

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Patientenkollektiv

Die in Folge näher beschriebenen Untersuchungen wurden bei insgesamt 68 Patienten der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Charite durchgeführt. Hierbei handelte es sich um Patienten beiderlei Geschlechts, welche aufgrund maligner Tumoren im Kopf-Hals-Bereich alle einer primär chirurgischen Therapie zugeführt wurden, welche einer Tumorexzision mit mindestens einseitiger Neck dissection entsprach. Voraussetzung war weiterhin eine prä- und postoperativ normale globale Gerinnung.

Ausschlusskriterien waren:

- das Auftreten einer disseminierten intravasalen Gerinnung
- eine substitutionspflichtige Hypoproteinämie
- ein komplexer Gerinnungsfaktorenmangel
- eine postoperative Lokaltherapie.

Es erfolgte eine Aufklärung hinsichtlich der geplanten Untersuchungen und der Verabreichung des Fibrogammin® (soweit die Patienten der Verumgruppe der Vorstudie zugeordnet wurden). Von allen Patienten wurde eine schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an den Untersuchungen gegeben.

#### 3.1.1. Art der Untersuchungen

Präoperativ, sowie täglich vom 1. bis 4. postoperativen Tag erfolgten folgende Blutuntersuchungen:

1. Kleines Blutbild
2. Gerinnung (Quick, PTT, Fibrinogen, ATIII, FXIII, Fibrinmonomere, D-Dimere)
3. Klinische Chemie (Natrium, Kalium, Kalzium, Kreatinin, Gesamtbilirubin, Protein, Albumin, ASAT, ALAT, Glukose)

Parallel wurden täglich vom 1. bis 4. postoperativen Tag Proben der in den Redon-Drainagen gesammelten Wundsekrete bei insgesamt 51 Patienten gewonnen. Neben der Dokumentation des Drainagevolumens innerhalb von 24 Stunden erfolgten Bestimmungen des Fibrinogengehalts und der Faktor XIII-Konzentration.

Bei insgesamt 55 Patienten wurden unterschiedliche Gewebeproben hinsichtlich ihrer Faktor XIII-Konzentration untersucht. Zusätzlich wurde die Menge des Gesamtproteins bestimmt. Dabei wurden bei 35 Patienten Proben von Muskel- und Hautgewebe sowie bei 8 dieser

### 3. Material und Methoden

Patienten zusätzlich Tumorgewebeproben untersucht. Bei 20 weiteren Patienten erfolgten die Bestimmungen in Proben von Tumorgewebe und Gewebe der Glandula submandibularis.

#### 3.1.2. Risikogruppenzuteilung

Hinsichtlich ihres Risikos für Wundheilungsstörungen wurden alle Patienten entsprechend der Punktesumme eines Risikoscores nach MISHIMA und SCHMIDTLER bewertet [41, 101]. Anhand des unten aufgeführten Risikoscores erfolgte die Einteilung in eine Gruppe mit niedrigem Risiko ( $\leq 10$  Punkte) und eine Gruppe mit hohem Risiko ( $> 10$  Punkte) für das Auftreten postoperativer Wundheilungsstörungen.

Kriterium	Punkte	Kriterium	Punkte
<b>Alter (Jahre)</b>		<b>Operationsdauer (Stunden)</b>	
<60	0	<3	0
$\geq 60$	1	3-5	2
<b>Geschlecht</b>		$\geq 5$	3
männlich	1	<b>Frühe Zweitoperation</b>	3
weiblich	0	<b>Summe der Blutproduktesubstitution (Erythrozytenkonzentrat, FFP/ ml)</b>	
<b>Anämie präoperativ (g/dl)</b>		<1000	0
8-12	2	1000-2000	4
<8	4	2000-3000	8
<b>Nebenerkrankungen</b>		>3000	10
Vorbehandeltes Malignom (Operation bzw. Radiatio im Kopf- Hals-Bereich)	4	<b>Postoperative Komplikationen</b>	
Ulcus ventriculi/ Ulcus duodeni	1	Lokal	1
Pankreatitis	1	Systemisch	3
Diabetes mellitus	1	<b>Resektionsgrad</b>	
Kachexie	1	R0	0
Hepatitis B/ C	2	R1	1
Alkoholtoxische Leberzirrhose	2		

Tabelle 4: Risikoscore modifiziert nach [101]

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.1.3. Postoperative Behandlung

Von den 68 untersuchten Patienten erhielten 17 im Rahmen der zuvor näher beschriebenen Studie zum Einfluss einer Faktor XIII-Prophylaxe auf Wundheilungsstörungen nach Tumorresektionen im Kopf-Hals-Bereich je 1250 IE Fibrogammin® HS (Centeon Pharma, Marburg) i.v. am 2., 4. und 6. postoperativen Tag.

