

Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis von
Autoantikörpern gegen die Thyreoidale Peroxidase
in Trockenblut und dessen Anwendung in der
Humanmedizin und Prüfung der möglichen
Anwendung in der Veterinärmedizin

Daniela Dey



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin - Klinik für Kleintiere
Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. A. Moritz

und

der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsklinik der
Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Betreuer: Prof. Dr. med. H.-J. Biersack

**Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis von
Autoantikörpern gegen die Thyreoidale Peroxidase in
Trockenblut und dessen Anwendung in der Humanmedizin und
Prüfung der möglichen Anwendung in der Veterinärmedizin**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Daniela Dey
Tierärztin aus Homburg / Saar
Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. med. vet. A. Moritz

Prof. Dr. med. H.-J. Biersack

Tag der Disputation:

16. April 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
I. Humanmedizinischer Teil	3
2. Literatur	5
2.1. Morphologie der Schilddrüse	5
2.1.1. Makroskopische Anatomie der menschlichen Schilddrüse	5
2.1.2. Mikroskopische Anatomie	6
2.2. Physiologie der Schilddrüse	7
2.2.1. Hypothalamo-hypophysio-thyreoidaler Regelkreis	7
2.2.2. Die Wirkung des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH)	8
2.3. Schilddrüsenhormone	9
2.3.1. Die Rolle der thyreoidalen Peroxidase (TPO) in der Biosynthese	9
2.3.2. Periphere Regelmechanismen	11
2.3.3. Physiologische Wirkungen der Schilddrüsenhormone	12
2.4. Klassifikation der Schilddrüsenkrankheiten in der Humanmedizin	13
2.4.1. Morphologische Veränderungen	13
2.4.1.1. Struma	13
2.4.1.2. Schilddrüsentumoren	15
2.4.2. Schilddrüsenentzündungen	18
2.4.2.1. Akute Thyreoiditis	19
2.4.2.2. Subakute Thyreoiditis	19
2.4.2.3. Chronische Thyreoiditis	21
2.4.3. Funktionsstörungen	21
2.4.3.1. Hypothyreose	21
2.4.3.2. Hyperthyreose	24
2.4.4. Autoimmune Schilddrüsenenerkrankungen	27
2.4.4.1. Autoimmunität	27
2.4.4.2. Hashimoto-Thyreoiditis	29
2.4.4.3. Morbus Basedow	31
2.5. Diagnose der Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse - Labordiagnostik	32
2.5.1. TSH-Bestimmung	33

2.5.2.	TRH-Bestimmung	33
2.5.3.	Bestimmung von Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3)	34
2.5.4.	Thyreoglobulin (Tg) Bestimmung	35
2.5.5.	Schilddrüsenautoantikörper	35
2.5.5.1.	Autoantikörper gegen Thyreoglobulin (TAK)	35
2.5.5.2.	Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor (TRAK)	36
2.5.5.3.	Autoantikörper gegen die thyreoidale Peroxidase (TPO-AK/MAK)	36
3.	Material und Methoden	39
3.1.	Patientengruppe	39
3.1.1.	Alter	39
3.1.2.	Geschlecht	39
3.1.3.	Diagnose	40
3.2.	Der Radioimmunoassay	41
3.2.1.	Die Testkomponenten und die Testcharakteristika	42
3.2.2.	Das Testprinzip	43
3.2.3.	Arbeitsschritte zur Durchführung des Radioimmunoassay	44
3.2.4.	Der Gamma - Counter	45
3.2.5.	Strahlenschutzmaßnahmen	46
3.3.	Die Blutentnahme und das Aufbereiten der Blutproben	47
3.3.1.	Referenzmethode	47
3.3.2.	Filterpapiermethode	48
3.4.	Versuchsmodifikationen zur Evaluation der Filterpapiermethode	50
3.4.1.	Variation der Filterpapierblättchenanzahl	50
3.4.2.	Verdünnungsreihen zur Ermittlung des optimalen Blut/Puffer-Verhältnisses	54
3.4.3.	Einfluss der Inkubationszeit	57
3.4.4.	Verwendung von Antikoagulanzen	58
3.4.5.	TPO-AK Verteilung im Trockenblutfleck	59
3.4.6.	Lagerung und Lagerfähigkeit der Filterpapierkarten	60
4.	Ergebnisse	63
4.1.	Methodenvergleich	65
4.2.	Quantitativer Vergleich	67
4.2.1.	Deskriptive Betrachtung	67
4.2.2.	Regressionsanalyse	69
4.2.3.	Induktive Betrachtung	73
4.2.3.1.	Anpassungstest	73
4.2.3.2.	Unabhängigkeitstest	76

4.2.3.3.	Homogenitätstest	77
4.2.3.4.	Zweistichprobentest für die absolute Differenz arithmetischer Mittel bei verbundenen Stichproben	78
4.2.3.5.	Zweistichprobentest für die relative Differenz arithmetischer Mittel bei verbundenen Stichproben	80
4.2.4.	Präzision der Ergebnisse	80
4.2.4.1.	Intraassayvarianz	81
4.2.4.2.	Interassayvarianz	83
4.2.5.	Zuverlässigkeit der Filterpapiermethode	83
4.2.5.1.	Spezifität der Filterpapiermethode	84
4.2.5.2.	Sensitivität der Filterpapiermethode	85
4.2.5.3.	Tetrachorische Korrelation	85
4.2.6.	Referenzbereich	86

II. Veterinärmedizinischer Teil 89

5. Literatur 91

5.1.	Vergleich der Schilddrüse der Katze mit der Schilddrüse des Menschen . .	91
5.1.1.	Vergleich der Anatomie	91
5.1.2.	Vergleich der Physiologie	92
5.2.	Schilddrüsenerkrankungen der Katze	93
5.2.1.	Morphologische Veränderungen der Schilddrüse	93
5.2.1.1.	Euthyreote Strumen	93
5.2.1.2.	Schilddrüsentumoren	93
5.2.1.3.	Weitere morphologische Veränderungen der Schilddrüse .	95
5.2.2.	Thyreoditiden	96
5.2.3.	Funktionsstörungen	96
5.2.3.1.	Die Hypothyreose der Katze	96
5.2.3.2.	Die Ätiologie der Hyperthyreose der Katze	98
5.2.3.3.	Klinische Befunde der Hyperthyreose der Katze	100
5.3.	Diagnose von Schilddrüsenerkrankungen - Labordiagnostik	101
5.3.1.	Schilddrüsenhormonbestimmung	102
5.3.1.1.	Gesamt-Thyroxin (TT4)	102
5.3.1.2.	Freies Thyroxin (FT4)	104
5.3.1.3.	Trijodthyronin (T3) und freies Trijodthyronin (FT3) . .	104
5.3.1.4.	TSH-Bestimmung	105
5.3.2.	Suppressions-/Stimulationstests	105
5.3.2.1.	Trijodthyroninsuppressionstest	105

5.3.2.2.	TSH-Stimulationstest	105
5.3.2.3.	TRH-Stimulationstest	106
5.3.2.4.	Weitere Schilddrüsentests	106
5.3.3.	Schilddrüsenautoantikörper	107
5.3.3.1.	Messung von Antikörpern gegen Thyreoglobulin (Hund)	107
5.3.3.2.	Untersuchungen zu Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor bei der Katze	107
5.3.3.3.	Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase (TPO) . . .	108
6.	Material und Methoden	111
6.1.	Immunhistologie	113
6.2.	Entnahme der Katzenschilddrüse im Rahmen einer Sektion	115
6.3.	Fixierung der Schilddrüsen	115
6.4.	Einbetten der Schilddrüsen	116
6.5.	Das Schneiden der Präparate	116
6.6.	Das Färben der Schnitte	116
6.7.	Demaskierung der Antigene	117
6.8.	Durchführung der Immunhistologie an der Schilddrüse der Katze	117
7.	Ergebnisse	119
7.1.	Ergebnisse der Immunhistologie	119
7.2.	Kontrolle	120
7.3.	Strukturvergleich der Gensequenz der TPO des Menschen und der Katze	122
7.4.	Untersuchung von Katzenserum auf Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase	130
7.5.	Ergebnisse der Untersuchung von Katzenserum auf Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase	133
8.	Diskussion	137
9.	Zusammenfassung	145
A.	Gensequenzvergleich	147
	Abkürzungsverzeichnis	157
	Literaturverzeichnis	159
	Erklärung gemäß §10(5) der Promotionsordnung	167

Abbildungsverzeichnis

2.1. Hypothalamo-hypophysio-thyreoidaler Regelkreis	8
3.1. Altersverteilung	40
3.2. Geschlechterverteilung	40
3.3. Verteilung der Schilddrüsenerkrankungen im Patientengut	42
3.4. Filterpapierkarte zum Auftropfen von Kapillarblut	49
4.1. Differenz aus Serum- und Filterpapiermethode	68
4.2. Lineare Regression bezüglich der Wertepaare und Residuen	69
4.3. Lineare Regression bezüglich der logarithmisch skalierten Wertepaare . .	72
4.4. Logarithmische Differenz aus Serum- und Filterpapiermethode	73
6.1. Bindungen im humanmedizinischen Radioimmunoassay	111
6.2. Theoretische Bindungen beim Anwenden des human-RIA zur Untersu- chung von Katzen	112
6.3. Bindungsverhältnisse im folgenden immunhistologischen Ansatz: Bindet der humane-TPO-Antikörper an die feline TPO ?	113
7.1. Übersichtsaufnahme des felines Schilddrüsengewebes, 100x	121
7.2. Immunhistologisches Präparat des felines Schilddrüsengewebes, 320x . .	122
7.3. Schematische Darstellung der Schilddrüsenepithelzelle und Lokalisation der TPO nach [11]	123
7.4. Immunhistologisches Präparat des felines Schilddrüsengewebes, 630x . .	124
7.5. Immunhistologisches Präparat des felines Schilddrüsengewebes, Negativ Kontrolle, 320x	125
7.6. Immunhistologisches Präparat des felines Schilddrüsengewebes, 400x . .	126
7.7. Lage der human TPO auf Chromosom 2, [11]	126

Tabellenverzeichnis

2.1. Einteilung der Thyreoditiden	19
2.2. Referenzwerte TSH	33
2.3. Referenzwerte TRH	34
3.1. Vergleich der Filterpapierwerte bei unterschiedlicher Anzahl der Filterpapierblättchen bei gleicher Pufferkonzentration	51
3.2. Vergleich der Filterpapierwerte bei steigender Konzentration und Einsatz von 2 Filterpapierblättchen	52
3.3. Vergleich der Filterpapierwerte bei Einsatz von mehreren Filterpapierblättchen und steigender Konzentration	53
3.4. Verdünnungsreihe Patient 1	54
3.5. Verdünnungsreihe Patient 2	55
3.6. Vergleich der Verdünnung (1:13) und der Verdünnung (1:10) für 10 Patienten mit unterschiedlichen Antikörperwerten in der Referenzmethode	55
3.7. Verdünnungsreihe in 300 μ l und 290 μ l Pufferlösung	56
3.8. Einfluss der Inkubationszeit auf die Anzahl der Antikörper	57
3.9. Einfluss der Antikoagulanzen auf die Anzahl der Antikörper	59
3.10. Verteilung der TPO-Antikörper im Trockenblutfleck: Vergleich von zentralen und peripheren Probennahmen	60
3.11. Einfluss der Lagerung auf die Anzahl der Antikörper	61
3.12. Grenzen der Lagerfähigkeit der Filterpapierkarten	61
4.1. Übersicht über die TPO-positiv getesteten Patienten mit Filterpapier- und Serummethode	65
4.2. Übersicht über die TPO-negativ getesteten Patienten mit Filterpapier- und Serummethode	66
4.3. Deskriptive Kennzahlen der Serum- und der Filterpapiermethode im Vergleich	67
4.4. Deskriptive logarithmische Kennzahlen der Serum- und der Filterpapiermethode im Vergleich	72
4.5. Klassifizierung der positiv getesteten Patienten gemäß Tab. 4.1	74
4.6. Werte der erwarteten Verteilungsfunktion für Serum- und Filterpapiermethode	75

4.7. Werte der erwarteten relativen f_i^e und absoluten h_i^e erwarteten sowie beobachteten absoluten h_i^0 Häufigkeiten für Serum- und Filterpapiermethode	75
4.8. Kontingenztabelle zum Unabhängigkeitstest	76
4.9. Relative Häufigkeit der Merkmalskombinationen zum Unabhängigkeitstest	77
4.10. Tatsächliche und erwartete Häufigkeiten zum Homogenitätstest	78
4.11. Meßergebnisse der Intraassayvarianzanalyse	81
4.12. Meßergebnisse der Interassayvarianzanalyse	83
4.13. Vierfelder-Tabelle	85
5.1. Übersicht über die Symptome der Hyperthyreose	101
7.1. Legende zu der Nummerierung in den Abb. 7.1, 7.2, 7.4, 7.5, 7.6	120
7.2. Bezeichnungen der einzelnen Gendatenbanken für das Enzym TPO	127
7.3. Übereinstimmung (%) der einzelnen TPO-Gene/Proteine der Spezies mit der TPO des Menschen (Isoform-1)	129
7.4. Übereinstimmung (%) der einzelnen Exons der TPO der Katze mit der TPO des Menschen (Isoform-1)	130
7.5. T4- und FT4-Werte der zur Untersuchung verwendeten Katzensereren aus dem Vet Med Labor	133
7.6. TPO-Werte der mit dem CentAk-AntiTPO untersuchten Katzensereren	135

1. Einleitung

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil geht es um die Evaluierung einer veränderten Methodik zum Nachweis von Antikörpern gegen die thyreoidale Peroxidase (TPO). Die thyreoidale Peroxidase ist ein Enzym in der Schilddrüsenhormonbiosynthese. Antikörper gegen die TPO werden zur Diagnose von Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse herangezogen. Das für den Antikörpernachweis erforderliche Material der bereits etablierten und eingesetzten Methode ist Serum. Die hier vorgestellte veränderte Methodik arbeitet mit wenigen Tropfen Kapillarblut, die auf Filterpapierkarten aufgetropft werden. Diese Methode stellt eine Arbeitserleichterung dar, weil die Blutentnahme vereinfacht durchgeführt werden kann und der Transport der Filterpapierkarten sich einfacher gestaltet. So könnten breitgestreute Feldversuche erleichtert werden, die Aufschluss über die Verbreitung von Autoimmunkrankheiten liefern können. Genauso vereinfacht das Verfahren Untersuchungen an Neugeborenen, denen so eine Venenpunktion erspart bleibt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob diese Methode möglicherweise auch in der Tiermedizin zum Einsatz kommen kann.

Im Tierreich sind Schilddrüsenerkrankungen bei der Katze ein häufiges Problem. Die Hyperthyreose ist die häufigste Endokrinopathie der adulten Katze. Die Zahl der klinisch diagnostizierten Fälle von feliner Hyperthyreose nimmt seit den späten siebziger Jahren stetig zu. Obwohl die Erkrankung Gegenstand zahlreicher Studien weltweit ist, ist ihre Ätiologie noch nicht geklärt. Postuliert wurden immunologische, infektiöse, alimentäre, genetische und tumoröse Ursachen.

Das Krankheitsbild und auf histologischer Ebene das Schilddrüsengewebe der hypertyreoten Katzen erinnert an die aus der Humanmedizin bekannte Autoimmunerkrankung Morbus Basedow. Aus diesem Grund hat es zahlreiche Untersuchungen rund um Antikörper gegen den TSH-Rezeptor der Katze gegeben, ohne jedoch die Existenz von stimulierenden Antikörpern bei der Katze beweisen zu können. In der Humanmedizin werden zum Nachweis der immunologischen Genese der Erkrankung und zur Verlaufskontrolle eines Morbus Basedow nicht nur die Antikörper gegen den TSH-Rezeptor (TRAK), sondern auch Antikörper gegen die Thyreoidale Peroxidase bestimmt. In diesem zweiten Teil der Arbeit soll geprüft werden, ob sich die in der Humanmedizin eingesetzte Nach-

weismethode zum Nachweis von Antikörpern gegen die thyreoidale Peroxidase auch für Katzen eignet.

Teil I.

Humanmedizinischer Teil

2. Literatur

2.1. Morphologie der Schilddrüse

2.1.1. Makroskopische Anatomie der menschlichen Schilddrüse

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) ist ein schmetterlingsförmiges Organ mit zwei ovalen Lappen (*Lobus dexter* und *Lobus sinister*), die durch einen Isthmus in Höhe des zweiten bis vierten Halswirbels verbunden sind.

Die Länge der Lappen beträgt drei bis fünf Zentimeter. Das Gewicht des Organs beträgt bei Erwachsenen durchschnittlich 18 g - 60 g [73], wobei Ernährung, Alter, Schwangerschaft und andere Faktoren das Gewicht erheblich beeinflussen können. Seine Farbe ist rotbraun und die Konsistenz ist fibroelastisch.

Die Schilddrüse liegt direkt vor und neben der Luftröhre, unmittelbar unter dem Schildknorpel. Ihre Kapsel (*Capsula fibrosa*) ist mit der praetrachealen Faszie verbunden, so dass sie beim Schluckakt gemeinsam mit dem Kehlkopf bewegt wird. Die Kapsel der Schilddrüse teilt sich in zwei Blätter. Das innere Blatt ist untrennbar mit dem Parenchym verwachsen und schickt bindegewebige Septen in das Innere der Drüse. Das äußere Blatt der Kapsel ist vollständig bedeckt vom mittleren Blatt der Halsfaszie und geht kontinuierlich in die Faszien von Trachea und Oesophagus über. Lateral der Thyroidea liegen die *A. carotis*, die *V. jugularis*, der *N. laryngeus recurrens* und der *M. sternocleidomastoideus* [85].

Die vier Nebenschilddrüsen, auch Epithelkörperchen genannt, sind ungefähr 2-4 mm und liegen auf der Dorsalseite der Schilddrüsenlappen zwischen deren Kapselblättern in unmittelbarer Nachbarschaft des cranialen und caudalen Schilddrüsenpols.

Die Blutversorgung der Thyroidea wird durch die *A. Thyroidea superior*, dem ersten Ast der *A. carotis externa*, und die *A. thyroidea inferior* sichergestellt, welche meist aus dem *Truncus thyroecervicalis* oder direkt aus der *A. suclavia* entspringt. In 10 % der Fälle existiert zusätzlich die *A. thyroidea ima* zur Blutversorgung der Schilddrüse. Der Rückfluss des venösen Blutes erfolgt durch *Vv. Thyroideae superior* und weiter zur *V. Jugularis interna*. Zusätzlich existiert in einigen Fällen die *V. thyroidea media*, die

ebenfalls zur V. jugularis interna zieht. Das Blut im unteren Pol der Schilddrüse wird durch ein starkes Venengeflecht, den Plexus thyreoidalis impar, über die V. thyreoidea inferior zur V. brachiocephalica sinistra abgeleitet [34].

Die intrathyreoidalen Lymphgefäße, die sich um jeden Schilddrüsenfollikel ranken, nehmen als Lymphkapillaren und perilobuläre Bahnen Lymphe auf. Diese münden dann zu trabekulären Lymphbahnen, die die gesamte Schilddrüse netzartig durchziehen. Von dort aus wird die Lymphe dann entweder über Kantenlymphgefäße oder über Trabantenlymphbahnen zu jeweils spezifischen Lymphknotengruppen transportiert. Der Lymphabfluß erfolgt über den Truncus cervicalis dexter oder sinister in den Ductus lymphaticus dexter bzw. in den Ductus thoracicus.

Die Nerven der Schilddrüse gehören dem sympathischen und parasympathischen Nervensystem an. Die sympathischen Nervenfasern stammen vom Ganglion cervicale superior und versorgen gemeinsam mit den parasympathischen Nervenfasern aus dem N. laryngeus superior den oberen Pol der Schilddrüse. Die Innervation der unteren Teile der Schilddrüse übernehmen Nervenfasern aus dem Ganglion cervicothoracicum und aus dem Nervus laryngeus recurrens.

Beim operativen Zugang sind vor allem die Nähe zur A. carotis communis und zum N. laryngeus recurrens zu beachten. Als anatomische Besonderheiten können das Fehlen des Isthmus oder die Ausbildung des sogenannten Lobus pyramidalis, eines zusätzlichen Lobus, der vom Isthmus nach cranial wächst, genannt werden.

2.1.2. Mikroskopische Anatomie

Das innere Blatt der makroskopisch sichtbaren Bindegewebskapsel geht in das Interstitium der Schilddrüse über. Seine Septen verleihen dem Organ die typische Lobulierung. Das Interstitium besteht im Wesentlichen aus Bindegewebe in das retikuläre Fasern, zahlreiche fenestrierte Kapillaren und Lymphgefäßen eingebettet sind. Es unterteilt die Schilddrüse in Schilddrüsenlappen (Lobi) und Schilddrüsenläppchen (Lobuli).

Das Schilddrüsenläppchen besteht aus funktionellen Einheiten, den Schilddrüsenfollikeln. Diese Follikel werden von einschichtig angeordneten Follikelepithelzellen begrenzt, die der Basalmembran aufsitzen. Sie bilden die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Tetrajodthyronin (Thyroxin, T4). Im Lumen der Follikel befindet sich das jodreiche Kolloid, das einen Schilddrüsenhormonspeicher ¹ darstellt. Die Schilddrüse ist das einzige endokrine Organ, das in der Lage ist Hormone zu speichern. Deshalb wechseln Form und

¹Schilddrüsenhormone gebunden an Thyreoglobulin

Menge des Kolloids je nach Funktionszustand der Drüse. Die Epithelzellen verändern sich mit der Kolloidmenge von der kubischen Form im Ruhezustand, mit viel eingedicktem Kolloid, zu der hochprismatischen Form, mit Randvakuolen und wenig flüssigem Kolloid, im Sekretionszustand.

Die Epithelzellen verfügen über einen locker strukturierten, rundlichen Zellkern, primäre Lysosomen bzw. Phagolysosomen, ein gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum, zahlreiche freie Ribosomen, einen großen Golgiapparat und ebenfalls große Mitochondrien. An der Zelloberfläche ihres apikalen Zellpols tragen sie zahlreiche Mikrovilli und pseudopodienähnlichen Fortsätze.

Die Calcitonin² produzierenden C-Zellen, oder parafollikuläre Zellen, bilden eine eigene Zellpopulation mit einer abweichenden embryologischen Entwicklung. Sie stammen aus der Neuralleiste und nicht aus der Schlundtasche wie die restlichen Zellen der Schilddrüse. Sie liegen basal im Schilddrüsenepithel zwischen den Follikeln, ohne diese funktionell zu beeinflussen [41, 85].

2.2. Physiologie der Schilddrüse

2.2.1. Hypothalamo-hypophysio-thyreoidaler Regelkreis

Der Hypothalamus und die Hypophyse nehmen im endokrinen System eine zentrale Regulatorfunktion ein.

Die Rolle des übergeordneten Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) aus dem Hypothalamus besteht in der Stimulation der Synthese und Sekretion von TSH. Durch direkte nervale Impulse wird in den neuroendokrinen Zellen des Hypothalamus die Produktion von TRH induziert. Das TRH gelangt durch neuroaxonalen Transport in das Kapillarnetz der Adenohypophyse und veranlasst dort die Bildung des Thyreoidea-stimulierenden Hormones (TSH). Das ebenfalls im Hypothalamus gebildete Somatostatin hemmt die TSH-Sekretion.

Die TSH-bildende Zelle, die in der pars distalis der Adenohypophyse liegt, bildet und sezerniert TSH. Das gebildete TSH stimuliert die Schilddrüsenzellen zur Produktion und Freisetzung von Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) über eine durch den TSH-Rezeptor vermittelte Signalkaskade.

