

C. E. Dempfle, C. Hensler,  
R. Gladisch, D. L. Heene

Universität Heidelberg, Klinikum Mannheim,  
I. Medizinische Klinik  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dieter L. Heene)

# Lokale Faktor-XIII-Bestimmung in der Dickdarmmukosa

**P**atienten mit Colitis ulcerosa wie auch mit Kolonbefall eines Morbus Crohn weisen während des akuten Schubes erniedrigte Faktor-XIII-Spiegel im Plasma mit Werten um 40% der Norm auf (1, 2). In der Remissionsphase werden hingegen normale Faktor-XIII-Werte gemessen. Faktor XIII bewirkt neben der kovalenten Stabilisierung des Fibrins auch die Anbindung von Fibronektin an Fibringerinnsel (3, 4). Fibronektin ist erforderlich für die zelluläre Invasion und Organisation der Fibrinmatrix. Faktor XIII besitzt daher durch seine Wirkung auf das Fibrin und Fibronektin wesentlichen Einfluß auf die Wundheilung. Erste Erfahrungen zeigten einen günstigen Einfluß der therapeutischen Gabe von Faktor-XIII-Konzentrat auf intestinale Blutungen bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (5–7).

Die Ursache der Faktor-XIII-Erniedrigung bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist nach wie vor unklar. Am ehesten kommen jedoch ein Verbrauch durch lokale Gerinnungsvorgänge (8) oder ein Verlust im Bereich der entzündeten Darmschleimhaut in Betracht. Wichtig für eine Faktor-XIII-Therapie ist die Beantwortung der Frage, ob Faktor XIII lokal im entzündeten Darm angereichert wird oder vermindert ist und ob eine intravenöse Gabe von Faktor XIII einen Einfluß auf die lokale Faktor-XIII-Aktivität hat. Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode zur Bestimmung der lokalen Faktor-XIII-Aktivität in Gewebehomogenisaten und zeigt erste Resultate der Messungen in Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.

## Schlüsselwörter

Faktor-XIII-Aktivität, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn

## Zusammenfassung

Faktor-XIII-Aktivität wurde in endoskopisch gewonnenen, homogenisierten Biopsieproben von Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn mittels eines Amin-Inkorporationstests bestimmt. Lösliches Dinitrophenylcadaverin (DNPC) wird von aktiviertem Faktor XIII an Casein gekoppelt, das wiederum an die Wandung von Microtiterplatten adsorbiert ist. Das gebundene DNPC wird mittels spezifischem Antikörper detektiert. Es fand sich eine Abhängigkeit der Faktor-XIII-Aktivität von der histologischen Klassifikation (nicht entzündet, leichte Entzündung, schwere Entzündung) mit deutlich niedrigeren Werten bei schwerer Entzündung. Die beschriebene Methode eignet sich zur funktionellen Messung von Faktor XIII und anderen Proteintransglutaminasen in Gewebe- und Zellhomogenisaten und anderen trüben Probenmaterialien.

## Keywords

Factor XIII activity, ulcerative colitis, Crohn's disease

## Summary

Factor XIII activity was determined in endoscopic colon biopsy samples from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease by use of an amine-incorporation test. Soluble dinitrophenyl-cadaverine (DNPC) is incorporated into insolubilized casein, attached to the walls of microtiter plate wells. The bound DNPC is detected by a specific antibody-enzyme conjugate. We found reduced factor XIII activity in patient samples with histologically high inflammatory activity, compared to samples without signs of inflammation. Intermediate values were found in samples with minor signs of inflammation. The method can be used for functional measurement of factor XIII, as well as other protein-transglutaminases, in tissue or cell homogenisates or other turbid samples.

