Operationsareals wurde mit einem Hautlängsschnitt der rechte Hinterlauf der Tiere inzidiert und somit Zugang zum Metatarsus gewonnen. Nach Verdrängung des Weichgewebes und Präparation des gewünschten Gebietes wurden 6 Steinmann-Nägeln (4mm Durchmesser) eingebracht, von denen 2 zum Segmenttransport dienten und jeweils 2 zur Fixation der Ringe des anschließend montierten Ringfixateur externe.

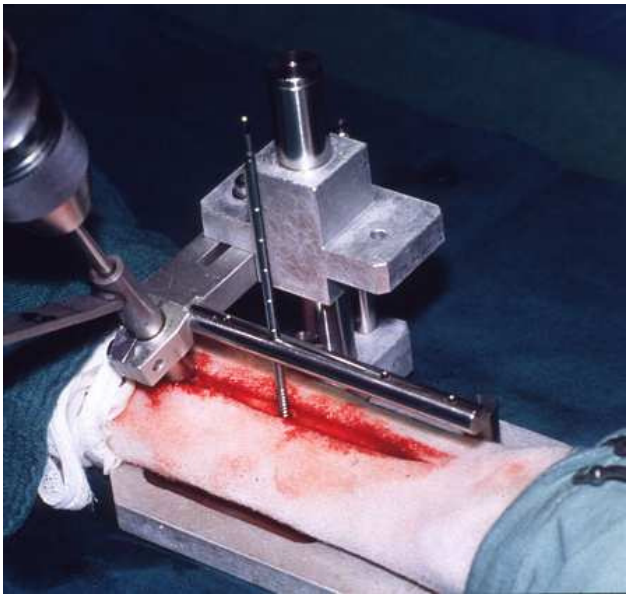


Abb. 6: Intraoperativ: Einbringen der Steinmann-Nägel mittels Bohrvorrichtung

Anschließend wurde der Metatarsus dreimal mittels einer Giglisäge planmäßig querosteotomiert (siehe Abbildung 7).

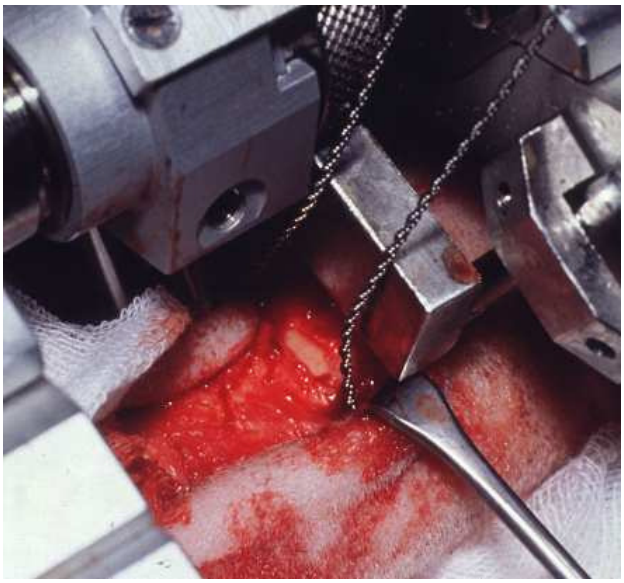


Abb. 7:
Beginn der planmäßigen Querosteotomien mittels Gigli-Säge

Zwischen den beiden proximalen Osteotomiespalten wurde ein freies Knochensegment von 25 mm Länge geschaffen, welches 2 der 4 eingebrachten Steinmannnägel enthielt um später den Segmenttransport zu ermöglichen. Zwischen den beiden distalen Osteotomiespalten wurde ein Knochensegment von 10 mm Länge entfernt, um einen knöchernen Defekt zu simulieren, der unter geringer Vorspannung des Systems 15mm betrug. Durch dieses Procedere entstand folgende gewünschte Konstellation von proximal nach distal: Metatarsus proximal – Osteotomiespalt – freies Knochensegment (25mm) – knöcherner Defekt (15mm) – Metatarsus distal (siehe Abbildung 8).

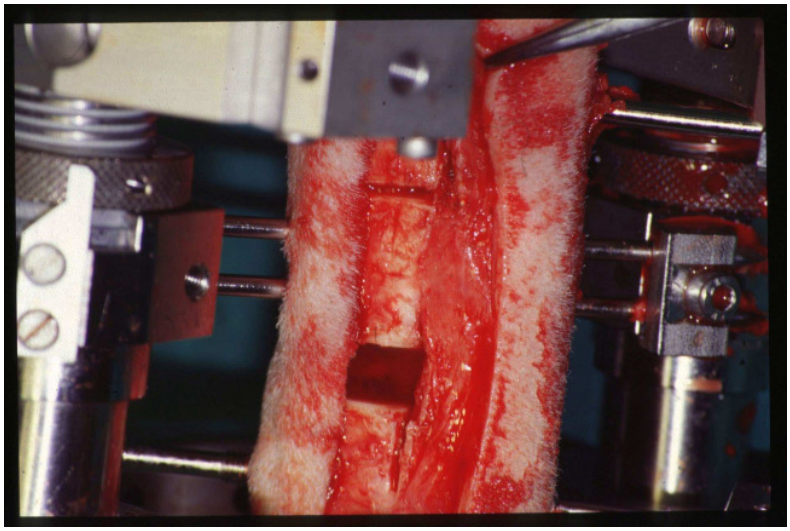
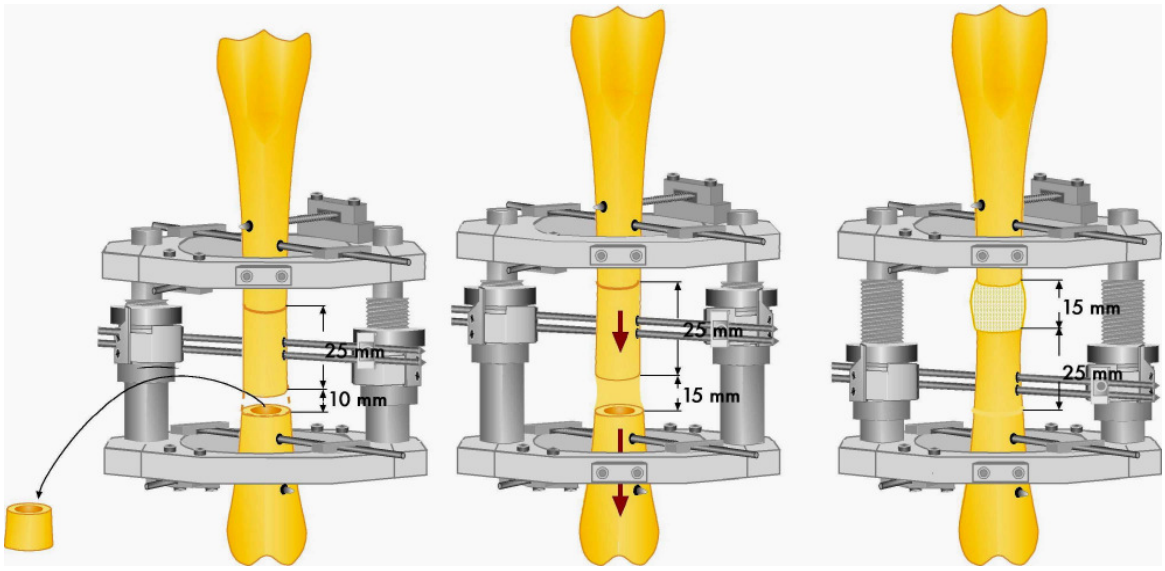


Abb. 8: Gewünschte Defektkonstellation intraoperativ. Proximales Segment, freies Segment für den Transport und distales Fragment, jeweils fixiert mit Steinmann-Nägeln

Nach überprüfter Stabilität des Systems wurde das Operationsgebiet nach den Gesetzen der Knochen- und Weichteilchirurgie versorgt und mit einer Hautnaht verschlossen (siehe Abbildung 5). Die folgende Abbildung 9 zeigt noch einmal schematisch im Überblick die einzelnen Schritte bis zur gewünschten Defektkonstellation.



a **b** **c**

Abb. 9: Schema des Defektmodells mit Segmenttransport:
a nach Anlage des Fixateurs, Osteotomie und Entfernung des 10mm Knochensegments
b nach korrekter Einstellung des Fixateurs mit geringgradiger Vorspannung (Pfeil unten) zu Beginn des Segmenttransports (Pfeil oben)
c nach Beendigung des Segmenttransports und Andocken des freien Knochensegments am distalen Knochenfragment; Distraktionskallus zwischen proximalem Fragment und ehemals freiem Knochensegment

2.5 FXIII-Konzentrat

Die exogene FXIII-Applikation in der Versuchsgruppe erfolgte intravenös in die Vena jugularis externa. Verwendet wurde hierfür ein FXIII-Präparat mit dem Namen Fibrogammin® HS P aus dem Angebot der Firma Behring in Marburg.

Appliziert wurden einmalig 2500 i.E. FXIII-Konzentrat und viermalig 1250 i.E. im Abstand von jeweils 2 Tagen.

2.6 Tierhaltung und Pflege

Die Tiere wurden im Zentralen Tierforschungszentrum der Universität Ulm am Oberberghof untergebracht. Im Stall herrschte ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden mit Licht von 6 – 18 Uhr.
Bis 24 h vor der Operation wurden die Tiere bei normaler Kost (Heu, Wasser ad libitum, Mineralfutter Altromin 0133®) in Freilaufställen (3x3 m, je 2 – 3 Tiere) gehalten. Postoperativ erfolgte die Haltung in Einzelboxen.
Jeweils 5 Tiere der Versuchs- und Kontrollgruppe entwickelten postoperativ Pin-Infektionen, die mit Ampicillintrihydrat erfolgreich antibiotisch behandelt werden konnten.

2.7 Versuchsablauf

Die Gesamtdauer des Experiments umfasste 12 Wochen und begann am Tag 0 mit der Operation der Versuchstiere. Nach viertägiger Latenz begann an Tag 5 die Phase der Kallusdistraktion. Hier wurde in 15 Tagen mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/Tag das Knochensegment von proximal nach distal durch den knöchernen Defekt bewegt, bis es am distalen Ende des Defektes an das distale Metatarsus-Fragment andockte. An Tag 19 (3 Wochen postoperativ) wurde die erste Fluorochrommarkierung mit Calceingrün (1 ml/kgKG i.m.) durchgeführt. Nach Ende der Distraktion erhielten die Versuchstiere am Tag 20 erstmalig 2500 I.E. FXIII-Konzentrat (Fibrogammin® HS P) in die Vena jugularis externa injiziert. An den Tagen 22, 24, 26 und 28 erhielten die Tiere der Versuchsgruppe erneut jeweils 1250 I.E. FXIII i.v.. An den Tagen 39 oder 49 (6 - 7 Wochen postoperativ) fand die zweite Fluorochrommarkierung mit Tetrazyklin (25 mg / kg KG i.v.) statt. Im Anschluss an den Segmenttransport wurde somit eine 9 wöchige Reifungsphase gewährleistet. Alle Tiere wurden am Tag 84 (12 Wochen postoperativ) getötet und der Auswertung zugeführt. Abbildung 10 zeigt ein Schema des Versuchsablaufs.

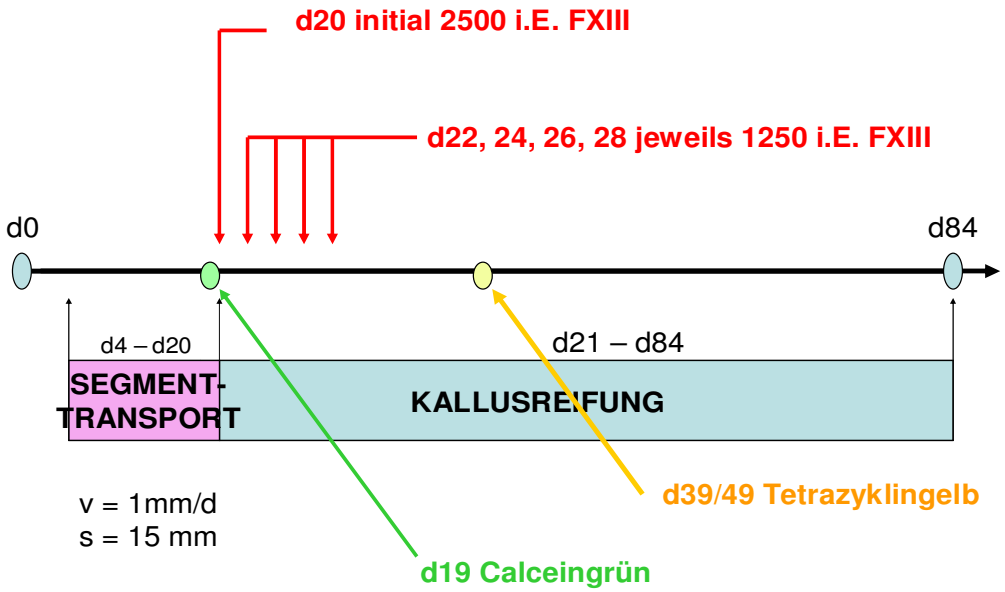


Abb. 10: Schema des Versuchsablaufs, v = Geschwindigkeit, s = Transportstrecke, d = Tag, d0 = Operation, d84 = Tötung

2.8 Auswertung

2.8.1 Radiologie

Unmittelbar nach Tötung der Tiere und Explantation der Metatarsae schloss sich die Messung der Knochendichte im Knochenneubildungsgebiet mit Hilfe eines Computertomographen (pQCT 960) an. Hierbei wurden 14 Ebenen senkrecht zur Knochenlängsachse einschließlich der proximalen und distalen Defektenden in einem Abstand von jeweils 1,5 mm gemessen. Gewebe oberhalb einer Knochendichte von 218 mg/cm³ wurde als Knochen definiert. Die Dichteverteilung über der Defektlänge wie auch die Kallusquerschnittfläche in der Mitte der Defektzone wurden mit der CT-Software bestimmt. Zur Elimination des Einflusses der Metatarsusgröße auf die Kallusfläche wurden die gemessenen Kallusflächen in Relation zur Fläche des angrenzenden Knochenquerschnittes ermittelt und in Prozenten des Querschnitts ausgedrückt. [16]

Ergebnisse hierzu wurden bereits von Claes et al. publiziert [16] und werden der Vollständigkeit halber und im Vergleich zu den Ergebnissen der Histomorphologie im Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit dargestellt.

2.8.2 Biomechanik

Zur biomechanischen Prüfung wurde ein Segment von 21 mm Länge, welches jeweils 3 mm distale und proximale Kortikalis und das 15 mm lange Kochenregenerat des früheren Defektes beinhaltete, aus dem Metatarsus herausgesägt und einem axialen Drucktest unterzogen. Hier wurde zunächst die mechanische Steifigkeit des Kallusregenerats getestet. In einer Materialprüfmaschine (Zwick 1454) wurde dann die Knochenprobe zwischen zwei planparallelen Druckplatten mit einer Belastungsgeschwindigkeit von 2 mm/min bist zu einer Maximallast von 50 N zerstörungsfrei belastet. Aus der Drucklast von 50 N und der gleichzeitig aufgezeichneten Verformung (ΔL) des Knochens wurde die Drucksteifigkeit (S) des Regenerats (S= 50 N / ΔL) errechnet. Anschließend wurde an einem longitudinalen, 2 mm dicken Segment aus der Mitte der sagittalen Knochenebene mit einem Stempel in einer Materialprüfmaschine an drei Lokalisationen des Kallusregenerats (¼, ½, ¾ der Distraktionslänge, ventral und dorsal) ein Eindrücktest durchgeführt. Hierbei wurde mit 1 mm/min bis maximal 150 N belastet und zusammen mit der gemessenen Eindrücktiefe anhand oben genannter Formel die Eindrücksteifigkeit berechnet. [16]
Die hieraus gewonnen Ergebnisse wurden ebenfalls bereits von Claes et al. publiziert [16] und werden im Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit in Ergänzung zur Histologie vorgestellt.

2.8.3 Histologie

2.8.3.1 Herstellung der histologischen Präparate

Zur Herstellung der histologischen Präparate kam das Verfahren der Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath (1982, 1987, 1988) zur Anwendung. Hierfür wurden unentkalkte Knochenblöcke aller Tiere nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Technovit in reines Technovit eingebettet.
Die eingebetteten Präparate wurden auf Objektträger aufgeblockt, zu planparallelen Längsschnitten verarbeitet, welche dann auf eine Schnittdicke von ca. 70µm geschliffen wurden.

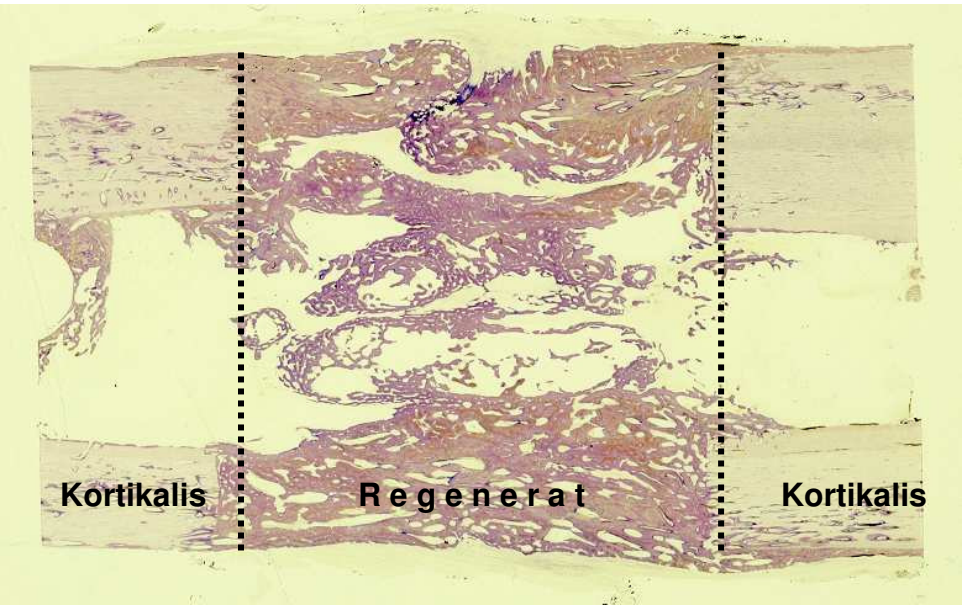


Abb. 11: Fertiges histologisches Längsschnitt-Präparat durch den Distraktionskallus (= Regenerat) mit angrenzenden Kortikalices am Schafsmetatarsus nach 15tägigem Segmenttransport und anschließender 9 wöchiger Heilungsphase

2.8.3.2 Färbung

Um Zell- und Gewebsstrukturen hervorzuheben, wurden die Schnitte angefärbt. Der Vorteil der Verwendung unentkalkter Schliffe liegt in dem Erhalt der kalzifizierten Knochensubstanz. Zur histologischen Auswertung wurde die Färbung nach Paragon gewählt, deren Reagenzien in der folgenden Tabelle aufgeführt sind (Tab. 7).

Tab. 7: Reagenzien für Färbung nach Paragon

Reagens
Ethanol, absolut p.a.
Ameisensäure p.a.
Ethanol vergällt, 99,8%
Toluidinblau O
Bas. Fuchsin
VLC 7200

Bei einem pH-Wert von 10 lassen sich damit folgende Farbeffekte beobachten, wodurch sich die unterschiedlichen Gewebearten voneinander differenzieren lassen (Tab. 8):

Tab. 8: Gewebe mit zugehörigem Farbeffekt in der Paragonfärbung (bei pH = 10)

Gewebe	**Farbeffekt**
Zellkerne, basophiles Plasma	Blau
Knorpel	Violett
Bindegewebe	Farblos bis leicht gelblich-rosa
Knochen	Rosa (zart bis kräftig, je nach Mineralisierungsgrad)

2.8.3.3 Durchlichtmikroskopie

Im Rahmen der Durchlichtmikroskopie wurden die histologischen Präparate unter dem Photomikroskop (Axiophot, Firma Zeiss) bewertet. Die Verwendung eines Netzokulars ermöglichte eine histomorphometrische Auswertung der einzelnen Präparate. Pro Präparat wurden zwischen 20 und 26 definierte Zählfelder (je nach Abstand der Kortikalisenden) im Defektareal und 12 Zählfelder

im periostalen Bereich bewertet. Die Verteilung der Zählfelder im histologischen Präparat ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt. Jedes Zählfeld umfasste 10 x 10 Zählpunkte (siehe auch Abbildung 13). Der Abstand der einzelnen Zählpunkte betrug 0,05 mm. Zur Auswertung herangezogen wurde eine 100fache Vergrößerung. Für jeden Zählpunkt wurde zwischen Knochen, Knorpel und Bindegewebe differenziert. Die dabei gewonnenen Daten lieferten im Anschluss die prozentuale Gewebeverteilung im Defektareal und im periostalen Bereich. Bei dieser Auswertung wurden insgesamt 5 mm² bis 6,5 mm² des Bereiches in der Defektzone interkortikal für jeden Schnitt ausgezählt. Die Bewertung der periostalen Zone bezog sich pro Präparat auf 3 mm². Für jedes Präparat wurde ein Mittelwert für den Knochen-, Knorpel- und Bindegewebeanteile sowohl in der Defektzone als auch im periostalen Bereich bestimmt.

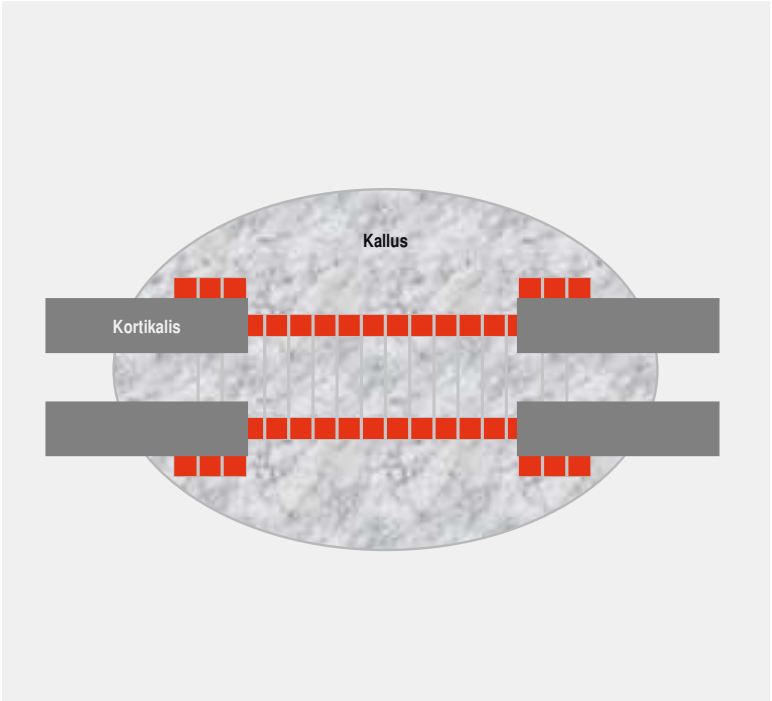


Abb. 12:
Verteilung der Zählfelder (rot) im histologischen Präparat. Jedes Quadrat entspricht einem Zählfeld von 100 Zählpunkten.