Die steigende Konzentration der beiden Schilddrüsenhormone T3 und T4 im Blut

²Hormon zur Regulation des Kalzium-Phosphat-Stoffwechsels

führt dann zu einer negativen Rückkopplung auf Ebene der Hypophyse. Die entscheidende Größe des Regelkreises ist hierbei das intrahypophysäre freie T₃, was durch die Dejodierung von T₄ entsteht. Das T₃ hemmt die Expression der TSH-Gene. So kann die TSH -bildende Zelle auch bei erhöhtem TRH -Angebot nicht mehr mit TSH Sekretion reagieren. Ob auch die Freisetzung von TRH direkt durch die T₃ beeinflusst wird, ist nicht sicher geklärt.

Durch den beschriebenen Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und der Schilddrüse bleiben die Konzentrationen der freien Schilddrüsenhormone im Serum konstant, und eine stabile Stoffwechsellage wird gewährleistet [93].

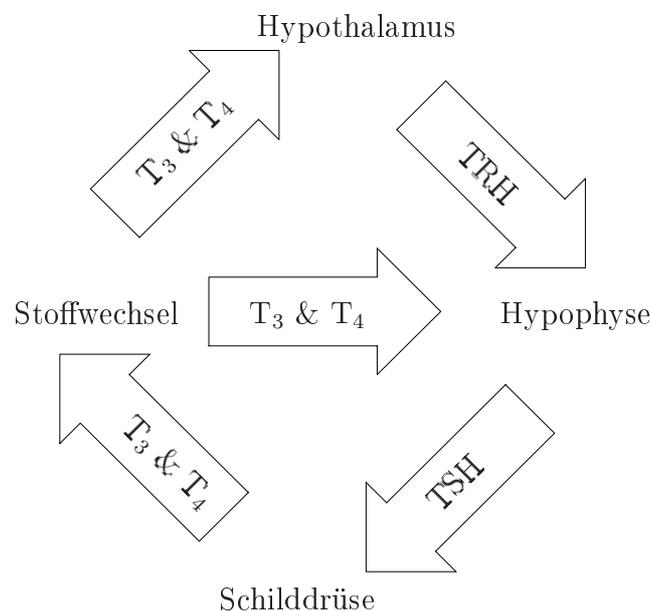


Abbildung 2.1.: Hypothalamo-hypophysio-thyreoidaler Regelkreis

2.2.2. Die Wirkung des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH)

TSH reguliert alle Schritte der Schilddrüsenhormonsynthese und -Sekretion. Die Sekretion unterliegt einem zirkadianen und einem jahreszeitlichen Rhythmus. Auf Phasen mit niedriger Umgebungstemperatur reagiert der Organismus mit einer gesteigerten TSH-Sekretion, vermehrter Bildung von Schilddrüsenhormon, einem gesteigerten Grundumsatz und dadurch vermehrter Wärmebildung. Ohne die Stimulation durch TSH würde die Schilddrüse nur einen Basisstoffwechsel von etwa 10-20 % der normalen Schilddrüsenhormonproduktion unterhalten.

Das durch die Hypophyse sezernierte TSH bindet sich an den TSH-Rezeptor, der in der Basalmembran der Schilddrüsenzelle verankert ist. Der TSH -Rezeptor ist mit sieben Transmembrandomänen in der Plasmamembran lokalisiert und an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt. Durch die Bindung von TSH wird eine intrazelluläre Signaltransduktion ausgelöst, die durch das G-Protein vermittelt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklasekaskade führt. Die resultierende Cyclo-AMP-Bildung führt zur Aktivierung der Jodaufnahme und zur vermehrten Hormonsekretion. Die Hormonsynthese und die Jodierung von Thyreoglobulin der Thyreozyten werden über einen Teil des G-Proteins vermittelt, der den Inositolphosphatweg aktiviert.

TSH stimuliert außerdem das Wachstum der Thyreozyten und nimmt damit nicht nur Einfluss auf die Funktion der Schilddrüse, sondern auch auf deren Morphologie. Eine pathogenetische Bedeutung hat der TSH-Rezeptor beim Morbus Basedow und bei der funktionellen Autonomie der Schilddrüse. Dies wird ausführlich in Kap. 2.4.4.3 behandelt.

2.3. Schilddrüsenhormone

2.3.1. Die Rolle der thyreoidalen Peroxidase (TPO) in der Biosynthese

Jenseits der Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese durch TSH wird die Schilddrüsenhormonsynthese durch die Jodidkonzentration im Blut beeinflusst. Bei niedrigen Jodidkonzentrationen wird Jod vermehrt aus dem Magen-Darm-Trakt aufgenommen und die Hormonproduktion der Schilddrüse wird stimuliert. Liegt ein hoher Gehalt an Jodid im Blut vor, so wird die Aufnahme von Jod sowie die Schilddrüsenhormonproduktion gehemmt [30]. Die tägliche Menge an Jod, die ein Erwachsener mit der Nahrung aufnehmen muss, beträgt nach Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung ca. 200 μg .

Die Schilddrüsenhormonsynthese lässt sich in die Abschnitte “Aufnahme von Jod“ (Jodination), “Einbau von Jod in das Thyreoglobulin“ (Jodisation) und “Kopplung der Hormonvorstufen“ gliedern.

Jod wird aktiv und unter Energieverbrauch mit Hilfe des Natrium-Jodid-Symporters (NIS) entgegen des Konzentrationsgefälles in die Schilddrüsenzelle transportiert. Die treibende Kraft für den Jodidtransport, bei dem zwei Na-Ionen zusammen mit einem Jod-Ion in die gleiche Richtung transportiert werden, ist ein ins Zellinnere gerichteter

Na-Gradient, der durch eine Na-K-ATPase aufrecht erhalten wird. TSH ist der wichtigste Modulator des Jodid-Transporter, der über den Adenylatcyclase-cAMP-Weg stimuliert wird [52].

Das auf diese Weise in der Zelle 10-200-fach angereicherte Jod wird dann an der apikalen Zellwand durch den Halogenidtransporter Pendrin oder hAIT (human apical iodide transporter) aktiv in das Follikellumen transportiert.

Die in der apikalen Zellwand verankerte Schilddrüsenperoxidase (TPO) überführt Jodid in eine reaktivere Form unter Beteiligung von Wasserstoffperoxid. Die Bereitstellung des Wasserstoffperoxids geschieht mithilfe der NADPH-abhängigen Thyreoidea-Oxidase I und II [85].

Die TPO ist ein membranständiges Protein, das aus 933 Aminosäuren besteht. Das rund 150 kB große TPO-Gen ist auf Chromosom 2pter-p12 lokalisiert und kodiert für 2 mRNA von 4 kB und 3,2 kB, die wiederum in 100 und 107 kDa große Glykoproteine translatiert werden. Das aktive Zentrum der TPO ist ein Häm-Rest als prosthetische Gruppe lokalisiert. Für seine Synthese ist somit auch Eisen notwendig [11].

Nach der Aktivierung des Jodids katalysiert die TPO die oxidative Iodierung der Tyrosinreste des Thyreoglobulins. Das Thyreoglobulin ist ein Glykoprotein, das von den Schilddrüsenfollikelzellen produziert und ins Follikellumen sezerniert wird. Durch die Iodierung der Tyrosinreste werden die Hormonvorläufer Monojodthyrosin (MIT) und Dijodthyrosin (DIT) gebildet.

In einer weiteren TPO-abhängigen Reaktion werden die Hormonvorläufer MIT und DIT durch Bildung einer Etherbrücke miteinander verbunden. In Abhängigkeit von der Anzahl der Iodatome in den Iodthyrosinresten entsteht entweder Trijodthyronin, T₃ (Kopplung von MIT und DIT) oder Tetrajodthyronin, T₄ (Kopplung von zwei Molekülen DIT). Die Schilddrüsenhormone sind durch ihre Bindung an das Thyreoglobulin inaktiv und werden bis zu ihrer Freisetzung im Follikellumen gespeichert.

Sinkt die Konzentration von Schilddrüsenhormonen im Blut, wird durch TSH die Wiederaufnahme des Thyreoglobulin-Hormon-Komplexes aus dem Follikellumen gefördert. Dieser Prozess wird durch die Verflüssigung des Kolloids durch proteolytische Enzyme am Rande des Follikels eingeleitet. Danach erfolgt zunächst eine Pinocytose von Kolloidtropfen, diese verbinden sich dann mit den Lysosomen zu Phagolysosomen. Nach einer dort stattfindenden hydrolytischen Abspaltung von Thyroxin und Trijodthyronin vom Thyreoglobulin können dann die Hormone T₄ und T₃ über Diffusion ins Blut freigesetzt

werden. Dabei werden auch die Hormonvorläufer MIT und DIT freigesetzt, deren Jod in einem Recyclingprozess wieder in den Hormonbildungskreislauf eingeschleust wird. Auch intaktes Thyreoglobulin gelangt wahrscheinlich auf diesem Weg in den Blutkreislauf.

Die Schilddrüsenperoxidase (TPO) ist in der apikalen Membran von Schilddrüsenfollikelzellen derart verankert, dass die katalytische Region zum Follikellumen hin orientiert ist. So gelagert katalysiert sie zum einen die Oxidation von Jodid zu elementarem Jod, und zum anderen die Jodierung von Tyrosylresten im Thyreoglobulin sowie die Kopplung von MIT und DIT zu den Hormonen T3 und T4. Damit kommt diesem Enzym eine Schlüsselrolle in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone zu.

2.3.2. Periphere Regelmechanismen

Die Schilddrüse versorgt den Organismus mit Schilddrüsenhormon. Während das gesamte Thyroxin (T4) direkt aus der Schilddrüse sezerniert wird, stammt der überwiegende Teil des im Blut zirkulierenden T3, das wohl für alle durch Schilddrüsenhormone bedingten biologischen Effekte verantwortlich ist, aus der Monodejodierung des T4 in der Peripherie.

Die Konversion von T4 zu T3 wird nach dem Bedarf geregelt und durch die 5'-Dejodase Typ I katalysiert, die eine Abspaltung des seitenkettenfernen Jodatoms bewirkt. Dieser Mechanismus bietet die Möglichkeit, die Menge des wirksamen T3 genau der Stoffwechsellage anzupassen. Die Abspaltung des Jodatoms wird durch Faktoren wie TSH, Selen, ein hohes Angebot an Kohlenhydraten und Schilddrüsenhormonen gefördert.

Da in katabolen Stoffwechselsituationen (z.B. Fasten oder Allgemeinerkrankungen) weniger stoffwechselwirksames Hormon benötigt wird, wird die Aktivität der 5'-Dejodase Typ I gehemmt, und stattdessen wird T4 überwiegend in das nichtstoffwechselwirksame reverses T3 (rT3) konvertiert. Für diese Reaktion, bei der das seitenkettennahe Jodatom abgespalten wird, ist die 5'-Dejodase Typ III verantwortlich.

Die 5'-Dejodase Typ II, die nur in der Hypophyse vorkommt, katalysiert ebenfalls die Umwandlung von T4 in T3, allerdings führt diese Umwandlung zu Anpassungen im Stoffwechsel, weil die Menge an T3 in der Hypophyse die Regelgröße zu Änderungen in der TSH-Ausschüttung darstellt. Die 5'-Dejodase Typ II reguliert im Rahmen des Hypothalamus-Hypophysen-Systems die Menge der freigesetzten Schilddrüsenhormone (siehe 2.2).

Schilddrüsenhormone werden im Blut von Trägerproteinen transportiert, da sie nicht

wasserlöslich sind. Diese Eiweißbindung verhindert außerdem den Verlust der Proteine über die Niere. Die Transportproteine sind zu 75% das thyroxinbindende Globulin (TBG), zu 10% das thyroxinbindende Albumin (TBA) und zu 15% das thyroxinbindende Präalbumin (TBPA). Solange die Hormone an die Transportproteine gebunden sind, sind sie stoffwechsellinaktiv. Nur 0,3% des T3 und 0,3% des T4 liegen ungebunden vor, man bezeichnet sie auch als die sogenannten freien Schilddrüsenhormone (fT3 und fT4). Nur der ungebundene Anteil der Schilddrüsenhormone kann an die Rezeptoren im Zielgewebe binden und dort zu hormoneller Wirkung führen.

Die Aufnahme der Hormone in die Zielzellen des Körpers erfolgt zum einen durch Diffusion, zum anderen durch aktiven, carriervermittelten Transport. Nachdem sie von den Zielzellen aufgenommen worden sind, erfolgt dann die Bindung an nukleare T3-Rezeptoren. Es existieren verschiedene Isoformen des Thyroid hormone receptors (TR), die je nach Gewebe unterschiedlich exprimiert werden. Die T3 Wirkung ist umso stärker je mehr Rezeptoren exprimiert sind. Die TR interagieren nach Bindung von T3 mit spezifischen DNA-Sequenzen, die dann über die mRNA-Synthese die Expression verschiedener Gene steuern.

Aber die komplexen Wirkungen der Schilddrüsenhormone beruhen nicht alleine auf der veränderten Genexpression und der daraus resultierenden Palette der gebildeten Proteine bzw. Enzyme, sondern die Schilddrüsenhormone binden sich auch direkt an Proteine in den Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum und im Zytosol, um so ihren regulierenden Einfluss geltend zu machen.

2.3.3. Physiologische Wirkungen der Schilddrüsenhormone

T3 stimuliert den gesamten Metabolismus des Körpers. In erster Linie wird der zelluläre energiekonsumierende Natrium-Kalium-Transport stark beschleunigt. Zu diesem Zweck wird die Utilisation von Kohlenhydraten verstärkt. Die intestinale Kohlenhydratresorption wird stimuliert, die Vorgänge Glukoneogenese, Glykolyse und Glykogensynthese sowie Glykogenolyse werden vermehrt durchgeführt. Auch die Proteinsynthese wird angekurbelt, was bei physiologischer Menge an Schilddrüsenhormonen zu einer anabolen Stoffwechsellage führt, und bei einer erhöhter Konzentration von T3 katabole Effekte nach sich zieht. Genauso wird die Fettverbrennung angeheizt. Durch die Steigerung der Fettmobilisation wird mehr Speicherfett verbraucht, gleichzeitig wird auch die Lipidsynthese mäßig erhöht. Deshalb kommt es in diesem Zusammenhang zu einem Abfall des Cholesteringehaltes im Blut. Durch einen hohen T3-Spiegel wird also mehr Energie verbraucht. Zu diesen Verbrennungsprozessen ist Sauerstoff notwendig. Die Sauerstoffverbrauch, also der Grundumsatz, ist erhöht und die dabei freiwerdende Wärme dient der Thermoge-

nese. Am Herzen führt T₃ zu einer Steigerung der Kontraktilität des Myokards, einer Steigerung des Schlagvolumens, einer Steigerung der Herzfrequenz und daraus folgend einer Steigerung der Blutdruckamplitude. Die Wirkung am Herzen wird durch eine Zunahme der β - Rezeptoren am Herzen vermittelt.

Neben der Rolle im Metabolismus kommt dem T₃ eine wichtige Wirkung bei Wachstum und Entwicklung zu. Ein Fehlen an Schilddrüsenhormonen kann hier zu schweren Störungen des Wachstums führen. Das Knochenwachstum und der Epiphysenschluss sind verzögert. Es kann zu irreversiblen Störungen der Gehirnreifung kommen und in den Lungen ist die Bildung von Surfactant gestört. Das klinische Bild ist unter dem Namen Kretinismus bekannt.

2.4. Klassifikation der Schilddrüsenerkrankungen in der Humanmedizin

2.4.1. Morphologische Veränderungen

2.4.1.1. Struma

Unter einem Kropf bzw. einer Struma versteht man eine Vergrößerung der gesamten Schilddrüse oder von Teilen der Schilddrüse. Die Bezeichnung „Struma“ wird grundsätzlich als Überbegriff für alle Arten von „Vergrößerung“ der Schilddrüse verwendet unabhängig von deren Ursache. Die Vergrößerung wird entweder durch eine diffuse Vermehrung des Schilddrüsengewebes (diffuse Struma) verursacht oder durch das Entstehen von einem oder mehreren Knoten (Knotenstruma - Struma uninodosa/multinodosa). Bei normaler Funktion spricht man von „euthyreoter Struma“, bei Überfunktion von „hypertyreoter Struma“ und bei Unterfunktion entsprechend von „hypothyreotem Struma“.

Die häufigste Ursache eines Strumas ist der Jodmangel. Die tägliche Jodzufuhr sollte bei im Mittel bei 200 μg liegen. Weltweit leben ca. 1 Milliarde Menschen unter Jodmangelbedingungen. Über 200 Millionen haben ein klinisch bedeutsames Struma. Deutschland zählt zu den jodärmsten Ländern der Erde. In der Literatur wird angegeben, dass die von der WHO empfohlene Jodaufnahme in Deutschland nur ca. 50 % beträgt. 30 % der Bevölkerung sind von Jodmangelerscheinungen betroffen. Diesem Umstand begegnet man mit der Jodierung von Speisesalz. Von einem relativen Jodmangel spricht man, wenn in den Lebensphasen der Pubertät, Schwangerschaft und Stillzeit ein Jodmangel entsteht, der durch den erhöhten Jodbedarf in dieser Zeit begründet ist. Deshalb manifestiert sich ein Kropf insbesondere zu diesen Zeiten.

Bei Jodmangel droht ein Mangel an Schilddrüsenhormon, dessen lebensnotwendige Funktion in vielen Stoffwechselprozessen bereits beschrieben wurde (siehe Kap. 2.3.3). Als Gegenregulation wird die Schilddrüse zu vermehrter Aktivität angeregt, um das vorhandene Jod optimal auszunutzen. Dies geschieht durch das Steuerhormon TSH aus der Hypophyse, was wiederum zu einer funktionellen Adaptation durch Regulation der Syntheseleistung und Hormonabgabe führt. Im Zuge dessen führt TSH zur Zellhypertrophie. Zusätzlich werden durch den Jodmangel in der Schilddrüse Wachstumsfaktoren (IGF I, und IGF II, EGF, TGF, FGF) freigesetzt, die einen Wachstumsreiz auf die Schilddrüsenzellen ausüben, der zur Zellhyperplasie führt. Bei Jodmangel ist das Gleichgewicht zwischen wachstumsstimulierenden und wachstumshemmenden Faktoren gestört. Der Proliferationsfaktor IGF-I wird normalerweise durch Jod gehemmt; im Jodmangel entfällt diese Schutzfunktion. Außerdem ist die Bildung von Iodlaktonen vermindert und ihre wachstumshemmenden Eigenschaften ebenfalls. Zusätzlich kommt es bei Jodmangel zu einer Sensibilisierung gegenüber der trophischen Wirkung von TSH [32]. Das Euthyreote Struma macht 90 % der Schilddrüsenerkrankungen aus, wobei noch genügend Schilddrüsenhormon gebildet wird. Allerdings verändert sich das Verhältnis von T3 und T4 zugunsten des potenteren T3.

Bei größeren Struma können durch den Druck auf die Luft- und Speiseröhre, den die vergrößerte Schilddrüse bewirkt, Beschwerden auftreten. Dazu gehören:

- Druck- und Kloßgefühl,
- Schluckbeschwerden,
- Dyspnoe bei Belastung,
- Dyspnoe bei bestimmten Kopfhaltungen.

Außerdem wird durch die ständige Belastung der Atmung und durch den Druck auf die Blutgefäße das rechte Herz belastet. Es bildet sich möglicherweise ein sogenanntes Kropfherz. Die Irritation des Nervus recurrens ruft Heiserkeit hervor.

Die durch den Jodmangel ausgelösten Wachstumsschübe des Schilddrüsengewebes bedingen Ernährungsstörungen. Das neugebildete Gewebe erscheint inhomogen. Die Zellen der Schilddrüse reagieren auf die veränderten Wachstumsimpulse nicht gleichmäßig, manche Zellbezirke wachsen stärker als andere. Verstärkt poliferierende Schilddrüsenzellen scheinen für das Auftreten von Mutationen besonders anfällig zu sein. Schließen jene überaktive Zentren sich zu Verbänden zusammen, können Knoten entstehen, die autonom (d.h.vom TSH-Einfluss entkoppelt) Schilddrüsenhormon produzieren. Man spricht dann nicht länger vom euthyreoten Struma, was ausschließlich eine Volumenzunahme des Organs charakterisiert, sondern vom sogenannten „toxischen Knotenstruma“, was der Hormonbildung dieses Gewebes Rechnung trägt.

Geht die Kropfbildung mit Hyper- oder Hypothyreose einher, manifestieren sich zusätzlich die bei diesen Funktionsstörungen im Kap. 2.4.3 genannten Symptome.

Neben dem Jodmangel gibt es noch andere Ursachen, die einen Kropf verursachen können. Einen Grund für die Entstehung eines Struma können strumigene Substanzen sein. Von den folgenden Verbindungen ist bekannt, dass sie die Kropfbildung begünstigen: Thiocyanate, Nitrate, Phenolderivate, Zyanoglykoside (Goitrin), Flavonoide und Resorcinol. Genauso unterstützen Zink und Selenmangel die Strumaentstehung. Außerdem gibt es Medikamente (z. B. Amiodaron 2.4.2.2, IFN- α , IL-2, Lithium, Carbamezepin, Phenytoin und Haloperidol) von denen beschrieben ist, dass sie die Schilddrüsenfunktion beeinflussen, obwohl hier zum Teil eine Thyreoiditis eher zu erwarten ist als ein Struma [43]. In seltenen Fällen führen Dyshormogenesen, durch Enzymdefekte in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone, zum Struma. Auch andere Erkrankungen können eine Strumabildung bedingen: Zystenbildung, Amyloidosen, Blutungen, Traumata, Metastasen, Malignome anderer Organe, Hypophysentumore, Schilddrüsenhormonresistenz oder Akromegalie. Grundsätzlich können alle der in den folgenden Kapiteln näher beschriebenen Krankheiten mit einer Strumabildung einhergehen:

- Neoplasien (siehe Kap.2.4.1.2)
- Schilddrüsenentzündungen (siehe Kap.2.4.2)
- Hyper- und Hypothyreose (siehe Kap.2.4.3)
- Immunthyreopathien³

2.4.1.2. Schilddrüsentumoren

Obwohl gutartige Zubildungen in der Schilddrüse häufig sind, handelt es sich dabei meist um polyklonale Knotenbildungen, die in Folge der Wachstumsstimulation bei Jodmangel entstehen (siehe Kap. 2.4.1.1). Echte benigne Neoplasien wie follikuläre Adenome treten, genau wie die Schilddrüsenmalignome, seltener auf. Die durchschnittliche Prävalenz einzelner Knoten der Schilddrüse liegt bei 6,4 % bei Frauen und 1,5 % bei Männern [34].

Einteilung der Schilddrüsentumoren nach der WHO-Klassifizierung der Schilddrüsentumore:

1. Epitheliale Tumoren

a) benigne

i. follikuläres Adenom

³Pathologischer Wachstumsreiz, durch irregulär entstandenes TSH oder TSH ähnliche Stoffe (siehe Kap.2.4.4).

- ii. andere
- b) maligne
 - i. follikuläres Karzinom
 - ii. papilläres Karzinom
 - iii. medulläres Karzinom (C-Zell Karzinom)
 - iv. undifferenzierte Karzinome
 - v. andere
- 2. Nichtepitheliale Tumoren
 - a) benigne
 - b) maligne
- 3. Maligne Lymphome
- 4. Andere
- 5. Sekundäre
- 6. Unklassifizierbare Tumoren
- 7. Tumor-like Lesions

Adenome

Ein Adenom ist ein gutartiger Tumor der vom Schilddrüsengewebe ausgeht. Es ist der häufigste gutartige Tumor der Schilddrüse. Diese Art der Umfangsvermehrung kommt bevorzugt bei jungen Frauen vor.