## Material und Methoden

### Material

Mono-Dinitrophenylcadaverin (DNPC) wurde nach der Methode von Clarke et al. hergestellt (9). Anti-Dinitrophenol-Antiserum vom Kaninchen und Alkalische-Phosphatase-konjugierter Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin waren von DAKO, Hamburg. Faktor-XIII-

Mangelplasma, Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris), Zellkulturmedium HBSS, und Paranitrophenylphosphat (pNPP) waren von Sigma, Deisenhofen, alle anderen Pufferkomponenten (Diethanolamin, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Tween 20, Dithioerythritol (DTE) in p.A.-Qualität von Serva, Heidelberg. Hochgereinigtes Faktor-XIII-Lyophilisat und Fibrogammin® wurden von Herrn Dr. H. Metzner, Behringwerke Marburg, zur Verfügung gestellt.

## Aufbereitung der Gewebeproben

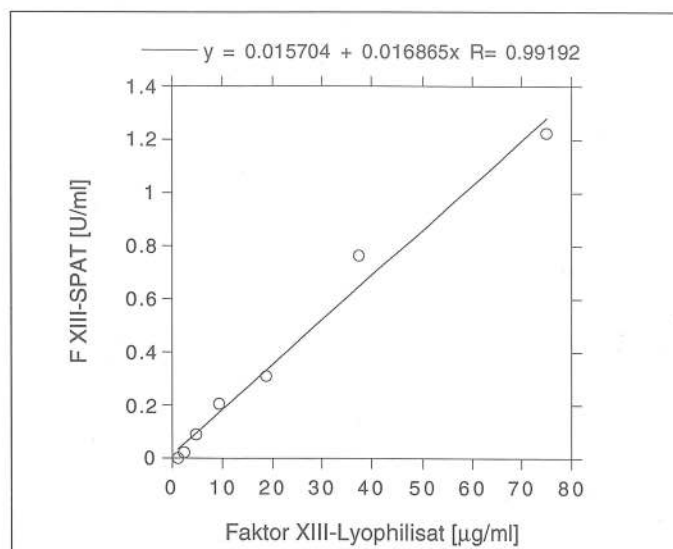
Endoskopisch gewonnene Biopsieproben wurden sofort in physiologischer NaCl-Lösung gespült, um Blutreste zu entfernen, mit einer angefeuchteten Kompresse abgetupft und in vorbereitete, mittels Analysenwaage gewogene 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden erneut gewogen und das Probengewicht als Differenz zwischen Leergewicht und Endgewicht des Reaktionsgefäßes definiert. Das Gewicht der Proben lag zwischen 10 und 50 mg. Die Gefäße wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Analyse wurden die Proben mit 500  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium HBSS überschichtet, aufgetaut und mechanisch homogenisiert (IKA-Homogenisator).

## Faktor-XIII-Aktivitätstest

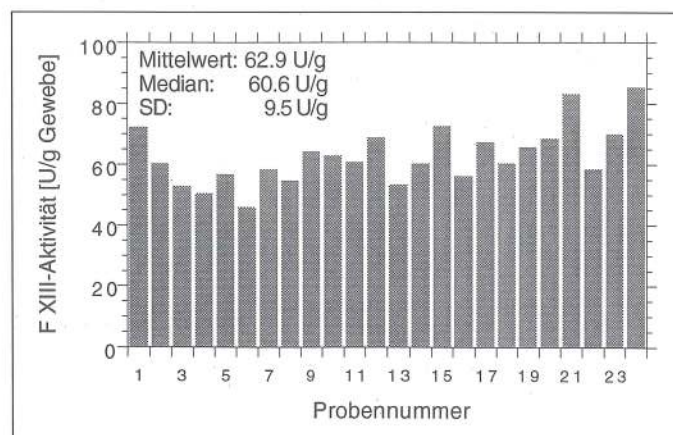
Die Messung der Faktor-XIII-Aktivität erfolgte mittels Faktor-XIII-SPAT (solid phase activity test) nach vorbeschriebener Methode (10) unter Verwendung einer Plasma-Eichkurve aus einem Normalplasma-Spenderpool und Faktor-XIII-Mangelplasma. Die Aktivität des Normalplasmas im Test wurde als 100% der Norm oder 1 U/ml definiert. Microtiter-Platten mit 96 wells wurden für 16 Stunden mit Casein-Beschichtungslösung aus 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 6  $\mu\text{g/ml}$  Casein, pH 8,5 beschichtet und anschließend mit TTBS gespült. 80  $\mu\text{l}$  Gewebehomogenisat oder Eichplasma wurden jeweils als Doppel- oder Dreifachwerte in die Casein-beschichteten Microtiterplatten gegeben und mit 80  $\mu\text{l}$  DNPC-Substratlösung (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 30 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Dithioerythritol [DTE], 1 mM Dinitrophenylcadaverin [DNPC], pH 7,4) gemischt. Zur Faktor-XIII-Aktivierung wurden 80  $\mu\text{l}$  Thrombinlösung 10 NIH U/ml (Rinder-Thrombin Topostasin®, Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen) hinzugegeben. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Auskippen der Platten und Waschen mit TTBS gestoppt.