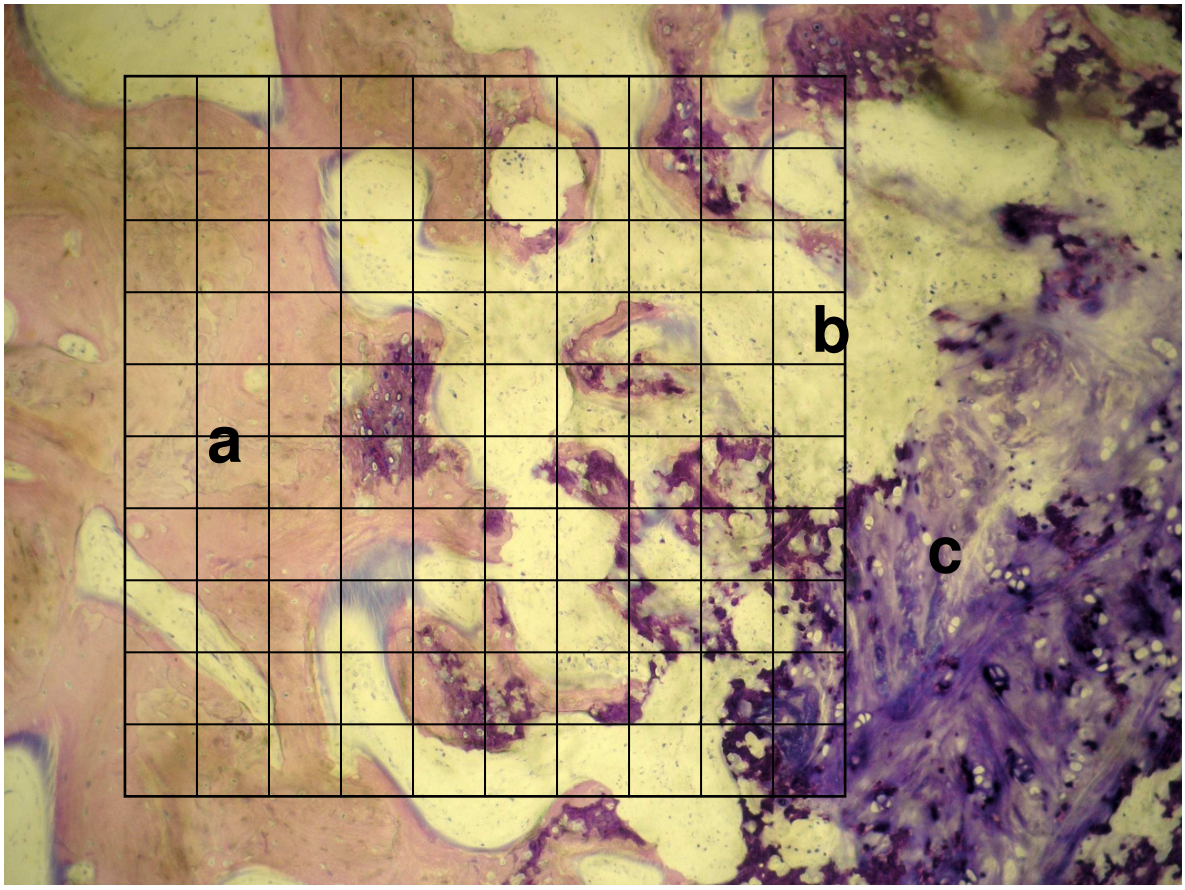


Abb. 13: Durchlichtmikroskopie. Histologisches Präparat eines Distraktionskallus des Schafsmetatarsus, Paragon-Färbung, in 100x Vergrößerung zur Gewebedifferenzierung. Zwischengeschaltetes Zählokular (10x10 Zählpunkte).
a Knochen; **b** Bindegewebe; **c** Knorpel
Die Gewebeart wurde jeweils an den Linienkreuzungspunkten bestimmt.

2.8.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die im Versuchsablauf bereits erwähnte Fluorochrommarkierung mit Calceingrün (3 Wochen postoperativ) und Tetrazyklin (6 - 7 Wochen postoperativ) diente der Fluoreszenzmarkierung neu gebildeter Mineralisationsfronten des Knochens, wie sie bei Rahn und Perren beschrieben ist [56].
Die histologischen Schnitte wurden für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ebenfalls im Photomikroskop (Axiophot, Zeiss) in 100facher Vergrößerung, mit demselben Netzokular und in denselben Zählarealen wie in der Durchlichtmikroskopie ausgewertet (siehe 2.8.3.3 und Abbildung

12). Die Darstellung der Fluoreszenzmarkierung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Auflicht) mit einem UV-Licht-Filter für Licht der Wellenlänge 395 - 440nm.

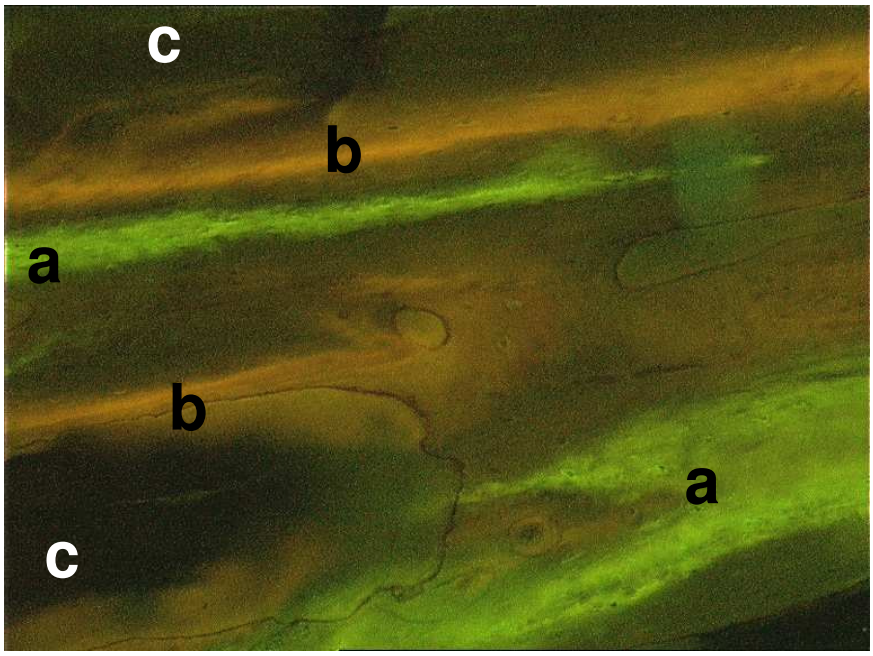


Abb. 2.10: Fluoreszenzmikroskopie. Histologisches Präparat eines Distraktionskallus des Schafsmetatarsus, 100x Vergrößerung, zur Bandendifferenzierung:
a grüne Bande; **b** gelbe Bande; **c** keine Bande

Im Rahmen der Auszählung wurde für jeden Zählpunkt differenziert zwischen keiner Fluoreszenz, grüner Fluoreszenz und gelber Fluoreszenz. Die daraus gewonnenen Ergebnisse lieferten die zum Zeitpunkt der Farbstoffapplikation vorherrschende Knochenanbaudynamik. Die Anzahl von fluoreszierenden Zählpunkten pro Zählfeld (100 Punkte) gab dann die Häufigkeit in Prozent wider. Bezüglich der Fluoreszenz wurde für jedes Präparat der Mittelwert bestimmt.

Weiterhin wurde die Fluoreszenzmikroskopie im Axiophot-Mikroskop über ein Bildanalyse-Gerät mit einer Analysis-Software am Rechner verknüpft. Jedes Präparat wurde sowohl im periostalen als auch im interkortikalen Bereich (mittlere Defektzone oder kortikalisnah, siehe Abb. 15) mäanderförmig nach fluoreszierenden Banden abgesucht, die parallel zueinander lagen und dadurch eine Messung des Abstandes zwischen den fluoreszierenden Banden erlaubten.

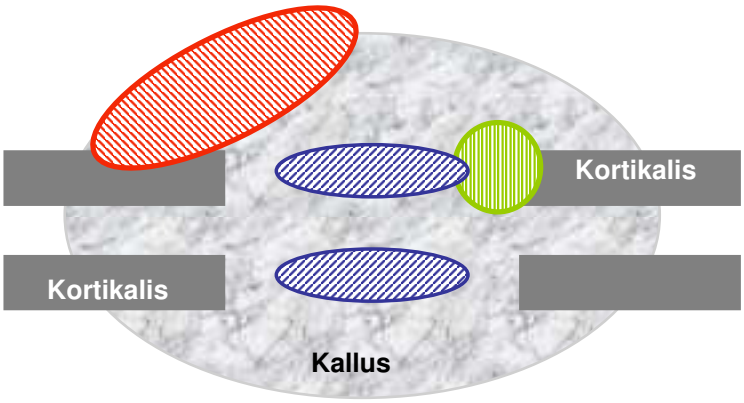


Abb. 15:
Bereiche für die Messung der Distanz zwischen den grün- und den gelblfuoresziernden Banden im histologischen Präparat des Distraktionskallus.
(periostal, Defektzone, kortikalisnah)

Wiederum wurde für jedes einzelne Präparat ein Mittelwert der Bandenabstände bestimmt.
Dieser spiegelt das quantitative Knochenwachstum im Zeitraum zwischen der ersten (3 Wochen postoperativ) und der zweiten Fluorochrommarkierung (6 - 7 Wochen postoperativ) wider. Mittels Division des gemessenen Abstandes durch den Zeitraum zwischen den beiden Fluorochrommarkierungen in Tagen konnten wir so die Knochenwachstumsgeschwindigkeit spezifisch für jedes Tier in µm/d bestimmen.

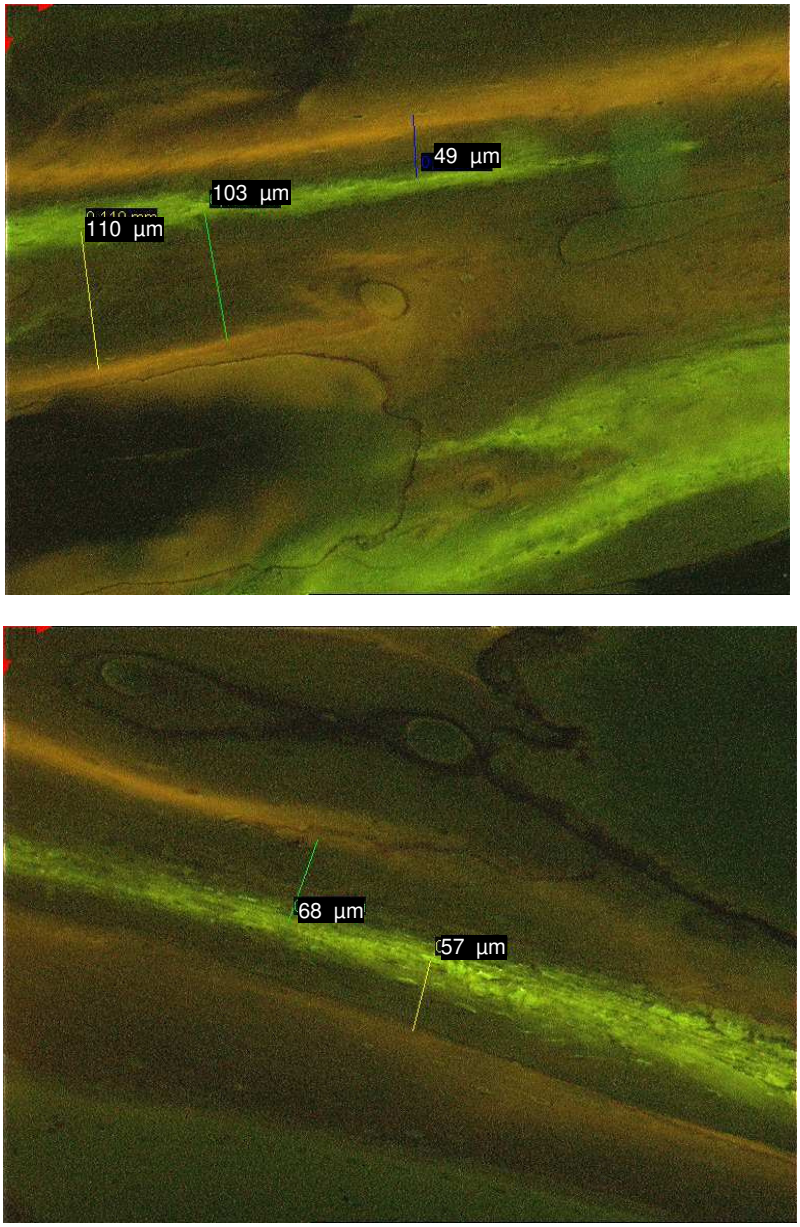


Abb. 16 : Fluoreszenzmikroskopie. Histologische Präparate eines Distraktionskallus des Schafsmetatarsus, 100x Vergrößerung. Distanzmessung zwischen fluoreszierenden Banden (nach Fluorochrommarkierung mit Calceingrün und Tetrazyklin 3 bzw. 6-7 Wochen postoperativ) via Bild-Analyse-Gerät am PC.

2.8.4 Statistik

Zur Durchführung aller statistischen Analysen und der Darstellung der Messergebnisse wurden die Software-Programme EXCEL (Microsoft, Seattle, CA, USA) und JMP Statistical Analysis Software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) verwendet.
Da nicht von der Normalverteilung der Messwerte ausgegangen werden kann und die Anzahl der Versuchstiere mit n = 18 zu klein ist, um einen sinnvollen Test auf Normalverteilung durchzuführen, wurde für den Vergleich der FXIII- mit den Kontrolltieren auf die Angabe von Mittelwerten und Standardabweichungen verzichtet. Grundlage der graphischen Darstellungen im Boxplot- als auch im Säulendiagramm-Format sind somit Mediane, Minima und Maxima, sowie 1. und 3. Quartile.
Lediglich für den Vergleich der Distanzmessungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen zur Darstellung herangezogen, da hierfür eine größere Anzahl an Messwerten vorlag.
Getestet wurden die Ergebnisse im Globaltest nach Kruskal-Wallis für unverbundene Stichproben.
Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 gesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Biomechanik und Morphologie

Die Ergebnisse der biomechanischen Auswertungen wurden von Claes et al. [16] bereits publiziert. In Tabelle 9 und den Abbildungen 17 und 18 sind die Resultate der CT-Dichtemessungen und Kallusquerschnittberechnungen dargestellt. Sowohl die geringste Knochendichte als auch die größte Querschnittfläche konnten für beide Gruppen in der Defektmitte beobachtet werden.

Die Knochendichte und die Querschnittfläche (normalisiert auf die individuelle Diaphysenfläche) waren in der FXIII-Gruppe gegenüber den Kontrolltieren leicht erhöht (Kallusfläche + 10%, Tab. 9). Die axiale Steifigkeit des Kallusregenerats lag in der FXIII-Gruppe um 22% höher als in der Kontrollgruppe. Die größten, auch statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test), fanden sich in den lokalen Steifigkeiten des Kallusregenerats beim Eindrücktest (Tab. 9, Abb. 17). In der Mitte des Kallusregenerats lagen die lokalen Kallussteifigkeiten der FXIII-Gruppe 163% höher als jene der Kontroll-Gruppe (Abb. 19).

Tab. 9: Einfluss der FXIII-Behandlung auf morphologische und biomechanische Eigenschaften des Distraktionskallus am Schafsmetatarsus (Regeneratmitte), MW ± STABW. [16]

Messwert	Kontrollgruppe	FXIII-Gruppe
CT-Dichte, mg/cm³	590 ± 68	608 ± 105
Kallusfläche, mm²	309 ± 134	396 ± 165
Kallusfläche in % der Diaphysenfläche	122 ± 41	132 ± 44
Axiale Steifigkeit N/mm	2942 ± 1913	3586 ± 3263
Lokale Eindrücksteifigkeit, N/mm	590 ± 354	1556 ± 522

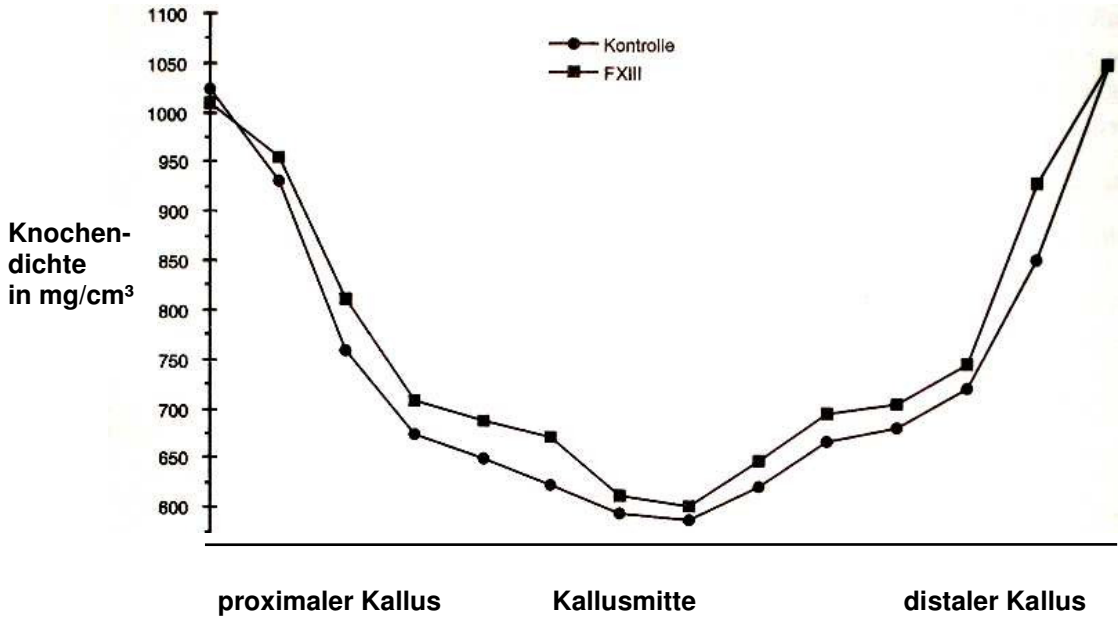


Abb. 17: Verteilung der Knochendichtemesswerte im Distraktionskallus (entlang der Kalluslängsachse) für die Kontroll- und die FXIII-Gruppe [16]

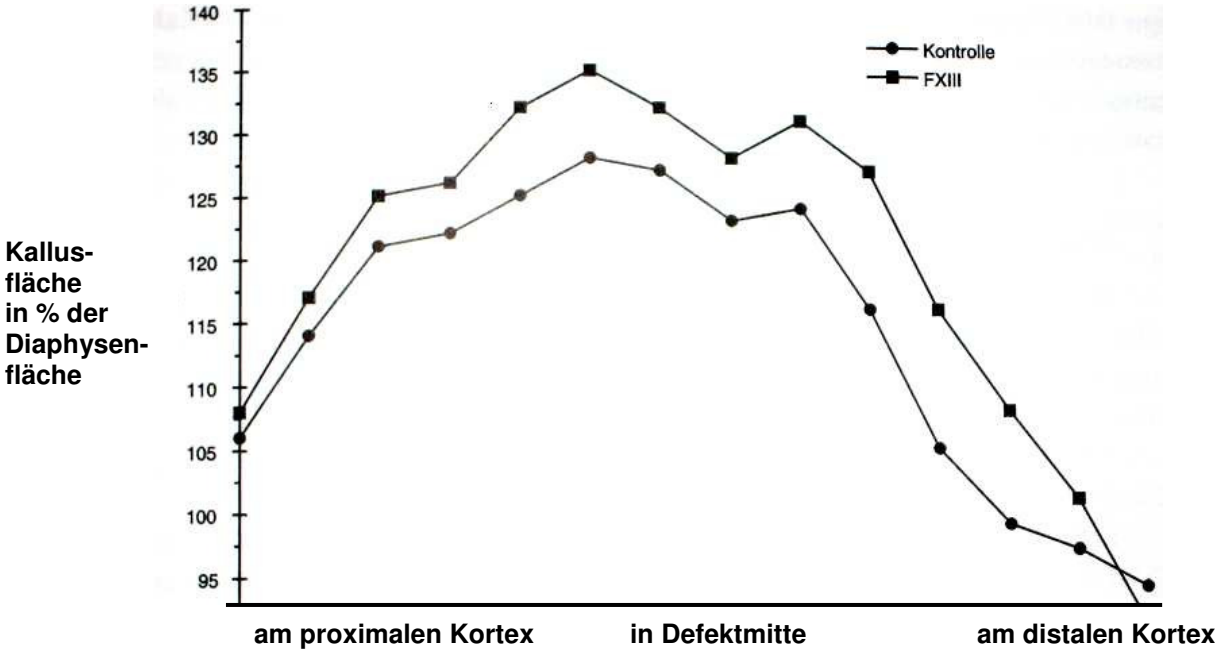


Abb. 18: Verteilung der Kallusfläche (in % der Diaphysenfläche) entlang des Distraktionskallus jeweils für die Kontroll- und FXIII-Gruppe [16]

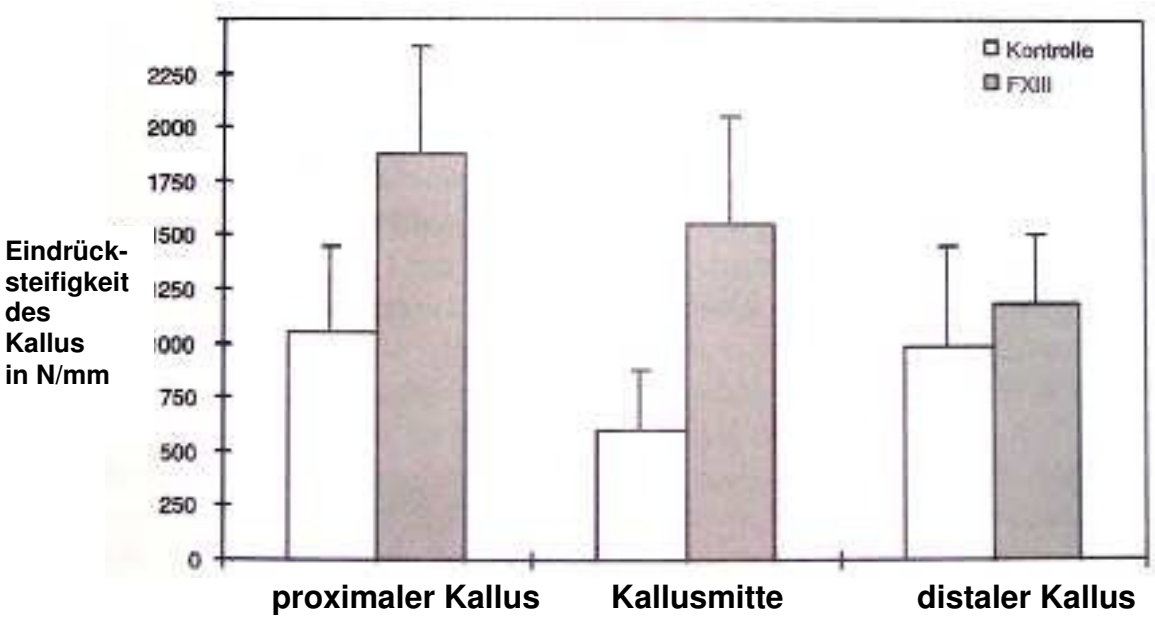


Abb. 19: Eindrücksteifigkeiten an verschiedenen Lokalisationen des Distraktionskallus für die Kontroll- und FXIII-behandelte Gruppe [16]

3.2 Histologie

3.2.1 Durchlichtmikroskopie

Die Gewebeverteilung im gesamten Regenerat ergab 12 Wochen postoperativ einen um 9 Prozentpunkte höheren Knochenanteil in der FXIII-Gruppe als in der Kontrollgruppe. Während in der FXIII-Gruppe der knöcherne Anteil im Regenerat überwog, fand sich in der Kontrollgruppe als prozentual führende Gewebeart Bindegewebe. Die Abbildungen 21 und 22 zeigen die Verteilung der Gewebearten im Regenerat für beide Gruppen, die Abbildungen 20a – 20h zeigen histologische Äquivalente.