Das Adenom verfügt über eine deutliche Kapsel und verdrängt das umliegende Schilddrüsengewebe. Häufig findet man auch fibrosierende oder verkalkte Zentren. Die meisten Schilddrüsenadenome sind endokrin inaktiv und stellen sich aus diesem Grund in der Szintigraphie als kalte Knoten dar. Sie werden daher häufig mit Malignomen verwechselt. Es gibt allerdings auch endokrin aktive Adenome sog. autonome Adenome, auf die dann das klinische Bild der funktionellen Autonomie zutrifft (siehe Kap.2.4.3.2).

Das hyalinisierte trabekuläre Adenom ist eine ungewöhnliche Adenomvariante, die als Differentialdiagnose histologisch und immunhistochemisch vom papillären und vom medullären Karzinom abzugrenzen ist. Trotz zytologisch und histologisch scheinbar malignen Merkmalen (Zellreichtum, Zellpolyorphie, Mitosereichtum) verursacht es weder Gefäßinvasion noch Kapseldurchbrüche.

Karzinome

Bösartige Schilddrüsentumoren zählen zu den seltenen Tumorerkrankungen. Von allen Krebserkrankungen machen sie nur etwa 0,5 bis 1% aus. Ungefähr 95 % der Schilddrüsenmalignome sind primäre Karzinome und stellen damit die häufigsten endokrinen Karzinome dar.

Der Hauptteil der primären Schilddrüsenkarzinome geht von den Thyreozyten aus und wird als differenziertes Schilddrüsenkarzinom bezeichnet. Zu den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen gehören das papilläre und das follikuläre Schilddrüsenkarzinom. Differenzierte Schilddrüsenkarzinome ähneln noch weitgehend dem normalen Schilddrüsen- gewebe und haben damit einen niedrigen Grad der Bösartigkeit.

Zu den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen, die auch als anaplastische Karzi- nome bezeichnet werden, gehören spindelzellige, parenchymatöse und kleinzellige Kar- zinome, die alle einen hohen Grad an Bösartigkeit aufweisen und nur noch eine geringe Ähnlichkeit zum normalen Schilddrüsen- gewebe zeigen.

Einen Sonderfall stellt das medulläre Schilddrüsen- Karzinom dar, weil es durch eine Entartung der sogenannten C-Zellen entsteht. Diese C-Zellen produzieren das den Kalzi- umstoffwechsel regulierende Hormon Kalzitinin. Bei Patienten mit medullärem Schild- drüsenkarzinom sind die Kalzitininwerte extrem erhöht und werden mit dem Pentagastrin- Test laborchemisch nachgewiesen. [76].

Die Ursachen für die Entwicklung der Schilddrüsenkarzinome sind nur für das medul- läre Schilddrüsenkarzinom geklärt. Dafür ist eine Mutation im RET-Protooncogen auf Chromosom 10 verantwortlich. Begünstigende Faktoren für die Entstehung von Schild- drüsenkarzinome sind Jodmangel ⁴, Strahlung ⁵ und genetische Faktoren ⁶.

Beschwerden treten meist erst mit zunehmender Tumorgröße auf. Diese äußern sich dann durch die Einengung der umliegenden Strukturen und deren Folgen, wie sie bereits im Abschnitt 2.4.1.1 beschrieben wurde. Eine Störung der Schilddrüsenfunktion liegt in den meisten Fällen nicht vor. Sollte dennoch eine Hyperthyreose bestehen, so resultiert diese eher aus einem gleichzeitig vorliegenden Morbus Basedow oder einer Autonomie (siehe Kap. 2.4.4.3 und Kap. 2.4.3.2).

Die Gefahr des Schilddrüsenkarzinoms liegt hauptsächlich in der Metastasierungsneigung

⁴In Gebieten mit Jodmangel ist das Risiko auf das 2,3-fache erhöht.

⁵Einfluss ionisierender Strahlen im Halsbereich und im Kindesalter erhöht das Risiko auf das vier bis 45-fache der normalen Inzidenz.

⁶multiple endokrine Neoplasien, MEN-Syndrom zeigt familiäre Häufung.

und dahingehend unterscheiden sich die einzelnen Karzinomtypen⁷ voneinander.

Andere Tumoren

Außer den oben beschriebenen Adenomen und Karzinomen kommen noch einige andere Tumorarten in der Schilddrüse vor. Als Beispiel für einen nichtepithelialen Tumor kann man das maligne Haemangioendotheliom (epitheloides Angiosarkom) anführen. Ein Vorkommen dieses malignen Gefäßtumors wird hauptsächlich in alpinen Strumaendemiegebieten beschrieben.

Maligne Lymphome, die etwa 5 % aller Schilddrüsentumoren ausmachen, kommen vermehrt bei Frauen vor, bei denen TPO-Antikörper oder Antikörper gegen Thyreoglobulin im Serum nachgewiesen werden konnten. Sie entwickelten sich sehr häufig in der Folge einer Hashimoto-Thyreoiditis. Primäre maligne Lymphome der Schilddrüse können zum überwiegenden Teil den Lymphomen des Mucosa assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) zugerechnet werden. Eine Beteiligung des Gastrointestinaltraktes wird in diesem Zusammenhang oft beobachtet.

Häufige metastatische Tumoren sind: Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom, Bronchuskarzinom, malignes Melanom, Karzinome des Oesophagus [34].

2.4.2. Schilddrüsenentzündungen

Bei einer Thyreoiditis handelt es sich um eine herdförmig oder diffus auftretende Entzündung des Schilddrüsenorgans. Entzündungen der Schilddrüse machen etwa 1-3 % aller Schilddrüsenerkrankungen aus. Sie werden zum einen nach ihrer Entstehungsursache, und zum anderen nach ihrem Verlauf in akute, subakute und chronische Entzündungen unterteilt, von denen jede ein eigenständiges Krankheitsbild darstellt.

7

- Follikuläres Schilddrüsen-Karzinom: Lymphknotenmetastasen sind selten. Es werden vorwiegend Fernmetastasen in gleicher Häufigkeit in der Lunge und in den Knochen beobachtet.
- Papilläres Schilddrüsen-Karzinom: Bei ca. 2/3 der Patienten treten Lymphknotenmetastasen in den benachbarten Halslymphknoten auf. Fernmetastasen finden sich häufiger in der Lunge als in den Knochen und sind bei Patienten jünger als 40 Jahre allerdings sehr selten.
- Medulläres Schilddrüsen-Karzinom: Es treten sowohl Lymphknotenmetastasen als auch Fernmetastasen, z.B. in Lunge, Leber, Knochen und Nebenniere auf.
- Undifferenziertes/anaplastisches Schilddrüsen-Karzinom: Meist sind bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Lymphknoten- und Fernmetastasen vorhanden. Neben der Lunge und den Knochen sind hier das Gehirn und die Leber betroffen.

Akute Thyreoiditis	Subakute Thyreoiditis	Chronische Thyreoiditis
Infektiöse T.	Granulomatöse T. de Quervain	Chronisch lymphozytäre T.
Iatrogene T.	Lymphozytäre T./Silent T.	Autoimmunthyreoiditis (Hashimoto-Thyreoiditis)
	Postpartale T.	chronisch fibrosierende T. (Riedel)
	Medikamentös induzierte T.	

Tabelle 2.1.: Einteilung der Thyreoiditiden

2.4.2.1. Akute Thyreoiditis

Die akute Thyreoiditis wird meist durch Bakterien ausgelöst, die auf dem Blut- oder Lymphweg von ihrem ursprünglichen Infektionsort, z.B. dem Rachen, in die Schilddrüse verschleppt werden. Dort führen sie zu einer bakteriellen Infektion. Die akute Thyreoiditis tritt nur sehr selten auf. In den Körper eingedrungene Bakterien greifen die Schilddrüse normalerweise nur bei geschwächten Abwehrkräften an. Darüber hinaus kann auch durch Trauma, Lymphogranulomatose, Sarkoidose, Parasitenbefall, Mykose, oder durch radioaktive Bestrahlung (Tumorbehandlung im Hals- oder Brustbereich), eine Schädigung des Schilddrüsengewebes und damit eine akute Entzündungsreaktion hervorgerufen werden.

Charakteristisch ist eine plötzlich einsetzende Entzündung mit starkem Druckschmerz. Hinzu kommen Fieber, Schwellung der Schilddrüse sowie Überwärmung und Rötung der Schilddrüse. Bei einer akuten, bakteriell ausgelösten Schilddrüsenentzündung besteht die Gefahr, dass sich eitrige Herde abkapseln und Abszesse bilden.

Eine iatrogene Thyreoiditis kann durch fehlerhafte Feinnadelbiopsie, zwei Tage nach einer Radiojodtherapie, als Folge einer Strahlentherapie oder bei Operationen anderer zervikaler Strukturen entstehen. Die Symptome entsprechen denen der oben beschriebenen akuten Thyreoiditis, sind aber im allgemeinen selbstlimitierend und weniger drastisch. Eine symptomatische Therapie ist in den meisten Fällen ausreichend.

2.4.2.2. Subakute Thyreoiditis

De Quervain beschrieb erstmals 1904 das Krankheitsbild der subakuten Thyreoiditis. Die Erkrankung wird auch Riesenzellthyreoiditis genannt, weil sich Riesenzellen im Gewebe der Schilddrüse gebildet haben. Die Ursachen der Thyreoiditis de Quervain ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird, dass bei Menschen mit erblicher Neigung

zu dieser Erkrankung, im Anschluss an einen Virusinfekt, der häufig Atmungstrakt-assoziiert ist, die Entzündung der Schilddrüse letztlich durch eine überschießende Immunreaktion ausgelöst wird.

Die subakute Thyreoiditis ist mit erheblichen Schmerzen verbunden, die ins Ohr, den Ober- bzw. Unterkiefer ausstrahlen. Zu den Symptomen zählen allgemeines Krankheitsgefühl mit Fieber, Abgeschlagenheit und Leistungsschwäche, so wie man das bei einem schweren viralen Infekt erwarten würde. Zunächst kommt es in der Anfangsphase der Erkrankung zu einer Hyperthyreose mit den entsprechenden Symptomen (siehe Kap. 2.4.3.2). Dann normalisiert sich die Drüsenfunktion bis zur Euthyreose und geht dann häufig in eine Hypothyreose über.

Die lymphozytäre oder sogenannte **silent Thyreoiditis** heißt so, da sie symptomarm abläuft. Es gibt keine Anzeichen einer Entzündung und histologisch gleicht das Bild der in Kap. 2.4.4.2 erläuterten Hashimoto-Thyreoiditis mit starker lymphozytärer Infiltration und Ausbildung von Lymphfollikeln. Von dieser lässt sich die silent Thyreoiditis nur durch ihren niedrigen Antikörperspiegel abgrenzen. Es ist möglich, dass sich eine Hypothyreose im Laufe der Zeit bildet.

Die **postpartale Thyreoiditis** tritt bei ca. 10 % der Frauen in den ersten sechs Monaten nach der Entbindung auf. Bei Frauen die bereits vor oder während der Schwangerschaft schilddrüsenpezifische Antikörper nachweisbar sind, steigt das Risiko an einer Schwangerschaftsthyreoiditis zu erkranken auf 40 % [30]. Dabei entsteht eine vorübergehende Hyperthyreose, die durch die übermäßige Hormonabgabe der durch die Entzündung geschädigten Schilddrüsenfollikel zustande kommt. Durch die Destruktion der Follikel entsteht schließlich eine Hypothyreose, der dann drei bis neun Monate später die spontane Ausheilung folgt. Die Hyperthyreose ähnelt in ihrem Verlauf der subakuten Thyreoiditis. Das allgemeine Krankheitsgefühl und die charakteristischen Schmerzen fehlen allerdings und so gestaltet sie sich in ihren Krankheitsanzeichen wesentlich milder. Zur Pathogenese wird angenommen, dass es sich um einen sogenannten Rebound-Effekt nach der Suppression der Immunprozesse während der Schwangerschaft handelt.

Amiodarion ist ein Typ-III-Antiarrhythmikum. Da es mit den Schilddrüsenhormonen strukturverwandt ist und 39 % Gewichtsanteile Jod enthält, kann es durch dessen Einnahme zu einer medikamentös-induzierten Thyreoiditis kommen. **Zytokine** (Interferone, Interleukin-2) können ebenfalls eine Thyreoiditis auslösen. Man verwendet sie zur Beeinflussung der zellulären Immunregulation, u.a. bei Virusinfektionen und Tumoren. Bei längerfristiger Therapie ist mit Funktionsstörungen der Schilddrüse (meist Hyperthyreose, selten auch Hypothyreose) in 15 % der Fälle zu rechnen. Besonders gefährdet

sind Frauen mit erhöhten Schilddrüsenantikörperwerten [30].

2.4.2.3. Chronische Thyreoiditis

Zur chronischen Thyreoiditis gehört die **chronisch fibrosierende Thyreoiditis (Riedel)** und die Hashimoto-Thyreoiditis. Erstere ist eine extrem seltene Sonderform der chronischen Schilddrüsenentzündung. Die Pathogenese ist nicht geklärt, aber neuerdings wird eine autoimmune Genese des Fibrosierungsprozesses diskutiert. Die Tatsache, dass mehr als 50 % der Betroffenen Antikörper gegen Schilddrüsenstrukturen bilden, legt eine solche Vermutung nahe. Beim Riedel-Struma (eisenharte Struma) kommt es zu einer Fibrosierung der Schilddrüse und ihrer Umgebung, das heißt, es wird sehr hartes, chronisch entzündetes Bindegewebe eingelagert. Dabei wird das Schilddrüsenparenchym zerstört. Die Schilddrüse ist dann gegen ihre Umgebung nicht mehr verschieblich und wird eisenhart. Manchmal kommt es zusätzlich zu Fibrosierungen in anderen Körperregionen. Differentialdiagnostisch muss es immer von Neoplasien der Schilddrüse abgegrenzt werden.

Die **Hashimoto-Thyreoiditis** ist eine autoimmun verursachte Schilddrüsenentzündung. Sie wird auch als chronisch lymphozytäre Thyreoiditis oder autoimmune Thyreoiditis bezeichnet. Die Bezeichnung Autoimmunthyreopathie schließt neben der Hashimoto-Thyreoiditis auch den Morbus Basedow mit ein. Deshalb werden Morbus Basedow und die Hashimoto-Thyreoiditis im Abschnitt 2.4.4 gemeinsam erläutert.

2.4.3. Funktionsstörungen

2.4.3.1. Hypothyreose

Eine Hypothyreose ist eine Unterversorgung des Körpers mit Schilddrüsenhormonen. Der Verdacht entsteht bei erhöhtem TSH Wert und erniedrigter Konzentration des freien Thyroxins. Da durch vermehrte Stimulation der Schilddrüse bis zu einem gewissen Grad der Schädigung die periphere Hormonkonzentration konstant gehalten werden kann, handelt es sich meist um einen fließenden Übergang von normaler Schilddrüsenfunktion, über die subklinische Hypothyreose⁸ zur manifesten Hypothyreose⁹.

Die Formen der Hypothyreose sind die primäre, die sekundäre und die tertiäre Hypothyreose. Von einer primären Hypothyreose spricht man bei fehlender oder mangelhafter Produktion von Schilddrüsenhormonen durch Fehlfunktion der Schilddrüse. Man unterscheidet hier noch zwischen angeborenen Ursachen¹⁰ und erworbenen Ursachen. Zu den

⁸TSH ist erhöht, fT4 ist normal

⁹TSH ist erhöht, fT4 ist erniedrigt

¹⁰z.B.: Aplasie, Dysplasie, Jodfehlverwertung, periphere Schilddrüsenhormonresistenz oder intrauterin erworbene Hypothyreosen durch Jodexzess, Jodmangel, Aufnahme von strumigen Substanzen, Au-

erworbenen Ursachen gehören die iatrogenen Ursachen sowie die Krankheitsbilder, die durch extremen Jodmangel oder Jodexzess, entzündliche oder neoplastische Veränderungen der Schilddrüse hervorgerufen werden (siehe dazu auch Kap. 2.4.1.1, Kap. 2.4.2, Kap. 2.4.1.2). Häufigste Ursache von erworbenen Schilddrüsenunterfunktionen ist die Autoimmunthyreoditis der Schilddrüse. Dabei bildet der Körper Antikörper gegen das eigene Schilddrüsengewebe. Das Schilddrüsengewebe wird zerstört und kann nicht mehr genügend Schilddrüsenhormone produzieren (Hashimoto-Thyreoiditis, siehe Kap.2.4.4.2).

Die sekundäre Hypothyreose ist bedingt durch die fehlende zentrale Stimulation durch die Hypophyse, z.B. durch Zerstörung der Hypophyse durch einen Tumor, Einblutungen, Granulome oder andere raumfordernde Prozesse.

Die noch seltenere sogenannte tertiäre Hypothyreose bezeichnet den Ausfall der TRH-Bildung durch den Hypothalamus.

Die Hypothyreose betrifft zwei % der Frauen und 0,1 % der Männer. Meist wird eine Schilddrüsenunterfunktion zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr entdeckt. Eins von 3000 bis 4000 Neugeborenen kommt mit einer Schilddrüsenunterfunktion zur Welt, wobei Mädchen doppelt so häufig betroffen sind wie Jungen.

Die Stärke mit der sich die durch die Hypothyreose verursachten Beschwerden äußern, hängt vom Schweregrad, der Dauer des Hormonmangels, vom Alter bei Krankheitsbeginn und von Begleiterkrankungen ab. Nicht jeder Patient muss alle Symptome entwickeln.

Leitsymptome sind:

- Gewichtszunahme
- Trockene und kühle Haut, frieren
- Haarausfall
- Herzvergrößerung und Verlangsamung des Herzschlags (Bradykardie)
- Früharteriosklerose in Folge von erhöhten Cholesterinwerten
- Durchblutungsstörungen, taube Fingerspitzen
- Myopathien
- Desinteresse, Konzentrationsschwäche
- Kopfschmerzen
- Impotenz, Zyklusstörungen bei Frauen, Verlust der Libido

toimmunerkrankungen der Mutter

- Myxödem
- Rheumatische Beschwerden
- Atembeschwerden
- Verstopfung, Darmverschluss
- Heisere und tiefe Stimme

Schilddrüsenhormone beeinflussen alle Stoffwechselfvorgänge des Körpers und die Symptome sind deshalb sehr unspezifisch (siehe dazu Kap. 2.3.3). Besonders bei älteren Menschen ist Leistungsschwäche oft das einzige Symptom. Die Schilddrüsenunterfunktion wird aus diesem Grund oft verkannt und leicht mit allgemeinen altersbedingten Veränderungen verwechselt.

Eine besondere Verlaufsform ist die angeborene Hypothyreose, auch **Neugeborenen-Hypothyreose** genannt. Sie führt unbehandelt zu schweren geistigen und körperlichen Entwicklungsstörungen, dem Kretinismus. Deshalb werden alle Neugeborenen an ihrem fünften Lebenstag anhand einer Blutprobe (Fersenblutstropfen auf Filterpapier) auf das Vorliegen einer Hypothyreose (Hypothyreose-Screening) untersucht [28]. Bei Neugeborenen kann der Grund eine nicht angelegte oder eine unzureichend große Schilddrüse sein. Auch eine übermäßige Jodzufuhr kann eine Hypothyreose verursachen. Weitere Ursachen für eine Hypothyreose sind ein Jodmangel der Mutter in der Schwangerschaft, die Einnahme von schilddrüsenhemmenden Medikamenten oder immunologische Ursachen, wenn im Rahmen einer Immuntthyreopathie die Antikörper der Mutter gegen die Schilddrüse diaplazentar auf das Kind übergehen. Aus diesem Grund sollte bei angeborener Hypothyreose sowohl bei der Mutter als auch bei dem Kind eine Bestimmung von Schilddrüsenantikörpern vorgenommen werden. Die Symptome einer angeborenen Hypothyreose sind ähnlich den oben beschriebenen Symptomen für den betroffenen Erwachsenen. Zusätzliche Anzeichen beim Neugeborenen sind:

- verspäteter Geburtstermin
- hohes Geburtsgewicht
- Trinkunlust, Erbrechen und Verstopfung
- verlangsamter Puls
- schlaffe Muskulatur und Bewegungsunlust
- trockene und teigige Haut
- ausdruckslose Mimik

Eine weitere Form der Hypothyreose ist die so genannte **periphere Hormonresistenz**. Dies bedeutet, dass der Körper, oder auch nur ein einzelnes Organ, gegen Schild-

drüsenhormone unempfindlich ist, und sie nicht verwerten kann. Ursache ist eine Mutation der hormonbindenden Domäne des T3-Rezeptor-b-Gens. Es entsteht das sehr seltene Bild einer Hypothyreose, ohne dass ein Mangel an Schilddrüsenhormonen festzustellen ist.

Von einer **peripheren Hypothyreose** spricht man bei Hormonverlust infolge einer Nephropathie oder exsudativen Enteropathie. In diesen Fällen steht aber meist die Grunderkrankung im Vordergrund.

Das **hypothyreote Koma** ist ein seltener Endzustand einer lange bestehenden schweren Hypothyreose. Es handelt sich um eine lebensbedrohliche Erkrankung, die durch Hypothermie (30°C), Bradypnoe, Bradykardie, Hypotonie, verlängerte Reflexzeiten, Bewusstseinsstörungen und Krämpfe gekennzeichnet ist. Auch wenn die Pathogenese der Erkrankung noch nicht abschließend geklärt ist, sind Stress, Herzinsuffizienz, Kälteschocks und Narkosen häufige Auslöser dieser Stoffwechselkrise. Es besteht ein fließender Übergang zwischen schwerer Hypothyreose und hypothyreotem Koma. Auch ohne Bewusstseinsstörung kommt es bei schwerer Hypothyreose in über 50 % zu Todesfällen.

2.4.3.2. Hyperthyreose

Eine Hyperthyreose ist eine Überfunktion der Schilddrüse mit Überangebot an Schilddrüsenhormonen, das zu zahlreichen Krankheitserscheinungen des gesamten Körpers bis hin zur lebensgefährlichen thyreotoxischen Krise führt.

Fast immer liegt der Hyperthyreose eine Erkrankung der Schilddrüse selbst zugrunde, die mit einer gesteigerten Produktion und Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen einhergeht. Die Schilddrüsenüberfunktion wird in den meisten Fällen entweder durch die Basedow-Krankheit oder eine Schilddrüsenautonomie hervorgerufen.

Der **Morbus Basedow** ist eine Autoimmunerkrankung. Durch eine Fehlregulation des Immunsystems kommt es zur Produktion von Antikörpern, die eine ähnliche Struktur haben wie der physiologische Schilddrüsenaktivator TSH und so an den TSH-Rezeptor binden. Durch die ständige Stimulation der Hormonproduktion kommt es zur Schilddrüsenüberfunktion. Der Morbus Basedow wird in Kap. 2.4.4.3 ausführlich besprochen.

Bei der sogenannten **Schilddrüsenautonomie** handelt es sich um ein Krankheitsbild, bei dem Schilddrüsengewebe, das dem körpereigenen Regelkreis zur Aufrechterhaltung eines gleichbleibenden Schilddrüsenhormonspiegels nicht mehr unterliegt, ungebremst Schilddrüsenhormone produziert. Auch in einer gesunden Schilddrüse finden sich einzel-

ne autonome Follikel, die für die Basisproduktion an Schilddrüsenhormon verantwortlich sind. Einen Krankheitswert gewinnt die funktionelle Autonomie dann, wenn die autonomen Zellen so zahlreich sind, dass sie in der Lage sind, einen Überschuss an Schilddrüsenhormon zu produzieren. Ursächlich ist meist ein Jodmangel vorhanden, der dann die Proliferation von Schilddrüsenzellen stimuliert. Bei dieser Proliferation kommt es zudem zum Auftreten somatischer Genmutationen, die sich in diesem Fall häufig in einer Mutation des TSH-Rezeptors äußern. Der mutierte TSH-Rezeptor, der auch in Abwesenheit von TSH die Signaltransduktion einleitet, bildet, durch seine ständige Aktivität einen Wachstumsreiz, der schließlich zur Bildung autonomer Tochterfollikel führt.