Gebundenes DNPC wurde durch einen polyklonalen Kaninchen-Anti-

**Abb. 1** Serielle Verdünnung von humanem Faktor-XIII-Konzentrat in Zellkulturmedium HBSS.



**Abb. 2** Faktor-XIII-Aktivität in 24 sequenziellen Proben aus einem operativen Kolon-Resektat.

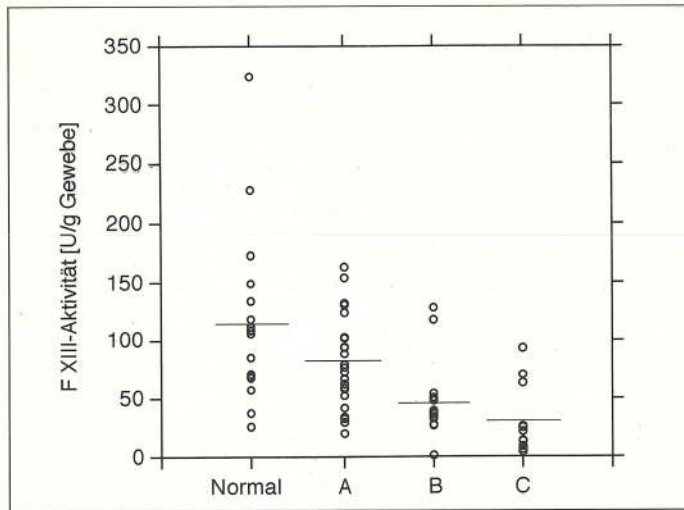


körper gegen Dinitrophenol sowie einen sekundären, Alkalische-Phosphatase-konjugierten Antikörper von der Ziege gegen Kaninchen-Immunglobulin detektiert. Die Inkubationszeiten mit den Antikörpern betragen jeweils 60 Minuten. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Platten 4mal mit Waschpuffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,2% TWEEN 20, pH 7,4 (TTBS) gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte mit para-Nitrophenylphosphat (p-NPP), 15 mg, in einer frisch angesetzten Mischung aus 5 ml 1 M Diethanolamin, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 9,5, und 20 ml Aqua bidest. Die Farbreaktion wurde kinetisch in Intervallen von 8 Sekunden bei 405 nm gemessen. Die Meßergebnisse wurden anhand des ermittelten Probenfeuchtgewichtes auf 1 g Gewebe hochgerechnet und in Plasma-Einheiten pro g Gewebe (U/g) angegeben.

## Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt die Faktor-XIII-Aktivitätswerte einer Verdünnungsreihe von lyophilisiertem humanem Faktor XIII in Zellkulturmedium HBSS. Es findet sich ein linearer Meßbereich zwischen 0,01 und 1,2 U/ml mit einem Regressionskoeffizienten von  $R = 0,99$ .