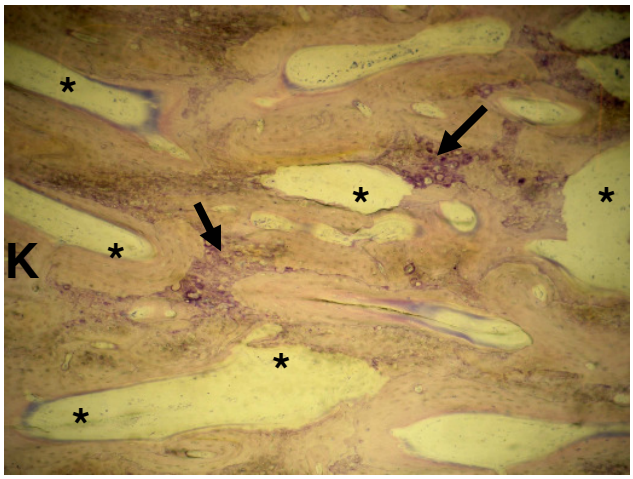


Abb. 20a: Kontrollgruppe. Histologisches Präparat des Distraktionskallus,100x Vergrößerung, Paragon-Färbung.

Deutlich mehr Bindegewebe (*) und noch vorhandene Knorpelinseln (→)

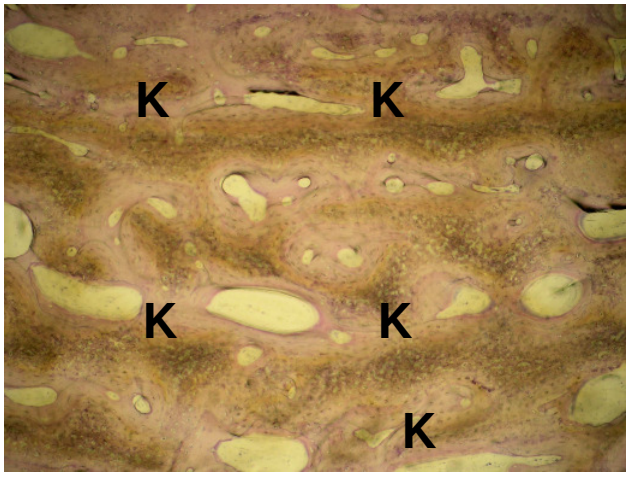


Abb. 20b: FXIII-Gruppe. Histologisches Präparat des Distraktionskallus, 100x Vergrößerung, Paragon-Färbung.
Knochen (K) als dominantes Gewebe

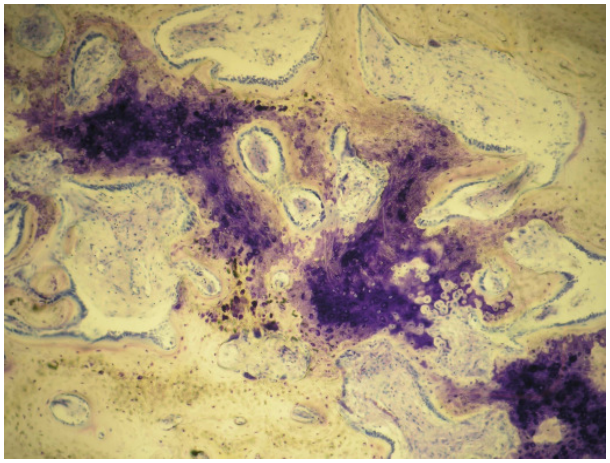


Abb. 20c: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 20a)

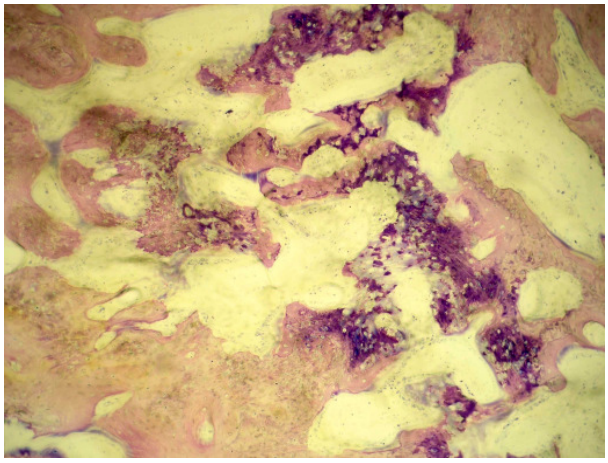


Abb. 20d: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 20b)

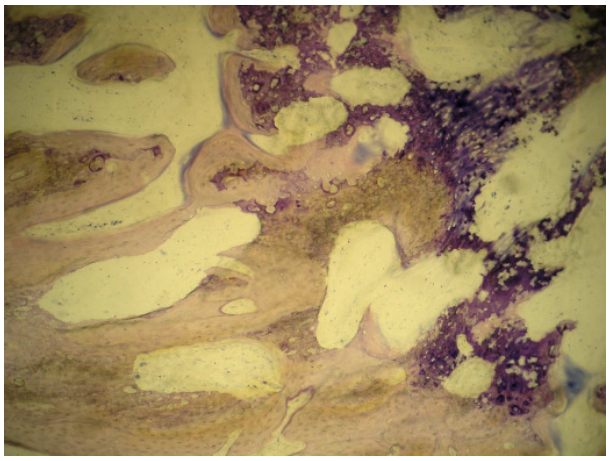


Abb. 20e: : Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 20a)

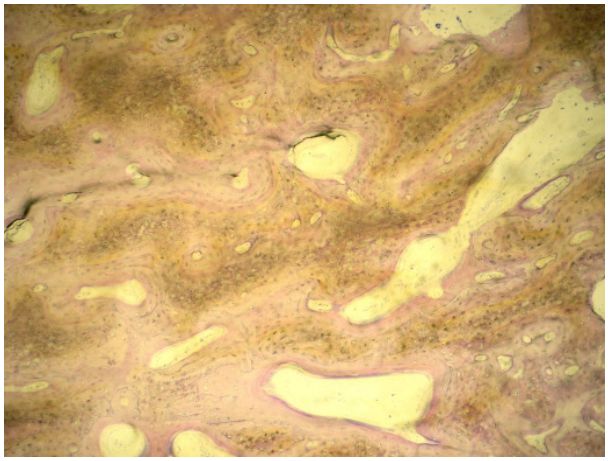


Abb. 20f: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 20b)

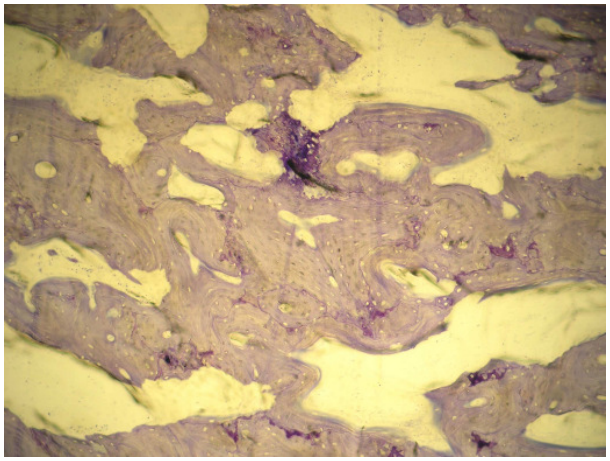


Abb. 20g: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 20b)

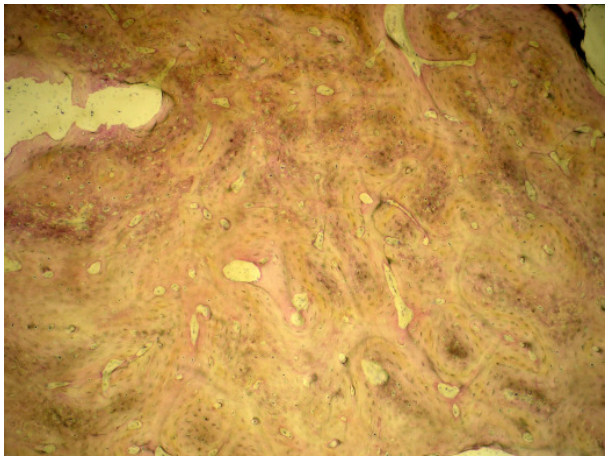


Abb. 20h: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 20b)

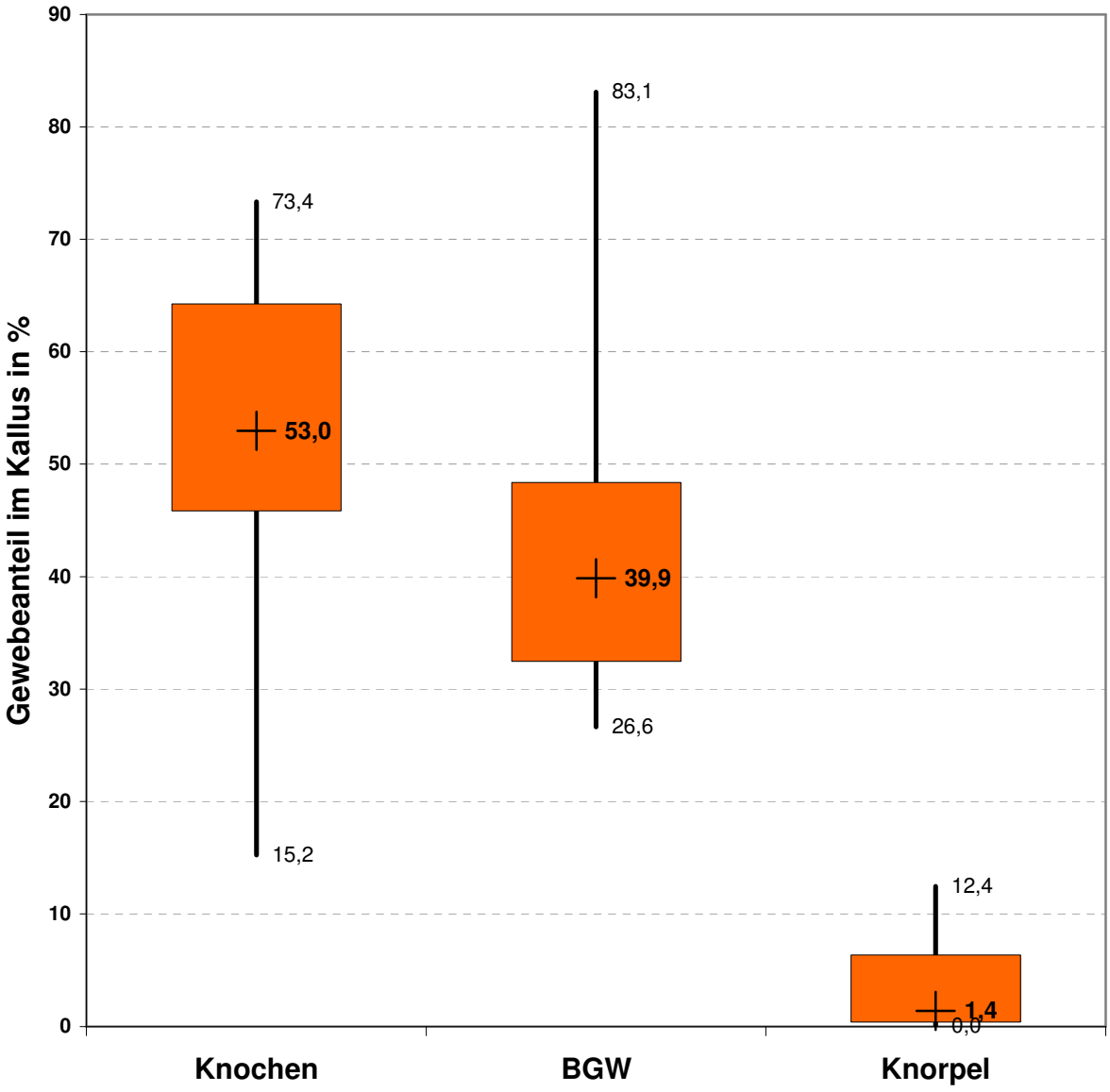


Abb. 21: Gewebeverteilung (%) im Distraktionskallus der FXIII-Gruppe. BGW = Bindegewebe. (dargestellt sind Medianwerte, 1. und 3. Quartile, Minima und Maxima)

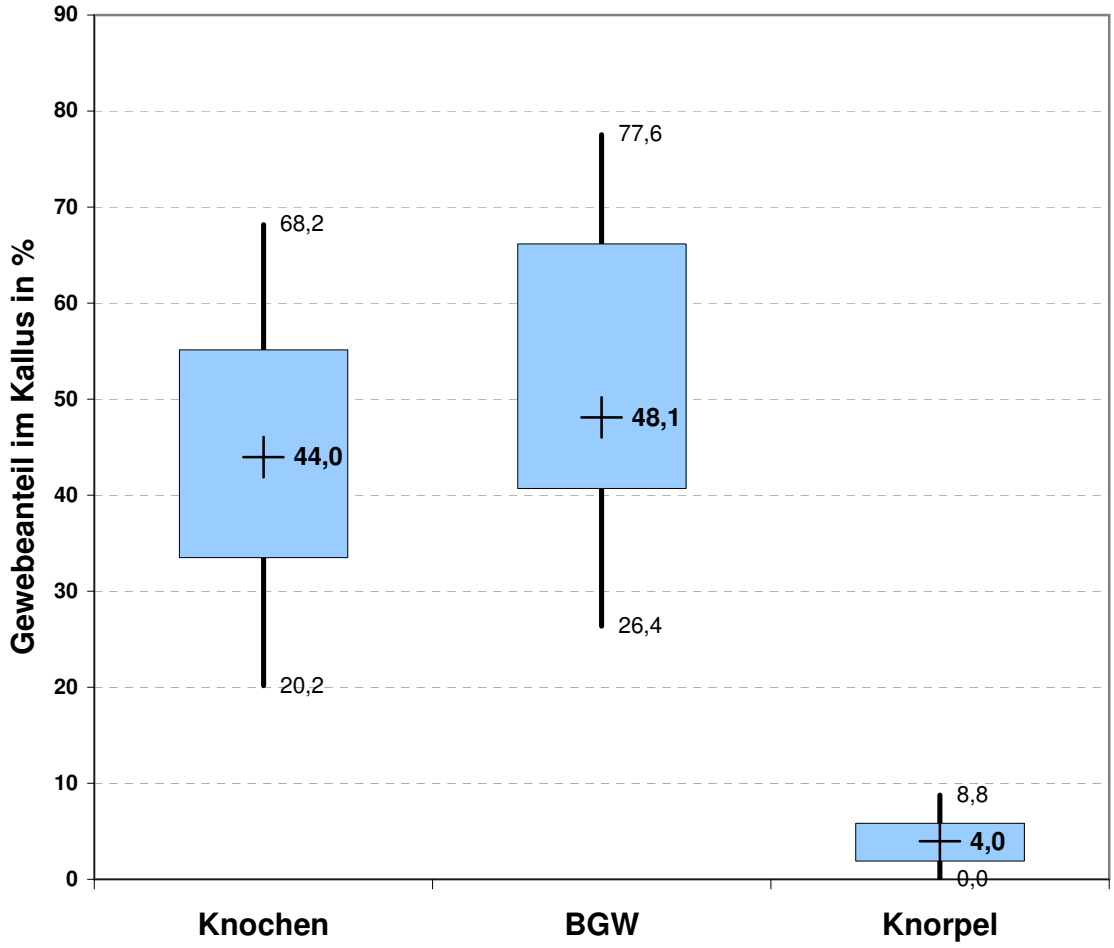


Abb. 22: Gewebeverteilung (%) im Distraktionskallus der Kontrollgruppe. BGW = Bindegewebe. (dargestellt sind Medianwerte, 1. und 3. Quartile, Minima und Maxima)

Bei der genaueren Betrachtung des knöchernen Gewebeanteils entlang des früheren Defektbereiches zeigte sich bei der Aufteilung der Defektzone in einen proximalen, mittleren und distalen Bereich (siehe Abb. 15, Kapitel 2.8.3.4) eine homogenere Verteilung des knöchernen Gewebes in der FXIII-Gruppe. Hier konnten im Bereich der Regeneratmitte, der instabilsten Lokalisation einer Defektheilung, 17,8 Prozentpunkte mehr Knochen beobachtet werden als in der Kontrollgruppe. Tendenziell zeigt sich in allen drei Bereichen des Defektes für die FXIII-Gruppe 12 Wochen postoperativ ein gleicher (distal) bis deutlich höherer Knochenanteil (proximal und vor allem mittig), als für die Kontrollgruppe.

In Abbildung 23 und Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Knochenverteilung in Abhängigkeit von der Lokalisation im Regenerat dargestellt. Die Abbildungen 24a – 24h zeigen qualitativ beispielhafte histologische Präparate aus beiden Tiergruppen in der Übersichtsaufnahme zur Verbildlichung der Gewebesituation in dem Defektbereich.

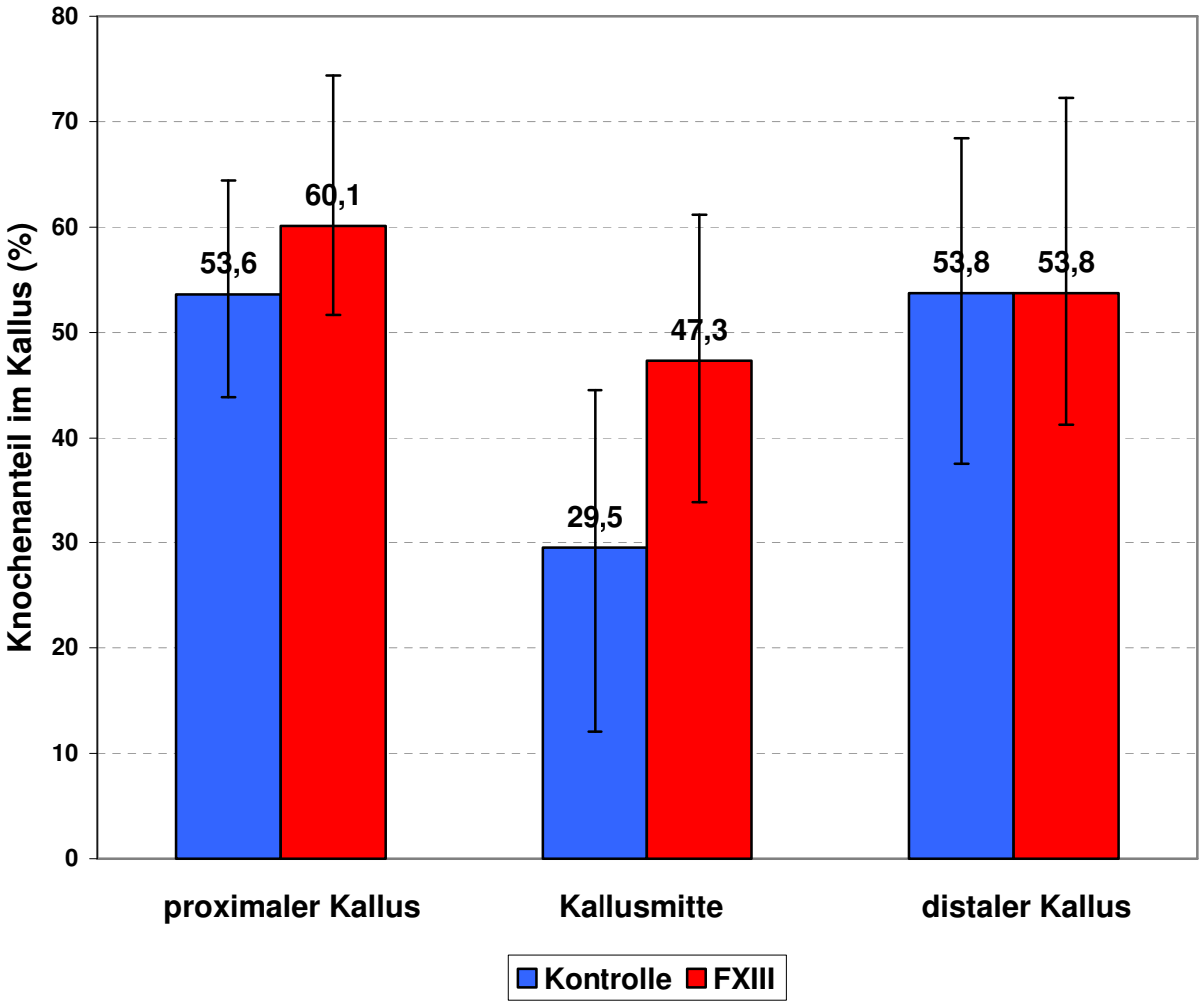


Abb. 23: Knochenverteilung (%) im Regenerat in Abhängigkeit der Lokalisation. Kontroll- und FXIII-behandelte Gruppe. (dargestellt sind Medianwerte, 1. und 3. Quartile)

Tab. 10: Knochenverteilung (%) im Regenerat in Abhängigkeit der Lokalisation. Kontroll- und FXIII-behandelte Gruppe. (min = Minimum; max = Maximum)

	proximaler Kallus		Kallusmitte		distaler Kallus	
	Kontrolle	FXIII	Kontrolle	FXIII	Kontrolle	FXIII
min	30,5	14,0	1,5	5,3	28,3	28,8
max	79,0	82,3	67,0	78,7	75,3	84,0

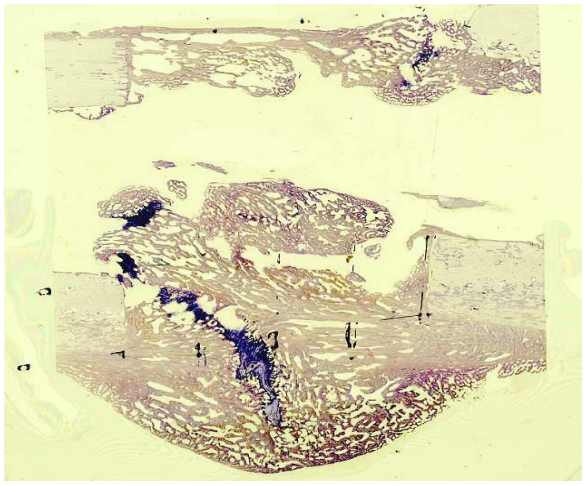


Abb. 24a: Kontrollgruppe. Übersichtsaufname eines histologischen Längsschnittpräparates (Paragon-Färbung) durch den Distraktionskallus des Schafsmetatarsus.