Die postoperative Antibiose sowie Ulkus- und Thromboseprophylaxe erfolgte jeweils nach demselben Schema. Dabei erhielten die Patienten täglich:

3x4,5g            Tazobac® { Piperacillin (4g) und Tazobactam (0,5g) i.v.

3x50mg           Sostril® { Ranitidin i.v.

1x0,2ml           Fragmin® P { Dalteparin s.c.

#### 3.1.4. Bewertung der Wundheilung

Die Bewertung der Wundheilung erfolgte täglich während des gesamten stationären Aufenthalts unter folgenden Gesichtspunkten:

- 0      primäre Wundheilung
- 1      Wunddehiszenz mit sekundärer Wundheilung
- 2      diffuses Hämatom
- 3      Fistel, Lymphfistel
- 4      Lappennekrose bzw. -dehiszenz

Zusätzlich erfolgte die Fotodokumentation der Wundheilungsstörungen.

### 3.2. Versuchsvorbereitung

#### 3.2.1. Probengewinnung

Jeweils morgens zur selben Uhrzeit wurden die Blutproben venös und die Proben der Drainageflüssigkeiten mittels Blutentnahmeröhrchen mit Citratzusatz aus dem wundnahen Bereich des Schlauches der Redon-Drainage entnommen. Bei den Patienten, welche eine Faktor XIII-Substitution erhielten wurde der Substitutionserfolg zusätzlich 30 Minuten nach Injektion von Fibrogammin® durch erneute Bestimmung der Faktor XIII-Plasmaaktivität kontrolliert.

Die Gewebeproben wurden intraoperativ aus den entsprechenden Geweben entnommen. Dabei handelt es sich bei den Muskelgewebeproben um Anteile des M. sternocleidomastoideus, bei den

### **3. Material und Methoden**

---

Hautgewebeproben um Proben aus dem Wundrandgebiet, bei den Tumorgewebeproben um Anteile des resezierten Malignoms und zusätzlich Proben aus der Glandula submandibularis.

#### **3.2.2. Aufbereitung der Wundsekrete**

Direkt nach der Gewinnung wurden die Proben jeweils 2x10 Minuten bei 14°C und einer Beschleunigung von 4000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquote von jeweils 300 µl abgefüllt und bis zur Bestimmung bei -80°C tiefgefroren.

#### **3.2.3. Aufbereitung der Gewebeproben**

Die Gewebeproben wurden zunächst direkt nach der Entnahme ohne weitere Zusätze bei -80°C tiefgefroren.

Später erfolgte die weitere Aufbereitung. Dazu wurden Stückchen der Gewebeproben von ca. 1mm<sup>3</sup> Größe zunächst noch weiter mit dem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden diese Proben mit Zusatz von 1ml physiologischer Kochsalzlösung mittels Potter homogenisiert. Das Gemisch wurde nun 10 min bei 4°C und 14000 G zentrifugiert und der Überstand in Aliquoten von 300 µl erneut bei -80°C tiefgefroren.

### **3.3. Versuche zur Stabilität von Faktor XIII**

Vorbereitend wurden Versuche zur Stabilität der Faktor XIII-Aktivitäten in Wunddrainageflüssigkeiten bei verschiedenen Umweltbedingungen durchgeführt.

Zunächst wurden Wundsekrete und Albuminlösung, welche als Leerwert diente, mit Faktor XIII-Konzentrat auf ca. 100% versetzt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei unterschiedlichen Bedingungen:

1. bei 25°C in einem Gefäß
2. bei 25°C in Aliquoten für die entsprechende Anzahl von Messungen
3. bei 25°C in einem Gefäß auf einem Mischer
4. bei 37°C in einem Gefäß.