Autonomes Schilddrüsengewebe kann einen Knoten in der Schilddrüse (autonomes Adenom) oder mehrere Knoten bilden (multifokale Adenome) oder fein über die gesamte Schilddrüse verteilt sein, dann spricht man von disseminierter Autonomie. Zur Hyperthyreose kommt es zunächst nicht, da die Knappheit des Bausteins Jod die Hormonproduktion begrenzt. Sobald sich jedoch die Jodversorgung verbessert, kann akut eine thyreotoxische Krise auftreten.

Außer dem Morbus Basedow und der funktionellen Autonomie der Schilddrüse gibt es noch andere allerdings weniger häufige Ursachen einer Hyperthyreose.

Seltene Ursachen der Hyperthyreose:

- hormonproduzierende Schilddrüsenneoplasien (Adenom, Karzinom)
- sehr seltene schilddrüsenhormonproduzierende Tumore außerhalb der Schilddrüse (z.B. Ovarialtumore)
- hormonproduzierende Tumore der Hypophyse, die unter anderem das Thyreoidea-stimulierende Hormon im Überschuss produzieren z.B. Hypophysenadenom (extrem selten)
- Entzündungen der Schilddrüse, wie z.B. die Thyreoiditis de Quervain oder die Hashimoto-Thyreoiditis (Hyperthyreose im Anfangsstadium durch Freisetzung gespeicherter Schilddrüsenhormone, später durch Gewebszerstörung oft Hypothyreose)
- Hypothyreosis factitia (bei Überdosierung von Schilddrüsenhormonen T3 und T4)
- periphere Überempfindlichkeit gegenüber Schilddrüsenhormonen
- Schwangerschaftshyperthyreose
- Mutation des TSH-Rezeptors (Vererbte Veränderung, nicht autoimmun-bedingt) und

- hypophysäre Hormonresistenz

Unabhängig von der Ursache führt der Überschuss an Schilddrüsenhormonen zur Beeinflussung aller Stoffwechselfvorgänge des Körpers. Typische Symptome der Hyperthyreose sind Gewichtsabnahme trotz Appetitsteigerung, da die Körperzellen mehr Energie verbrennen. Eine erhöhte Körpertemperatur führt zu Schweißausbrüchen und Wärmetoleranz. Eine Schilddrüsenüberfunktion führt zu gesteigerter körperlicher Aktivität, zu Unruhegefühl, Nervosität, Reizbarkeit, Schlaflosigkeit trotz schnellerer Ermüdung, Stimmungsschwankungen bis hin zu Depressionen. Die Schilddrüse ist häufig jedoch nicht immer zum Kropf vergrößert. Die Darmtätigkeit ist beschleunigt, es kommt zu häufigeren Stuhlentleerungen bis hin zu massiven Durchfällen. Es kann zu Untergang von Lebergewebe kommen. Die Haare fallen aus, auch der Stoffwechsel von Knochen ist beschleunigt, es kann eine Osteoporose entstehen. Es kommt zur Muskelschwäche und Muskelabbau. Die Schilddrüsenhormone machen den Körper gegenüber den Stresshormonen Adrenalin und Noradrenalin empfindlicher. Durch die potenzierten Wirkungen der Stresshormone ergibt sich vor allem eine gesteigerte Herzaktivität. Eine erhöhte Blutdruckamplitude, ein beschleunigter Puls, Herzklopfen, Bluthochdruck, Herzvergrößerung und Herzrhythmusstörungen können auftreten. War das Herz schon vorgeschädigt, kann es sich bis zum Herzinfarkt steigern. Insbesondere bei älteren Menschen sind die Symptome oft untypisch. Statt gesteigerter Aktivität tritt häufig Apathie mit Gewichtsverlust, Kräfteverfall gemeinsam mit Herzproblemen auf.

Bei stark erhöhten Schilddrüsenwerten kann es zur **thyreotoxischen Krise** kommen. Diese kann plötzlich einsetzen, wenn eine abrupte Belastung des Organismus hinzukommt oder, im Falle der funktionellen Autonomie, eine Jodgabe stoßartig stattfindet.

Die thyreotoxische Krise ist ein lebensbedrohlicher Zustand, der mit den folgenden Symptomen einhergeht:

- Angst und Bewusstseinsverlust bis hin zum Koma
- Muskelschwäche
- Erbrechen und Durchfall
- Fieber bis 41° C mit starkem Schwitzen und rascher Austrocknung des Körpers
- hochgradiger Beschleunigung des Herzschlags
- gefährlichen Herzrhythmusstörungen
- Kreislaufversagen

2.4.4. Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen

Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen betreffen 3% der Weltbevölkerung. Die Gruppe der Betroffenen gliedert sich in zwei Hauptgruppen, die unter Hyperthyreose leidenden Morbus Basedow Patienten einerseits, und die Gruppe der Hashimoto-Thyreoiditis Patienten mit Hypothyreose andererseits. In beiden Fällen kommt es zu einem Zusammenbruch der immunologischen Toleranz und zur Entstehung von IgG-Antikörpern. Die Antikörper richten sich im einzelnen gegen den TSH-Rezeptor (Morbus Basedow), gegen Thyroglobulin (Hashimoto-Thyreoiditis) und gegen die TPO. Antikörper gegen die TPO werden in 90% der Fälle bei Morbus Basedow Patienten nachgewiesen und kommen bei 75% der Hashimoto-Thyreoiditiden vor. Aus diesem Grund ist der Nachweis von TPO-Antikörpern als Hinweis auf die ätiologische Diagnose von autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen zu werten.

2.4.4.1. Autoimmunität

Grundlage eines funktionierenden Immunsystems ist die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Stoffen. Das Ausbleiben der Immunantwort gegenüber körpereigenen Zellen nennt man Immunologische Toleranz¹¹.

Die Störung dieser Erkennungsmechanismen kann zu Autoaggressionsreaktionen führen. Manifestieren sich solche Reaktionen, bei denen das Immunsystem des Körpers gegen eigene Zellen vorgeht, spricht man von Autoimmunität bzw. Autoimmunerkrankungen. Die Pathogenese ist zwar im einzelnen noch nicht bekannt, jedoch weiß man einiges über die Erkennungsmechanismen, deren Versagen als Ursache einer jeden Autoimmunkrankheit anzusehen ist.

Das Immunsystem lässt sich in zwei große Gruppen einteilen: die humorale und die zellvermittelte Immunität. Zur ersteren gehören die Antikörper¹² und die sie produzierenden B-Lymphozyten, die andere Gruppe bilden die T-Lymphozyten und die durch sie stimulierten Makrophagen. Die humorale Abwehr bekämpft vorwiegend extrazelluläre Antigene¹³ und die zelluläre Abwehr kommt vermehrt bei intrazellulären Antigenen zum

¹¹Immunologischer Toleranz wird durch klonale Deletion von Lymphozyten durch ubiquitäre Selbst-Antigene oder deren Inaktivierung durch gewebespezifische Antigene in Abwesenheit von Costimulation erreicht.

¹²Antikörper sind Immunglobuline, die von den B-Lymphozyten gebildet werden. Die Immunglobuline sind aus zwei jeweils für die Gruppe charakteristischen schweren Proteinketten, und aus zwei leichten Proteinketten aufgebaut, die miteinander in typischer Y-Form verknüpft sind. Daraus ergeben sich dann, je nach Zahl und Anordnung, die Gruppen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Funktionell sind sie in der Lage, vereinfacht ausgedrückt, an die Fremdkörper (Antigene) anzudocken und diese zunächst zu neutralisieren, indem sie z.B. die Bindung von Viren oder Toxinen unmöglich machen und im Anschluss gegebenenfalls zu zerstören.

¹³Als Antigen wird jede Substanz bzw. jedes Merkmal auf Oberflächen bezeichnet, das eine Bildung

Einsatz.

Der reguläre Ablauf einer Immunreaktion, deren Ziel es ist, eingedrungene Antigene zu eliminieren, läuft in drei Phasen ab. Die erste Phase nennt man die Erkennungsphase. In dieser Phase wird der eingedrungene Fremdkörper zum einen von Antikörpern auf den B-Lymphozyten, und zum anderen von T-Lymphozyten erkannt. Damit T-Lymphozyten das Antigen erkennen, muss es von einer Antigen-präsentierenden-Zelle (APC) auf einem MHC Klasse II-Molekül präsentiert werden. Zusätzlich zu der Erkennung des MHC II-Peptidkomplexes muss noch ein zweites sogenanntes costimulierendes Signal von der APC ausgesandt werden, um eine Aktivierung der T-Zelle zu erreichen. Während der Aktivierungsphase werden spezifisch die Lymphozyten vermehrt, die das Antigen erkennen können. Außerdem machen die Lymphozyten eine Differenzierung zur sogenannten Effektorzellen durch. Für die B-Zellen bedeutet das, dass sie, wenn sie über den passenden Antikörper verfügen, beginnen denselben zu produzieren.

T-Lymphozyten lassen sich in zwei Klassen einteilen: CD4 - und CD 8 -Zellen. CD4 -Zellen proliferieren zu T-Helferzellen Typ 1 (TH1) und Typ 2 (TH2) und aus den CD8-Zellen werden die Cytotoxischen-T-Zellen. In der Effektorphase sezernieren die Cytotoxischen-T-Zellen ihre Cytotoxine, die in der Zielzelle eine Apoptose herbeiführen. Während die TH1 -Zellen für eine Aktivierung der Makrophagen sorgen und die TH2-Zellen die B-Lymphozyten stimulieren. Die von den B-Zellen produzierten Antikörper erhöhen die Phagozytosefähigkeit der neutrophilen Granulozyten, oder sie führen zur Aktivierung des Komplementsystems. Dies führt schließlich über eine Kaskadenreaktion zur Zerstörung der Fremdsubstanz. Auch eine Degranulation von Mastzellen, was zu einer Freisetzung von Mediatoren führt, die eine akute Entzündung provozieren können, wird durch Antikörper hervorgerufen.

Die spezifische Immunantwort steht also nicht für sich alleine, sondern sie amplifiziert die Mechanismen der natürlichen Immunität (z.B. Phagozytose) und ist damit extrem wirksam.

Sie ist aber auch sehr zerstörerisch wenn sie sich gegen körpereigene Zellen richtet. Paul Ehrlich hat Anfang des 20. Jahrhunderts diese Tatsache mit dem Begriff „horror antitoxicus“ bezeichnet.

In der Regel richtet sich das Immunsystem ausschließlich gegen Fremdartige und nicht gegen körpereigene Zellen. Diese Gegebenheit verdanken wir der oben bereits erwähnten immunologischen Toleranz. Diese Toleranz wird erreicht durch Selektionsvor-

von Antikörpern hervorruft.

gänge, die potentiell autoreaktive Lymphozyten eliminieren. Während ihrer normalen Reifung durchlaufen Lymphozyten ein Stadium, in dem sie, wenn sie Eigenantigene erkennen, abgetötet (klonale Deletion) oder inaktiviert (Anergie)¹⁴ werden. Durch diese Auswahl erreicht man zentrale Toleranz. Auch später können bereits reife Lymphozyten, die ein passendes Antigen finden, bei dem aber keine Costimulation stattfindet, anergisch werden (periphere Toleranz). Außerdem kennt man den Zustand der immunologischen Ignoranz, bei der B- und T-Zelle gemeinsam mit ihrem Antigen vorkommen, ohne zu interagieren.

Autoimmunität entsteht als Folge verschiedener Faktoren die einen Zusammenbruch der Autotoleranz verursachen [1]. Solche Faktoren sind:

- genetische Dispositionen insbesondere im Zusammenhang mit den MHC-Genen
- Störungen der Lymphozytenselektion
- Mechanismen zur Überwindung der peripheren Toleranz wie die polyklonale Lymphozytenaktivierung (Aktivierung von stillen autoreaktiven Lymphozyten durch starke Zellaktivatoren)
- Immunologischen Kreuzreaktionen zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen,
- Störungen der Lymphozytenregulation
- Infektionen und Gewebeschädigungen

2.4.4.2. Hashimoto-Thyreoiditis

Die Hashimoto-Thyreoiditis ist eine chronische, autoimmunbedingte Entzündung der Schilddrüse. Sie ist nicht nur die häufigste Entzündungsart der Schilddrüse und der Hauptverursacher einer Hypothyreose, sondern sie ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen und kann auch gemeinsam mit anderen Autoimmunerkrankungen (Typ I-Diabetes mellitus, Nebennierenrindeninsuffizienz, Myasthenia gravis etc.) auftreten. Betroffen sind alle Altersgruppen jedoch bevorzugt Frauen im mittleren Alter [75].

Es werden zwei Formen der Krankheitsausprägung unterschieden [25]: die atrophische Form, bei der die Schilddrüse immer kleiner wird, durch die fortschreitende entzündliche Zerstörung von Schilddrüsengewebe, und die hypertrophe Form, bei der es zu einer Größenzunahme der Schilddrüse (Struma) kommt, die mit einer Hypothyreose einhergeht.

¹⁴Anergie ist ein Zustand fehlender Reaktivität auf Antigene. B- und T-Zellen sind anergisch wenn sie selbst bei optimaler Stimulation nicht auf ihr Antigen reagieren.[36]

Als Ursachen der Autoimmuninfektion werden eine genetische Prädisposition, Umweltfaktoren wie Jodid und Virusexposition sowie Dysregulationen im zellulären Immunsystem diskutiert. Genetisch findet sich eine familiäre Häufung, bei der die Gewebemarker HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5 und HLA-B8 auftreten. Allerdings kann das nicht allein für das Entstehen der Autoimmunität verantwortlich gemacht werden, weil er nur bei 50% der Patienten stimmig ist. Also muss man von einer Kombination der oben genannten Faktoren und einer genetischen Prädisposition ausgehen. Bisher konnte keine Virusinfektion mit direktem Zusammenhang zur Immunthyreopathie gefunden werden. Aber man diskutiert die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern, die mit den Epitopen, der ehemals durch den Virus angegriffenen Zelle, übereinstimmen und so eine Autoimmunreaktion provozieren.

An der Pathogenese der Hashimoto-Thyreoiditis sind sowohl zelluläre als auch humorale Mechanismen des Immunsystems beteiligt. Durch einen Defekt der T-Suppressorzellen, kommt es zur unkontrollierten Vermehrung der T-Helferzellen, die ihrerseits die Bildung von Antikörpern durch die B-Zellen forcieren. Die komplementfixierenden Antikörper führen dann zu einer Apoptose der Schilddrüsenzellen. Außerdem gibt es Hinweise, dass infiltrierende Lymphozyten über den fas-Rezeptor eine Apoptose der Schilddrüsenzellen direkt vermitteln.

Charakteristisch für die Hashimoto-Thyreoiditis ist der Nachweis hoher Antikörpertiter. TPO-Antikörper stellen die größte Fraktion dar, sie sind in 80-90% der Fälle nachweisbar. Tg-Antikörper treten in 70-80% auf und TSH-Rezeptor-Antikörper sind mit 10-20% seltener nachzuweisen. Ungeklärt ist die Rolle der Antikörper. Es wird diskutiert ob die nachgewiesenen Antikörper aktiv an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt sind oder ob sie nur ein begleitendes Immunphänomen bilden. Es ist bisher strittig, ob die TPO- Antikörper in der Lage sind, das Enzym TPO zu blockieren und ob sie damit zur Entstehung der Hypothyreose beitragen, oder ob sie lediglich als eine Folge des intrathyreoidalen Immunprozesses anfallen.

Der Verlauf der Hashimoto-Thyreoiditis beginnt meist mit einer destruierenden Entzündung. Diese geht histologisch mit einer zunehmenden fokalen oder diffusen lymphozytären und plasmazellulären Infiltration der Schilddrüse einher. Unter Ausbildung von Lymphfollikeln und gemeinsam mit den Schilddrüsenbindegewebszellen wuchern diese, und vermehren so den Bindegewebsanteil auf Kosten des funktionellen Schilddrüsengewebes. Diese Proliferation ist typisch für eine chronische Entzündung. Wird das organspezifische Gewebe dabei durch Bindegewebe ersetzt, nimmt natürlich auch ab einem gewissen Grad die Hormonproduktion ab. Ist eine kritische Schwelle erst einmal unterschritten, sind die Funktionseinbußen meistens auch nicht wieder gutzumachen und

es entsteht eine bleibende Hypothyreose. Anfänglich ist allerdings mit einer passageren Hyperthyreoten-Phase (Hashitoxikose) zu rechnen, die durch die Freisetzung der präformierten Hormone aus den, durch den Entzündungsprozess zerstörten Zellen, zustande kommt.

2.4.4.3. Morbus Basedow

Erstmals beschrieben und benannt wurde die Erkrankung durch den Merseburger Arzt von Basedow um 1840. Er fasste die Symptome Struma, Tachykardie und Exophthalmus zum sogenannten Merseburger Trias zusammen.

Der Morbus Basedow ist eine Krankheit, die sich aus drei Hauptmerkmalen zusammensetzt: diffuse Struma, Ophthalmopathie und Dermatopathie. Häufig tritt aber nur eine der drei Ausprägungen auf. Die relativ häufige Erkrankung tritt in jedem Alter auf, jedoch bevorzugt bei Frauen im mittleren Alter.

Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung deren Pathogenese noch nicht abschließend geklärt ist. Ähnlich wie bei der Hashimoto-Thyreoiditis werden auch die verschiedensten Erklärungsansätze diskutiert. Neben einer genetischen Prädisposition (erhöhte Häufigkeit bei den Haplotypen HLA-B8) und folglich familiärer Häufung besteht auch ein vermehrt gemeinsames Auftreten mit anderen Autoimmunerkrankungen. Als ursächlich nimmt man heute eine genetisch determinierte Störung der immunologischen Kontrolle an. Dafür sprechen die lymphozytäre Infiltration, die gesteigerte Aktivität des lymphatischen Systems, der Nachweis von Autoantikörpern und auch eine gewisse Überschneidung mit dem Krankheitsbild der Hashimoto-Thyreoiditis. Es handelt sich vermutlich um eine verwandte komplexe multifaktorielle Pathogenese, bei der sowohl die genetische Prädisposition als auch Umwelteinflüsse als auslösende Noxen eine Rolle spielen (siehe auch Kap. 2.4.4.2).

Im Unterschied zur Hashimoto-Thyreoiditis sind in diesem Fall jedoch die Antikörper gegen den TSH-Rezeptor gerichtet. Sie führen zu einer Dauerstimulation des TSH-Rezeptors, die der negativen Rückkopplung nicht mehr unterliegt. Auch ihre Wirkdauer am Rezeptor ist gegenüber der von TSH verlängert. Deshalb hat man die Antikörper in diesem Fall auch als long-acting thyreoid stimulator (LATS) bezeichnet. LATS bewirken sowohl eine Hyperplasie der Schilddrüse als auch eine Stimulation der Zellteilung. Es gibt auch TSH-Bindung hemmende Antikörper (TSH-Binding inhibitory Immunoglobulins, TSBI), deren Auftreten die Kombination von Morbus Basedow mit hypothyreoter- oder euthyreoter- Stoffwechsellage erklären. Untersuchungen [47] zu Folge binden die hemmenden Antikörper am N-terminalen Ende des TSH Rezeptors, während die vor-

mals genannten stimulierenden Antikörper, am C-terminalen Ende binden. Daraus folgt, dass je nach Konzentration bzw. Interaktionsregion der Subpopulation an TSH-R-AK die funktionelle Aktivität des TSH-Rezeptors moduliert wird. Die Dauerstimulation durch die weit häufigeren stimulierenden Antikörper führt zur Hyperthyreose, deren klinische Symptome im Abschnitt Hyperthyreose bereits genannt wurden (siehe Kap. 2.4.3.2).

Das Krankheitsbild des Morbus Basedow ist nicht alleine durch die Hyperthyreose gekennzeichnet. Zu den assoziierten Erkrankungen zählt auch die **endokrine Orbitopathie** unter der 60 % der Patienten mit Morbus Basedow leiden [30]. Auslösend ist eine Änderung der Antigenität des Retrobulbärgewebes, wobei eine Beteiligung eines TSH-R-Ak nicht ausgeschlossen werden kann. Die endokrine Orbitopathie führt zu einer einseitigen oder beidseitigen Protusio bulbi, die durch die entzündlichen Schwellung der retrobulbären Strukturen zustande kommt. Begleitet wird dies von Exophtalmus, fehlender Oberlidsenkung bei Blicksenkung, Lidretraktion, Konvergenzschwäche, über der Hornhaut sichtbaren Sklerenstreifen, seltenem Lidschlag in fortgeschrittenem Stadium auch Sehnervkompressionen und Augenmuskelerkrankungen.

Eine weitere assoziierte Erkrankung des Morbus Basedow ist die **Dermopathie**. Sie ist durch eine Verdickung der Dermis gekennzeichnet, die mit Lymphozyten infiltriert ist. Meist tritt sie an der Dorsalseite von Beinen oder Füßen auf. Die erhabene Läsion, die das Aussehen von Orangenhaut hat, gelegentlich mit Juckreiz verbunden ist und hyperpigmentiert sein kann, wird auch als lokalisiertes Myxödem bezeichnet. Eine Keulenbildung von Fingern oder Zehen kann mit den Hautveränderungen einhergehen.

2.5. Diagnose der Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse - Labordiagnostik

Auch bei den Schilddrüsenerkrankungen empfiehlt es sich, zunächst eine gründliche Anamnese durchzuführen. Diese sollte sowohl familiäre Häufungen von Autoimmunerkrankungen und Schilddrüsenerkrankungen erfassen, als auch auf persönlich beobachtete Veränderungen am Patienten eingehen sowie eine Medikamentenanamnese umfassen. Die durch die körperliche Untersuchung des Patienten erhobenen Befunde geben die Richtung und Reihenfolge der weiteren Untersuchungen vor. Nur eingebettet in den klinischen Gesamtkontext ist eine aussagekräftige Bewertung der weiterführenden Diagnostik insgesamt möglich. Das gilt auch für alle im folgenden beschriebenen labordiagnostischen Bestimmungen.

2.5.1. TSH-Bestimmung

Der basale TSH-Wert ist der empfindlichste und sicherste Einzelparameter zur Erfassung der Schilddrüsenfunktion [81]. Der TSH-Wert ändert sich schon bei leichtem Überschuss oder Mangel an Schilddrüsenhormonen. Eine Indikation zu dessen Bestimmung liegt vor, wenn es darum geht eine Euthyreose, bzw. eine Schilddrüsenfunktionsstörung nachzuweisen [17]. Angewandt wird er auch routinemäßig beim Neugeborenencreening. Untersuchungsmaterial ist Serum bzw. für das Neugeborenencreening ein Blutstropfen, da hier eine entsprechende Filterpapiermethode bereits evaluiert wurde [28].

TSH-Normbereich	0,4-4 mU/l	Euthyreose
TSH erhöht	4 mU/l	Hypothyreose
TSH erniedrigt	0,1 mU/l	Hyperthyreose

Tabelle 2.2.: Referenzwerte TSH

Bei dem Bestimmungsverfahren handelt es sich um immunometrische Verfahren mit zwei monoklonalen Antikörpern. Möglich sind Enzymimmunoassays, Fluoreszenzimmunoassays, Lumineszenzimmunoassays und Radioimmunoassays. Mit Hilfe der Testsysteme ist eine sichere Trennung von hypo- und hyperthyreoten Patienten möglich. Die Überschneidungen liegen unter 1 %. Interpretationsschwierigkeiten ergeben sich dennoch z.B. bei Schilddrüsenkrankheiten ohne Funktionsstörungen, kleinen, fokalen Autonomien, bei der extrem seltenen sekundären Hypothyreose, bei Schilddrüsenhormonresistenz, bei schweren Allgemeinerkrankungen oder durch Einnahme von Medikamenten mit Einfluss auf die Schilddrüsenfunktion.