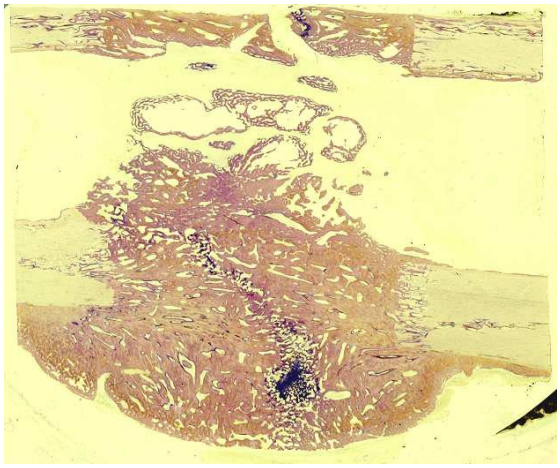


Abb. 24b: FXIII-Gruppe. Übersichtsaufname eines histologischen Längsschnittpräparates (Paragon-Färbung) durch den Distraktionskallus des Schafsmetatarsus.
In der Übersichtsaufnahme sichtbare, bessere Verknöcherung in Defektmitte (weniger Knorpel und Bindegewebe)

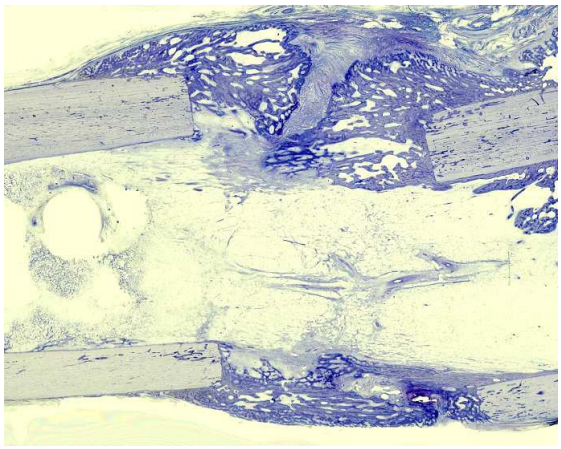


Abb. 24c: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 24a)

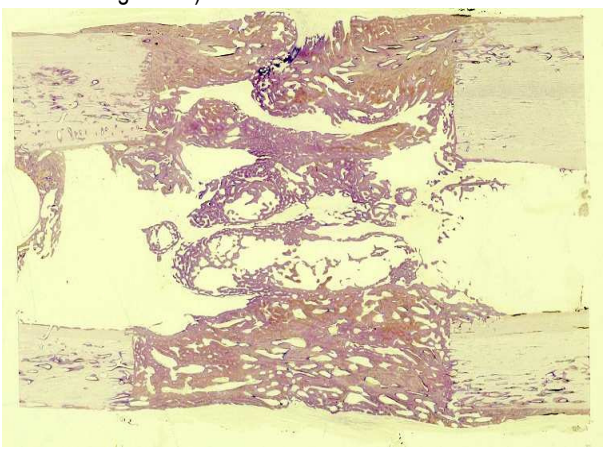


Abb. 24d: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 24b)

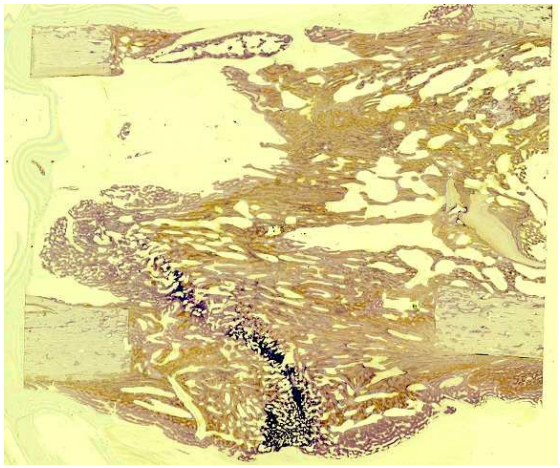


Abb. 3.8e: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 24a)

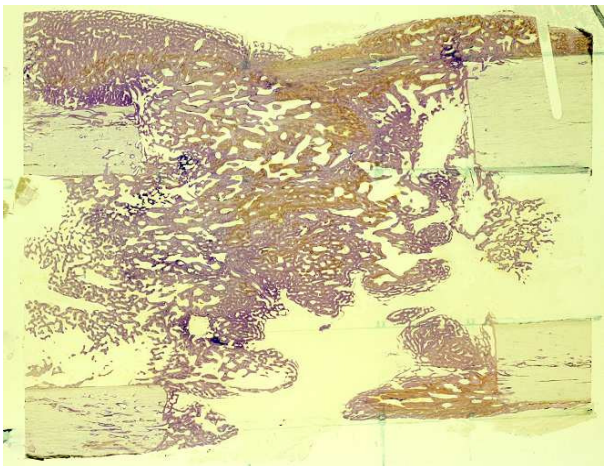


Abb. 3.8f: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 24b)

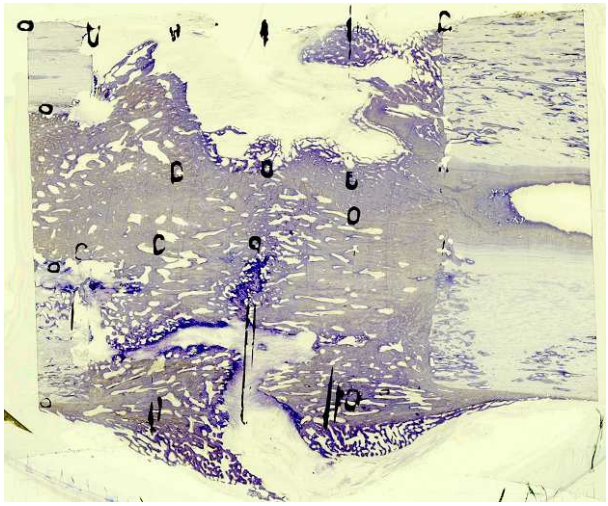


Abb. 24g: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 24a)

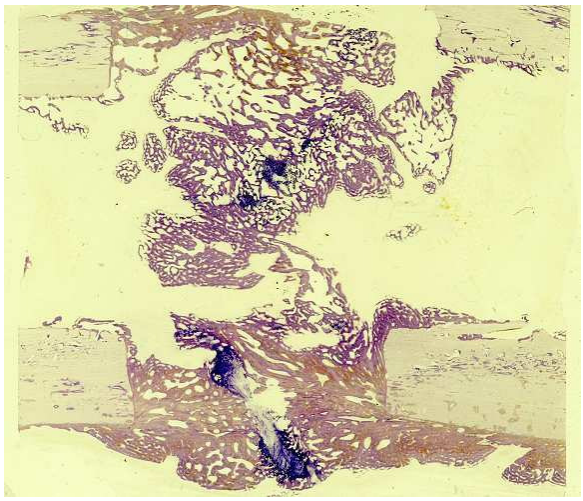


Abb. 24h: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 24b)

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung des prozentualen Fluoreszenzanteils, der der Knochenanbauaktivität zur Applikationszeit + 3 Tage entspricht, erbrachte für die Calceingrün-Fluoreszenz (Applikation 3 Wochen postoperativ) sowohl in der Defektzone als auch im periostalen Bereich für beide Gruppen annähernd gleiche Werte von ca 6% und ca 3% (siehe Abbildungen 26 und 27).
Die Auswertung der Tetrazyklin-Fluoreszenz (Applikation 6 – 7 Wochen postoperativ) ergab für die FXIII-Gruppe sowohl in der Defektzone als auch im periostalen Bereich im Median um den Faktor 3 bis 4 höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Siehe auch Abbildungen 28 und 29.
Abbildungen 25a – 25d zeigen beispielhaft Präparate aus beiden Tiergruppen in der Fluoreszenzmikroskopie (100x Vergrößerung).

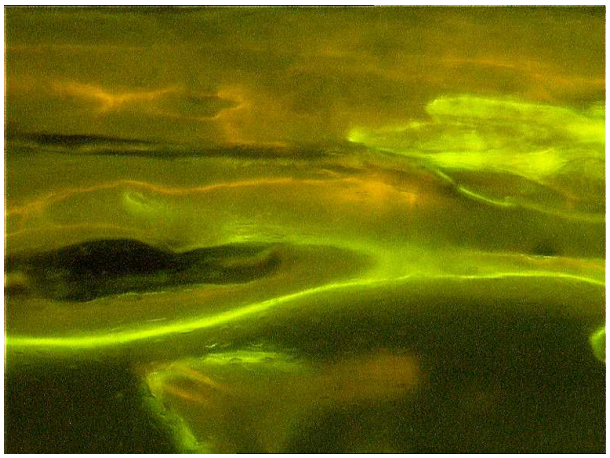


Abb. 25a: Kontrollgruppe. Histologisches Präparat des Distraktionskallus in der Fluroeszenzmikroskopie, 100x Vergrößerung.

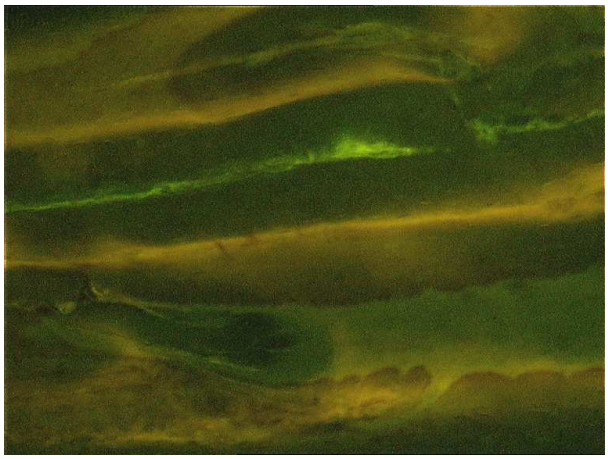


Abb. 25b: FXIII-Gruppe. Histologisches Präparat des Distraktionskallus in der Fluoreszenz-Mikroskopie, 100x Vergrößerung.

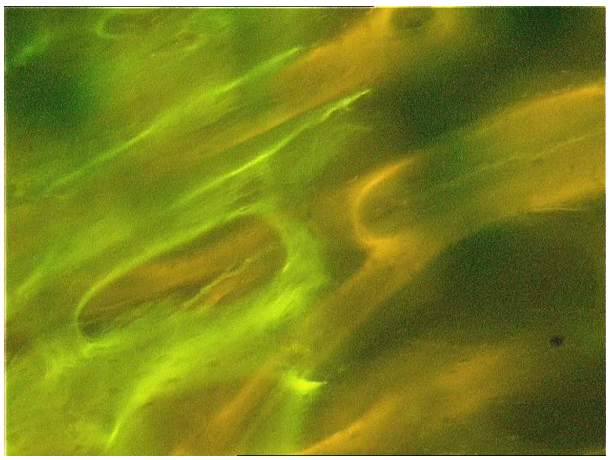


Abb. 25c: Kontrollgruppe. (siehe Bildbeschreibung 25a)

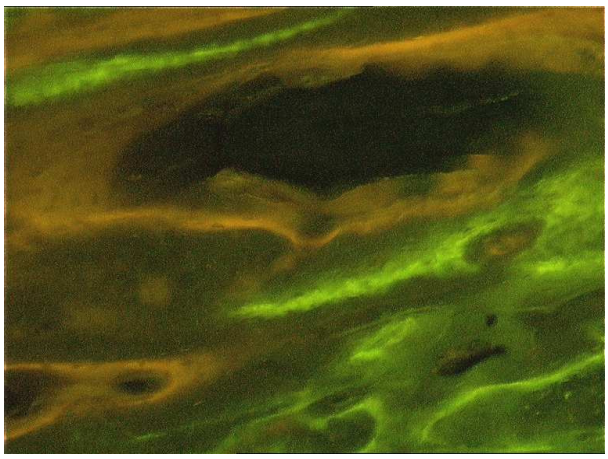


Abb.25d: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 25b)

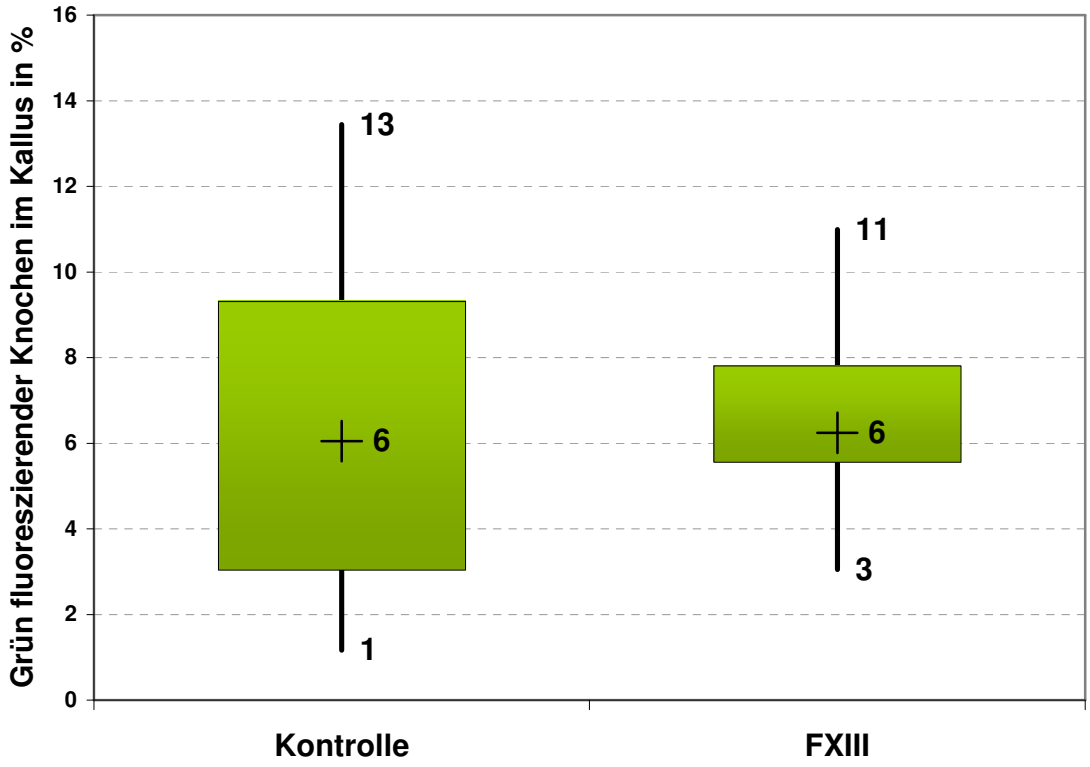


Abb. 26 : Prozentualer grün-fluoreszierender Knochenanteil im Defektbereich des Distraktionskallus für die Kontroll- und die FXIII-behandelte Gruppe; entsprechend der Knochenanbauaktivität zum Injektions-zeitpunkt (+ 3 Tage) der Substanz Calceingrün. Injektionszeitpunkt = 3 Wochen postoperativ. (dargestellt sind Medianwerte, 1. und 3. Quartil, Minima und Maxima)

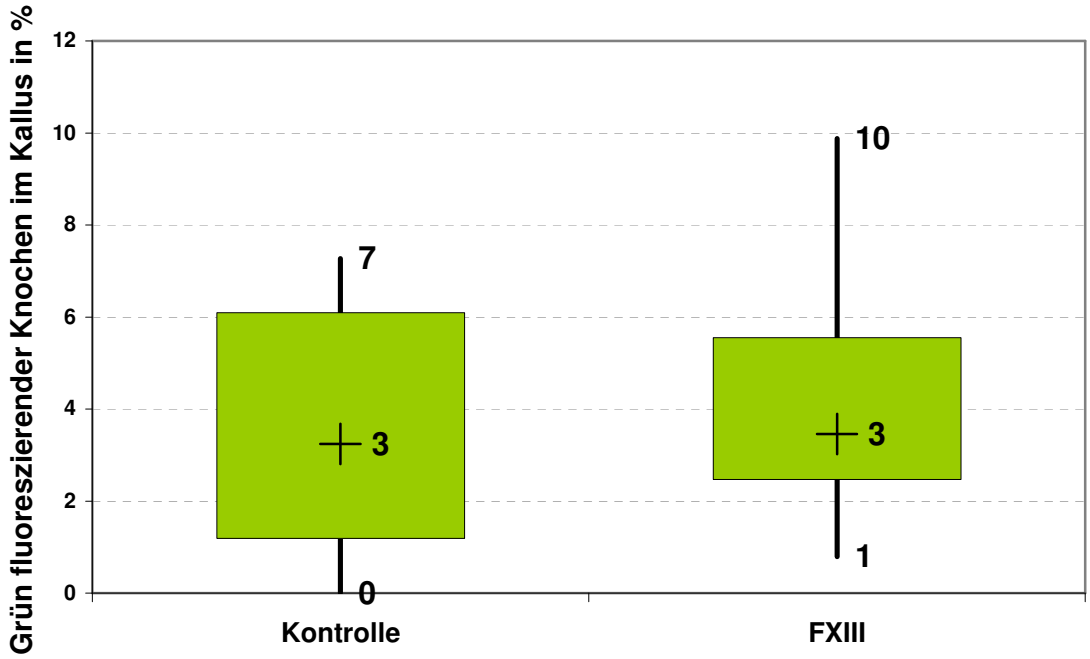


Abb. 27: Prozentualer grün-fluoreszierender Knochenanteil im periostalen Bereich des Distraktionskallus für die Kontroll- und die FXIII-behandelte Gruppe; entsprechend der Knochenanbauaktivität zum Injektions-zeitpunkt (+3 Tage) der Substanz Calceingrün. Injektionszeitpunkt = 3 Wochen postoperativ. (dargestellt sind Medianwerte, 1. und 3. Quartil, Minima und Maxima)

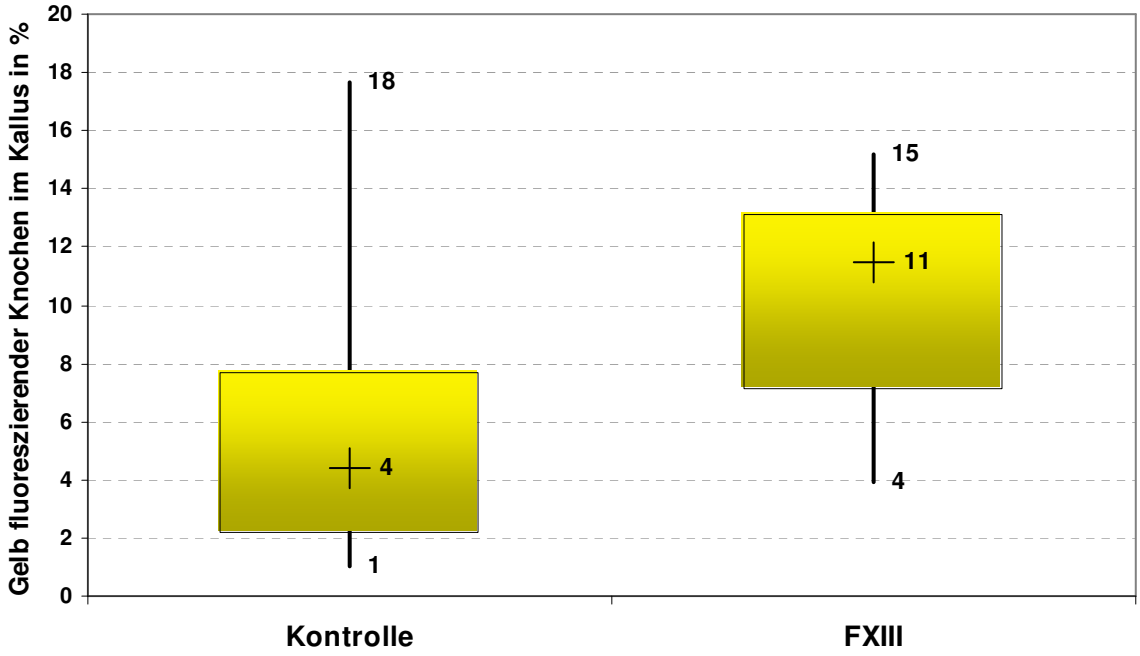


Abb. 28: Prozentualer Anteil gelb-fluoreszierenden Knochens im Defektbereich des Distraktionskallus für die Kontroll- und die FXIII-behandelten Tiere; entsprechend der Knochenanbauaktivität zum Injektions-zeitpunkt (+ 3 Tage) der Substanz Tetrazyklin. Injektionszeitpunkt = 6 - 7 Wochen postoperativ. (dargestellt sind Medianwerte, 1. und 3. Quartil, Minima und Maxima)