Es erfolgten Messungen der Faktor XIII-Aktivität zu definierten Zeitpunkten über 48 Stunden mit dem Berichrom® Faktor XIII-Test. Parallel erfolgte die Messung der Faktor XIII-Aktivität in definierten Kontrollplasmen.

Als Reaktionsteilnehmer ist bei diesem Testverfahren Fibrinogen erforderlich. Deshalb wurden in weiteren Versuchen Wundsekrete und die Albuminlösung zusätzlich zum Faktor XIII-

### **3. Material und Methoden**

---

Konzentrat auch mit Fibrinogen in unterschiedlicher Höhe substituiert. Außerdem wurden Plasmaproben mit Fibrinogen versetzt. Messungen der Faktor XIII-Aktivität erfolgten alle 30 Minuten über 4 Stunden bei 25°C.

#### **3.4. Bestimmung der Faktor XIII-Konzentration mittels ELISA**

##### **3.4.1. Prinzip der Faktor XIII-Bestimmung mittels ELISA**

Der Sandwich-ELISA ist nach dem folgenden Prinzip zur in vitro-Bestimmung des humanen Faktor XIII aufgebaut.

Unter Verwendung von Mikrotiterplatten, welche mit gegen die A-Untereinheit des FXIII gerichteten Antikörpern beschichtet sind, bindet sich der in der Probe enthaltene FXIII während der ersten Inkubation spezifisch. In einer zweiten Reaktion werden Peroxidase-konjugierte Antikörper, welche gegen die Tierspezies des ersten Antikörpers gerichtet sind, an die freien Determinanten gebunden. Diese Bindung wird mit Hilfe eines Chromogens sichtbar gemacht und die Extinktion wird bei 492 nm gemessen. Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur Faktor XIII-Konzentration der Probe.

##### **3.4.2. Geräte und Reagenzien**

Verwendete Geräte:

- Kolbenhub-Pipetten: Firma Eppendorf
- Multistepper/Waschvorrichtung
- Inkubationskammer: Temperatur 37°C
- Photometer: Organon Teknika Reader 530; Messwellenlänge 492 nm

Verwendete Reagenzien:

- Forschungskit der Firma Centeon Pharma GmbH, Marburg:
  - Mikrotiterplatten, beschichtet mit Anti-FXIII-A-Antikörpern vom Hasen
  - Anti-FXIII-A-POD-Konjugat (Lot.-no. 200989)
- Reagenzien des TAT-Assays Enzygnost® TAT micro (Behring Diagnostics GmbH, Marburg):  
(Proben- und Konjugatverdünnungspuffer TAT, Waschlösung POD, POD-Substratsystem)
- FXIII-Standard: Standard Humanplasma (Charge 502558B)
- Kontrollen: Kontrollplasma P (Charge 512630B)  
IL Kalibrationsplasma (Charge 512630B)
- Abdeckfolie

### **3. Material und Methoden**

---

#### **3.4.3. Durchführung des ELISA mit Wundsekreten und homogenisierten Gewebeproben**

Die Vorbereitung der Reagenzien erfolgte nach Firmenvorschrift. Den zu messenden Wundsekreten und homogenisierten Gewebeproben wurde 2g/l Fibrinogen entsprechend der zuvor durchgeführten Versuche zur Stabilität von Faktor XIII zugesetzt.

Nach Vorschrift der Firma Centeon Pharma GmbH erfolgte bei der Testdurchführung zunächst die Inkubation der Probe auf der mit dem Primärantikörper beschichteten Mikrotiterplatte für eine Stunde bei 37°C. Danach wurde die Platte drei Mal mit Waschlösung gewaschen bevor die Konjugatlösung, welche den Sekundärantikörper enthält, hinzugefügt wurde. Nach erneuter Inkubation von einer Stunde bei 37°C wurde wiederum drei Mal mit Waschlösung gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Substratlösung zugesetzt und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die Farbreaktion durch Zugabe einer Stopplösung unterbrochen und die Extinktion bei 492 nm gemessen, welche zur Faktor XIII-Konzentration der Probe direkt proportional ist.