Faktor-XIII-Aktivität wurde mittels funktionellem Test in Kolon-Biopsien von 16 Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen und ohne makroskopischen oder histologischen Nachweis entzündlicher Veränderungen des Kolons bestimmt. Diese Patientengruppe ist nur eingeschränkt als Normalkollektiv zu bezeichnen, da keine Vergleichbarkeit bezüglich Alters- und Geschlechtsverteilung zur Kolitis-Gruppe gegeben



**Abb. 3** Faktor-XIII-Aktivität in endoskopischen Kolon-Biopsien von Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung (»Normal«), sowie Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung, klassifiziert nach histologischem Score (A: keine nachweisbare Entzündung im Präparat, B: leichte entzündliche Aktivität, C: schwere Entzündung).

war und die Patienten jeweils unter Erkrankungen litten, die zur Diagnostik die Durchführung einer Koloskopie erforderlich machten. Es fanden sich Werte zwischen 26 und 324 U/g Gewebe mit einem Mittelwert von 116,6 U/g Gewebe, einem Median von 108,9 U/g Gewebe und einer Standardabweichung von 73,2.

Sequenzielle Proben wurden aus einem Darmresektat ohne entzündliche Veränderungen gewonnen. Die Operation war bei diesem Patienten wegen eines Kolonkarzinoms durchgeführt worden. Die Gewebeproben stammten aus tumorfreier Kolonmukosa. Es fanden sich Werte um 60 U/g Gewebe, mit einer Standardabweichung von 9,5 (Abb. 2).

Endoskopische Biopsien wurden von Patienten mit Colitis ulcerosa und Kolitis bei Morbus Crohn gewonnen. Die Biopsien wurden nach endoskopisch-makroskopischem und histologischem Score in drei Kategorien eingeteilt: A: keine Entzündungszeichen, B: leichte Entzündungszeichen und C:

schwere Entzündungszeichen. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde die histologische Einteilung verwandt. Wie aus Abbildung 3 und aus Tabelle 1 hervorgeht, zeigt sich eine Abhängigkeit der lokalen gemessenen Faktor-XIII-Aktivität vom Schweregrad der Entzündung mit einer Tendenz zu niedrigen Werten bei schwerer Entzündung.

### Diskussion

Die Ursache der Faktor-XIII-Verminderung im Plasma von Patienten im akuten Schub von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist nach wie vor ungeklärt (1, 2). Verbrauch von Faktor XIII durch lokale Gerinnungsvorgänge im entzündeten Darm (8) wie auch ein Verlust über die dysfunktionelle Darmwand wurden diskutiert. Therapeutische Gabe von Faktor-XIII-Konzentrat zeigte einen günstigen Einfluß auf den intesti-

nalen Blutverlust bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (5-7). D'Argenio et al. beschrieben eine Methode zur Bestimmung der Transglutaminaseaktivität in Darmhomogenisaten von der Ratte (11) und fanden lokal erhöhte Transglutaminaseaktivität im Restdarm von Dünndarm-resezierten Ratten (12), während die Serum-Transglutaminasespiegel bei den resezierten Tieren im Vergleich mit nichtresezierten Tieren vermindert waren. Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, daß die Regeneration und Hypertrophie des Restdarms mit einer erhöhten Aktivität und damit einem Verbrauch von Faktor XIII im Darm einhergeht.

Wir adaptierten einen Microtiterplatten-Amin-Inkorporationstest (10) zur Messung der Faktor-XIII-Aktivität in Darmschleimhautbiopsien. Vorteil dieser Methode ist ihre hohe Empfindlichkeit durch Verstärkung der Reaktion durch immunologische Detektion des Reaktionsproduktes. Dies ermöglicht die Messung der Faktor-XIII-Aktivität in Homogenisaten von endoskopisch gewonnenen Kolon-Biopsien mit einem Gewicht von 10-50 mg. Lösliches Dinitrophenylcadaverin wird von aktiviertem Faktor XIII in wandständiges Casein auf der Microtiterplatte inkorporiert und mittels eines spezifischen Antikörpers gegen Dinitrophenol markiert. Eine weitere Verstärkung erfolgt durch die Bindung eines Alkalische-Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörpers. Durch die Wasch-Schritte nach der Enzymreaktion hat, im Gegensatz zur Messung in einem photometrischen Test mit löslichem Reaktionsprodukt (13), die Trübung oder Färbung der Probe keinen Einfluß auf Meßbarkeit und Resultat.