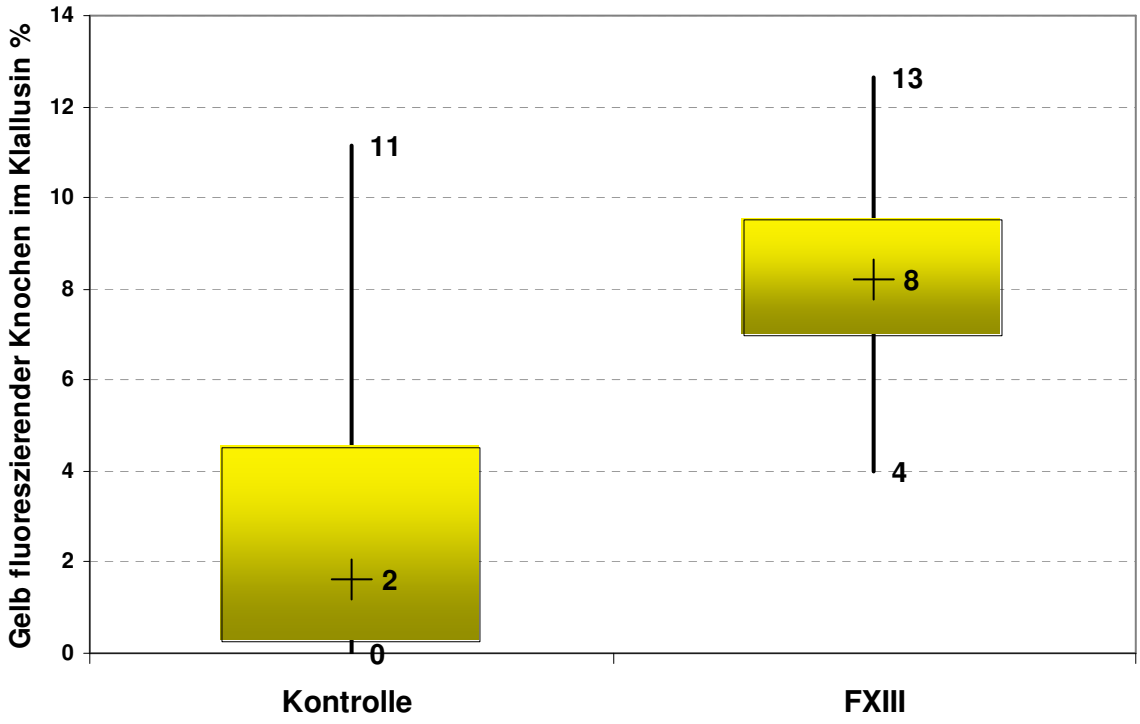


Abb. 29: Prozentualer Anteil gelb-fluoreszierenden Knochensim periostalen Bereich des Distraktionskallus für die Kontroll- und die FXIII-behandelten Tiere; entsprechend der Knochenanbauaktivität zum Injektions-zeitpunkt (+ 3 Tage) der Substanz Tetrazyklin. Injektionszeitpunkt = 6 – 7 Wochen postoperativ. (dargestellt sind Medianwerte, 1. und 3. Quartil, Minima und Maxima)

3.2.3 Distanzmessung zwischen grüner und gelber Fluoreszenz

Klar begrenzte fluoreszierende Bandenanschnitte erlaubten eine Messung der Distanz zwischen der Calceingrün-Fluoreszenz-Bande und der Tetrazyklin-Fluoreszenz-Bande. Diese Distanz entspricht dem quantitativen Knochenanbau im Zeitraum zwischen den beiden Fluoreszenzmarkierungen. Diese Messungen lieferten für die FXIII-Gruppe eine beinahe doppelt so große Distanz (67,3 µm gegenüber 36,3 µm) wie für die Kontroll-Gruppe. Abbildung 31. Abbildung 30a – 30p zeigen einige Distanzmessungen der Fluoreszenzbanden in beiden Tiergruppen (100x).

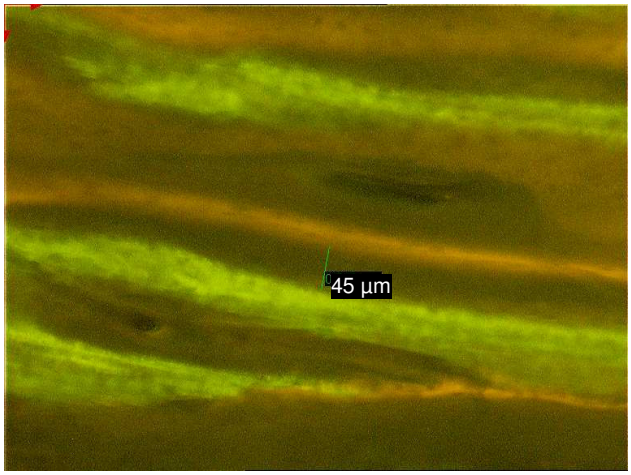


Abb. 30a: Kontrollgruppe. Fluoreszenzmikroskopie. Histologisches Präparat des Distraktionskallus, 100x Vergrößerung. Distanzmessung zwischen grün- und gelb- fluoreszierenden Banden via Bild-Analyse-Gerät am Computer.

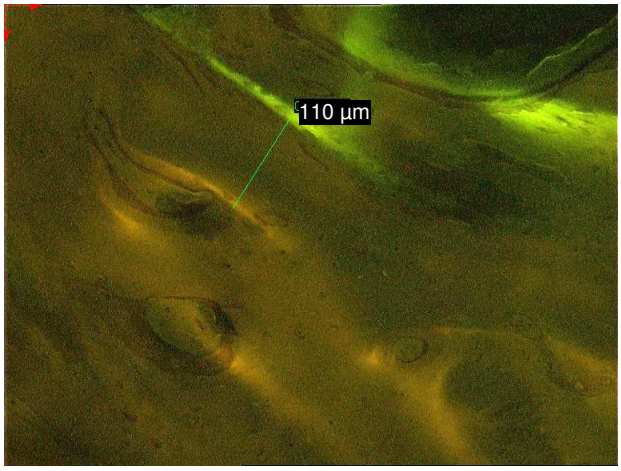


Abb. 30b: FXIII-Gruppe. Fluoreszenzmikroskopie. Histologisches Präparat des Distraktionskallus, 100x Vergrößerung. Distanzmessung zwischen grün- und gelb- fluoreszierenden Banden via Bild-Analyse-Gerät am Computer.

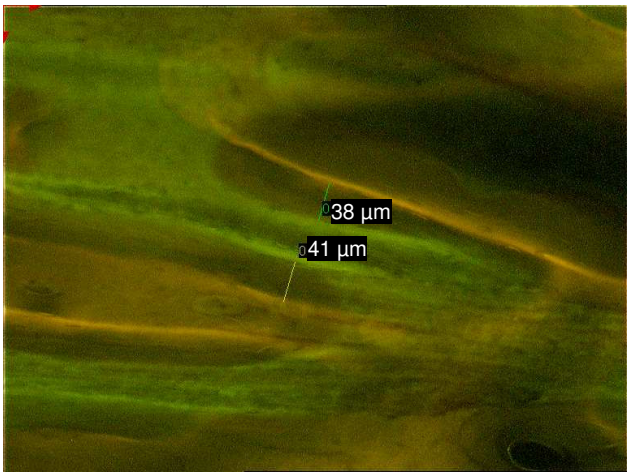


Abb. 30c: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 30a)

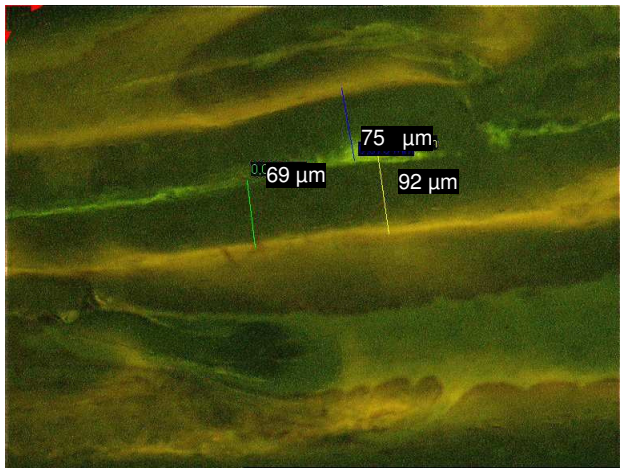


Abb. 30d: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 30b)

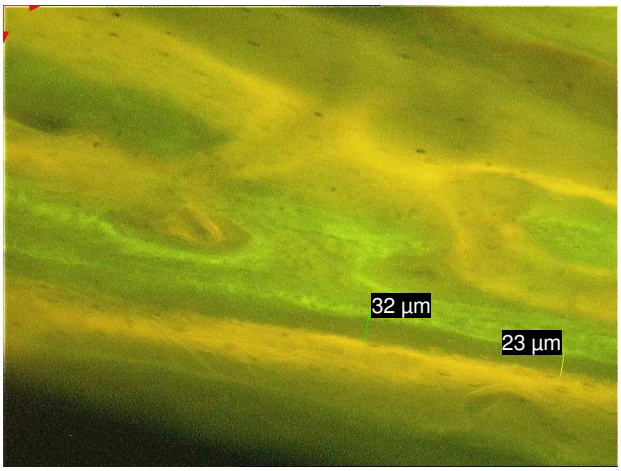


Abb. 30e: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 30a)

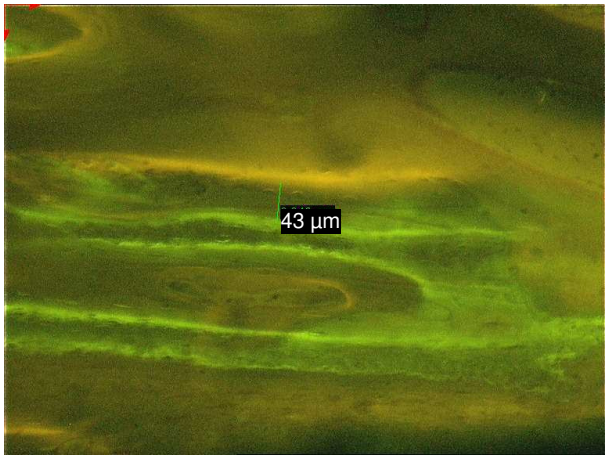


Abb. 30f: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 30b)

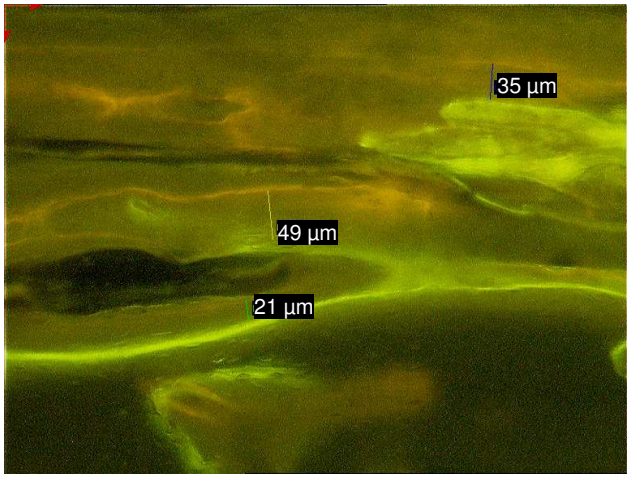


Abb. 30g: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 30a)

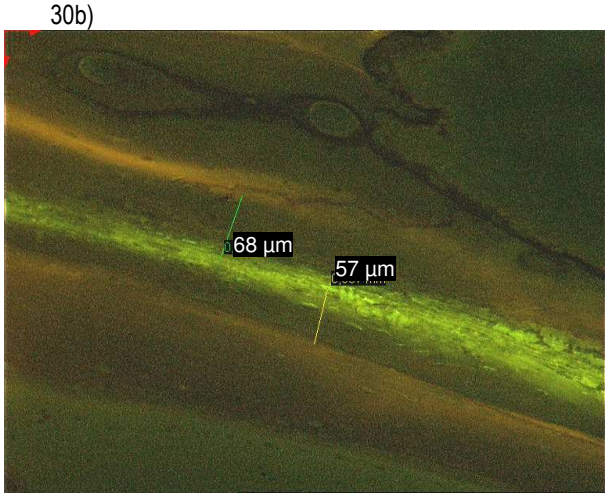


Abb. 30: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 30b)

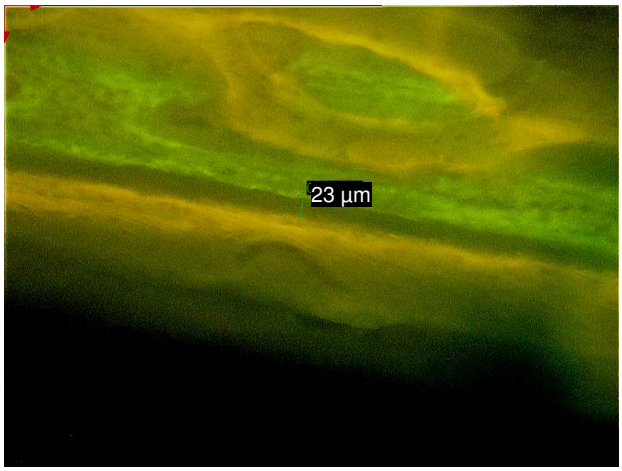


Abb. 30i: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 30a)

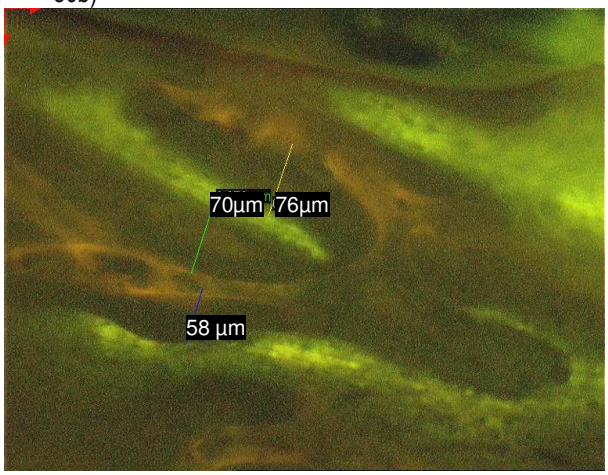


Abb. 30k: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 30b)

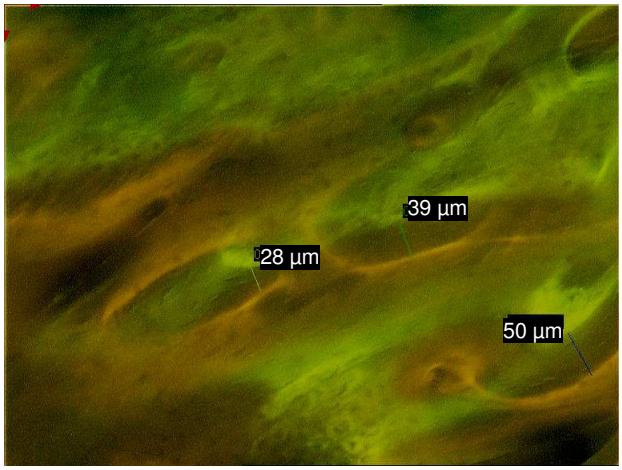


Abb. 30l: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 30a)

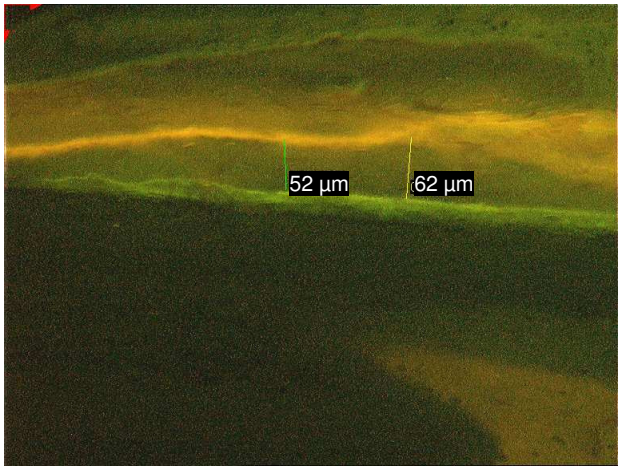


Abb. 30m: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 30b)

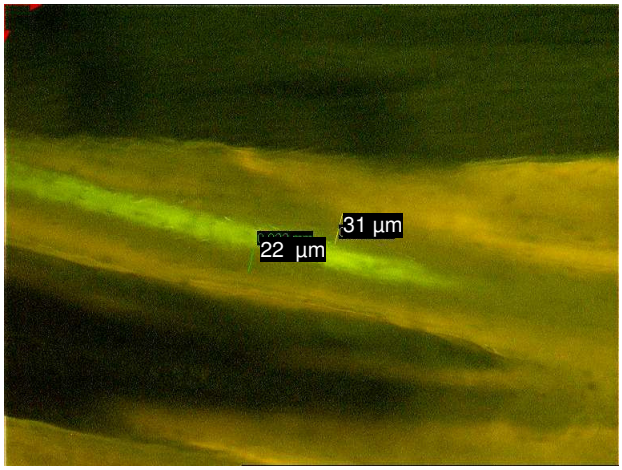


Abb. 30n: Kontrollgruppe (siehe Bildbeschreibung 30a)

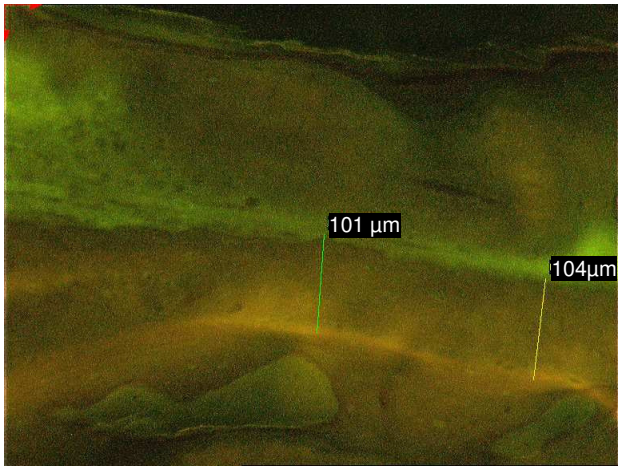


Abb. 30p: FXIII-Gruppe (siehe Bildbeschreibung 30b)

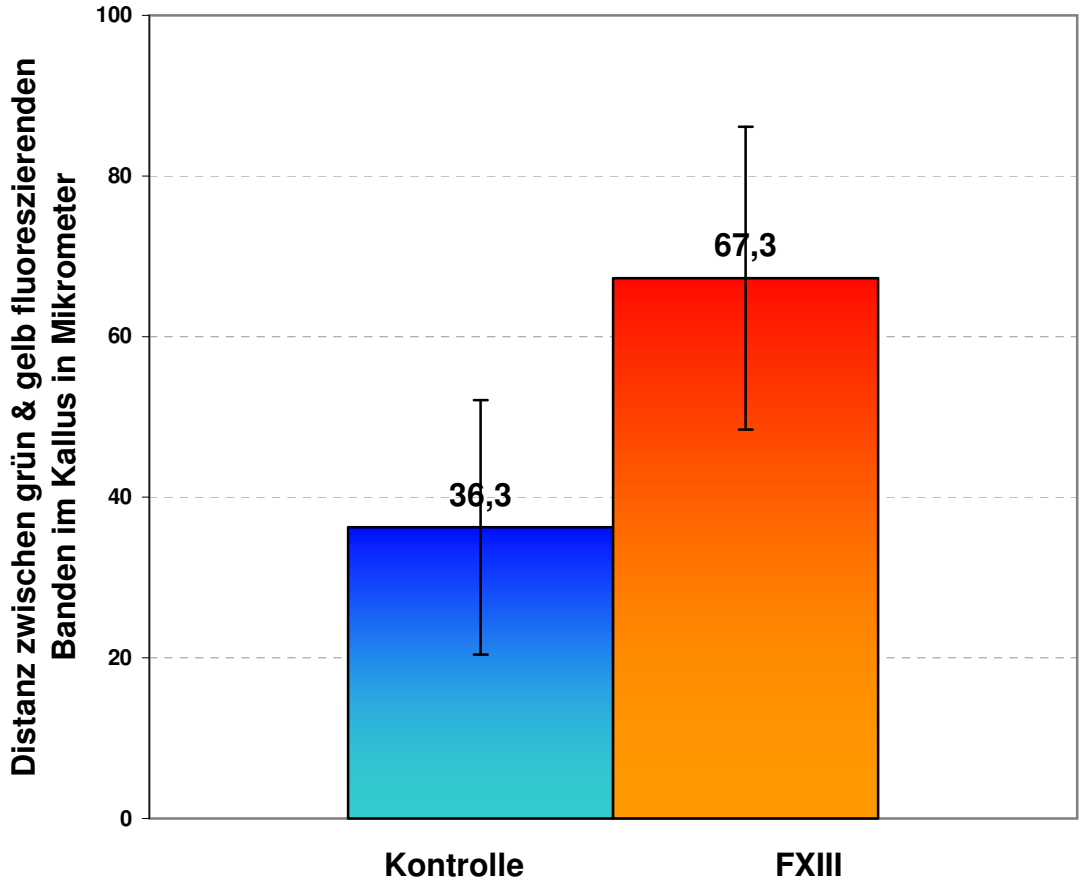


Abb. 31: Mittlere Distanz zwischen grün und gelb fluoreszierenden Banden im Distraktionskallus in µm für die Kontrolll- und FXIII-behandelte Gruppe; enstprechend der Knochenmenge, die zwischen beiden Fluorochrommarkierungen angebaut wurde.
(dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen)

Eine Aufteilung der Distanzmessungen in einen periostalen, kortikalisnahen und Defektmitte-Bereich zeigt, dass in der FXIII-Gruppe in allen Bereichen gleichmäßig signifikant größere Distanzen zwischen den Fluoreszenzmarken gefunden werden ($p < 0,05$). Vor allem im Bereich der Defektmitte sind die gemessenen Distanzen mehr als doppelt so groß, wie in der Kontrollgruppe. Abbildung 32. Zu den Lokalisationsbereichen im Regenerat siehe auch Abbildung 15 in Kapitel 2.8.3.4.