2.5.2. TRH-Bestimmung

Der TRH-Test hat seit Einführung sensiblerer TSH-Tests an Bedeutung verloren. Früher wurde er häufig angewandt um normale TSH-Werte von erniedrigten zu unterscheiden. Eine TSH-Suppression bei Hyperthyreose konnte nur durch die fehlende Stimulierbarkeit der TSH-Sekretion im TRH-Test nachgewiesen werden. Heute konzentriert sich der Einsatz der intravenösen, nasalen oder selten auch oralen TRH-Gabe auf spezielle Krankheitsbilder, beispielsweise Erkrankungen des Hypothalamus oder der Hypophyse. Auch bei grenzwertigen Ergebnissen im TSH-Test kann er zur Differenzierung eingesetzt werden. Zur Durchführung wird zunächst der basale TSH-Wert (TSH1) im Serum bestimmt, dann wird TRH in einer je nach Applikationsart differierenden Menge verabreicht und nach einer festgelegten Zeitspanne wird die Menge an TSH (TSH2) im Serum erneut gemessen.

TSH1-TSH2	< 2,5 mU/l	TRH negativ, Hyperthyreose
TSH1-TSH2	> 2,5 mU/l	TRH positiv, euthyreot
TSH1-TSH2	> 25 mU/l	Hypothyreose

Tabelle 2.3.: Referenzwerte TRH

Subklinische Erkrankungen werden durch den TRH-Test nicht erfasst. Störeinflüsse z. B. Steroidmedikation oder eine schwere Allgemeinerkrankung verfälschen das Testergebnis.

2.5.3. Bestimmung von Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3)

Besteht ein klinischer Verdacht oder/und sind die TSH-Werte erhöht, dann sollten die freien (ohne Proteinbindung) Schilddrüsenhormone bestimmt werden. Auch zur Kontrolle während der Behandlung einer Schilddrüsenfunktionsstörung ist die Bestimmung der freien Schilddrüsenhormone angezeigt. Die Konzentration der freien Schilddrüsenhormone ist im Vergleich zu der Gesamtkonzentration an T3 und T4 sehr gering, da aber nur dieser nicht gebundene Anteil an die Rezeptoren des Zielgewebes bindet, stellen die freien Schilddrüsenhormone die Schilddrüsenfunktion gut dar.

Die Gesamtkonzentration an T3 und T4 sollte, da sie mit zahlreichen Veränderungen der Eiweißbindung (insbesondere während Gravidität und Einnahme der „Antibabypille“) schwankt, nicht zur Diagnostik herangezogen werden.

Von der Proteinbindung unabhängig, dafür allerdings methodisch auch störanfälliger, ist die Bestimmung der freien Schilddrüsenhormone FT3 und FT4. Ihre direkte Messung, bei der tatsächlich das freie Hormon durch Ultrazentrifugation abgetrennt wird, ist extrem aufwendig und wird daher nur zur Bestimmung von Referenzwerten benutzt.

In der Routinediagnostik bedient man sich der methodisch wesentlich simpleren indirekten Bestimmung. Dabei unterscheidet man sogenannte 1-Schrittverfahren¹⁵ von 2-Schrittverfahren¹⁶.

Außerdem gibt es noch die Index-Methode bei der die Gesamthormonmenge also T3 oder T4 bestimmt wird und durch einen Parameter zur Abschätzung der Eiweißbindung in ein Verhältnis gesetzt wird. Bei diesem Parameter handelt es sich wahlweise um das

¹⁵Dabei ist der Komplex aus markiertem Antikörper und freiem Hormon direkt messbar.

¹⁶Hier wird das freie Hormon zunächst an einen festen Träger gebunden und dann in einem zweiten Schritt durch einen markierten Antikörper nachgewiesen.

thyroxinbindende Globulin (TBG) oder die freie Bindungskapazität (TBK).

Bei Kindern liegen höhere, im senium niedrigere Hormonspiegel vor, deshalb müssen altersabhängige Referenzbereiche etabliert werden. Fehlbestimmungen freier Schilddrüsenhormone sind in folgenden Situationen möglich [17]:

1. Bestimmte Medikamente (z.B. Heparin, Barbiturate, Azetylsalizylsäure usw.)
2. Schwerkranke Patienten mit NTI-Syndrom
3. Schilddrüsenhormonantikörper
4. angeborene Anomalien der Schilddrüsenhormonbindungsproteine (bei Index- Methoden!)

2.5.4. Thyreoglobulin (Tg) Bestimmung

Tg weist man im Zuge von Verlaufskontrollen bei einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom nach, um post operativ festzustellen, ob das Tumorgewebe restlos entfernt wurde und/oder ob Metastasen vorhanden sind (Tumormarker). Bei Neugeborenen mit Hypothyreose testet man auf Tg um festzustellen, ob überhaupt eine Schilddrüse angelegt ist.

Bei extrem hoher Schilddrüsenhormongabe (Hyperthyreosis factitia) fällt das Tg ab, während es bei Hyperthyreosen anderer Ursache eher erhöht ist.

Zum Nachweis dienen die Standardmethoden: IRMA und ICMA. Bei jeder Tg-Bestimmung ist es wichtig einen Tg-Wiederfindungs-Test durchzuführen, da Tg-Antikörper das Testergebnis verfälschen können. Das heißt, eine bekannte Menge Tg wird der Probe zugeführt, wenn diese nicht vollständig nachgewiesen werden kann, muss auch das Testergebnis entsprechend angepasst werden.

2.5.5. Schilddrüsenautoantikörper

Bei der Mehrzahl der Über- und Unterfunktionen der Schilddrüse handelt es sich um Autoimmunerkrankungen. Die Bestimmung der Autoantikörper zählt nach der Messung der Schilddrüsenhormone, der TSH und TRH-Funktio-testes zu den wichtigsten diagnostischen Parametern bei Dysregulationen der Schilddrüse.

2.5.5.1. Autoantikörper gegen Thyreoglobulin (TAK)

Thyreoglobulin ist ein starkes Autoantigen. Schon im Blut von Gesunden lassen sich B-Lymphozyten mit membranständigen IgM-Antikörpern gegen Thyreoglobulin nachweisen. Im Serum nachweisbare, hoch-titrige IgG-Antikörper gegen Thyreoglobulin (TAK)

sind zusammen mit TPO-AK ein Marker für die Hashimoto-Thyreoiditis. Eine alleinige Erhöhung der TAK-Titer ist selten, deshalb eignen sie sich hauptsächlich zur Absicherung bei Verdacht auf eine Autoimmunthyreoiditis, wenn die TPO- Antikörper negativ bzw. nur grenzwertig erhöht sind.

2.5.5.2. Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor (TRAK)

TSH-Rezeptor-Antikörper (TRAK) können die Schilddrüsenfunktion auf drei verschiedene Arten beeinflussen:

1. Als thyroid stimulating antibodies oder long acting thyroid stimulator (LATS) imitieren sie bei der Bindung an den Rezeptor zugleich die Funktion des natürlichen Liganden TSH. Ihre Bindung ist meistens stärker als die des TSH. Es resultiert eine lang andauernde Stimulierung, die zur vermehrten T3- und T4-Ausschüttung führt.
2. Als thyroid-receptor blocking antibodies oder TSH-Binding inhibitory Immunglobulins (TSBII) blockieren sie die Rezeptorfunktion. Die Zellen werden refraktär gegen TSH.
3. Als thyroid growth-stimulating antibodies (TGAB) stimulieren sie die Zellen wie TSH zum Wachstum.

Der in der Routine durchgeführte Radioimmunoassay (RIA) kann lediglich die Bindung von Antikörpern an den Rezeptor nachweisen, nicht jedoch ihre Funktion. TRAK sind hochspezifische Marker für Morbus Basedow. Beginnende Hyperthyreosen sind in 80-85 % positiv. Im Verlauf der Behandlung sinkt die Prävalenz auf 40-60 % ab. Bei euthyreoter Struma, akuter Thyreoiditis, subakuter Thyreoiditis (de Quervain) oder bei chronischer Thyreoiditis lassen sich in nur weniger als 10 % (dann meist nur niedrigtitrig) TRAK nachweisen. Schwangere mit hohem TRAK-Titer gebären häufig Kinder mit Hypothyreose.

2.5.5.3. Autoantikörper gegen die thyreoidale Peroxidase (TPO-AK/MAK)

Die Bezeichnung MAK bedeutet Autoantikörper gegen Mikrosomen der Schilddrüse und sie ist seit Ruf 1987 nachgewiesen hat, dass es sich dabei um die Thyreoidale Peroxidase (TPO) handelt, als veraltet anzusehen.

Antikörper gegen die Thyreoidale Peroxidase sind heterogen: Sie gehören verschiedenen Subklassen an und sind gegen unterschiedliche Epitope des Enzyms gerichtet. Nicht sicher geklärt ist wie das Enzym, dass in der apikalen Membran der Schilddrüsenzelle liegt, dem Immunsystem zugänglich wird. Das Enzym ist bei Hashimoto Thyreoiditis Patienten auch auf der Zellmembran nachzuweisen, weshalb man eine pathogenetische

Bedeutung diskutiert wird [42].

TPO-AK (und TAK) werden in hoher Konzentration bei der chronisch lymphozytären Thyreoiditis gefunden. Die diagnostische Sensitivität bei beginnender Hashimoto-Thyreoiditis beträgt 90 - 100 %.

Sie kommen aber auch bei Patienten mit M. Basedow neben TRAK und TAK vor. Deshalb hat die Bestimmung von TPO-AK eine große Bedeutung in der Differentialdiagnose bei Hyperthyreose, wenn es darum geht zu entscheiden, ob es sich um eine immunogene oder nicht immunogene Genese handelt.

Bei M. Basedow und Hashimoto- Thyreoiditis (hypertrophe Form) findet man eine vergrößerte Schilddrüse mit einer echoarmen Binnenstruktur im Sonogramm, insbesondere bei diesem Befund sollte auf TPO-AK (bzw. TRAK) getestet werden.

Das Auftreten von TPO-Antikörpern in Verbindung mit erhöhten TSH- Werten spricht bei einer subklinischen Autoimmunthyreoiditis stark für eine Entwicklung zur klinisch manifesten Hypothyreose. Wichtig ist, dass mit den TPO-AK nicht nur die manifeste sondern auch eine latente Hypothyreose festgestellt werden kann.

Weiterhin nutzt man diese Form der Diagnostik bei der postpartalen Schilddrüsendysfunktion. Insbesondere Schwangere mit TPO-AK oder TAK haben ein erhöhtes Risiko für eine post-partum Thyreoiditis mit transientser Hyperthyreose und anschließender (möglicherweise bleibender) Hypothyreose.

Eine wichtige Aufgabe Erfüllen die TPO- AK- Tests bei der Hypothyreose der Neugeborenen. Eine angeborene Hypothyreose, die unbehandelt zu schweren geistigen und körperlichen Entwicklungsstörungen (Kretinismus) führt, kann zahlreiche Ursachen haben (siehe Kap. 2.4.3.2). Alle Neugeborenen, bei denen im Rahmen des Hypothyreose-Screenings (Fersenblutstropfen auf Filterpapier) eine Hypothyreose festgestellt wurde, müssen auf TPO- AK getestet werden, da eine immunogene Genese der Erkrankung nicht ausgeschlossen werden kann, weil die Antikörper von der Mutter diaplazentar auf das Kind übertragen werden können.

Es ist es sogar möglich Aussagen über die Prognose von Morbus Basedow Patienten zu machen, indem man deren Antikörper-Titer überwacht [89].

In Ausnahmefällen ist der TPO-AK-Wert auch bei nicht immunogenen Schilddrüsenerkrankungen oder schilddrüsengesunden (meist älteren)Patienten erhöht. In diesen Fällen

handelt es sich aber nur um grenzwertige oder sehr niedrige Titer. Trotzdem ist es besonders dann nötig, auch andere Kriterien wie Ergebnisse der klinischen Untersuchung, Sonographie oder Szintigraphie zu berücksichtigen, um zu einer richtigen Beurteilung zu kommen.

Zum Nachweis der TPO-AK benutzt man Standardmethoden: RIA, IRMA, ELISA mit gereinigter humaner oder rekombinanter Schilddrüsenperoxidase als Antigen. Der Referenzbereich sollte nach der Leitlinie zur Schilddrüsendiagnostik [17] in jedem Labor überprüft und neu erstellt werden.

Die durch Haemagglutination nachweisbare Kreuzreaktion mit anderen Schilddrüsenantikörpern (TAK oder TRAK) ist bei den RIAs der neuen Generation durch die hohe Qualität des Tracers nicht mehr vorhanden. Hämagglutinationstests sollten aus diesem Grund nicht mehr verwendet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Patientengruppe

Die Blutproben für die Evaluation der Filterpapiermethode zum Nachweis von Autoantikörpern gegen die thyreoidale Peroxidase, wurden von Patienten aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Nuklearmedizin und der Kinderklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn, im Rahmen der täglichen Routinediagnostik entnommen. Die Proben wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren (April 2003 bis März 2005) gesammelt. Es handelt sich um männliche und weibliche Probanden (siehe Kap. 3.1.2), verschiedener Altersgruppen (siehe Kap. 3.1.1), die an unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen leiden (siehe Kap. 3.1.3) bzw. bei denen ein Verdacht auf ein Schilddrüsenleiden besteht. Es wurden insgesamt 90 Blutproben von 77 verschiedenen Probanden untersucht. Davon konnten 10 Proben aufgrund falscher Lagerung nicht regulär ausgewertet werden. Die 13 Proben von Patienten, von denen jeweils mehr als eine Probe untersucht wurde, sind zwar in die Evaluierung eingegangen (im Rahmen von Versuchsreihen z.B. zur Verdünnung oder zur Inkubationszeit), wurden aber in der Gesamtwertung nur als eine Probe berücksichtigt.

3.1.1. Alter

Die Altersverteilung (siehe dazu 3.1) zeigt, dass die Patienten der hier zugrunde liegenden Stichprobe aus allen Altersgruppen (ab 20 Jahren) ausgewählt wurden. Der Schwerpunkt der altersmäßigen Verteilung liegt im Vergleich mit der Altersverteilung der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2003, herausgegeben vom Bundesamt für Statistik, mehr zum senium hin verschoben. Wenn man berücksichtigt, dass hier nur Menschen mit Schilddrüsenbeschwerden oder Verdacht auf solche untersucht wurden, verwundert diese Verschiebung nicht, denn die Prävalenz der meisten Schilddrüsenerkrankungen steigt mit zunehmendem Alter. Das Durchschnittsalter¹ des Patientenkollektivs beträgt 48 Jahre. Siehe dazu Abbildung 3.1

3.1.2. Geschlecht

Die Geschlechterverteilung der Stichprobe zeigt, dass der Anteil der Frauen in der Stichprobe den Anteil der Männer um den Faktor sechs übersteigt. Dieses ungleiche Verhältnis

¹Die Proben der Universitätskinderklinik sind bei der Altersverteilung nicht berücksichtigt

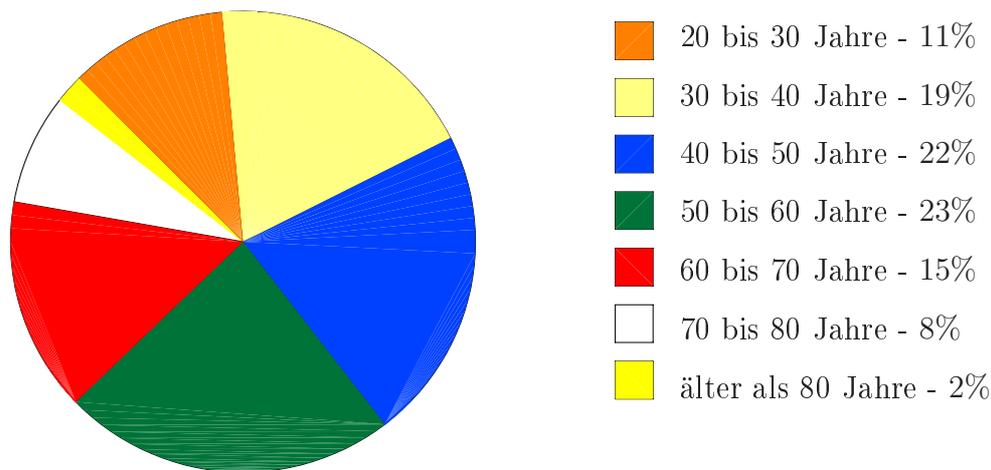


Abbildung 3.1.: Altersverteilung

von Männern und Frauen spiegelt die Verteilung der Schilddrüsenerkrankungen wieder. So leiden z. B. fünf mal mehr Frauen an Hypothyreose als Männer. Diese geschlechtsabhängige Prädisposition hat schon zu Überlegungen über einen ursächlichen, z.B. hormonellen Zusammenhang geführt. Dieser konnte bisher aber noch nicht nachgewiesen werden. Siehe dazu Abbildung 3.2

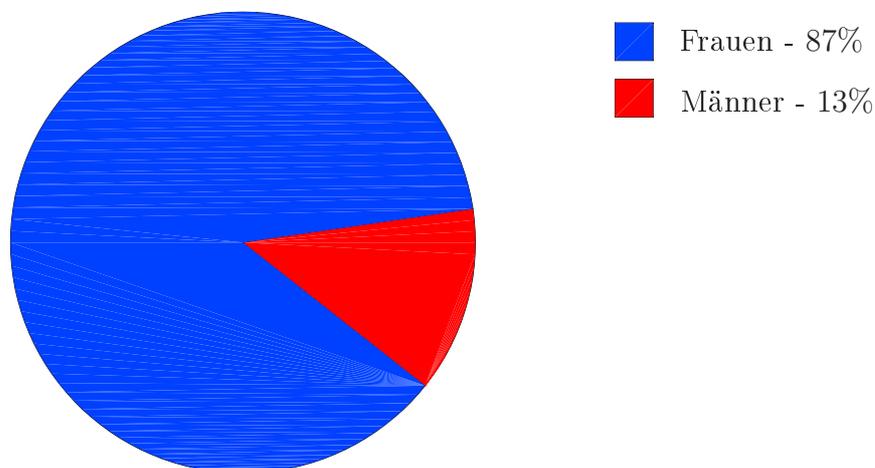


Abbildung 3.2.: Geschlechterverteilung

3.1.3. Diagnose

Im Rahmen der bereits in der Routinediagnostik etablierten Referenzmethode, wird der Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen die Thyreoi-

dale Peroxidase (TPO) in humanem Serum und Plasma eingesetzt.

Immunthyreopathien umfassen mehrere Schilddrüsenerkrankungen (siehe Kap. 2.4.4), die reichen von einer manifesten Hypo- oder Hyperthyreose bis zu subklinischen Erkrankungen mit noch asymptomatischer Schilddrüse. Ein verbindendes Element liegt im Vorhandensein der genannten Autoantikörper. Nach den Leitlinien Schilddrüse[17] ist die Bestimmung der thyreoidalen Peroxidase (TPO) bei den folgenden Indikationen angebracht:

- Verdacht auf chronisch lymphozytäre Thyreoiditis (Hashimoto-Thyreoiditis)
- Bei echoarmer Binnenstruktur im Sonogramm, insbesondere vor Einleitung einer Therapie mit Iodid.
- Bei latenter oder manifester Hypothyreose.
- Abgrenzung einer immunogenen von einer nicht-immunogenen Hyperthyreose.

Zusätzlich kann ihre Bestimmung in den folgenden Fällen sinnvoll sein: Der Anstieg von TPO-AK kann als ein unabhängiger Hinweis auf Schwangerschaftsrisiken angesehen werden. Schwangere mit TPO-AK oder TAK haben ein erhöhtes Risiko für eine postpartum Thyreoiditis mit transienter Hyperthyreose und anschließender (möglicherweise bleibender) Hypothyreose. Alle Neugeborenen, bei denen im Rahmen des Hypothyreose-Screenings (Fersenblutstropfen auf Filterpapier) eine Hypothyreose festgestellt wurde, müssen auf TPO-AK getestet werden, da eine immunogene Genese der Erkrankung nicht ausgeschlossen werden kann. Der Morbus Basedow wird bestätigt durch hohe TRAK, TAK und TPO-AK-Spiegel. Der Test auf TPO-AK ist besonders bei TRAK negativem Morbus Basedow interessant. TPO-Ak können in 70% der Morbus Basedow Fälle nachgewiesen werden. 90% aller Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis weisen Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase nach.

Um ein realistisches Bild der Verhältnisse widerzuspiegeln wurden nicht nur Patienten mit Morbus Basedow und Patienten, die an der Hashimoto-Thyreoiditis litten und Schilddrüsengesunde untersucht, sondern es wurden Patienten mit den unterschiedlichsten Schilddrüsenerkrankungen getestet. Dadurch soll die Sensitivität und Spezifität der Filterpapiermethode überprüft werden.

3.2. Der Radioimmunoassay

2

²nach Herstellerangaben der Firma Medipan

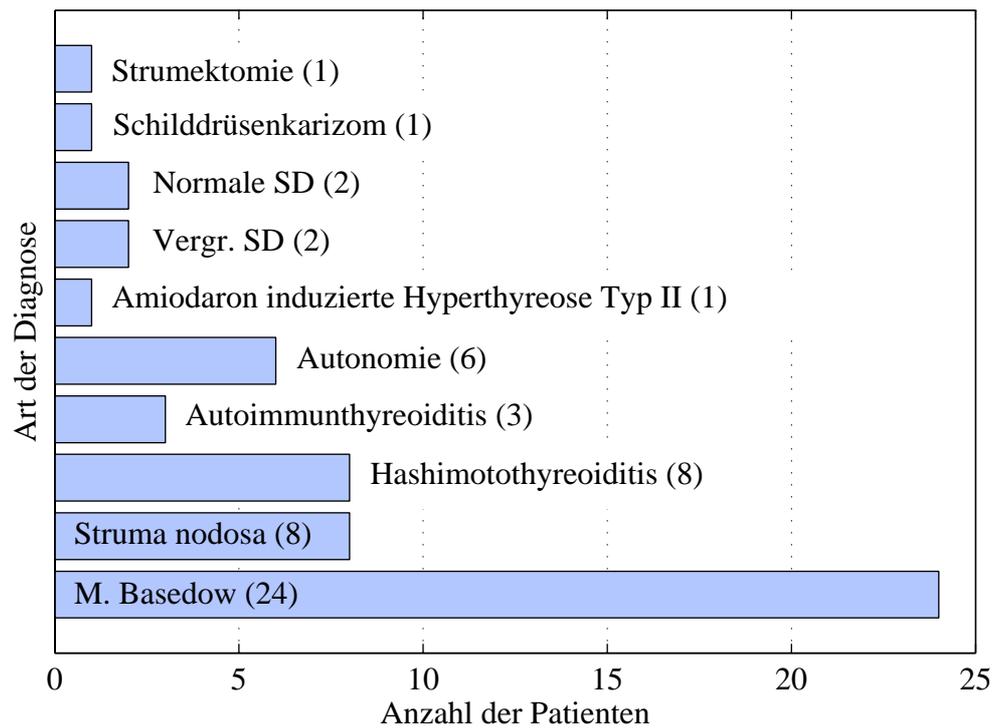


Abbildung 3.3.: Verteilung der Schilddrüsenerkrankungen im Patientengut

Zum Nachweis der Autoantikörper gegen die Thyreoidale Peroxidase (TPO) wird in dieser Arbeit der Radioliganden-Assay CentAK anti- TPO der Firma Medipan verwendet.