Im Gegensatz zu den Tierversuchsergebnissen von D'Argenio et al. (12) zeigte sich eine Verminderung von Faktor XIII in entzündeter Kolonmukosa, verglichen mit nichtentzündeten Bereichen. Im Vergleich zum Kontrollkollektiv zeigten sich bei den Patienten mit Colitis ulcerosa und Kolitis im Rahmen eines Morbus Crohn niedrigere Werte, so daß insgesamt von einer verminderten Faktor-XIII-Wirkung im entzündeten Darm auszugehen ist. Ob die Faktor-XIII-Verminderung

**Tab. 1** Faktor-XIII-Aktivität (U/g Gewebe) in Kolon-Mukosaprobe

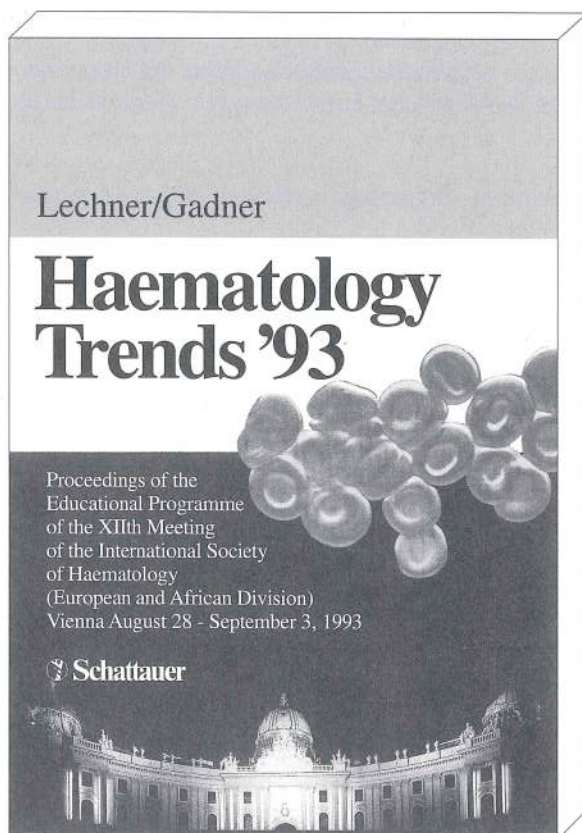
	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Normal (n=16)	116,6	108,9	73,2	25,9	324,0
Kolitis-Gruppe A (n=22) (keine lokale Entzündung)	82,3	75,1	39,2	20,1	163,6
Kolitis-Gruppe B (n=14) (geringe lokale Entzündung)	48,4	43,7	29,9	1,3	128,4
Kolitis-Gruppe C (n=11) (schwere lokale Entzündung)	31,5	21,7	30,1	4,3	93,4

derung Ursache der alterierten Abheilung der Darmläsionen ist, können Untersuchungen der Produkte der Faktor-XIII-Wirkung in Darmbiopsien zeigen. Die beschriebene Methode erlaubt die Messung von Faktor-XIII-Aktivität in sehr kleinen, endoskopisch gewonnenen Proben und kann auch zur Beantwortung der Frage hilfreich sein, ob intravenös applizierter Faktor XIII bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn zu einer vermehrten lokalen Faktor-XIII-Wirkung im Darm führt.