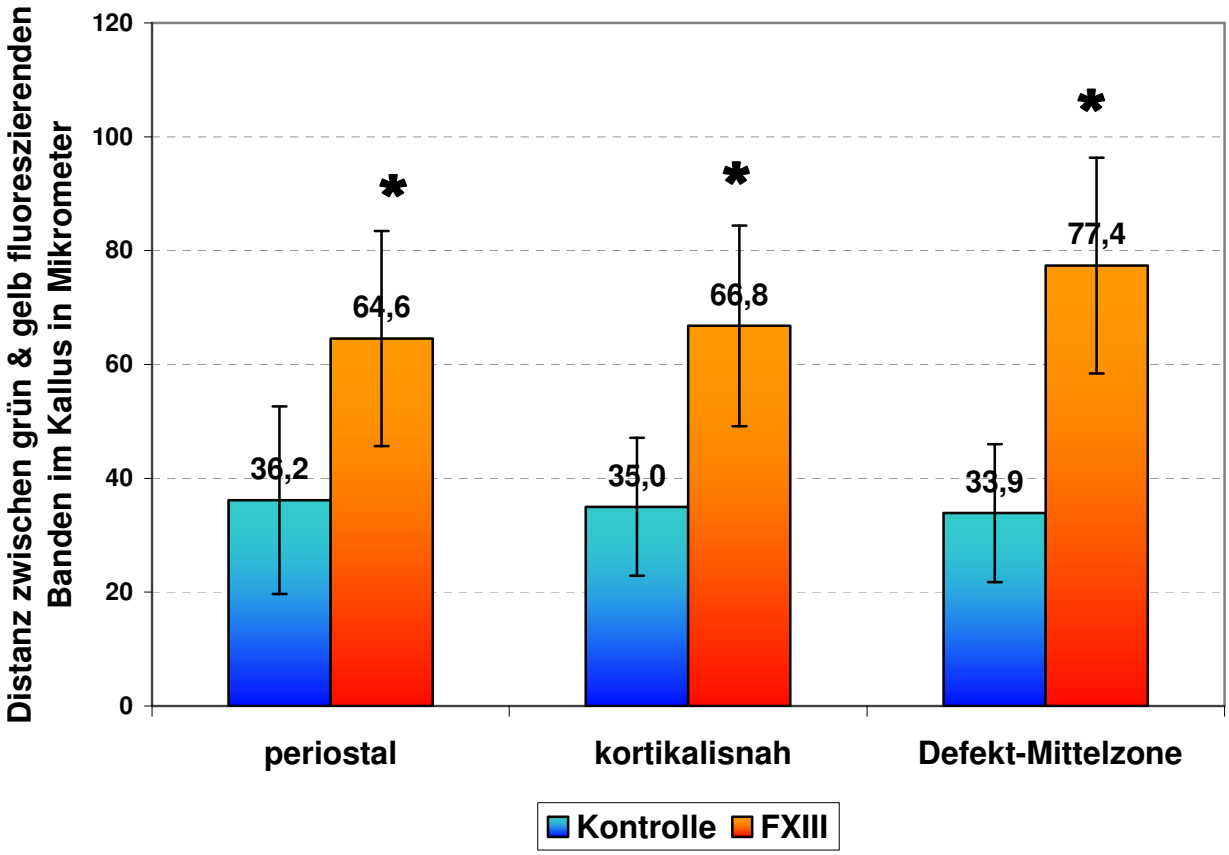


Abb. 32: Distanz zwischen grün und gelb fluoreszierenden Banden im Distraktionskallus in µm in Abhängigkeit der Lokalisation im Regenerat, jeweils für die Kontroll- und die FXIII-behandelte Gruppe; entsprechend jeweils der angebauten Knochenmenge zwischen den beiden Fuorochrommarkierungen.
(dargestellt sind Mittelwerte und Standardabeweichungen)

Durch Division der Bandenabstände durch die Zeitintervalle zwischen den Fluoreszenzmarkierungen erhält man für jedes Tier eine spezifische Knochenanbaugeschwindigkeit in µm/d. Dadurch ist es möglich, die nicht für alle Tiere genau gleich langen Zeitintervalle dennoch für einen direkten Vergleich heranzuziehen. In beiden Gruppen konnte je ein Versuchstier zu dieser Auswertung nicht herangezogen werden, da für die Distanzmessung keine geeigneten Bandenanschnitte gefunden wurden.

Die Knochenanbaugeschwindigkeiten der einzelnen Tiere lieferten für beide Gruppen eng gestreute Ergebnisse. Abbildung 33 zeigt die Durchschnitts-Knochenanbaugeschwindigkeit der Kontrollgruppe im Vergleich zur FXIII-Gruppe. Im Zeitraum zwischen den beiden Fluoreszenzmarkierungen (3. und 6./7. Woche postoperativ) wurde in der FXIII-Gruppe mit der 2,4 fachen Geschwindigkeit der Kontrollgruppe Knochenmatrix angebaut. Die Knochenanbaugeschwindigkeit der FXIII-behandelten Tiere ist damit signifikant größer ($p < 0,05$).

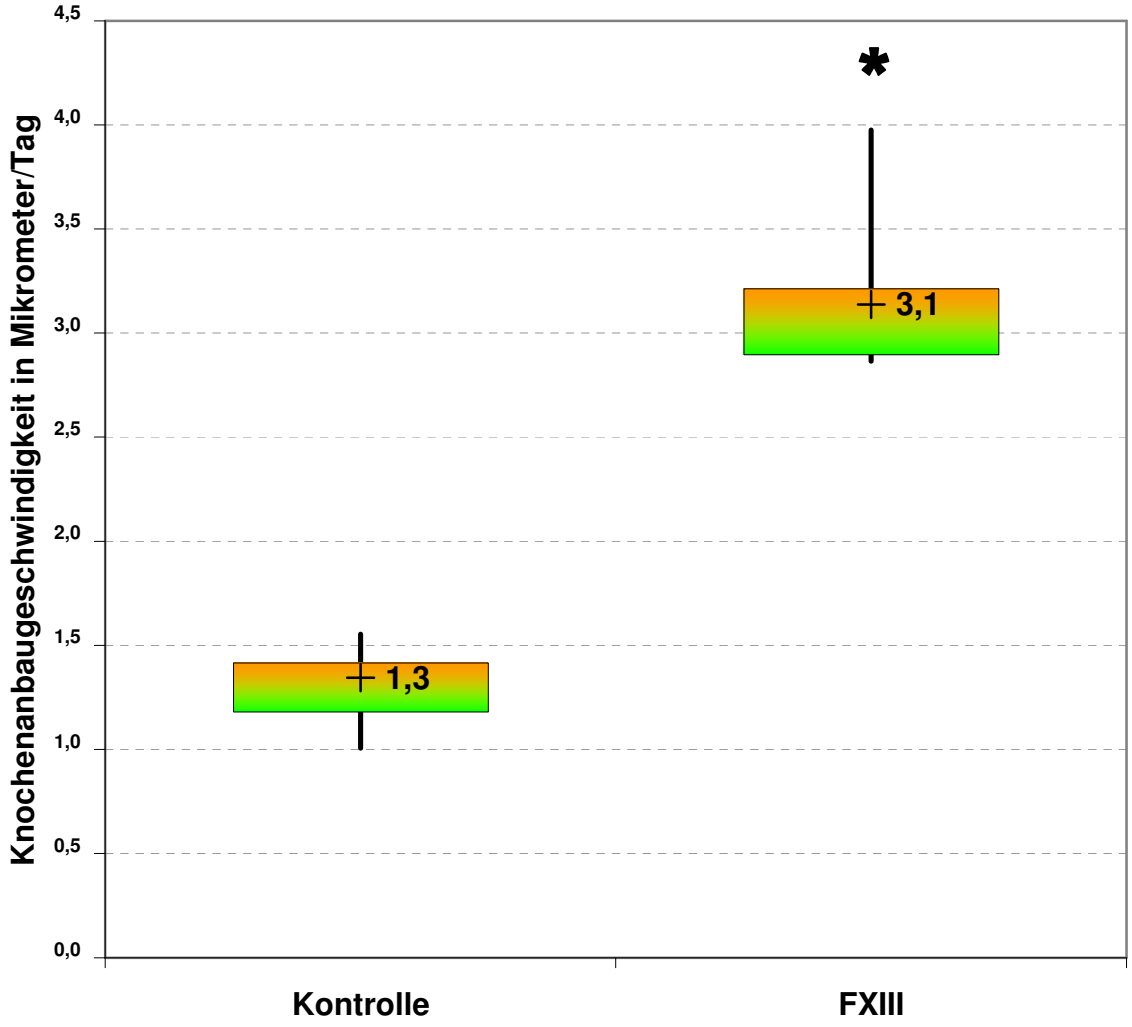


Abb. 33: Knochenanbaugeschwindigkeit in µm/d für Kontroll- und FXIII-Tiere im Zeitraum zwischen den beiden Fluorochrommarkierungen.
(dargestellt sind Medianwerte, 1. und 3. Quartile, Minima und Maxima)

4. Diskussion

Wir haben mit dieser Arbeit den Einfluss einer FXIII-Applikation auf die Kallusregeneration genauer untersucht. Unser Ziel war es, bereits veröffentlichten, biomechanischen und morphologischen Resultaten ein histologisches Korrelat zuzuweisen. Dies gelang uns durch die Histomorphometrie und die Fluorochrommarkierung. Wir konnten zeigen, dass eine FXIII-Applikation in der frühen Phase der Kallusregeneration zu einer signifikanten Steigerung der Knochenanbaugeschwindigkeit führt. 12 Wochen postoperativ finden wir zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren zwar keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der im Defektareal entstandenen Knochenmasse, jedoch aber eine interessante und charakteristisch veränderte Verteilung der neu angebauten Knochenmatrix. Bei den FXIII-behandelten Tieren zeigt sich eine homogenere Knochenverteilung und tendenziell mehr Knochen im instabilsten Bereich des Defektes, der Regeneratmitte. Diese Beobachtung erklärt die biomechanischen Ergebnisse von einer lediglich 10% höheren Knochendichte in der FXIII-Gruppe, jedoch eine um 22% höhere axiale Steifigkeit und eine um 163% höhere lokale Steifigkeit in der Regeneratmitte.
Im Folgenden sollen nun die gewonnen Ergebnisse im Vergleich zur Literatur und im Kontext mit vorherrschenden Hypothesen zum Wirkungsmechanismus des FXIII, sowie Methodik und damit verbundene Limitationen unserer Studie diskutiert werden.

In der Durchlichtmikroskopie zeigte zunächst der direkte Vergleich der Gewebeverteilung im gesamten interkortikalen Regenerat für beide Versuchsgruppen ein charakteristisches Gewebemuster: In der FXIII-Gruppe imponierte als dominante Struktur Knochengewebe, während in der Kontrollgruppe Bindegewebe überwog. Auch fanden wir in der Kontrollgruppe noch vermehrt knorpelige Anteile. Diese Gewebeverteilung ist vereinbar mit einer weiter fortgeschrittenen Knochenheilung und einer früher einsetzenden Mineralisation bei den FXIII-Tieren. Eine solche Beobachtung finden wir auch bei Benfer und Struck [3], die in einer tierexperimentellen Studie an der osteotomierten Rattentibia den Heilungsprozess histologisch und röntgenologisch beobachteten. Auch sie konnten bei histologischen Beobachtungen (2 Tage, 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ) einen weiter fortgeschrittenen Heilungsprozess für die FXIII-Tiere belegen (siehe auch Tab. 6, Kapitel 2.1.4).
Beim Auffächern unserer Ergebnisse in unterschiedliche Anteile des Regenerats (proximal, mittig, distal) erhielten wir für die FXIII-Gruppe eine sehr viel homogenere Verteilung des

Knochengewebes im Defekt, als für die Kontrollgruppe. Besonders in der Regeneratmitte, der instabilsten Lokalisation im Defekt, fanden wir deutlich mehr Knochengewebe für die FXIII-behandelten Tiere. Die mikroskopischen Auswertungen korrelierten hier mit den makroskopischen Messungen der Eindrücksteifigkeit entlang des Kallusregenerats: In der Mitte des Regenerats zeigte die FXIII-Gruppe eine signifikant höhere Eindrücksteifigkeit (+163%) und mikroskopisch einen deutlich höheren Anteil an Knochengewebe. Die gesamte axiale Steifigkeit des Kallusregenerats lag für die FXIII-Gruppe um 22% höher, was ebenso auf die homogenere Knochenverteilung zurückgeführt werden kann. Claes et al messen insgesamt der signifikant höheren Eindrücksteifigkeit größere Bedeutung für die Stabilität eines Defektes bei als der axialen Steifigkeit, da in vivo neben axialen Kräften auch Torsionskräfte auf einen Kallus einwirken und hierfür eine homogene Verteilung des stabilen Knochengewebes nötig ist [16].
Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse der Durchlichtmikroskopie, analog zu Benfer und Struck [3], eine deutliche Tendenz zur schleunigeren Heilung unter systemischer Gabe eines FXIII-Konzentrats. Wir fanden für unsere FXIII-behandelten Tiere tendenziell mehr Knochengewebe im Regenerat und besonders aber fanden wir dieses „Mehr“ an Knochen genau dort, wo es sich am günstigsten für die Stabilisation des Defektes auswirkte, nämlich in der Defektmitte. So kann also neben einer tendenziell schnelleren Heilung auch von einer tendenziell schnelleren primären Stabilisierung der Defektsituation ausgegangen werden.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der fluoreszierenden Banden fanden wir bezüglich der grünen Fluoreszenz für beide Versuchsgruppen annähernd gleiche Werte von ca 6% interkortikal und ca 3% periostal. Da die grüne Fluoreszenzmarkierung unmittelbar nach Ende des Segmenttransports und unmittelbar vor der ersten FXIII-Applikation stattfand, ist zu diesem Zeitpunkt der Markierung noch kein Unterschied hinsichtlich der Knochenanbauaktivität zwischen beiden Gruppen zu erwarten. Die Tatsache, dass beide Gruppen nach dem Segmenttransport und zu Beginn der FXIII-Applikation gleiche grün fluoreszierende Anteile in der Auswertung liefern, zeigte uns, dass beide Versuchsgruppen tatsächlich gleich schnell heilen. Somit konnten wir ausschließen, dass jene Tiere, die nach mehrmaliger FXIII-Applikation eine erhöhte Knochenanbauaktivität aufwiesen, diese bereits schon vor FXIII-Applikation innehatten. Folglich gingen wir von einem homogen heilenden Kollektiv aus.
Im Vergleich hierzu fanden wir für die Tetrazyklin-Fluoreszenz sowohl interkortikal als auch periostal deutlich mehr Fluoreszenz für die Tiere der FXIII-Gruppe (interkortikal 11% gegenüber 4% in der Kontrollgruppe, periostal 8% gegenüber 2%). Da zum Zeitpunkt der grünen Fluoreszenzmarkierung

die Knochenanbauaktivität für beide Gruppen gleich hoch war und die weiteren Versuchsbedingungen sich nur im Hinblick auf die Applikation des FXIII-Konzentrats unterschieden, können wir davon ausgehen, dass der FXIII erheblich zur sichtbaren Steigerung der Knochenanbauaktivität beigetragen hat.

Diese Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie, die chronologisch der frühen Knochenheilungsphase entsprechen, zeigten uns einen positiven Effekt der FXIII-Applikation auf die Knochenanbauaktivität.

Wieder deckten sich unsere Ergebnisse in der Fluoreszenzmikroskopie mit den frühen histologischen Beobachtungen von Benfer und Struck [3]. Unsere erhöhte Knochenanbaugeschwindigkeit für die FXIII-Tiere wies ebenso, wie Benfer und Strucks zu jeder Zeit der histologischen Beobachtung fortgeschrittene Organisation im Defektareal, auf eine beschleunigte Heilung unter FXIII-Einfluss hin. Auch Gerngroß et al. [25] konnten in einem Versuchsmodell mit autologer Spongiosafüllung von Bohrlöchern in Schafsdiaphysen unter FXIII-Einfluss signifikant mehr Knochen nach 7 Wochen im Transplantatareal zeigen und eine dadurch wesentlich bessere und schnellere Einheilung des Spongiosamaterials.

Um nun nicht nur Messwerte im Verhältnis zueinander betrachten zu können, wie dies bei der Methode der prozentualen Fluoreszenz der Fall war, entschieden wir uns, den absoluten Knochenanbau in beiden Gruppen für den Zeitraum zwischen den Fluoreszenzmarkierungen zu bestimmen. Diese knöcherne Distanz zwischen den beiden fluoreszierenden Banden war für die FXIII-Tiere signifikant größer – obwohl für die FXIII-Tiere das Zeitfenster zwischen grüner und gelber Fluoreszenzmarkierung im Durchschnitt fast 10 Tage kürzer betrug, als für die Kontrollgruppen-Tiere. Mit anderen Worten sagten unsere Ergebnisse der Distanzmessung, dass bei den FXIII-Tieren signifikant mehr Knochen in deutlich weniger Zeit entstanden ist. Die Division der angebauten Knochendistanz (in µm) durch die Zeit (in Tagen) zwischen den Fluorochrommarkierungen lieferte uns die spezifische Knochenanbaugeschwindigkeit pro Tag für jedes Versuchstier. Ein Vergleich zwischen der Kontroll- und FXIII-Gruppe zeigte einen signifikanten und sehr gering gestreuten Unterschied hinsichtlich der Knochenanbaugeschwindigkeit zugunsten der FXIII-Gruppe. Mit dieser Ermittlung der Knochenanbaugeschwindigkeit ist es uns erstmalig gelungen, das tatsächliche Ausmaß des FXIII-Effekts auf die Frakturheilung in Zahlen zu fassen.

Beim Vergleich der durchlichtmikroskopischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit jenen der Fluoreszenzmikroskopie sahen wir, dass der in der Fluoreszenzmikroskopie (frühe Heilungsphase) signifikante Unterschied in der Knochenanbaugeschwindigkeit nicht in einer signifikant vermehrten Knochenmenge bei zunehmender Heilungsdauer resultierte. In der Literatur finden wir dieses

Phänomen bereits des Öfteren beschrieben als einen „Abfall des FXIII-Effekts bei zunehmender Heilungsdauer“. Meyer et al. konnten in einer in vitro-Studie zeigen, dass Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die bei Spongiosaentnahmen aus dem überschüssigen Blut gewonnen wurden, unter FXIII-Applikation signifikant mehr Alkalische Phosphatase (als Parameter für die Mineralisation) sezernierten [47]. Auch bei Meyer et al. fiel dieser im Anfangsstadium signifikante Unterschied der Alkalischen Phosphatase-Aktivität im Verlauf des Heilungsprozesses wieder ab und glich sich mit zunehmender Heilungsdauer mehr und mehr dem Niveau der Kontrollgruppe an. Auch im Experiment von Benfer und Struck [3] blieb die Tendenz zu einer höheren Kallusstabilität für die FXIII-Gruppe während des gesamten Experiments erhalten, ein Vergleich der Messwerte verdeutlichte aber, dass der positive Einfluss des FXIII mit zunehmender Heilungsdauer geringer wurde. In der Literatur wurde dies meist dahingehend bewertet, dass ein therapeutisch relevanter Benefit aus einer reinen FXIII-Applikation mit anfänglich suffizienten FXIII-Aktivitäten der Versuchstiere langfristig nicht zu erwarten ist. Tatsächlich profitieren können laut bisherigen Studien vor allem Patienten mit vorangehenden insuffizienten FXIII-Plasma-Spiegeln (Mangel, erhöhter Verbrauch bei Polytraumatisierung, chronisch entzündlichen Erkrankungen), da solche Situationen nachgewiesen eine verzögerte Knochenheilung erwarten lassen [64], oder aber Patienten mit bereits manifester Knochenheilungsstörung.

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Versuchsaufbau entsprach nicht einem Substitutionsmodell, sondern gezielt einem Additionsmodell bei Versuchstieren mit präoperativ suffizienten FXIII-Spiegeln. Allerdings handelt es sich bei der externen Fixation mit Segmenttransport um eine komplexe Therapieform, die bedingt durch die langen Liegezeiten des Fixateurs nach Ende des Segmenttransports erhöhte Komplikationsraten aufgrund von Pininfektionen aufweist. Eine Verkürzung der Liegezeit eines Fixateur externe dank einer früheren Stabilisierung könnte somit die Pininfektions-Rate senken und Therapiekosten mindern.

Unsere gewonnenen Ergebnisse zeigten im Additionsmodell bei einer komplexen Therapie eine in der Frühphase signifikant erhöhte Knochenanbaugeschwindigkeit, die jedoch bei fortgeschrittener Heilungszeit keine signifikant höheren Knochenmengen für die FXIII-Gruppe lieferten. Dennoch konnten wir auch in der Durchlichtmikroskopie zum spätesten Auswertungszeitpunkt eine deutlich homogenere Verteilung des Knochengewebes im Regenerat aufzeigen, die letztendlich in der biomechanischen Auswertung zu gesteigerter Stabilität für die mit FXIII behandelten Defekte führte. Somit fanden wir im Gegensatz zur bisher vorherrschenden Meinung in der Literatur, dass auch im reinen FXIII-Additionsmodell ein Benefit erreicht wird. Vorteile für die Stabilität des Defektes bringt der FXIII bereits frühzeitig und vor allem dahingehend, dass die im Vergleich zur Kontrollgruppe

mehr angebaute Gewebemasse überwiegend in der Regeneratmitte angesiedelt ist. Hier trägt sie zur Stabilisierung des Defektes am effektivsten bei und führt in den biomechanischen Auswertungen zu tendenziell bis signifikant besseren Ergebnissen. Um jedoch den Benefit einer reinen FXIII-Addition sehen zu können, bedarf es mehrerer Blickwinkel. Biomechanische Vorteile beschreiben neben uns auch Benfer und Struck mit einer während des gesamten Experiments vorhandenen tendenziell höheren Kallusstabilität für die FXIII-Tiere und auch Claes et al. in einem vorangegangenen Experiment an osteotomierten Schafsmetatarsae mit einer signifikant erhöhten Knochenbruchfestigkeit um +44% bei einer Zunahme der Knochendichte um lediglich 7,3% [15]. Die bisher oft rein quantitative Messung der Knochenmenge mit und ohne FXIII-Behandlung führt hier nicht zum Ziel, eher sogar zum Trugschluss, dass die FXIII-Addition zu keinem signifikanten Benefit führt. Wie genauere Betrachtungen des FXIII-Einflusses im Additionsmodell zeigten, resultiert der letztendlich benefittragende Effekt aus einer weiter fortgeschrittenen Gesamtheilung im Defektareal. Claes et al. fanden für eine um 44% erhöhte Kallusbruchfestigkeit bei lediglich 7,3% höherer Knochendichte deutlich mehr Osteone, die den Osteotomiespalt überquerten und somit die Kontinuität des Knochens durch mechanische Verbindung beider Fragmente wiederherstellten. In der jetzigen Arbeit fanden wir für die FXIII-Tiere ebenso nur eine tendenziell erhöhte Knochenmenge, aber eine homogenere Knochenverteilung im Defektareal zugunsten der Kontinuität des Metatarsus. Mit diesem Wissen, dass der Effekt des FXIII nicht in einer rein quantitativen Erhöhung der Knochenmenge, sondern in einer qualitativen Besserung durch eine weiter fortgeschrittene Heilung mit homogenerer Knochenverteilung liegt, könnte man bisherige Studien durchaus anders auslegen: Meyer et al. zum Beispiel zeigten für die FXIII-behandelten Zellkulturen eine im Frühstadium signifikante Steigerung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität als Parameter für die Mineralisierung, die sich jedoch im Lauf der Zeit dem Niveau der Kontrollgruppe anglich [47]. Die Deutung einer Abnahme des FXIII-Effekts über die Zeit lag nahe. Wir haben in unserer Arbeit ebenso eine signifikant erhöhte Knochenanbaugeschwindigkeit in der frühen Heilungsphase festgestellt, die letztendlich nicht zu einer signifikant höheren Knochenmenge, aber zu tendenziell bis signifikant besseren biomechanischen Eigenschaften geführt hat. Somit gehen wir heute davon aus, weil wir von der verbesserten Gesamtheilung im Defektareal durch FXIII und den dadurch verbesserten biomechanischen Eigenschaften wissen, dass eine reine FXIII-Addition auch langfristig einen Benefit bringt. Nach wie vor am deutlichsten wird der Benefit des FXIII auf die Frakturheilung logischerweise dann, wenn die physiologische Knochenheilung aus irgendeinem Grund gestört ist (Polytraumatisierung, manifeste Knochenheilungsverzögerung, FXIII-Mangel etc.) und FXIII im Sinne einer Substitution zugeführt wird.