3.2.1. Die Testkomponenten und die Testcharakteristika

Dieser Radioimmunoassay (RIA) setzt sich aus den folgenden Testkomponenten zusammen:

- **Tracer:** Der Tracer besteht aus der vollständigen humanen TPO an die ^{125}J -Jod gebunden ist. Pro Tracerbehältnis ist mit einer Strahlung von bis zu 0,041 MBq zu rechnen (Jedes Testkitt verfügt über zwei Tracerbehältnisse). Beim Umgang sind deshalb Strahlenschutzgesichtspunkte zu berücksichtigen (siehe Kap. 3.2.5). Zur Verwendung wird der Tracer in mit 2,6 ml des Puffers gelöst. Der gelöste Tracer ist bei einer Lagerung von $2^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$ für zwei Wochen stabil und kann entsprechend in diesem Zeitraum zur Messung eingesetzt werden. Danach ist mit Radiolyseprozessen zu rechnen weswegen zu einem späteren Zeitpunkt kein exaktes Messergebnis zu erzielen ist.
- **Puffer:** Es handelt sich um einen, durch die Firma Medipan leider nicht näher

definierten, Phosphat-Puffer, der sowohl zur Rekonstitution des Tracers und der Protein A-Suspension eingesetzt wird, als auch zur Vorverdünnung der Serumproben in der Referenzmethode. Im Rahmen der hier zu evaluierenden Methode ist der Phosphat-Puffer zur Lösung des Patientenblutes aus den Filterpapierkarten angewendet worden.

- **Protein A-suspension:** Dieses Pulver enthält Protein A, gebunden an Staph. Aureus Zellen. Es muss ebenfalls mit 2,6 ml Pufferlösung pro Behältnis verdünnt werden. Nach der Lösung im Puffer ist die Suspension bei Lagerung zwischen 2-8°C noch zwei Wochen haltbar. Da sich die Suspension gemäß ihrer Aufgabe im Assay häufig absetzt, muss sie kurz vor der Anwendung durchmischt werden.
- **Anti-TPO-Standards (1-6):** Hierbei handelt es sich um verdünntes Humanserum, das eine definierten Menge an TPO-AK enthält.
- **TPO- Kontrollseren:** Auch hier handelt es sich um verdünntes Humanserum. Die Konzentrationen variieren mit dem verwendeten Testkitt und sind einer Faltblatt-information zu entnehmen.

Charakteristika des Radioimmunoassay ³

Bindungskapazität Die maximale Bindungskapazität wird mit dem höchsten Standard ermittelt und beträgt 50%-70%.

Kalibrierung Der CentAK anti-TPO orientiert sich am Referenzserum 66/387 (Nat. Inst. For Biol. Standards and Control, Hampstead, London, UK)

Parallelität von Standards und Serumproben. Definierte Verdünnungen des Referenzserums werden im CentAK anti-TPO mit den entsprechenden Werten wiedergefunden.

Spezifität Durch die Qualität des Tracers schließt der Hersteller Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Thyreoglobulin oder gegen TSH-Rezeptor-AK aus.

Nachweisgrenze Werte unterhalb von 15 U/ml sind mit Variationskoeffizienten von 10% (Intraassay) und 20% (von Tag zu Tag) behaftet und somit nicht ausreichend zuverlässig.

3.2.2. Das Testprinzip

Der Tracer (Jod-125 gebunden an TPO) verbindet sich mit den Antikörpern aus der Blutprobe des Patienten. Das Protein A bindet dabei an den Fc-Teil des Antikörpers und

³nach Herstellerangaben der Firma Medipan

verbindet so den Antikörper mit Zellen (*Staph. aureus*), was ein Absinken der gesamten Komplexe bewirkt und damit das Zentrifugieren und Dekantieren der Probe erleichtert. Ein solcher Sandwich-Komplex entsteht nur dann, wenn die Patientenprobe Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase enthält. Ist die Probe frei von Antikörpern, findet keine Komplexbildung statt und der Tracer wird beim Dekantieren verworfen. Nach dem Absaugen bzw. Dekantieren und einem Waschvorgang wird die Radioaktivität des Präzipitats in einem Gamma-Counter gemessen.

Je höher die Konzentration an TPO-AK in der Probe ist, desto mehr Tracer liegt gebunden vor. Das bedeutet, dass die Konzentration des Tracers bzw. seines Messsignals sich direkt proportional zur Konzentration von TPO-AK in der Probe verhält. Liegt kein TPO-AK in der Probe vor, entsteht auch kein Immunkomplex und kein Präzipitat - somit ist auch keine Radioaktivität messbar.

Im positiven Fall errechnet sich die Konzentration der TPO-AK der Proben aus der Standardkurve, die sich aus den counts-per-minute-Mittelwerten (cpm-Mittelwerten) der sechs Standardseren (verdünntes Humanserum mit bekanntem TPO-AK-Wert) ergibt. Den cpm-Mittelwerten der Standardseren lassen sich direkt Konzentrationen an TPO-AK zuordnen. Die aus den cpm-Mittelwerten bestimmten TPO-AK-Werte der einzelnen Patientenseren und der beiden Kontrollseren lassen sich dann direkt aus der Kurve ableiten.

3.2.3. Arbeitsschritte zur Durchführung des Radioimmunoassay

Die im folgenden geschilderten Arbeitsschritte zur Durchführung des RIA dienen einem fehlerfreien Ablauf und richten sich nach den Herstellerangaben der Firma Medipan.

- Als erstes werden die Spitzbodenröhrchen beschriftet, um Probenverwechslungen vorzubeugen.
- Danach sind 50 μl jeder Patientenprobe abzunehmen und in das entsprechende Röhrchen zugeben.
- Anschließend werden jeweils 50 μl der beiden Kontrollseren und jeweils 50 μl der sechs verschiedenen Standards in die dafür vorgesehenen Röhrchen pipettiert.
- Als nächstes wird in alle Probenröhrchen, inklusive eines zusätzlichen Röhrchen für die Totalaktivität, jeweils 50 μl Tracer gefüllt.
- Unmittelbar danach wird in alle Röhrchen, (mit Ausnahme des Totalaktivitätsröhrchen) 50 μl Protein A- Suspension gefüllt.

- Nach Abschluss des Pipetiervorganges müssen alle Röhren für die Dauer von mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Nach der Inkubationszeit wird in jedes Röhren 1 ml Puffer gegeben.
- Der nächste Schritt ist die Zentrifugation aller Röhren bei 2000g für 15 min.
- Der Überstand der zentrifugierten Spitzbodenröhren wird abgeschüttet und in ein dafür vorgesehenes Becken gegeben, an dem eine Vakuumpumpe angeschlossen ist, die den Überstand direkt absaugt und das radioaktive Material sofort in bleiabgeschirmte Behälter gelangt von wo aus es direkt entsorgt wird.
- Der zumessende Bodesatz verbleibt in der Spitze des Röhrens.
- Die Probenröhren werden für die Dauer von 5-10 min mit der Öffnung nach unten auf eine ausreichend dicke Lage Zellstoff gestellt, um ein Abtropfen von Flüssigkeitsresten aus den Probenröhren zu gewährleisten. Verbleibt ein zu großer Rest an Flüssigkeit im Röhren, so kann das die Präzision der Messergebnisse beeinflussen und zu falsch hohen Ergebnissen führen.
- Abschließend erfolgt die Messung aller Proben inklusive Totalaktivität, Standards und Kontrollen im Gamma-Counter.

3.2.4. Der Gamma - Counter

Radioaktivität wird messbar, sobald Energie aus der Strahlung in Materie absorbiert wird. Die zum Nachweis von Gammaquanten eingesetzten Szintillationszähler enthalten als absorbierendes Medium einen Natriumjodidkristall, in dem die aufgenommene Energie in einen Lichtblitz umgesetzt wird.

Das γ -Quant wird im Kristall absorbiert. Die dabei erzeugten Lichtquanten gelangen über ein optisches Fenster auf die Photokatode und setzen dort Elektronen frei. Diese werden in einem nachgeschalteten Elektronenvervielfacher (Photomultiplier) um das millionenfache verstärkt und von einer Anode abgesaugt, so dass ein kurzzeitiger Anodenstrom fließt, der zu einem Spannungsimpuls führt. Am Ausgang entsteht ein elektrisch messbares Signal, dessen Größe der Energie der absorbierten Strahlung entspricht. Die Zahl der pro Zeiteinheit messbaren Signale, die Zählrate, ist der Menge der Radioaktivität proportional.

Sollen möglichst alle Quanten einer radioaktiven Probe im Nachweisgerät absorbiert werden, müsste die Probe in den Mittelpunkt einer Kristallkugel gebracht werden. Eine praktikable Näherungslösung ist der Bohrlochdetektor. Der Bohrlochszintillator ist ein

Messgerät, das in der Nuklearmedizin zur Messung von Proben mit geringer Aktivitätskonzentration verwendet wird. Der Szintillationskristall besitzt eine zentrale Bohrung in die Probe eingebracht wird. Der Vorteil besteht darin, dass die Probe allseitig vom Detektor umgeben ist. Deshalb trifft fast jedes Quant den Szintillator. Um äußere Störgrößen zu vermeiden ist eine starke Bleiabschirmung notwendig. Die an den Bohrlochkristallzähler angeschlossene Messtechnik zählt die elektronischen Impulse und versorgt den Elektronenvervielfacher mit Betriebsspannung. Zur Messung im Gamma-Counter werden die Proben in Halterungen, sogenannte Racks, eingebracht. Das Gerät gibt die Rack-Besetzung vor. Da es sich üblicherweise um Doppelbestimmungen handelt, muss man bei Einzelbestimmungen gegebenenfalls beachten. Die Messzeit beträgt eine Minute. Die Ergebnisse der einzelnen Proben ergeben sich aus der Standardkurve. Die Standardkurve entsteht, indem die cpm-Mittelwerte der Standardserien 1-6 auf der Ordinate gegen die entsprechenden bekannten anti-TPO-Konzentrationen auf der Abszisse aufgetragen werden. Anhand der Kurve können jetzt auch bisher unbekannte Proben Werte in U/ml zugeordnet werden. Die Standardkurve wird von der Auswerteeinheit so berechnet, dass der Kurvenverlauf entsprechend geglättet wird, so dass Streuungen ausgeglichen werden.

Wichtig neben den Ergebnissen der Patienten ist, die Werte der beiden Kontrollen mit dem vorgegeben Referenzbereich (wird vom Hersteller dem Testkitt beigelegt) abzugleichen.

3.2.5. Strahlenschutzmaßnahmen

Der Tracer Jod 125 ist mit einer Aktivität von weniger als 0,041 MBq pro Flasche keine starke Strahlenquelle. Aber da ionisierende Strahlung auch schon in geringfügigen Dosen Schäden hervorrufen können, ist unter prinzipieller Beachtung des Strahlenschutzgesetzes bzw. der Strahlenschutzverordnung gearbeitet worden.

Alle Versuchsreihen für diese Arbeit sind im Labor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsklinik der Rheinischen-Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn durchgeführt worden, das mit den entsprechenden Räumlichkeiten und Möglichkeiten zum Strahlenschutz ausgestattet ist.

Für den praktischen Arbeitsablauf bedeutet Strahlenschutz, dass eine Exposition durch Strahlen weitestgehend vermieden wird. Aus diesem Grund ist beim Durchführen des RIA der Tracer nur solange wie der Pipetiervorgang andauert überhaupt am Arbeitsplatz vorrätig. Außerdem ist zügiges Arbeiten ein Gebot, denn je länger der Umgang mit der strahlenden Materie desto höher ist auch die resultierende Strahlenbelastung. Es wurde durchgehend mit Schutzkleidung gearbeitet, wobei dem Tragen von Handschuhen

besondere Bedeutung zukommt, da diese nicht nur vor Kontakt mit dem potentiell infektiösen Patientenmaterial schützen, sondern auch eine Inkorporation von Tracer und damit Strahlung vermeiden. Im Falle einer Umgebungskontamination mit dem Tracer Jod125, ist eine Verschleppung von Radioaktivität durch Absperrung und Reinigung der kontaminierten Gegenstände mit geeigneten Detergenzien ausgeschlossen worden. Alle Abfälle, die mit dem radioaktiven Tracer in Berührung waren, sind ,gemäß Strahlenschutzverordnung, in geeigneten Behältnissen entsorgt worden. Zur eigenen Kontrolle wurde zu jederzeit ein Dosimeter getragen.

3.3. Die Blutentnahme und das Aufbereiten der Blutproben

3.3.1. Referenzmethode

Gegenstände zur **Venenpunktion und Aufbereiten der Serumprobe:**

- Desinfektionslösung und steriles Material zum Auftragen der Lösung
- VASUFLO mit Adapter (Kanüle mit Adapter zum Anschluss an Vakuumsysteme zur Blutentnahme)⁴
- Serumröhrchen (mit spezieller Granulatfüllung, die als Gerinnungs- und Zentrifugierhilfe dient.)
- Zentrifuge (max. 3.000 U/min)
- Pipetten (Messbereich 50 μ l, 300 μ l, 1ml)
- Probenröhrchen: Zur Vorverdünnung wurden Rundbodenröhrchen eingesetzt. Während des eigentlichen Messverfahrenes wird mit Spitzbodenröhrchen gearbeitet, um das Absinken der Immunkomplexe und das Messen im Gamma- Counter zu erleichtern.
- Vortexer (oder Schüttler-Geräte) dienen dem Homogenisieren der Probe

Der Radioimmunoassay, der routinemäßig zum Nachweis der TPO-AK eingesetzt wird und hier als Referenzmethode dient, arbeitet mit Serum. Zur Serumgewinnung muss eine Venenpunktion durchgeführt werden. Vor der Blutabnahme wird die Haut an der Abnahmestelle sorgfältig desinfiziert. Danach wird das Gefäß gestaut und die Venenpunktion mit einer weitlumigen Kanüle durchgeführt. Die erforderliche Blutmenge beträgt 50 μ l

⁴Bei Entnahme einer Blutprobe mit einer Spritze und nachfolgender Verteilung in Probenröhrchen besteht die Gefahr der Entmischung, deshalb sollte dies vermieden werden!

Serum pro Probe. Das bedeutet auch bei Doppel- und Nachbestimmungen reichen ca. 2 ml Vollblut (0,5-1 ml Serum) aus. Das Blut wird in Probenröhrchen zur Abnahme von Serumproben aufgefangen. Serumröhrchen verfügen über eine spezielle Granulatfüllung, die als Gerinnungs- und Zentrifugierhilfe dient. Die Abtrennung des Plasmas von den korpuskulären Blutbestandteilen sollte in der Regel im Untersuchungslabor durchgeführt werden.

Zur Serumgewinnung wird das Blutröhrchen ca. 30 min. bei Raumtemperatur senkrecht stehen gelassen. Es ist wichtig, die Zentrifugation erst nach Eintritt der Gerinnung durchzuführen, da sonst mit einer Nachgerinnung gerechnet werden muss. Die Zentrifugation der Serumröhrchen erfolgt 10 min lang mit max. 3.000 U/min. Die Lagerung ist bei 2-8°C bis zu 3 Tagen möglich. Bei -20 °C können Serumproben über längere Zeit aufbewahrt werden. Allerdings sollten einmal aufgetaute Proben direkt untersucht und nicht erneut tiefgefroren werden. Bevor man die so gewonnenen Serumproben mit dem Radioimmunoassay getestet werden können, müssen sie zunächst wieder auf Raumtemperatur gebracht werden. Anschließend werden die Proben kurz gemischt, um die Homogenität der Probe zu sichern. Schließlich müssen die Proben vor dem Einsatz im Testsystem vorverdünnt werden. Der hier verwendete CentAK anti-TPO Test verlangt eine Verdünnung von 1:20 Teilen. Das bedeutet, dass man jeweils 50 µl der Serumprobe abpipettiert und in einem neuen Reagenzglas mit 1 ml Puffer vermischt. Bei den üblichen Doppelansätzen geschieht das pro Serumprobe zweimal.

3.3.2. Filterpapiermethode

Gegenstände zur **Kapillarblutentnahme**:

- Desinfektionslösung und steriles Material zum Auftragen der Lösung
- Sterile Lanzette/Sicherheitslanzetten mit Entnahnehilfe (z.B. MiniCollect) oder Punktionsgeräte
- Die Filterpapierkarte: Es handelt sich um eine Filterpapierkarte der Firma Schleicher und Schuell (Nummer 2992). Sie hat eine Größe von 7x12 cm, die über neun, im Durchmesser jeweils 1 cm große, markierte Kreisflächen verfügt, auf die das Blut des Probanden aufgeträufelt werden muß. Ein Blutstropfen reicht meist nicht aus, um die Kreisfläche vollständig auszufüllen. Der Tropfen kann größer als die markierte Fläche sein, darf aber nicht kleiner als der gekennzeichnete Kreis sein. Die Blutmenge in der Stanzfläche beträgt 15 µl.
- Die Stanze: Zum gleichmäßigen Entfernen der blutgefüllten Flächen wird eine Metallstanze mit einem Durchmesser von 6,5 mm verwendet.

- Der Vortexer (oder Schüttler-Geräte): Sie dienen dem Homogenisieren der Probe und unterstützen den Lösungsprozess des Blutes in der Pufferlösung.
- Die Probenröhrchen: Zur Vorverdünnung wurden Rundbodenröhrchen eingesetzt, während des eigentlichen Messverfahrenes wird mit Spitzbodenröhrchen gearbeitet, um das Absinken der Immunkomplexe und das Messen im Gamma-Counter zu erleichtern.

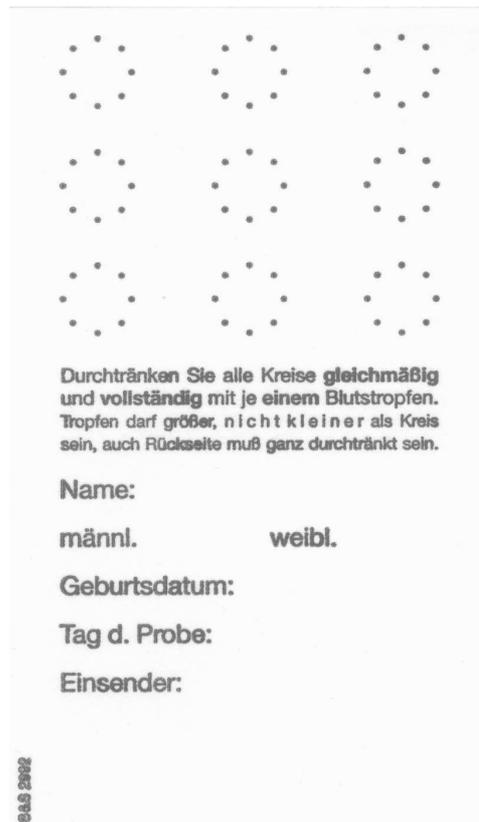


Abbildung 3.4.: Filterpapierkarte zum Auftropfen von Kapillarblut

Es ist entscheidend auf einheitliche Filterpapierträger zu achten [31], da nach einer Arbeit von Hintze, 1989 [29], erhebliche Unterschiede in der Saugfähigkeit bestehen. So wird z. B. bei Filterpapierkarten aus den USA (S&S 903) eine höhere Saugfähigkeit beschrieben als bei dem entsprechenden Produkt aus der Bundesrepublik (S&S2992). Aus der höheren Saugfähigkeit ergeben sich dann auch höhere Ergebnisse, was zu Fehleinschätzungen führen könnte. Die hier gemachten Angaben gelten nur für das Filterpapier 2992 der Firma Schleicher und Schuell.

Es ist mit dieser Methode nicht erforderlich eine Venenpunktion vorzunehmen. Es genügt die nahezu schmerzfreie Gewinnung von Kapillarblut aus Fingerbeere, Ferse oder

Ohrläppchen mit Hilfe einer Lanzette oder eines Punktionsgerätes. Dazu ist die Entnahmestelle vor dem Einstich thermisch zu hyperämisieren. Danach wird die entsprechende Stelle desinfiziert und anschließend wird die Haut mit einem der oben genannten Instrumente kurz durchdrungen, bis Blut austritt. Die Blutstropfen werden dann direkt auf die bereits beschriebene Filterpapierkarte aufgetropft. Dabei die Fingerbeere nicht drücken, nicht reiben oder quetschen, da sonst Gewebsflüssigkeit austritt (Verdünnungseffekt). Ein Blutstropfen reicht meist nicht aus, um die Kreisfläche vollständig auszufüllen. Die Blutstropfen können über die markierte Fläche hinaus auslaufen, aber sie sollten so groß sein, dass sie mindestens die gekennzeichnete Fläche ausfüllen.

Zum gleichmäßigen Entfernen der blutgefüllten Flächen wird eine Metallstanze mit einem Durchmesser von 6,5 mm verwendet. Zum Ausstanzen muss der Blutstropfen vollständig getrocknet sein, da im nassen Zustand ein Ausfasern der Ränder beim Stanzen zu Ungenauigkeiten führt. Bei einer Einfachbestimmung werden drei Tropfkreise (bei Doppelbestimmungen entsprechen sechs Tropfkreise) ausgestanzt und in ein Reagenzglas gegeben (siehe dazu Kap. 3.4.1). Zu diesen drei Filterpapierblättchen eines Patienten werden dann 300 μl Pufferlösung pipettiert (siehe dazu Kap. 3.4.2). Anschließend werden die Proben in einem Vortexer oder ähnlichen Geräten für 30 min durchmischt. In dieser Inkubationszeit lösen sich die Blutbestandteile und mit ihnen die TPO-Antikörper in der Pufferlösung (siehe Kap. 3.4.3). Zwischenzeitlich kann ein Rack mit Spitzbodenröhrchen vorbereitet und beschriftet werden. In diese pipettiert man die für den Test verwendeten 50 μl Probenlösung, die Totalaktivität, die sechs Standardseren und beide Kontrollen. Die folgenden Arbeitsschritte entsprechen genau den im Abschnitt 3.2.3 beschriebenen. Die Arbeitsschritte zur Durchführung des RIA gelten für die Serummethode und die Filterpapiermethode gleichermaßen.

3.4. Versuchsmodifikationen zur Evaluation der Filterpapiermethode

3.4.1. Variation der Filterpapierblättchenanzahl

Je nach Anzahl der Filterpapierblättchen, ändert sich die Anzahl der TPO-AK und mit ihnen die Anzahl der spezifischen Bindungen zwischen Antigen und Antikörper. Je mehr Blättchen gelöst werden, desto mehr TPO-AK gehen während des Inkubationsprozesses in Lösung und entsprechend mehr Antigen-Antikörperkomplexe können gebildet werden.

Nun kann man aber nicht beliebig viele Probenblättchen benutzen, da in der Regel von einem Patienten nur eine Filterpapierkarte betropft wird. Eine Filterpapierkarte besteht aus neun Tropfkreisen. Man muss damit rechnen, dass nicht jeder betropfte Kreis zu ver-

wenden ist, unzureichend große oder unvollständig aufgetropfte Kärtchen sind eher die Regel als die Ausnahme. Des weiteren muss eine Doppelbestimmung/Nachbestimmung möglich sein. Aus diesen rein praktischen Überlegungen ergibt sich ein Maximum von allerhöchstens vier Tropfkreisen.

Auf der anderen Seite ist es erforderlich die Anzahl der Blutblättchen nicht zu gering zu wählen, um eine ausreichende Menge an Antikörpern in der Lösung zur Bestimmung zur Verfügung zu haben, und damit ein zuverlässiges Ergebnis zu erzielen.

Es wurden mehrere Ansätze mit der gleichen Probe, aber einer jeweils unterschiedlichen Anzahl an Filterpapierblättchen durchgeführt, um die optimale Anzahl an Filterpapierblättchen zu bestimmen.

Dabei wurden die neun Tropfkreise eines Patienten ausgenutzt, um vergleichbare Ergebnisse zu haben. Da nie mehr als zwei, in vielen Fällen jedoch nur eine, Filterpapierkarte von einem Patienten zur Verfügung stand, wurde hierbei zugunsten der Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf Doppelansätze verzichtet.