Die Faktor XIII-Konzentration aller Proben wurde doppelt gemessen. Die Messwerte wurden anschließend gemittelt. Parallel zu den Proben wurde auf jeder Platte die Standardkurve inkubiert.

#### **3.4.4. Kontrollen**

Bei jeder Messserie wurden Kontrollen mit Kontrollplasmen mitgeführt. Die Zielwerte der Faktor XIII-Konzentration dieser Kontrollplasmen lagen zwischen 105-140%, bzw. 26-40%. Die Messwerte der Proben wurden nur verwendet, wenn die Werte der Kontrollen im Vertrauensbereich lagen.

### **3.5. Bestimmung des Fibrinogengehalts der Wundsekrete**

#### **3.5.1. Prinzip der Fibrinogenbestimmung nach CLAUSS**

Grundlage ist die Kinetik der Thrombin-Fibrinogen-Reaktion. Die Gerinnung einer stark verdünnten Probe wird durch eine hohe Konzentration an Thrombin aktiviert. Die Gerinnungsgeschwindigkeit ist nun abhängig von der in der Probe enthaltenen Fibrinogenkonzentration. So wird konzentrierte Thrombinlösung zu einer schwachen Fibrinogenlösung (verdünnten Probe) hinzugefügt und die Gerinnungszeit gemessen. Die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration erfolgt anhand einer Kalibrationskurve [20].

### **3. Material und Methoden**

---

#### **3.5.2. Testdurchführung**

Vorbereitung der Reagenzien und die Testdurchführung erfolgte nach Firmenvorschrift (Roche Diagnostic, Messung am STA). Alle Proben wurden doppelt gemessen.

#### **3.5.3. Kontrollen**

Zu Beginn jeder Messserie wurden Kontrollen mit Plasma bekannten Fibringehalts bestimmt. Die Messwerte der Proben wurden nur verwendet, wenn die Werte der Kontrollen im Vertrauensbereich lagen.

### **3.6. Bestimmung des Proteingehalts der Gewebeproben**

#### **3.6.1. Prinzip der Proteinbestimmung nach LOWRY**

Die Proteinbestimmung nach LOWRY ist eine Methode zur Bestimmung der Konzentration löslicher sowie unlöslicher Proteine. Sie beruht auf zwei Reaktionen. Zunächst wird ein Komplex zwischen Protein und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung gebildet. In einem zweiten Reaktionsschritt bewirken der Kupfer-Protein-Komplex und die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan die Reduktion von im Folin-Phenol-Reagenz enthaltenen Heteropolyphosphorsäuren unter Bildung von Mischoxiden. Bei der Reduktion erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau, dessen Extinktion gemessen wird. Hierbei ist die Extinktion annähernd direkt proportional der Proteinkonzentration [73].

#### **3.6.2. Testdurchführung**

Vorbereitung der Reagenzien und die Testdurchführung erfolgte nach Firmenvorschrift (Testkit der Firma Pierce, Rockford). Alle Proben und Standards wurden doppelt gemessen.

#### **3.6.3. Kontrollen**

Es wurden bei jeder Messserie Kontrollen mit Albuminlösung bekannten Albumingehalts durchgeführt. Die Messwerte der Proben wurden nur verwendet, wenn die Werte der Kontrollen im Vertrauensbereich lagen.

#### 3.7. Statistische Auswertung

Zur Berechnung der Signifikanzen wurden die Einzelwerte der zu berechnenden Parameter in den jeweiligen Gruppen herangezogen. Die statistische Auswertung der gewonnenen Rohdaten als unverbundene Stichproben erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dieser Test wurde angewendet, weil der t-Test für unverbundene Stichproben aufgrund teilweise geringer und ungleicher Stichprobengröße und fehlender Parallelverteilung der Einzelwerte in den Gruppen nicht anwendbar war. Verbundene Stichproben wurden aus gleichen Gründen mit dem Wilcoxon-Test untersucht. Weiterhin erfolgte bei geeigneten Parametern die Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test.

Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Alle statistischen Auswertungen wurden mittels SPSS für Windows (Version 11.0, 2000, SPSS inc. Chicago, USA) berechnet.