Als Gesamtergebnis auf die Frage nach dem Effekt einer systemischen FXIII-Gabe auf die Kallusregeneration sehen wir also eine signifikante Erhöhung der Knochenanbaugeschwindigkeit in der frühen Knochenheilungsphase und eine deutlich vorangeschrittene Heilung mit homogenerer Verteilung der angebauten Knochenmenge und dadurch besserer Wiederherstellung der Kontinuität des Knochens. Beide Effekte zusammen resultieren letztendlich in einer tendenziellen bis signifikanten Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften.

FXIII-Wirkungsmechanismus

Molekulare Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus des FXIII sind uns vor allem aus der Gerinnungsphysiologie und aus der Wundheilung bekannt. Kapitel 2.1 zeigt bereits einen Einblick in diese Thematik.
Für die Frakturheilung interessante Aspekte der Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus des FXIII sind vor allem Fibroblasten und Osteoblasten betreffende. So wissen wir, dass der FXIII vermehrt Fibroblasten in das Defektareal rekrutiert. Diese werden unter FXIII-Einfluss zusätzlich zu höheren Synthese- und Proliferationsleistungen veranlasst. Mehr früh verfügbare Produktivität beschleunigt den Heilungprozess sowohl für die Wund- als auch für die Frakturheilung, denn in beiden Fällen muss zunächst das Defektareal inklusive dort bestehendem Hämatom organisiert werden. Dieser Vorgang läuft unter FXIII-Einfluss wesentlich effektiver ab als in der Kontrollgruppe ohne FXIII-Einfluss. Auch Benfer und Struck [3] beobachten in der Phase der Frakturheilung, bevor die Mineralisation einsetzt, eine gesteigerte Stabilität, die größtenteils nicht durch langsam wachsenden Knochen sondern durch unmittelbare und quantitative Bindegewebsanhäufung im Defektareal zwischen den beiden Knochenfragmenten zustande kommt. Durch die bessere und schnellere Organisation, wie auch Benfer und Struck [3] histologisch zeigen konnten, wird der Mineralisation und der Knochenbildung ein besseres Fundament geboten. Kuglmeier et al. konnten in vitro zeigen, dass Osteoblasten unter FXIII-Einfluss eine verstärkte Proliferation zeigen. Claes et al. [17] konnten zeigen, dass im Tierversuch durch FXIII-Applikation im Defektareal (hier Bohrlöcher in Rattentibiae) 10 Tage postoperativ 54% mehr Osteoblasten und 33% mehr neugebildeter Knochen imponieren und wiesen dem FXIII so eine mitogene Wirkung auf Osteoblasten zu. Meyer et al. [47] (siehe auch Kapitel 2.1) konnten in vitro (FXIII-Einfluss auf Osteoblasten) einen signifikanten Anstieg der Alkalischen Phophatase als Parameter für die Mineralisation zeigen. Diese beiden Mechanismen – gesteigerte Fibroblastenmigration, -proliferation, -syntheseleistung und gesteigerte Osteoblastenproliferation und Mineralisation – sind sehr wahrscheinlich für die beschleunigende

Wirkung des FXIII auf den Frakturheilungsprozess verantwortlich. Auch unsere Ergebnisse zeigten einen deutlichen Heilungsvorsprung in der frühen Phase, besonders anschaulich dargestellt in der Maßeinheit der Knochenanbaugeschwindigkeit. Zum bereits genannten Effekt hinzu kam die Beobachtung einer homogeneren Knochenverteilung im Defektareal unter FXIII-Therapie.

Nun stellt sich die Frage nach dem genauen Mechanismus der Induktion von Fibroblastenmigration, -proliferation, -adhäsion und gesteigerter Synthese. Die Frage nach der verstärkten Migration und Adhäsion von Fibroblasten in FXIII-quervernetzten Matrix lässt sich damit beantworten, dass Fibronektin als Bestandteil des Zytoskeletts der Fibroblastenmembran zu den bevorzugten Substraten des FXIII (siehe auch Kapitel 2.1) gehört. Für die Migration und Adhäsion von Fibroblasten ist sehr wahrscheinlich die FXIII-katalysierte Bindung von Fibrin im Hämatom mit Fibronektin in der Fibroblastenmembran verantwortlich. Weiter finden sich bei diesen in FXIII-Matrix fixierten Fibroblasten eine vermehrte Proliferation und gesteigerte Kollagensynthese. Die molekularen Prozesse für die optimale Proliferation und Syntheseleistung von Fibroblasten sind nicht genau bekannt. Dass FXIII aber eine Voraussetzung hierfür darstellt, zeigten Beck et al [2] und Bruhn et al [10]. Denkbar wäre, dass Fibroblasten für Proliferation und Kollagensynthese ein gewisses Maß an Ruhe in ihrem Zellkörper benötigen, welches sie durch die FXIII-vermittelte „Fixierung vor Ort“ erhalten.

Dieselbe Frage nach dem genauen Wirkungsmechanismus stellt sich ebenfalls für die Steigerung der Proliferation und Aktivität der Osteoblasten. Die Vermutung, FXIII könne Stamm- und Vorläuferzellen zum Eintritt in die osteogene Reihe beeinflussen, konnte bisher nicht sicher nachgewiesen aber auch nicht ausgeschlossen werden [47]. Ein solcher Ansatz wäre ebenso denkbar, wie die alleinige Steigerung einzelner Zellleistungen.

Die Frage nach den Mechanismen, die zu einer homogeneren und effektiveren Verteilung des Knochengewebes führen, lässt sich vielleicht als Folge der vorangegangenen Organisationprozesse beantworten. Durch eine stabilere FXIII-Quervernetzung im Rahmen der Hämatomorganisation entsteht eine stabilere Grundmatrix, die letztendlich die Basis für die weiteren Granulationsprozesse darstellt. Eine stabilere und dadurch gleichmäßigere Basis, auch an jenen Stellen, die vermehrt Scherkräften oder Belastungen ausgesetzt sind, ermöglicht eine gleichmäßigere und zügigere Adhäsion von Fibroblasten und damit eine gleichmäßigere und zügigere Kollagennetzausbildung. Hier wiederum können sich Osteoblasten niederlassen. Als logische Konsequenz erstellen sie dann zügiger eine homogener verteilte Knochenmatrix. Früher und homogener verteilter Knochen resultiert in früherer und besserer Stabilität.

Für diese Studie wurde als Versuchstier das Schaf gewählt, da es sich einerseits in der Forschung der Knochenheilung bewährt hat [37,]24] und andererseits auf diese Weise direkt an Vorgängerprojekte angeknüpft werden konnte. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Defektrekonstruktion benötigen ein verlässliches Defektmodell. Untersuchungen an Kleinsäugern sind nur begrenzt auf den Menschen übertragbar wegen der geringen Größe ihrer Knochen sowie höheren Turnover-Raten des Knochenumbaus. Das Schaf weist dagegen ein ähnliches Körpergewicht wie der Mensch auf, so dass Experimente mit klinisch vergleichbaren Defekten möglich sind. Zusammen mit dem Hund gilt das Schaf als das Versuchstier, dessen knöcherne Regenerationsprozesse denjenigen des Menschen am ähnlichsten sind. Schafe zeigen gegenüber dem Hund ein wesentlich homogeneres Bild der durch experimentelle Manipulation gesetzten Schäden, was die Interpretation der Versuchsergebnisse erleichtert [61]. Das Schaf besitzt dem menschlichen Skelett ähnliche Ausmaße und die mechanisch wirkenden Belastungen sind mit denen am Menschen vergleichbar. Zudem besteht in unserer Einrichtung eine langjährige Erfahrung mit Studien am Schaf, so dass wir von optimierten Versuchsbedingungen ausgehen und für die Kontroll-Gruppe auf bereits vorhandene Ergebnisse zurückgreifen können.

Rinder und Pferde als Versuchstiere wurden aus finanziellen, Primaten aus ethischen und finanziellen Gründen ausgeschlossen.

Die für die Studie ausgewählten Schafe entsprachen einander in Rasse, Alter, Geschlecht und Gewicht. Die Tiere verbrachten die Zeit bis zur Euthanasie unter den gleichen Haltungsbedingungen und im selben Raum. Demnach wurden die externen Bedingungen für die Heilung der Osteotomie identisch gehalten.

Der Versuchsaufbau wurde aus erfolgreichen, vorangegangenen Studien am Schaf übernommen, ebenso die Operationstechnik und die dafür verwendeten Materialien. In unserem Institut wurde eigens für das Schaf ein Ringfixateur externe entwickelt, der in dieser Studie zur Anwendung kam. Die Operation sowie die Anlage das Fixateur externe gelangen problemlos, ebenso gestaltete sich der postoperative Verlauf.

Einzig nennenswerte Probleme im Versuchsverlauf waren Pininfektionen bei jeweils 5 Schafen beider Versuchsgruppen. Diese konnten durch eine antibiotische Behandlung erfolgreich therapiert werden.

Der Zeitraum zwischen den beiden Fluorochrommarkierungen liegt für die FXIII-Tiere aus heute nicht mehr nachvollziehbaren Gründen im Durchschnitt bei 10 Tagen weniger. Da wir jedoch die Knochenanbaugeschwindigkeit pro Tag berechnet haben, konnten wir diese Unebenheit im

Versuchsaufbau beheben. Die Frage nach veränderten Ergebnis-Tendenzen bei exakt gleichem Fluorochrommarkierungs-Verhalten ist berechtigt, würde sich jedoch gegen vorbestehende Literatur wenden und ebenso auch gegen die Resultate der Durchlichtmikroskopie. Die Wahrscheinlichkeit, in der Kontrollgruppe 10 Tage früher eine gleichfalls erhöhte Knochenanbaugeschwindigkeit zu haben, die dann innerhalb weniger Tage auf beinahe die Hälfte abfällt, erscheint uns unwahrscheinlich. Außerdem macht die enge Streuung der errechneten Knochenanbaugeschwindigkeiten den Eindruck eines gewissen Heilungs-Grundtempos für beide Tiergruppen, das in dieser geringen Streuung eher an der Art der Behandlung, als an dem Zeitpunkt der Messung liegen mag.

Die histologische Auswertung mittels Durchlichtmikroskopie wurde gewählt, um zunächst den Status quo 12 Wochen postoperativ hinsichtlich der Gewebeverteilung im Regenerat zu beurteilen. Mittels Zählokular und definiertem Auszählbereich im Präparat (siehe Abb. 12 in Kapitel 2.8.3.3) erhält man mit diesem Verfahren durch die Vielzahl der ausgewerteten Zähleinheiten (> 1000 pro Präparat im Defektbereich) ein objektives und reproduzierbares Ergebnis. Die eigenständigen Kontrollmessungen durch eine zweite, sachkundige Person ergaben lediglich geringfügige Abweichungen. Tabelle 11 zeigt die Abweichung der Messergebnisse unterschiedlicher Personen exemplarisch an der durchlichtmikroskopischen Auswertung des Defektareals in 8 Präparaten. Die Messwerte der Kategorie A sind hierbei die dieser Arbeit zugrunde liegenden Ergebnisse, Kategorie B sind eigenständige Auswertungen einer zweiten Person (selbe Präparate, selbe Kriterien). Zu differenzieren waren drei, für das menschliche Auge nahezu unschwer unterscheidbare Gewebstypen (Knochen, Knorpel und Bindegewebe, siehe Abb. 34).

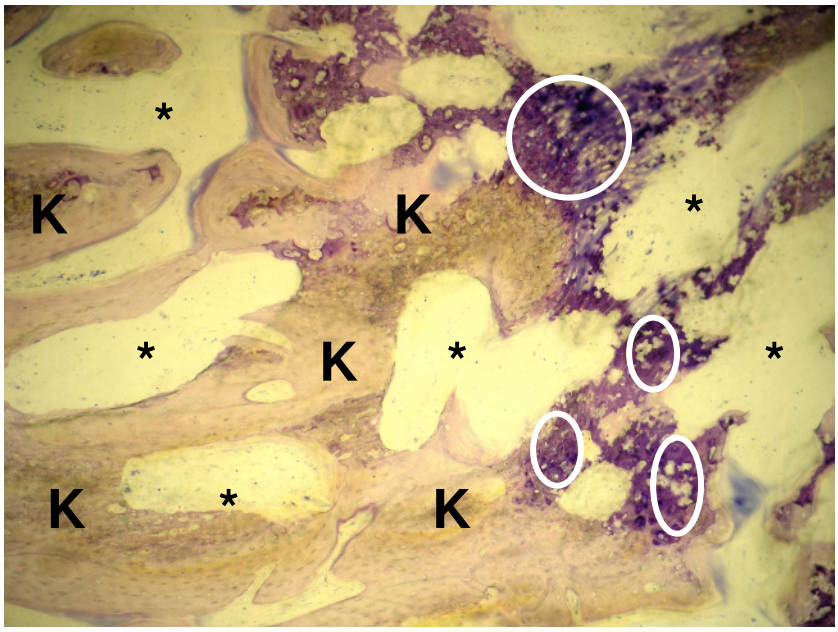


Abb. 34: Histologisches Präparat des Distraktionskallus des Schafsmetatarsus, Paragon-Färbung, 100x Vergrößerung. Gewebedifferenzierung:
K = Knochen, * = Bindegwebe, O = Knorpel

Geringfügige Abweichungen zwischen den Mikroskopierern ergeben sich überwiegend daraus, dass die Präparatelage und die auszuzählenden Bereiche nicht immer 100% übereinstimmen, da das Einlegen und Weitertransportieren der Präparate unter dem Sichtfeld des Zählokulars manuell und damit subjektiv geschieht.

Tab. 11: Durchlichtmikroskopie-Ergebnisse zweier unterschiedlicher Personen im Vergleich

Präparat-Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8			
	Messung									Median	1.Quartil	3.Quartil
Knochen	A	45,0	20,2	42,9	57,2	54,5	27,3	35,6	68,2	**44,0**	33,5	55,2
	B	42,4	16,2	35,7	66,1	64,0	29,8	37,1	64,9	**39,8**	34,2	64,2
Bindegewebe	A	46,2	77,6	50,0	39,2	41,2	73,7	63,7	26,4	**48,1**	40,7	66,2
	B	41,7	78,6	54,2	31,5	32,6	65,6	55,4	20,6	**48,0**	32,3	58,0
Knorpel	A	8,8	2,3	7,1	3,6	4,3	0,0	0,8	5,5	**4,0**	1,9	5,9
	B	15,7	5,4	11,2	2,4	3,4	4,6	7,7	15,3	**6,6**	4,3	12,2

Wie letztendlich die Abweichungen zeigen (für Knochen und Bindegewebe <10%), ist diese subjektive Komponente weitgehend vernachlässigbar. Größere Unterschiede, wie zum Beispiel für Knorpel ergeben sich daraus, dass die Knorpelzone im Präparat meist nur an einer bestimmten Stelle vorhanden ist und daher dieses Ergebnis ganz besonders sensibel auf den manuellen Weitertransport des histologischen Präparates im Sichtfeld des Zählokulars reagiert. Da die Ergebnisse des Knorpel-Anteils in dieser Arbeit jedoch im Hintergrund stehen, verzichteten wir hier auf eine Optimierung, obgleich eine solche zu diskutieren wäre. Von größerer Bedeutung sind für uns jedoch die Ergebnisse des knöchernen Anteils im Präparat. Für diesen erarbeiteten wir reproduzierbare Ergebnisse.

Unter Elimination des Faktors „manueller Weitertransport des Präparates im Mikroskop“ erzielten wir im stichprobenartigen Direktvergleich (d.h. 100 gleiche Zähleinheiten von 3 unterschiedlichen Personen ausgewertet) eine Übereinstimmung von >95%.

Die histomorphometrische Auswertung dieser Art (mittels Zählokular und >1000 Zähleinheiten pro Präparat) gilt auch in der Literatur als ein etabliertes Verfahren mit objektiven und reproduzierbaren Ergebnissen.

In der Fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurde prinzipiell derselbe Vorgang gewählt, wie bei der Durchlichtmikroskopie, d.h. selbes Mikroskop (Axiophot ZEISS), selbe Vergrößerung (100fach), selbes Zählokular (10x10 Zählpunkte pro Sichtfeld), selber Bereich im histologischen Präparat zur Auswertung. Lediglich wurde ein gelb-grün Filter zwischengeschaltet, der die Fluoreszenzen in Auflichtmikroskopie unter einem Filter für Licht der Wellenlänge 395 – 440 nm im abgedunkelten Raum hervorhob.

Beurteilt wurde nun hinsichtlich der Treffer von Zählpunkt auf fluoreszierender Bande und differenziert wurde zwischen grüner, gelber und keiner Fluoreszenz. Da im Durchschnitt zwischen 2 und 11 Prozent Fluoreszenz pro Sichtfeld (100 Zähleinheiten) gezählt wurden, können wir davon ausgehen, dass diese Art der Auswertung noch sensibler auf den manuellen Weitertransport und das Einlegen des Präparates reagiert, als die Durchlichtmikroskopie. Um nun diese labile Komponente auszuklammern und letztendlich die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu prüfen, führten wir für alle Präparate jede Zählfeldauswertung exakt zweimal durch (Messung I und II), ohne das Präparat im Mikroskop zu verändern. Siehe Tabelle 12.

Tab. 12: Fluoreszenzauswertung in zwei Messungen, Vergleich

Kontrolle		Regenerat		**FXIII**		Regenerat	
Präparat		Fluoreszenz grün %	Fluoreszenz gelb %	Präparat		Fluoreszenz grün %	Fluoreszenz gelb %
1	I	8,9	4,3	**9**	I	11,0	11,4
	II	9,3	3,7		II	11,0	11,9
2	I	6,4	1,0	**10**	I	6,0	8,9
	II	6,5	1,0		II	5,6	9,4
3	I	5,7	5,7	**11**	I	8,9	13,1
	II	5,7	5,7		II	8,8	13,5
4	I	3,5	5,0	**12**	I	6,4	11,0
	II	3,5	4,6		II	6,3	11,6
5	I	13,0	17,6	**13**	I	3,1	4,0
	II	13,9	17,6		II	3,1	4,0
6	I	1,1	1,4	**14**	I	8,1	5,8
	II	1,2	1,3		II	8,1	5,4
7	I	1,7	2,4	**15**	I	4,5	15,5
	II	1,5	2,5		II	4,5	14,9
8	I	10,5	13,4	**16**	I	7,1	14,4
	II	9,4	13,8		II	6,7	14,9
				17	I	5,8	6,4
					II	6,5	6,3
				18	I	5,9	13,1
					II	5,1	12,4
Median	I	6,0	4,7	**Median**	I	6,2	11,2
	II	6,1	4,1		II	6,4	11,7
	I+II	6,0	4,4		I+II	6,3	11,5

Beide Messungen zeigen nur minimale Abweichungen, woraus wir schließen können, dass *derselbe* Beobachter im *selben* Zählfeld *seine* Ergebnisse sehr genau reproduzieren kann.

Da die fluoreszierenden Banden in den Präparaten nicht immer senkrecht angeschnitten und damit scharf begrenzt sind, sondern häufig fließend übergehen in nicht fluoreszierende Areale, bestimmt das Auge des Betrachters für sich selbst das Unterscheidungskriterium zwischen „noch fluoreszierend“ und „nicht mehr fluoreszierend“. Dies heißt auch, dass zwar ein und derselbe Betrachter seine Ergebnisse im selben Auswertungsbereich reproduzieren kann, aber dass die Ergebnisse eines Betrachters nicht als absolute Zahlenwerte gesehen werden können. Bewertet werden kann lediglich das Verhältnis der gelben gegenüber der grünen Fluoreszenz innerhalb einer Tiergruppe oder das Verhältnis der grünen oder gelben Fluoreszenz der Kontrollgruppe gegenüber derselben Fluoreszenz der Versuchsgruppe.

Für die Bandendistanzmessung wurden die histologischen Präparate mäanderförmig nach scharf begrenzten Bandenanschnitten durchsucht und die mikroskopischen Bilder in eine Analyse-Software auf den PC übertragen. Am Bildschirm wurden anschließend unter Berücksichtigung der mikroskopischen Vergrößerung die Distanzen zwischen den Banden gemessen. Beginn der Messung entsprach dem Beginn der grünen Fluoreszenzbande, Ende der Messung entsprach dem Beginn der gelben Fluoreszenzbande. Die gesamte gemessene Distanz bezieht sich somit auf den Zeitraum zwischen der grünen und gelben Fluoreszenzmarkierung, die für jedes Tier aus dem Versuchsprotokoll entnommen werden kann. Fehlerquellen im Rahmen der Distanzmessung belaufen sich folglich nur auf die Auswahl der zu messenden Stellen im Präparat. Jeweils ein Päparat jeder Gruppe lieferte bei der mäanderförmigen Durchsuchung keine repräsentativ messbaren Stellen, d.h. keine scharf begrenzten Bandenanschnitte. Diese beiden Präparate gingen nicht in die Auswertung mit ein. Die restlichen Präparate lieferten unterschiedlich viele repräsentativ messbare Stellen, insgesamt konnten in der FXIII-Gruppe mehr als doppelt so viele Stellen ausgewertet werden. Dies hängt verständlich damit zusammen, dass insgesamt mehr gelb fluoreszierende Banden in der FXIII-Gruppe vorhanden sind (11% in der FXIII-Gruppe gegenüber 4% in der Kontrollgruppe).