Als Beispiel für die Vorgehensweise sind im Folgenden die Ergebnisse und die unmittelbar daraus folgenden Schlussfolgerungen für die erste Patientin beschrieben. Die Patientin hatte im Serumtest einen Wert von 9280 U/ml.

Im Filterpapiertest ergab sich:

Konzentration (Blättchen / μl)	1/200	3/600	5/1000
Filterpapierwert (U/ml)	5684	5613	4855
Serumwert (U/ml)	9280	9280	9280

Tabelle 3.1.: Vergleich der Filterpapierwerte bei unterschiedlicher Anzahl der Filterpapierblättchen bei gleicher Pufferkonzentration

Es wurde die Anzahl der Filterpapierblättchen von einem Blättchen zu drei Blättchen und dann auf fünf gesteigert. Dabei wurde die Konzentration von 1:20 (wenn man von 10 μl in Lösung gehendem Blut pro Blättchen ausgeht) beibehalten. Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Konzentration an Blut (Immunkomplexen) ist zu niedrig. Das Ergebnis ist, unabhängig von der Anzahl der Filterpapierblättchen, nur etwas mehr als die Hälfte des Ergebnisses mit Serum.
- Das Verwenden von fünf Blättchen bringt gegenüber der Verwendung von weniger

Blättchen keine Vorteile, solange das Verhältnis von Pufferlösung zur Anzahl der Blutblättchen gleich bleibt.

- Die Menge von 200 μl Puffer stellt das absolute Minimum an zu verwendenden Puffer dar. Dabei muss man berücksichtigen, dass die Blättchen jeweils noch in der Lage sind Pufferlösung zu resorbieren. Verwendet man weniger als 200 μl Pufferlösung treten arbeitstechnische Schwierigkeiten beim Abpipettieren auf.

Nun gibt es zwei Möglichkeiten, die im geschilderten Versuch offenbar zu niedrig gewählte Konzentration zu erhöhen.

1. Entweder erhöht man die Anzahl an Filterpapierblättchen oder
2. man verringert die Menge an verdünnendem Puffer.

Da bei der Lösungsvariante mit einem Filterpapierblättchen die Menge an zugegebenem Puffer nicht weiter reduziert werden kann, ohne Pipettierfehler in Kauf zu nehmen, muss folglich die Anzahl der Filterpapierblättchen erhöht werden.

Dazu wird Blut von einer weiteren Patientin untersucht, wobei diesmal pro Probe jeweils zwei Filterpapierblättchen verwendet wurden. Die Patientin hatte diesmal einen Serumwert von 1337 U/ml und in der Filterpapiermethode ergaben sich folgende Ergebnisse:

Konzentration (Blättchen / μl)	2/220	2/240	2/260	2/280	2/300	2/320	2/340	2/360
Filterpapierwert (U/ml)	287	471	359	318	321	262	195	302
Serumwert (U/ml)	1337	1337	1337	1337	1337	1337	1337	1337

Tabelle 3.2.: Vergleich der Filterpapierwerte bei steigender Konzentration und Einsatz von 2 Filterpapierblättchen

Schlussfolgerungen:

- Auch bei der Benutzung von zwei Filterpapierblättchen und einer gleichbleibend niedrigeren Puffermenge (Verdünnung wie bei Patient 1) und damit einer fast doppelt so hohen Konzentration (1:11) sind die Ergebnisse der Filterpapiermethode wesentlich geringer als die der Referenzmethode.
- Das erste und das letzte Ergebnis fallen aus der erwarteten Reihe heraus (fallende Werte mit fallender Konzentration bzw. steigendem Pufferanteil).

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse ist eine weitere Konzentrationserhöhung in den Proben erforderlich, um ein Ergebnis zu erzielen, was mehr dem Ergebnis der Serummethode und damit den tatsächlichen Verhältnissen des Patienten entspricht. Da eine Verringerung der verdünnenden Puffermenge aus den oben ausgeführten arbeitstechnischen Gründen nur schwer möglich ist, wird die Anzahl der Filterpapierblättchen erneut um eines erhöht.

Die Patientin wies diesmal in der Serummethode einen Wert von 2906 U/ml auf.

Es wurden in dieser Versuchsmodifikation 3 und mehr Filterpapierblättchen je Probe benutzt. Die entsprechenden Abstufungen in Blättchenanzahl und Puffermenge ergeben sich dabei aus den jeweiligen Konzentrationen, wobei angenommen wurde, dass pro Blättchen 10 μ l Blut in Lösung gehen. Das heißt, 5 Blättchen in 200 μ l entsprechen einer Konzentration von 50:200 oder 1:4. Dieses System wurde in Zwischenschritten fortgeführt bis zu einer Konzentration von 1:16 (das entspricht 3 Blättchen in 480 μ l Pufferlösung).

Konzentration (Blättchen/ μ l)	5/200	4/240	3/240	3/300	3/360	3/420	3/450	3/480
Filterpapierwert (U/ml)	5503	4944	4451	3752	3459	2195	2023	1906
Serumwert (U/ml)	2906	2906	2906	2906	2906	2906	2906	2906

Tabelle 3.3.: Vergleich der Filterpapierwerte bei Einsatz von mehreren Filterpapierblättchen und steigender Konzentration

Schlussfolgerungen

1. In dieser Versuchsmodifikation waren die Ergebnisse der Filterpapiermethode erstmalig höher als das entsprechende Serumergebnis.
2. Die zu erwartende Linearität der Ergebnisse, (mit fallender Konzentration jeweils einen niedrigeren Wert zu erhalten) war gegeben.
3. Die Ergebnisse, die dem Ergebnis der Serummethode am nächsten kamen waren die mit jeweils drei Filterpapierblättchen. Bezogen auf die Konzentration lag das beste Ergebnis zwischen 1:12 und 1:13. Die optimale Filterblättchenanzahl liegt demnach bei drei Blättchen pro Probe, die optimale Verdünnung muss in einer gesonderten Versuchsreihe gefunden werden.

3.4.2. Verdünnungsreihen zur Ermittlung des optimalen Blut/Puffer- Verhältnisses

Nachdem die optimale Filterpapierblättchenanzahl auf drei festgelegt wurde, gilt es nun die richtige Puffermenge im Sinne der optimalen Lösung der Blutstropfen vom Filterpapier zu ermitteln. Es gilt dabei die Modifikation ausfindig zu machen, die mit ihrem Wert dem der Referenzmethode am nächsten kommt. Dabei ist gleichzeitig auf eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu achten.

Da in der Versuchsmodifikation zur Ermittlung der Filterpapierblättchenanzahl die ideale Konzentration zwischen 1:12 und 1:14 lag, liegt es nahe, zunächst die Konzentration von 1:13 zu überprüfen.

Da möglicherweise mit Schwankungen dieser Konzentration in Abhängigkeit von der absoluten Antikörperanzahl des Patienten gerechnet werden muss, wird diese Verdünnungsstufe nicht solitär betrachtet sondern in einer Verdünnungsreihe geprüft. Dazu wurden jeweils drei Filterpapierblättchen von Patienten mit unterschiedlichen Antikörpertitern in einer unterschiedlichen Puffermenge gelöst und das jeweilige Ergebnis mit dem Ergebnis der Referenzmethode verglichen. Die Puffermenge ergibt sich dabei aus der Überlegung, dass pro Blättchen, dass in der Lage ist etwa $15 \mu\text{l}$ Vollblut zu absorbieren, ca. $10 \mu\text{l}$ Vollblut in Lösung gehen. Das heißt, bei Verwendung von drei Blättchen und einer Konzentration von 1:10 ergeben sich $300 \mu\text{l}$ Puffer.

Konzentration (Blättchen / μl)	3/300	3/360	3/390	3/420	3/450
Filterpapiermethode (U/ml)	3132	3158	2812	2765	2994
Serummethode (U/ml)	2848	2848	2848	2848	2848

Tabelle 3.4.: Verdünnungsreihe Patient 1

Patient 1 steht stellvertretend für eine optimale Verdünnungsstufe bei einer Konzentration von 1:13 (d.h. 3 Blättchen in $390\mu\text{l}$), Patient 2 hingegen repräsentiert optimale Verdünnung bei 1:10 (d.h. 3 Blättchen in $300\mu\text{l}$).

In der Folge soll nun festgestellt werden, welche der beiden Verdünnungsstufen repräsentativere Ergebnisse liefert. Aus diesem Grund sind explizit diese beiden Verdün-

Konzentration (Blättchen / μl)	3/240	3/300	3/360	3/390	3/420	3/450	3/480
Filterpapiermethode (U/ml)	3499	2949	2240	2296	2025	1903	1894
Serummethode (U/ml)	2906	2906	2906	2906	2906	2906	2906

Tabelle 3.5.: Verdünnungsreihe Patient 2

nungsstufen miteinander verglichen worden. Jeweils drei Tropfkreise von Patienten mit unterschiedlich hohen Antikörpertitern wurden in $300\mu\text{l}$ Pufferlösung und in $390\mu\text{l}$ Pufferlösung aufgelöst und das Ergebnis im Gamma- Counter gemessen und mit den Ergebnissen der Referenzmethode verglichen.

Patient	Filterpapiermethode (3B/300 μl) in(U/ml)	Filterpapiermethode (3B/390 μl) in(U/ml)	Serummethode in(U/ml)
1	13334	9872	15725
2	164	78	189
3	528	400	2902
4	180	151	285
5	4636	3703	11653
6	9115	9380	10916
7	926	1013	1726
8	4828	4564	5548
9	3247	5180	11407
10	0,1	0,1	0,1

Tabelle 3.6.: Vergleich der Verdünnung (1:13) und der Verdünnung (1:10) für 10 Patienten mit unterschiedlichen Antikörperwerten in der Referenzmethode

Bei den Patienten 6, 7 und 9 sind die Ergebnisse für die Verdünnung mit $300\mu\text{l}$ sind die Ergebnisse einer Nachuntersuchung⁵ entnommen und ihre Werte deshalb vergleichsweise

⁵Nachuntersuchungen wurden mit dem identischen Probenmaterial zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt, sowie bei Ergebnissen, deren Werte extrem abweichend vom erwarteten Wert waren. Mit Hilfe der Nachuntersuchungen sollte festgestellt werden, ob eine methodische Unsicherheit vorliegt oder ein arbeitstechnischer Fehler (z.B. Pipettierfehler) die Ursache bildet. In diesen Fällen konnte mit der selben Probe zu einem späteren Zeitpunkt ein besseres Ergebnis erzielt werden, weshalb wahrscheinlich ursprünglich ein Pipettierfehler o.ä. zugrunde lag. Der Nachteil einer Nachuntersuchung ist, dass das Ergebnis niedriger ist als es bei einem regulären Durchlauf vermutlich gewesen wäre, da inzwischen

geringer ausgefallen.

Ansonsten zeigt die Darstellung, dass die Verdünnung mit 300 μl der Verdünnung mit 390 μl überlegen ist, da das Ergebnis jeweils näher an dem der Referenzmethode lag. Aus diesem Grund soll nun mit Verdünnungen um 300 μl weiter experimentiert werden.

Zusätzlich wurde noch die Verdünnung mit 290 μl überprüft, aber obwohl die Ergebnisse noch ein wenig dichter an den Serumergebnissen lagen, wurde mit Rücksicht auf eine ökonomische Nutzung von Test-Kitts bzw. Patientenproben, eine übersichtliche Arbeitsanleitung und eine leichte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, auf eine Anpassung der Verdünnungsstufe in Zehnerschritten und Fünferschritten verzichtet.

Patient	1	2	3	4	5	6
Filterpapiermethode (300 μl) (U/ml)	140	9999,99	118	4689	900	3388
Filterpapiermethode (290 μl) (U/ml)	230	9999,99	102	9999,99	895	4151
Serummethode (U/ml)	268	12882	161	11166	893	8657

Tabelle 3.7.: Verdünnungsreihe in 300 μl und 290 μl Pufferlösung

Ziel der Modifikationen ist es, den Assay der Firma Medipan zwar auf optimale Empfindlichkeit, aber auch auf entsprechende Reproduzierbarkeit und im Sinne einer Arbeitserleichterung zu modifizieren. Diesen Forderungen wird man mit einer Puffermenge von 300 μl leichter gerecht, weil sich so Fehler vermeiden lassen, die sich durch die unübliche Menge an Puffer (die sich ohnehin nur mit einer entsprechend verstellbaren Pipette überhaupt erreichenden lässt) ergeben könnten. Der Vorteil, minimal näher am Serumergebnis zu liegen, relativiert sich durch den Grenzwert von 40 U/ml, der entweder deutlich überschritten oder erheblich unterschritten wurde (auch bei Ergebnissen, die nahe am Grenzwert lagen ergab sich mit der 300 μl - Verdünnung kein Fall, in dem die Filterpapiermethode ein anderes Ergebnis im Sinne von pos./neg. aufwies als die Serummethode). Diagnostische Konsequenzen hat nur die Überschreitung oder Unterschreitung dieses Grenzwertes (40 U/ml). Weiter interessant ist zur Beurteilung, ob ein Patient sehr hohe oder nur grenzwertige TPO- AK Titer aufweist. Zur Beurteilung einer Tendenz liegt immer ein Vergleichstitler vor, der allerdings mit der selben Methode bestimmt sein muss.

die Lagerung an der Probe gezehrt hat.

Der absolute Wert, der ja als Folge der Spontanität des radioaktiven Zerfalls Schwankungen unterliegt, ist für die Diagnose nicht von Bedeutung. Deshalb können die Ergebnisse, die mit einer Verdünnung von 300 μl erreicht wurden, hinreichend genau interpretiert werden.

3.4.3. Einfluss der Inkubationszeit

Da bei der Bestimmung mit Filterpapier nicht die gleichen kinetischen Bedingungen gelten wie bei einer Bestimmung der TPO-AK aus Serum, ist der Einfluss der Inkubationszeit auf die Sensitivität des Assays untersucht worden.

Die Inkubationszeiten sind von 10 min, 30 min, 60 min, 2 h, 4 h bis hin zur 24 h -Inkubation variiert worden. Dabei sind die Proben max. 30 min durchmischt worden. Die Inkubation hat immer bei Zimmertemperatur (22°C) stattgefunden.

Inkubationszeit (min)	10	30	60	120	240	1440
Filterpapierwert, Patient 1 (U/ml)	5655	6866	5820	7599	8271	5919
Filterpapierwert, Patient 2 (U/ml)	4295	5325	6844	3062	4292	6647

Tabelle 3.8.: Einfluss der Inkubationszeit auf die Anzahl der Antikörper

In diesen Kinetikversuchen wurde festgestellt, dass es möglich ist, durch eine längere Inkubationszeit eine größere Zählrate und damit auch eine höhere Konzentration an Antikörpern nachzuweisen.

Die Anzahl der Antikörper ist nach einer Inkubationszeit von 10 min deutlich geringer als nach einer Inkubationszeit von 30 min. Letzteres Ergebnis ist dem der Referenzmethode näher, und deshalb dem Ergebnis nach 10 min Inkubation vorzuziehen. Offensichtlich ist der Vorgang des Lösens der Blutbestandteile und damit auch der TPO-AK nach 10 min noch nicht abgeschlossen.

Nach 60 min hingegen wurde im Fall von Patient 2 eine Erhöhung der gemessenen Werte festgestellt, die aber bei Patient 1 nicht festgestellt werden konnte. Ferner muss man bemerken, dass die zusätzlichen 30 min zu Lasten der Praktikabilität gehen und damit der Gewinn von einem etwas höheren Wert der Wartezeit von einer Stunde gegenübersteht. Wobei hier ausdrücklich darauf hingewiesen sei, dass die Werteveränderung

in keinem Fall so groß gewesen ist, dass sich daraus diagnostische Konsequenzen ergeben hätten. Die gleichen Folgen zeigt eine Erhöhung der Inkubationszeit auf zwei, vier bzw. 24 Stunden. Auch hier stehen den möglicherweise höheren Antikörperwerten Zeitverluste beim Ansatz entgegen.

Im Rahmen der Vorversuchsreihen ist ebenfalls ermittelt worden, dass das in Lösung gehen des Blutes vom Filterpapier in die Pufferlösung nach ca. 20 min abgeschlossen ist (Kontrolle der Aktivität nach 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 1 d, 4 d). Die Ergebnisse der Vorversuche bestätigen also zusätzlich die oben gezogenen Schlüsse. Da die Konzentration in den Vorversuchen jedoch eine andere war, sind die Ergebnisse nicht direkt miteinander zu vergleichen und sollen hier deshalb nicht zusätzlich aufgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich also anmerken, dass die Werte der Filterpapiermethode nach einer 30 min überschreitenden Inkubationszeit, geringfügig höher sind als solche, die nach 30 min gemessen wurden. Allerdings entspricht der Wert nach 30 min annähernd dem Endergebnis, und die Praktikabilität der Methodik wird durch die vergleichsweise kurze Inkubationszeit nachhaltig erhöht.

3.4.4. Verwendung von Antikoagulanzen

Der Einfluss von Antikoagulanzen auf die Testergebnisse der Trockenblutproben musste festgestellt werden, da zu internen Kontrollzwecken im Rahmen der Versuchsreihen (z.B. Verdünnung der Filterpapierblättchen) nicht immer reines Vollblut, sondern auch mit Antikoagulanzen vermisches Blut verwendet wurde. Dies geschah rein aus Praktikabilitätsgründen. Zum einen konnten so von einem Patienten mehrere Filterpapierkarten betroffen werden, und zum anderen konnten so Proben von Patienten untersucht werden, bei deren Routineblutabnahme gerade keine Filterpapierkarte zur Hand war.

Zur Prüfung der Auswirkung von Antikoagulanzen wurde bei der Blutabnahme zunächst bei sieben Patienten der Klinik für Nuklearmedizin jeweils Blut ohne Zusatz auf Filterpapierkarten getropft. Vom jeweils gleichen Patienten wurde anschließend Blut in ein EDTA-Röhrchen getropft, und so mit EDTA versetztes Blut gewonnen. Anschließend wurde das Blut aus den EDTA-Röhrchen auf Filterpapierkarten aufgetropft, um möglichst ähnliche Versuchsbedingungen wie bei der Filterpapiermethode zu schaffen. Danach wurde jeweils eine Doppelbestimmung mit dem direkt aufgetropften Blut ohne Zusätze und mit dem später aus dem EDTA-Röhrchen aufgetropftem Blut durchgeführt. Als Referenzwert dient der Wert, der mit Hilfe von Patientenserum bestimmt wurde.

reines Vollblut (U/ml)	9381	9999	1013	0,1	3058	3388	2195
EDTA-Blut (U/ml)	8644	9999	1599	31,6	2812	4151	2023
Serummethode (U/ml)	10917	11407	1726	0,01	2848	8657	2906

Tabelle 3.9.: Einfluss der Antikoagulanzen auf die Anzahl der Antikörper

In der Auswertung der oben aufgeführten Ergebnisse zeigte sich eine durchschnittliche Abweichung von 28%. Die Untersuchungen zeigen, dass bei der Verwendung von EDTA-Proben statt reinen Vollblutproben eine geringfügige Abweichung besteht. Für die Routinediagnostik ist der Einsatz von aufgetropftem EDTA-Blut ohne Bedeutung. Eine Rolle spielt diese Abweichung nur für die selbst hergestellten Trockenblutproben aus EDTA-Blut von Patienten, die als Proben für Versuchsreihen in dieser Arbeit verwendet wurden. Da es aus rein praktischen Beweggründen notwendig war, mit solchen EDTA-Proben zu arbeiten, sollte diese Variation entsprechend berücksichtigt werden.

3.4.5. TPO-AK Verteilung im Trockenblutfleck

Untersuchungen von Höpfner, 2001 [31] zum Auftropfen von Blut auf Filterpapierkarten haben ergeben, dass es dabei zu einer ungleichen Verteilung von TSH-Konzentrationen vom Zentrum des Filterpapiertropfens gegenüber dessen Randbereich kommt. Die TSH-Konzentration in den Randbereichen ist relativ zum Zentrum erhöht. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem sogenannten Chromatographie-Effekt. Aus diesem Grund empfiehlt es sich einen ausreichend großen Stanzdurchmesser zu wählen, um repräsentative Analysenergebnisse zu erzielen. Der Stanzdurchmesser beträgt in dieser Arbeit von 6,5 mm. Da der Stanzdurchmesser dennoch etwas Spielraum innerhalb der Tropfkreise einräumt, ist geprüft worden, ob eine ähnliche Konzentrationsdifferenz auch für TPO-AK vorliegt.

Zu diesem Zweck wurden drei Proben von drei unterschiedlichen Patienten jeweils exakt mittig und sehr randständig ausgestochen. In der folgenden Tabelle ist die relative Verteilung von TPO-AK in Trockenblutflecken von drei Patientenproben mit verschiedenen Konzentrationen an TPO-AK dargestellt.

Bei den Patienten 1 und 3 sind die TPO- AK- Konzentrationen am Rand niedriger gegenüber der Konzentration, die in der Mitte des Tropfkreises gemessen wurde. Nur im

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Zentrale Probe (U/ml)	100	1826	5681
Periphere Probe (U/ml)	68	1967	5180
Serummethode (U/ml)	178	2034	5548

Tabelle 3.10.: Verteilung der TPO-Antikörper im Trockenblutfleck: Vergleich von zentralen und peripheren Probennahmen

Falle von Patient 2 ist der AK- Wert am Rand relativ zur Mitte erhöht. Bei diesen Beobachtungen weichen die Werte nicht so stark ab, wie es bei den TSH-Konzentration, die am Rand deutlich höher ist als in der Mitte, der Fall gewesen ist [31]. Möglicherweise ist das unterschiedliche Verteilungsmuster von TSH-AK und TPO-AK im Trockenblutblättchen auf die unterschiedliche Größe der Antikörper-Moleküle zurückzuführen. Denkbar ist auch, dass der Stanzdurchmesser im TSH-Versuchsaufbau kleiner gewählt wurde und die Unterschiede zwischen Rand und Mitte der Blättchenfläche deshalb deutlicher zum Tragen kommen. Der Chromatographie-Effekt spielt jedoch in diesem Versuchsaufbau nur eine vernachlässigbare Rolle.

3.4.6. Lagerung und Lagerfähigkeit der Filterpapierkarten

Um den Einfluss der Lagertemperatur und der Lagerzeit auf die Filterpapierproben zu untersuchen, wurden Filterpapierkarten mit aufgetropftem Vollblut bei Zimmertemperatur (22°C), im Kühlschrank (4°C) und im Tiefkühlschrank (-30°C) aufbewahrt.

Untersucht wurden drei Filterpapierkarten von verschiedenen Patienten mit unterschiedlichen TPO-AK-Werten unter den unterschiedlichen Lagertemperaturen am Probenentnahmetag und jeweils drei Wochen später. Die Bestimmungen wurden als Einzelbestimmungen durchgeführt; als Vergleichswert dient der Serumwert der Patienten.

Die folgenden Proben stammen alle von Patienten des Zentrums für Kinderheilkunde der Universität Bonn. Bei diesen Proben liegen zwischen dem Entnahmedatum und dem Untersuchungsdatum ein Zeitraum von mindestens einem halben und höchstens einem ganzen Jahr (siehe Tabelle 3.12). Als Vergleichswert dient der am Probenentnahmetag bestimmte Serumwert. Der Untersuchungswert wurde mit Hilfe der Filterpapiermethode ermittelt.