## LITERATUR

1. Wisen O, Gardlund B. Haemostasis in Crohn's disease: low factor XIII levels in active disease. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 961-6.
2. Galloway MJ, Mackie MJ, McVerry BA. Reduced levels of factor XIII in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Clin Lab Haematol* 1983; 5: 427-30.
3. Barry EL, Mosher DF. Factor XIII cross-linking of fibronectin at cellular matrix assembly sites. *J Biol Chem* 1988; 263: 10464-9.
4. Mosher DF, Fogerty FJ, Chernousov MA, Barry EL. Assembly of fibronectin into extracellular matrix. *Ann NY Acad Sci* 1991; 614: 167-80.
5. Lorenz R, Heinmuller M, Classen M, Tornieporth N, Gain T. Substitution of factor XIII: a therapeutic approach to ulcerative colitis. *Haemostasis* 1991; 21: 5-9.
6. Lorenz R, Clemens R, Karl M, Classen M. Substitution of F XIII concentrate in ulcerative colitis. *Z Gastroenterol* 1989; 27: 87-90.
7. Dempfle CE, Magez J, Röckel A, Gladisch R, Harenberg J, Heene DL. Acquired factor XIII-deficiency and substitution of factor XIII in exacerbated ulcerative colitis and Crohn's disease. In: Factor XIII: Second International Conference. McDonagh J, Seitz R, Egbring R (eds). 1993; 181-92.
8. Wakefield AJ, Sawyer AM, Dhillon AP, Pittilo RM, Rowles PM, Lewis AAM, Pounder RE. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet* 1989; 1057-62.
9. Clarke DD, Mycek MJ, Neidle A, Waelsch H. The incorporation of amines into protein. *Arch Biochem Biophys* 1959; 79: 338-54.
10. Dempfle CE, Harenberg J, Hochreuter K, Heene DL. Microtiter assay for measurement of factor XIII activity in plasma. *J Lab Clin Med* 1992; 119: 522-8.
11. D'Argenio G, Sorrentini I, Ciacci C, Mazzacca G. Transglutaminase activity along the rat small bowel and cellular location. *Enzyme* 1988; 39: 227-30.
12. D'Argenio G, Ciacci C, Sorrentini I, Ventriglia R, Spagnuolo S, Mattera D, Mellone MC, Iovino P, Mazzacca G. Transglutaminase changes in intestinal mucosa after experimental small bowel resection in the rat. *Clin Physiol Biochem* 1992; 9: 74-7.
13. Fickenscher K, Aab A, Stuber W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* 1991; 65: 535-40.

Korrespondenzadresse:  
Dr. med. Carl-Erik Dempfle  
Universität Heidelberg  
Klinikum Mannheim  
I. Medizinische Klinik  
Theodor-Kutzer-Ufer  
D-68167 Mannheim



## From the Contents:

Therapy of Acute Myeloid Leukemia: Where from now? · Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia · Hodgkin's Disease · B Cell Low-Grade Malignant Lymphomas · High Grade non-Hodgkin's Lymphomas · Hematopoietic Growth Factors in Malignant Disorders · Hematopoietic Growth Factors in Non-Malignant Cytopenias · Interferons in Hematology · Evolving Therapies in Globin Gene Disorders · Infection-Associated Haematological Disorders · Nutrition and Anaemia · Molecular Pathology of Haemophilia and Von Willebrand's · Clotting Factor Concentrates · Hereditary Thrombophilia · Chimeric and Dysregulated Transcriptional Control Genes in Human Acute Leukemia · New Hematopoietic Cytokines · Application of Molecular Genetics to Diagnosis in Leukemia · Gene Therapy for Congenital Hematologic Disorders · Bone Marrow Transplantation for Patients Lacking an HLA-Identical Sibling · Peripheral Blood Stem Cell Transplantation

Lechner/Gadner  
**Haematology Trends '93**  
Proceedings of the Educational  
Programme of the XIIth Meeting of the  
International Society of Haematology  
(European and African Division)  
Vienna August 28 - September 3, 1993

1993. 341 Pages, 16 Figures,  
51 Tables, cbd.  
DM 68.00/öS 531.00/£Fr 68.00  
ISBN 3-7945-1564-1

 **Schattauer**