Die klinische Frage, die hinter dieser tierexperimentellen Studie steht, beschäftigt sich mit den langen Liegezeiten der Fixateur-externe-Systeme und mit den damit verbundenen Komplikationen, allen voran die Pininfektionen. Jeder Tag, den man die Liegedauer des Fixateur-externe verkürzen könnte, wäre hinsichtlich der Komplikationsrate ein Gewinn. Dadurch ließen sich Rekonvaleszenzzeiten verkürzen und Therapiekosten senken.

Die Liegedauer des Fixateur-externe-Systems setzt sich zusammen aus der Segmenttransportzeit und der Kallusreifungsphase in Ruhe. Hierbei beträgt der Segmenttransport 1/3 der Gesamtliegezeit des Fixateurs und ist abhängig von der zu überwindenden Distanz (max. 1mm pro Tag). Die restlichen 2/3 der Gesamtliegezeit des Fixateurs entfallen auf die Kallusreifungsphase im ruhenden System. Beispielhaft benötigt ein 6cm knöcherner Defekt 60 Tage für den Segmenttransport und entsprechend 120 Tage für die Kallusreifung. Die Gesamtliegedauer des Fixateur-externe-Systems beträgt mit 180 Tagen also ein knappes halbes Jahr, in dem es zu Komplikationen mit Hinauszögerung der Gesundung sowie weiteren Therapiekosten kommen kann. Die Pin-Eintrittsstellen in das Integument stellen eine bakterielle Eintrittspforte dar. Trotz regelmäßiger Pin-Pflege kommt es in vielen Fällen zu Pininfektionen. Auch in unserem Experiment mussten 10 von 18 Tieren diesbezüglich antibiotisch behandelt werden. Eine frühzeitige Defektstabilisierung mit früherer Entfernung des Fixateur-Systems wäre hinsichtlich der Komplikationsraten, Therapiekosten und Rekonvaleszenzzeiten wünschenswert.
Unsere Ergebnisse einer systemischen FXIII-Applikation im Rahmen eines Segmenttransportes mittels Fixateur-externe-System zeigen eine deutlich fortgeschrittenere Knochenheilung zugunsten der FXIII-behandelten Schafe. Den histologischen und biomechanischen Ergebnisse folgend können wir also durchaus von einer früheren Stabilisierung des Defektareals und der gesamten knöchernen Situation ausgehen. Demnach besitzt der FXIII in einer additiven Therapie im Tierexperiment durchaus die Potenz, die obligate Liegedauer des Fixateur externes zu verkürzen. Im eben erwähnten Beispiel wäre eine Verkürzung der Gesamtliegezeit um 1/3 der Knochenhärtungsphase in Ruhe, also um 40 Tage, denkbar. In unserem durchgeführten Tierexperiment entspräche dies einer Verkürzung der Liegedauer um ca 20 Tage. Klinische Beobachtungen am Menschen wären diesbezüglich wünschenswert und bei bereits vorhandenen klinischen Ergebnissen zur FXIII-Applikation bei komplexen Frakturesituationen beim Menschen [26] ebenso vielversprechend.

5. Zusammenfassung

Die Motivation für unsere Studie zum Effekt der systemischen FXIII-Applikation auf die Kallusregeneration lag in den Umständen der langen Reifungsphasen im Therapiemodell mit Fixateur-externe-Systemen und Kallusdistraktion bzw. Segmenttransport. Insgesamt entfallen 1/3 der Gesamtliegezeit des Fixateur-externe-Systems auf die Distraktionsphase bzw. den Segmenttransport, die restlichen 2/3 der Liegedauer des Fixateurs entfallen auf die Kallusreifungsphase, die durch ihre lange Dauer mit Komplikationen (z.B. Pininfektionen) behaftet ist. Eine Verkürzung der Kallusreifungsphase erscheint daher wünschenswert.

Neben seinen bereits erwiesenen Funktionen im Rahmen der Wundheilung, wurden für den FXIII immer wieder auch Effekte im Rahmen der Frakturheilung in Frage gestellt. Unter Berücksichtigung der bisher vorliegenden Ergebnisse zu FXIII-Studien im Rahmen der Frakturheilung entschlossen wir uns für ein Tierexperiment am Schaf, mit dem Ziel, den Effekt einer systemischen FXIII-Applikation (ohne vorbestehenden FXIII-Mangel) auf die Kallusregeneration zu explorieren.

Als Versuchsmodell benutzten wir eine bereits bewährte Vorlage mit einem eigens für den Schafsmetatarsus entwickelten Ringfixateur-externe. Nach operativer Erzeugung eines 15mm Defektes und eines freien knöchernen Segments im Schafsmetatarsus des rechten Hinterlaufs schloss sich ein Segmenttransport mit 1mm pro Tag an. Weitere Elemente im Versuchsablauf stellten die mehrmalige systemische FXIII-Applikation bei präoperativ suffizienten FXIII-Spiegeln, die Fluorochrommarkierung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten mit Calceingrün und Tetrazyklin und die mehrwöchige Kallusreifungsphase im ruhenden System dar. Die Auswertungen unmittelbar nach Versuchsende (12 Wochen postoperativ) ergaben für die Biomechanik leicht erhöhte Knochendichte- und Kallusquerschnittwerte, eine um 22% erhöhte axiale Steifigkeit und eine signifikante, um 163% höhere lokale Eindrücksteifigkeit in der Kallusmitte.

Die korrespondieren histologischen Ergebnisse zeigen in der Durchlichtmikroskopie bezüglich der im Kallus vorhandenen Gewebemassen eine weiter fortgeschrittene Knochenheilung mit bereits mehr Knochengewebe und weniger Knorpelgewebe für die FXIII-Tiere. In Abhängigkeit der Lokalisation innerhalb der Defektzone fanden wir für die FXIII-Tiere eine homogenere Verteilung des neugebauten Knochens vor allem zugunsten der Defektmitte, die die instabilste Stelle der Gesamtsituation darstellt.

Die Fluoreszenzmikroskopie lieferte eine signifikant erhöhte Knochenanbaugeschwindigkeit für die FXIII-Tiere gegenüber der Kontrollgruppe. Wir konnten in unserem Experiment zeigen, dass für eine

bessere biomechanische Stabilität nicht allein die quantitative Knochenmenge ausschlaggebend ist, sondern viel mehr eine homogene Verteilung der Gewebemassen im gesamten Defektareal. In Anbetracht dieser, bisher in der Literatur nicht beachteten Tatsache, wäre bei einigen bisherigen Studien eine andere Auslegung der Ergebnisse möglich. Insgesamt und im Vergleich zu bisherigen Studien konnten wir auch im FXIII-Additionsmodell einen Benefit des FXIII auf die Kallusregeneration zeigen und entgegen bisheriger Meinungen eine FXIII-Therapie ohne vorbestehenden Mangel für komplexe knöcherne Heilungen empfehlen. Speziell in unserem Fall ist durch die histologisch deutlich fortgeschrittene Knochenheilung, die sich biomechanisch bestätigt, von einer früheren Stabilisierung der Defektzone auszugehen. Dies wiederum macht die Verkürzung der Liegedauer des Fixateur externes dank einer systemischen FXIII-Applikation um ca 20 Tage (1/3 der Kallusreifungsphase) denkbar und kann damit Komplikationsraten, Therapiekosten und die Dauer der Rekonvaleszenz vermindern.

Ausgehend vom günstigen Nebenwirkungsprofil des FXIII (in angepasster Dosierung entpsrechend dem Nebenwirkungsprofil anderer transfundierter Gerinnungs- und Plasmakomponenten), bietet die FXIII-Therapie eine elegante Option zur Beschleunigung der Knochenheilung in komplexen Fraktursituationen.

6. Literaturverzeichnis

1. Barkan G., Gaspar.A., *Zur Frage der Reversibilität der Fibringerinnung. II.* Biochem Zschr, 1923, 139, 291 - 301

2. Beck E., Duckert F., Ernst M., *The influence of fibrin stabilizing factor on the growth of fibroblasts in vitro and wound healing.* Thromb Diath Haemorrh, 1961, 6, 485 - 491

3. Benfer J., Struck H., *Factor XIII and Fracture Healing – An experimental study.* Eur Surg Res, 1977, 9, 217 – 223

4. Bernsmeier R., Holzgrebe E., Lück P., Bruhn H. D., Zurborn K. H., *Thrombin, Faktor XIII und Fibronectin als Regulatoren der Proliferation von Tumorzellen und Gefäßwandzellen.* Onkologie, 1983, 6, 4 - 7

5. Biehl H., Bohn H., Ronneberger H., Zwisler O. , *Beschleunigung der Wundheilung durch Faktor XIII der Blutgerinnung.* Arzneimittelforschung 1971, 21, 1429 – 1430

6. Bohn H., Becker W., Trobisch H., *Die molekulare Struktur der fibrinstabilisierenden Faktoren des Menschen.* Blut, 1973, 26, 303 - 311

7. Brockmeier S. J., Arnold W. and *Erfahrungen mit Faktor XIII bei Wundheilungsstörungen von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G. , (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 147 - 154

8. Brown L. F., Lanir N., McDonagh J., Tognazzi K., Dvorak H.F., Dvorak A. M., *Fibroblast migration in fibrin gel matrices.* Am J Pathol, 1993, 142, 273 - 283

9. Bruhn H. D., Bernsmeier R., Broers H., Pohl J., *Regulation der Fibroblasten- und Endothelzellenproliferation durch Thrombin, FXIII, und Fibronectin*.In: Blümel H., (Hrsg), *Mikrozirkulation und Prostaglandinstoffwechsel, Interaktion von Blutgerinnung und Fibrinolyse mit anderen proteolytischen Enzymsystemen. Neues über Fibrinogen, Fibrin und Fibrinkleber.* 1981, Schattauer, Stuttgart, 257 - 265

10. Bruhn H. D., Pohl J., *Growth regulation of fibroblasts by thrombin, factor XIII and fibronectin.* Klin Wochenschr , 1981, 59, 145 - 146

11. Calatzis A., Lorenz R., Stemberger A., Haas S., *Zunahme der Gerinnselfestigkeit durch Faktor-XIII-Substitution in vitro.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G. , (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 126 - 128

12. Cario E., Goebell H., Dignass A. U., *Factor XIII – a crucial factor for intestinal epithelial wound repair?* In: Egbring R.S. R., Wozniak G. , (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 227 - 234

13. Carmassi F., Uchino R., Cardinali M., Chung S., *Influence of factor XIII mediated cross-link on extravascular fibrinolysis.* In: McDonagh R.S. J., Egbring R., (Hrsg), *Factor XIII. Second International Conference Marburg.* 1993, Schattauer, Stuttgart - New York, 9 - 16

14. Chaoui K., Ziemer S., Lammert H., Lammert I., *Faktor-XIII-Prophylaxe und deren Einfluss auf Wundheilungsstörungen nach Tumorresektion im Kopf-Hals-Bereich.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 158 - 165

15. Claes L., Burri C., Gerngroß H., Mutschler W. , *Die Beschleunigung der Frakturheilung durch Faktor XIII.* Helv Chir Acta, 1984, 51, 209 – 212

16. Claes L., Boch W., Wilke H. J., Laule A., Gerngroß H., *Beschleunigung der Kallusbildung und Kallusreifung durch Faktor-XIII-Gaben.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 173 - 183

17. Claes L., Kuglmeier K., Gerngroß H., *Experimentelle Untersuchungen zur mitogenen Wirkung von Faktor XIII auf Osteoblasten.* Hefte zur Unfallheilkunde, 1987, 189, 153 – 156

18. Davids H., Hodel D., *Faktor XIII-Einsatz bei Wundheilungsstörungen nach ausgedehnten Tumorresektionen im Kopf-Hals-Bereich.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 155 - 157

19. Dempfle C. E., Magez J., Röckel A., *Acquired factor XIII deficiency and substitution of factor XIII in exacerbated ulcerative colitis and Crohn´s disease.* In: McDonagh R.S. J., Egbring R., (Hrsg), *Factor XIII. Second International Conference Marburg.* 1993, Schattauer, Stuttgart - New York 182 - 192

20. Diehl K.-H., Ronneberger H., *Effect of coagulation factor XIII from human plasma on wound healing in the cortisone treated rat.* Can J Physiol Pharmacol, 1994, 72, suppl 1, 612

21. Duckert F., Jung E., Shmerling D. H., *A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to Fibrin stabilizing factor deficiency.* Thromb Diatr Haemorrh, 1960, 5, 179 - 186

22. Edwards M. W., De Bang E., Strout G., Bishop P. D., *Recombinant Factor XIII supplemented clots resist lysis by plasmin and leukocyte elastase.* In: McDonagh R.S. J., Egbring R., (Hrsg), *Factor XIII. Second International Conference Marburg.* 1993, Schattauer, Stuttgart - New York, 17 - 21

23. Egbring R., Kröninger 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.*In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 34 - 54

24. Finlay J. B., Hurtig M.B., Hardie W. R., Liggins A. B., Batte S. W., *Geometrical properties of the ovine tibia: a suitable animal model to study the pin-bone interface in fracture fixation?* Proc Inst Mech Eng [H], 1995, 209, 1, 37 - 50

25. Gerngroß H., Claes L., Burri C., *Tierexperimentelle Untersuchungen zur autologen Fibrinspongiosaplastik unter Calcitonin- und Faktor XIII-Behandlung.* Langenbecks Arch Chir Suppl, 1981, 109 – 112

26. Gerngroß H., Steinmann R., Graf K., *Faktor XIII und Knochenheilung.* Die Medizinische Welt, 1987, 3, 1533 - 1538

27. Greenberg C., *Fibrin formation and stabilization.* In*:* Loscalzo J., Schafer A., (Hrsgb), *Thrombosis and Hemorrhage.* 1994, Blackwell, Oxford, 107 - 126

28. Heimburger N., Karges H.E., *Biochemie und Funktion des F XIII.* In: Brückner W.L., *Gerinnungsfaktor XIII*. 1983, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore. 3 - 13

29. Hellerer O., Brückner W.L., Frey K. W., Westerburg K. W., Klessinger U., *Fracture Healing under Factor XIII Medication.* Arch Orthop Traumat Surg, 1980, 97, 157 – 159

30. Herouy Y., Hellstern O., Schöpf E., Vanscheidt W., Norgauer J., *Genexpression von Matrix-Metalloproteinasen und fibrinolytischen Faktoren bei FXIII-behandelten Ulkuspatienten.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger*,* Freiburg, 235 - 241

31. Isogai N., Ueda Y., Kurozumi N., Kamiishi H., *Wound healing at the site of microvascular anastomosis: Fibrin-stabilizing factor XIII administration and its effects.* Microsurgery, 1990, 11, 40 – 46

32. Jokiel G., Hesse T., Gründling M., Hachenberg T., *Unterstützende Behandlung großer Wundflächen mit Faktor XIII.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 143 - 146

33. Knab J., Dissemond J., *Erfolgreiche Therapie eines erosiven gramnegativen Fußinfektes durch Erweiterung der systemischen Therapie mit Faktor XIII.* Journal for Woundhealing, 2005, 4, 165 - 167

34. Kuglmeier K., *Experimentelle und proliferationskinetische Untersuchungen über die Wirkung von Plasmafaktor XIII auf das Knochenwachstum in vivo und in vitro*. Dissertation, Universitätsklinik Ulm, 1985, Institut für Biomechanik und unfallchirurgische Forschung

35. Laki K., Lorand L., *On the solubility of fibrin clots.* Science, 1948, 108, 280

36. Lang D., *Einsatz von Faktor XIII bei verzögerter Knochenneubildung.* Die Gelben Hefte, 1978, 18, 91 - 92

37. Lanyon L. E., Hampson W.G., Goodship A. E., Shah J. S., *Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft.* Acta Orthop Scan, 1975, 46, 2, 256 - 268

38. Lenz C. (2003) *Fracture healing.* *http://grk615.unihannover.de/sites/gradkolleg/stipendiaten/lenz/fracture.html*.

39. Loewy A. G., Dahlberg J.E., Dorwart W. V., Weber M. J., Eisele J. A., *A transamidase mechanism for insoluble fibrin formation.* Biochem Biophys Res Comm, 1964, 15, 177

40. Loewy A. G., Dunathan K., Gallant J. A. , Gardner B., *Fibrinase III. Some enzymative properties.* J Biol Chem, 1961, 236, 2644

41. Lorand L., Jacobsen A., *Studies on the polymersiation of fibrin. The role of the globulin: fibrin-stabilizing-factor.* J biol Chem, 1958, 230, 421 – 434

42. Lorenz R., *Faktor XIII bei Colitis ulcerosa – Pilotstudie zur Substitution mit Faktor-XIII-Konzentrat.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 194 - 201

43. Matacic S., Loewy A.G., *Transglutaminase activity of the fibrin crosslinking enzyme.* Biochem Biophys Res Comm, 1966, 24, 858 - 866

44. McDonagh J., *Biochemistry of fibrin-stabilizing factor (F XIII).* In: McDonagh R.S. J., Egbring R., (Hrsg), *Factor XIII. Second International Conference Marburg.* 1993, Schattauer, Stuttgart - New York, 2 - 8

45. Metzner H. J., Dickneite G., Diehl K.-H., *Faktor XIII und Wundheilung – präklinische Untersuchungen.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 111 - 118

46. Meyer L. J. M., Böhm S.A., Schildberg F. W., *Darstellung der Muto-Studie zur Therapie manifester Wundheilungsstörungen mit FXIII – eigene Fallbeobachtungen.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 135 – 142

47. Meyer W., Böhm H.J., Kortmann H.-R., *Züchtung humaner Knochenzellkolonien in vitro und deren Beeinflussung durch Faktor XIII*, in *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, R.S. R. Egbring, G. Wozniak, Editor. 1999, Karger: Freiburg.

48. Miyachi Y., Takanahi H., Matsuishi T., *Effect of plasmafactor XIII on the growth and the morphological changes of human fibroblasts on plasma clots.* Jpn Pharmacol Ther, 1993, 21, 1721 - 1727

49. Muto T., Ishibiki K., Nakamura N., Matsuda M., Shirai Y., Ogawa N., *Postoperativer Faktor-XIII-Mangel und Wundheilungsstörungen.* Die Gelben Hefte, 1977, 37, 83 – 87

50. Nijweide P.J., van Iperen-van Gent A.S., Kawilarang-de Haas E. W. M., van der Plass A., Wassenaar A. M., *Bone formation and calcification by isolated osteblast like cells.* J Cell Biol, 1982, 93, 318 - 323

51. Ogawa T., Morioka Y., Inoue T., Takano M., Tsuda S., *Involvement of blood coagulation factor XIII in burn healing in the carbon tetrachloride-induced hepatic injury model in rats* . Inflamm Res, 1995, 44, 264 – 268

52. Ostermann H., *Biochemie und Funktion des Faktor XIII*. In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 1 - 6

53. Päge S., Schwenke E., *Substitution mit Faktor-XIII-Konzentration – eine adjuvante Behandlung bei therapieresistenter aktiver Colitits ulcerosa?* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 202 - 206

54. Paye M., Lapierce C.M., *Wundheilung: Der Beitrag des Gerinnungsfaktors XIII.* Die gelben Hefte, 1986, 16, 128 - 135

55. Preuss A., Broder M., Schölmerich J., Kruis W., *Additive Faktor-XIII-Therapie bei Colitis ulcerosa: Darstellung der Ergebnisse zweier klinischer Studien*. In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 213 - 225

56. Rahn B. A., Perren S.M., *Die mehrfarbige Fluoreszenzmarkierung des Knochenanbaus.* Chem Rundschau, 1975, 28, 12 - 14

57. Rasche H., *Blutgerinnungsfaktor XIII und Fibrinstabilisierung.* Klin Wschr, 1975, 53, 1137 - 1145

58. Robbins K.C., *A study of the conversion of fibrinogen to fibrin.* American J Physiol, 1944, 142, 581 - 588

59. Salzmann G., *Einsatz von Faktor XIII-Konzentrat bei verzögerter Knochenbruchheilung.* Die Gelben Hefte, 1976, 16, 129 - 130

60. Schwab R., Willy C., Pust R., Gerngroß H., *Postoperativer Faktor-XIII-Mangel – biochemisches Wundmonitoring nach großen Weichteileingriffen.* In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 129 - 134

61. Stürmer K. M., Schuchardt W., *New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep as a model for intramedullar nailing.* Unfallheilkunde, 1980, 83, 7, 341 - 345

62. Suzuki R., Toda H., Takamura Y., *Dynamica of blood coagulation factor XIII in ulcerative colitis and preliminary study of the factor XIII concentrate.* Blut, 1997, 59, 162 – 164

63. Tauber R., Seidel W., Schäfer R., *Tierexperimentelle Untersuchungen über den Einfluss des Faktors XIII der Blutgerinnung auf die Reißfestigkeit von Kaninchenfaszien.* Arzneimittelforschung, 1974, 24, 1557 – 1559

64. Thies H. A., Wahl R., Hahnenfeld R., *Hämatologische Kontrollen der Knochenbruchheilung.* Langenbecks Arch Chir, 1970, 327, 1207 – 1209

65. Ueki S., Tagaki J., Saito Y., *Dual functions of transglutaminase in novel cell adhesion,* J Cell Sci, 1996, 109, 2727 - 2735

66. Wigbels B., Prsser D., Bonsmann G., Luger T., *Einsatz von Faktor XIII bei Ulcera cruris bei Livedo-Vaskulopathie: Fallbericht*. In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 242 - 247

67. Wozniak G., Noll T., Dapper F., Piper H. M., Hehrlein F. W., *The fibrin-stabilizing factor as a topical means for leg ulcer healing. Biochemical and experimental properties and clinical results.* Int J Angiol , 1999, 7, 109 – 114

68. Wozniak G., Noll T., Hehrlein F.W., *Einfluss von Faktor XIII auf die endotheliale Barriere – Klinik und Experiment*. In: Egbring R.S. R., Wozniak G., (Hrsg), *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*, 1999, Karger, Freiburg, 16 - 25

Danksagung

Mein Dank gilt PROF. LUTZ CLAES,
dem INSTITUT FÜR BIOMECHANIK UND UNFALLCHIRURGISCHE FORSCHUNG
und all den MITARBEITERN,
die mir stets und in selbstverständlicher Weise
bei der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein Dank gilt außerdem meinen ELTERN,
GESCHWISTERN
und FREUNDEN,
die viele Jahre der Geduld für meine Ausbildung aufgebracht haben
ohne je eine Sekunde den Glauben daran zu verlieren.

In besonderer Weise gilt mein Dank
MARIANNE LAßMANN und dem CAFE CENTRAL in Peiting sowie
HUBERT GENTNER und seinem PAKETTRANSPORT-UNTERNEHMEN in Ulm.
Beide waren indirekt wesentlich an meinem Zugang zur Hochschule,
an der Weiterführung und dem erfolgreichen Abschluss
meines Hochschulstudiums
sowie meiner Promotion beteiligt.

Vielen Dank.