Patientenprobe	1	2	3
Filterpapiermethode nach max. 6 h Lagerung (U/ml)	8589	246	7859
Filterpapiermethode nach 3 Wochen Lagerung (U/ml) bei 20°C	6666	158	5015
Filterpapiermethode nach 3 Wochen Lagerung (U/ml) bei 4°C	7021	193	5930
Filterpapiermethode nach 3 Wochen Lagerung (U/ml) bei -20°C	7101	203	7270
Serummethode (U/ml)	9345	357	8467

Tabelle 3.11.: Einfluss der Lagerung auf die Anzahl der Antikörper

Patient	Ergebnis der Serummethode am Entnahmetag (+2 Tage) (U/ml)	Ergebnis der Filterpapiermethode Lagerungsdauer 6-12 Monate bei Zimmertemperatur (U/ml)
1	1174	172
2	188	33
3	9999	5067
4	9999	3640
5	4072	505
6	2308	404
7	468	12
8	7231	591
9	6719	562
10	19125	618
11	23	3125

Tabelle 3.12.: Grenzen der Lagerfähigkeit der Filterpapierkarten

Bei sehr langen Lagerzeiten (Zeiträumen zwischen einem halben Jahr und einem Jahr) und einer Lagerung bei Zimmertemperatur sinkt der TPO-AK-Wert deutlich. Trotzdem ist es bei den folgenden Proben nicht zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen gekommen. Da die Veränderung der Werte aber groß ist, könnte es, insbesondere bei grenznahen Werten, zu falschen Interpretationen kommen. Von einer Probenlagerung

über eine Zeitspanne die länger als drei Wochen dauert bei Zimmertemperatur, muss deshalb abgeraten werden.

4. Ergebnisse

Die hier aufgeführten Ergebnisse beruhen auf insgesamt 147 Messungen, die in dem zweijährigen Untersuchungszeitraum in dem Labor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Friedrich Wilhelm Universität in Bonn mit beiden Messmethoden parallel durchgeführt wurden. Die TPO-AK von 47 Patienten sind als positiv einzustufen (Tabelle 4.1). Das bedeutet, dass bei diesen Patienten eine immunogene Erkrankung der Schilddrüse vorlag. Die Ergebnisse der 21 TPO-negativen Patienten ergeben sich aus Tabelle 4.2.

Ausgenommen von den Betrachtungen wurden die im Kapitel 3.4.6 und in der Tabelle 3.12 aufgeführten 11 Messungen zur Grenze der Lagerfähigkeit der Filterpapierkarten. Die Proben, auf die hier Bezug genommen wird, stammen aus der Kinderklinik der Universität Bonn. Sie waren interessant bezüglich der sehr langen Lagerungszeit, aber in Folge derselben waren die Abweichungen der Ergebnisse von den Ergebnissen der Serummethode zu groß. Aus diesem Grund sind diese Ergebnisse in einer gesonderten Gruppe zusammengefasst, in der es ausschließlich um die Lagerfähigkeit von Filterpapierkarten geht.

Methodisch wurden die bekannten Ergebnisse nach der Serummethode mit den Ergebnissen der Filterpapiermethode verglichen. Dazu wurde wie bereits im Abschnitt Methoden beschrieben, das Vollblut auf die Filterpapierkarten getropft, die Tropfkreise ausgestanzt und jeweils drei Tropfkreise in 300 μl Puffer aufgelöst. Im Anschluss wurde der Radioimmunoassay der Firma Medipan gemäß den Herstellerangaben durchgeführt, und danach im Gamma-Counter gemessen. Die Serummethode wurde als sogenannter Gold-Standard gewertet. Die Bewertung der Filterpapiermethode richtet sich ausschließlich daran aus und berücksichtigt dabei nicht die Fehler der Referenzmethode.

Patienten, deren TPO-AK-Titer bei weniger als 40 U/ml lag, wurden als TPO-negativ bezeichnet, Ergebnisse über 50 U/ml wurden als positiv bewertet. Diese Grenze ergibt sich aus den Herstellerangaben für den Radioimmunoassay, der für Patientenserum ausgelegt ist, und diese Grenze hat sich auch für die Filterpapiermethode als richtig herausgestellt.

Patient	Serumwert (U/ml)	Filterpapierwert (U/ml)
p1	129	223
p2	161	118
p3	178	100
p4	189	164
p5	246	193
p6	268	140
p7	285	181
p8	357	158
p9	364	279
p10	384	995
p11	428	949
p12	894	900
p13	1337	1321
p14	1726	1599
p15	2035	1340
p16	2622	1166
p17	2848	2812
p18	2903	528
p19	2906	2949
p20	3259	3247
p21	3464	2057
p22	3828	435
p23	3990	3073
p24	4111	2095
p25	5549	4828
p26	5807	5803
p27	6340	6473
p28	6806	2722
p29	6974	5325
p30	8234	6105
p31	8466	7858
p32	8657	4921
p33	9289	5684
p34	9345	8589
p35	9505	982

Patient	Serumwert (U/ml)	Filterpapierwert (U/ml)
p36	10000	10000
p37	10000	5700
p38	10917	9115
p39	10980	4377
p40	11167	10000
p41	11408	5180
p42	11564	6866
p43	11653	4635
p44	12882	10000
p45	13034	13950
p46	13122	11924
p47	15726	13334

Tabelle 4.1.: Übersicht über die TPO-positiv getesteten Patienten mit Filterpapier- und Serummethode

4.1. Methodenvergleich

Für 68 Proben von Patienten wurde im Rahmen der experimentellen Arbeit der TPO-AK-Wert mittels der Serummethode gemessen. Danach wurden diese entsprechend der Aufteilung nach positivem und negativem TPO-AK-Nachweis gruppiert und numeriert¹. Die identische Probe wurde danach dem Filterpapierverfahren unterzogen. Das Ergebnis ist dann mit dem Ergebnis der Serummethode als Wertepaar zusammen der Patientennummer zugeordnet. Alle Proben, die im Serumverfahren positiv getestet wurden, haben auch im Filterpapierverfahren das gleiche qualitative Ergebnis geliefert, allerdings gab es quantitative Abweichungen. Entsprechend verhielt es sich mit negativen Ergebnissen der Serummethode. Daher gibt es keine widersprüchlichen Ergebnisse, d.h. unterschiedliche Zuordnungen eines Wertepaares zur positiven und negativen Ergebnisgruppe in Abhängigkeit vom verwendeten Verfahren.

Aus technischen Gründen lautet in 19 der 21 negativ getesteten Proben das Ergebnis beider Methoden 0,01 U/ml. Dies ist auf die funktionale Assay-Sensitivität zurückzuführen. Beim CentAK anti-TPO-Test, der hier als Goldstandard eingesetzt wird, sind die

¹px ist der positive Patient x , ny der negative Patient y .

Patient	Serumwert (U/ml)	Filterpapierwert (U/ml)
n1	0,01	0,01
n2	0,01	0,01
n3	0,01	0,01
n4	0,01	0,01
n5	0,01	0,01
n6	0,01	0,01
n7	0,01	0,01
n8	0,01	0,01
n9	0,01	0,01
n10	0,01	0,01
n11	0,01	0,01
n12	0,01	0,01
n13	0,01	0,01
n14	0,01	0,01
n15	0,01	0,01
n16	0,01	0,01
n17	0,01	0,01
n18	0,01	0,01
n19	0,01	0,01
n20	0,01	30
n21	29	31

Tabelle 4.2.: Übersicht über die TPO-negativ getesteten Patienten mit Filterpapier- und Serummethode

Werte unterhalb von 15 U/ml mit einem Variationskoeffizienten $>10\%$ (Intraassay) und einer Schwankung von Tag zu Tag von 20% im Interassay behaftet. Damit sind Werte unterhalb von 15 U/ml außerhalb der statistischen Sicherheit, die nach dem Qualitätsmanagement (GLP) gefordert ist, und damit nicht mehr sicher von null zu unterscheiden. Aus diesem Grund werden Konzentrationen < 15 U/ml als 0,01 U/ml angegeben. Konzentrationen die jedoch größer als 15 U/ml sind, genügen der statistischen Sicherheit und werden somit als absolute Zahlenwerte wiedergegeben.

Eine Probe weist in der Filterpapiermethode einen signifikant höheren Wert auf (n20) und ein weiterer Fall zeigte einen erhöhten Messwert (n21), allerdings ist in beiden Methoden die relative Abweichung kleiner 10%. Da mehr als 90% der negativen Proben,

aus den oben erläuterten Gründen, qualitative und quantitative Identität aufweisen, und der mathematisch signifikante Stichprobenumfang dadurch auf 2 schrumpft, wurde die Stichprobe mit negativen TPO-AK Nachweis keiner weiteren statistischen Betrachtung unterzogen. Es bleibt aber festzuhalten, dass der negative Nachweis in allen 21 Fällen bei beiden Methoden zur identischen Diagnose geführt hat. Daher werden alle folgenden Betrachtungen ausschließlich auf den positiven TPO-AK-Nachweis bezogen.

4.2. Quantitativer Vergleich

4.2.1. Deskriptive Betrachtung

Im ersten Schritt werden nun die Methoden der deskriptiven Statistik angewendet um die Merkmale der beobachteten Grundgesamtheit darzustellen. Bei den Merkmalen handelt es sich um absolute, kontinuierliche und nichtnegative Größen unbekannter Verteilung. Die in Tabelle 4.3 dargestellten statistische Kenngrößen ergeben sich dabei.

Kennzahl	Serumwert (U/ml)	Filterpapierwert (U/ml)
Minimum	129	100
Maximum	15726	13950
Arithmetisches Mittel μ	5667	4072
Median	4111	2949
Standardabweichung s	4664	3863
Intervallbreite	15597	13850

Tabelle 4.3.: Deskriptive Kennzahlen der Serum- und der Filterpapiermethode im Vergleich

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, dass die Serummethode im Vergleich zur Filterpapiermethode im Mittel wie auch bezüglich des Medians einen um 1200 bis 1600 U/ml höheren Messwert aufweist. Diese Merkmalsausprägung wird allerdings durch große absolute Abweichungen bei Patienten mit hohen Serumwerten (Abb. 4.1) verzerrt. Bei relativer Betrachtung mit dem Ergebnis der Serummethode als Basiswert für jedes Wertepaar, ergibt sich aber ein deutlich geringerer Wert von 19% für den Mittelwert. Im Vergleich liegt der Mittelwert bei 28 % bei absoluter Betrachtung. Damit kann gefolgert werden, dass die Filterpapiermethode gegenüber der Serummethode im allgemeinen zu einem Unterschätzen des TPO-AK Wertes führt. Der geringere Fehler bei relativer Messung, lässt eher auf einen Bias-Fehler als auf eine lineare Verzerrung schließen. Der relative Fehler liegt dabei im Mittel bei ca. $1/5$ der Merkmalsausprägung der Serumme-

thode.

Da kein Messergebnis der Serummethode oder der Filterpapiermethode in signifikanter Nähe zum Grenzwert des Cent-AK TPO Verfahrens von 40 bzw. 50 U/ml aufgetreten ist, bestand nicht die Gefahr einer Fehldiagnose hinsichtlich einer Erkrankung des Patienten. Allerdings kann die Abweichung von $1/5$ nach unten z.B. bei einem kritischen Serummethodenwert von 50 U/ml zu einem statistisch zu erwartendem Wert von 40 U/ml bei der Filterpapiermethode führen, d.h. zu widersprüchlichen diagnostischen Ergebnisse. Diese Problematik endet allerdings bereits bei einem Serummethodenmesswert von 63 U/ml, da dann der erwartete Ergebniswert der Filterpapiermethode auf Basis des Unterschiedes der Mittelwerte auch einen Messwert von > 50 U/ml ausgibt.

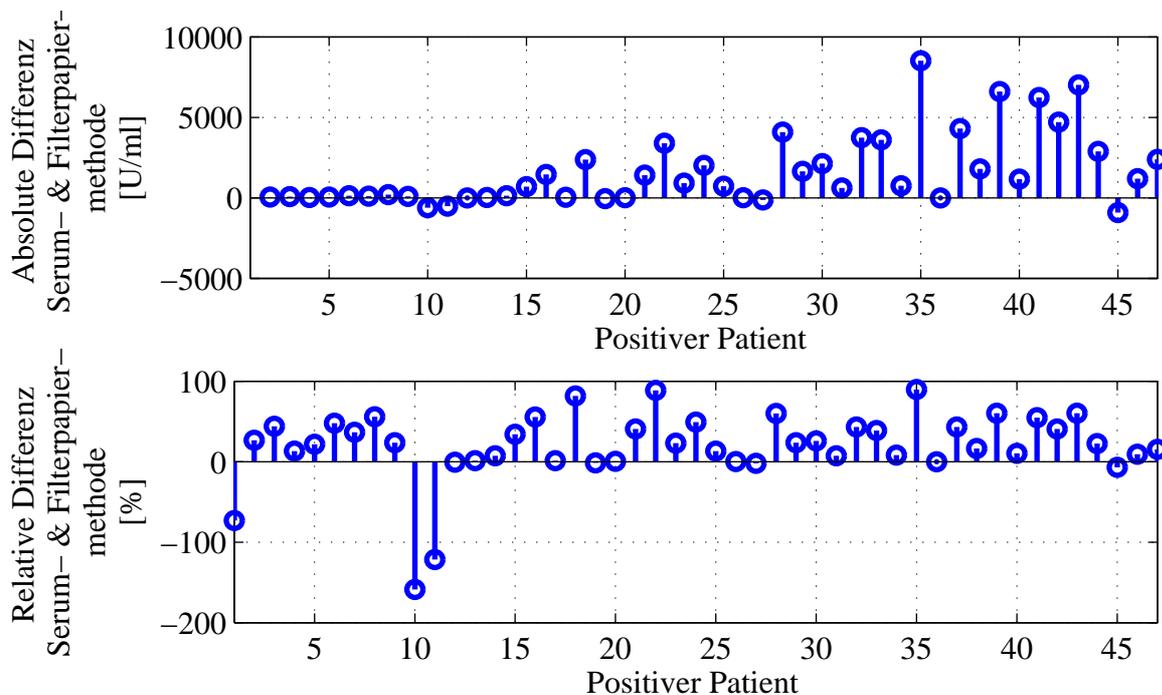


Abbildung 4.1.: Differenz aus Serum- und Filterpapiermethode

Bei Verwendung des Mittelwertes ergibt sich damit eine relative Varianz zwischen beiden Methoden von ca. 20% wobei nach Herstellerangaben die Intraassay-Varianz bei einem Testset bereits bei 10% liegt. Das relativiert die Einschränkung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse deutlich hinsichtlich der Existenz eines Fehlers innerhalb des CentAK. Daher kann auf Basis der deskriptiven Daten nicht mit Sicherheit von einer systematischen Verzerrung ausgegangen werden.

4.2.2. Regressionsanalyse

Im nächsten Schritt wird eine Regressionsanalyse beider Merkmalsausprägungen durchgeführt. Über der x-Achse ist dabei in Abb. 4.2 das Ergebnis der Filterpapiermethode, über der y-Achse das Ergebnis der Serummethode aufgetragen. Das Diagramm ist linear in beiden Dimensionen. Jeder Punkt stellt dabei ein Wertepaar dar. Die Regressions-

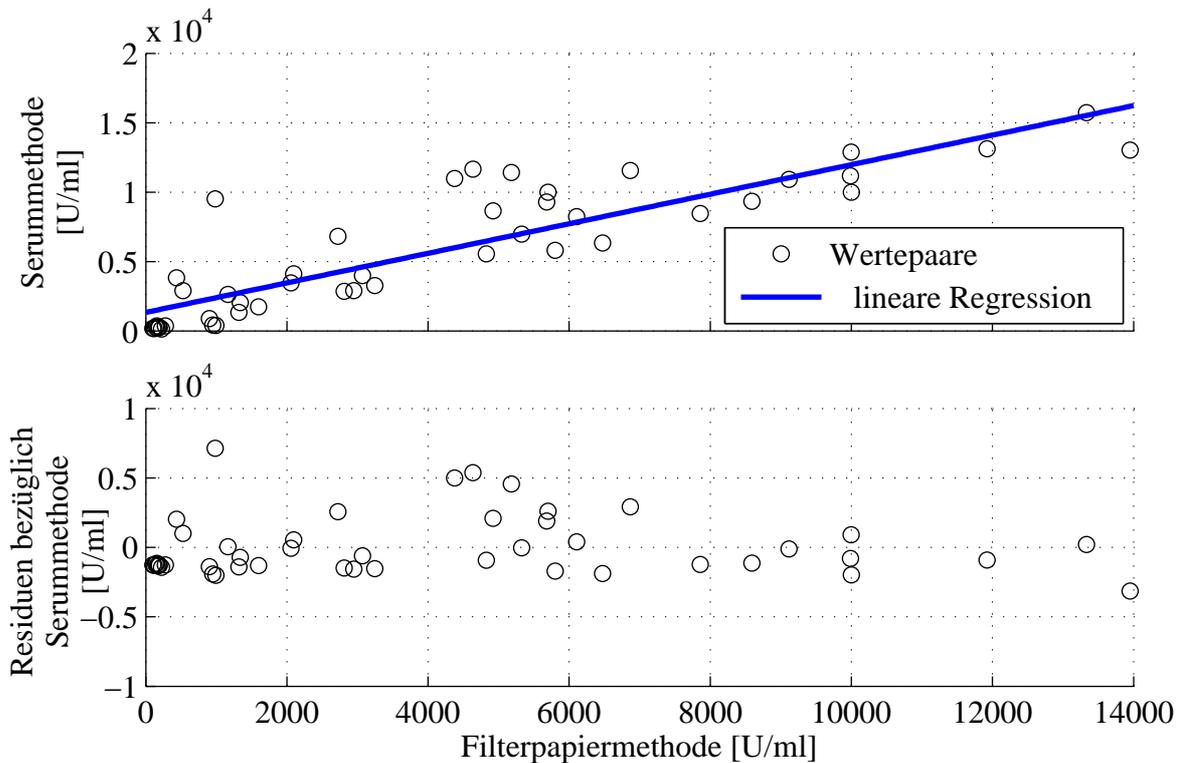


Abbildung 4.2.: Lineare Regression bezüglich der Wertepaare und Residuen

kurve als Schätzung der Funktion $f_{\text{Serum}}(x_{\text{Filter}})$, wobei f_{Serum} der abhängige Wert der Serummethode in U/ml und x_{Filter} unabhängige Werte der Filterpapiermethode in U/ml ist, hat dabei die Form

$$f_{\text{Serum}}(x_{\text{Filter}}) = 1,0643x_{\text{Filter}} + 1332,6 \text{ U/ml}. \quad (4.1)$$

Analog zur deskriptiven Betrachtung nach Kap. 4.2.1 ergibt sich wieder ein absoluter Versatz (Bias) von 1332,6 U/ml zwischen beiden Methoden, ausgedrückt durch den Achsenabschnitt der Regressionskurve. Dies ist analog zum deskriptiven Teil ein signifikanter Fehler für kleine Messergebnisse. Dieser resultiert aber aus der Betrachtung in vertikaler Richtung. Neben der Abweichung beim Achsenabschnitt ist eine extreme Linearität zwischen beiden Methoden festzustellen, da der Wert des Regressionskoeffizienten a der Geraden mit 1,064 sehr nahe an der Winkelhalbierenden liegt.

Entsprechend ergibt sich der empirische Korrelationskoeffizient als

$$r = a \frac{s_{\text{Filter}}}{s_{\text{Serum}}} = 0,8813. \quad (4.2)$$

Damit ist ein positiver, linearer, stochastischer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden gegeben. Hauptursache für diese Abweichung vom Idealwert 1 ist der Bias in der Regressionskurve, da mit dem Regressionskoeffizienten von 1,064 nahezu eine optimale Linearität vorliegt. Der empirische Korrelationskoeffizient ist eine Invariante des Problems, da er sich genauso aus der Regression von Filterpapier- über Serummethode ergeben hätte. Daher kann der Korrelationskoeffizient Aufschluss über die Güte des Zusammenhanges zwischen beiden Messreihen geben, unabhängig davon, welche Größe als abhängige und unabhängige Größe gewählt wird. Die Residuen

$$e_i = \bar{f}(x_i) - f(x_i) \quad (4.3)$$

mit $f(x_i)$ als tatsächlicher Wert an der Stelle x_i und $\bar{f}(x_i)$ als durch die Regressionskurve gebener Wert an x_i , sind in der unteren Hälfte von Abb. 4.2 dargestellt. Die euklidische Norm der Residuen ergibt

$$\|e\|_2 = \sqrt{\sum_i e_i^2} = 14938 \text{ U/ml} \quad (4.4)$$

wobei $e = [e_1, e_2, \dots, e_{47}]$ sei.

Der umgekehrte, zeichnerisch nicht dargestellte Fall der Regression mit dem Serummethodenwert als unabhängige Größe, und dem Filterpapiermethodenwert als abhängige Größe (KQ-Verfahren mit horizontaler Abstandsminimierung in Abb. 4.2) ergibt

$$f_{\text{Filter}}(x_{\text{Serum}}) = 0,72998x_{\text{Serum}} - 64,663\text{U/ml} \quad (4.5)$$

mit

$$\|e\|_2 = 12372 \text{ U/ml}. \quad (4.6)$$

Dabei ist der Regressionskoeffizient im Vergleich zu (4.1) mit 0,72998 deutlich weiter von der Winkelhalbierenden entfernt. Allerdings ist der Bias zwar negativ, aber über 20 mal geringer als im umgekehrten Fall. Ursache für diesen Unterschied ist die größere Standardabweichung bei der Serummethode, die zu einer Verstärkung des Effektes für kleine Messwerte führt, und damit die Regressionskurve zum Ursprung hin nach unten versetzt. Zudem ergeben sich bei der Filterpapiermethode nur 5 Messwerte kleiner als 250 U/ml, dagegen bei der Serummethode 8 in diesem Intervall. Dies führt zu einer Ballung der Messwerte auf der Ordinate und durch die gleichmäßige Gewichtung zu einem Abrutschen der Regressionsgerade und einer Drehung mit dem Uhrzeigersinn. Die euklidische

Norm der Residuen ist dabei deutlich geringer, was auf eine bessere Approximation hindeutet. In Abhängigkeit von der Definition der unabhängigen bzw. abhängigen Variablen ergibt sich daher entweder ein dominanter Fehler hinsichtlich idealer Linearität durch einen Bias oder eine lineare Verzerrung.

Die Autokorrelationen sind mit den Quadraten der Standardabweichungen in 4.3 gegeben ($\text{Var}(x_{\text{Filter}})$ und $\text{Var}(x_{\text{Serum}})$). Die Kreuzkorrelation wurde implizit bereits durch den empirischen Korrelationskoeffizient gegeben, es gilt

$$r = \frac{\text{Cov}(x_{\text{Serum}}, x_{\text{Filter}})}{\sqrt{\text{Var}(x_{\text{Filter}})\text{Var}(x_{\text{Serum}})}} \quad (4.7)$$

wobei r auch als normierte Kovarianz bezeichnet wird. Die Kovarianz

$$\text{Cov}(x_{\text{Serum}}, x_{\text{Filter}}) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{\text{Filter}} - \bar{x}_{\text{Filter}})(x_{\text{Serum}} - \bar{x}_{\text{Serum}}) \quad (4.8)$$

$$= 1,5881 \cdot 10^7 (\text{U/ml})^2 \quad (4.9)$$

mit $n = 47$ ergibt eine normierte Kovarianz von $r = 0,8813$ - wie auf Grund des Invariantencharakters nichts anders zu erwarten war. Damit variieren beide Meßreihen gleichläufig.

Die maximale normierte Kovarianz ($|r| \leq 1$) ergibt sich bei einer Skalierung beider Datensätze mittels Logarithmus zur Basis e zu

$$r_{\log_e} = 0,9202. \quad (4.10)$$

Polynomiale Skalierungen (x^n) erreichen dagegen nur mittels eines Optimierungsverfahrens bezüglich des Exponenten eine derartige Güte.

Daher werden die sämtliche Daten mit dem \log_e skaliert. Damit ergeben sich die Daten der Tabelle 4.4. Die beiden Regressionskurven haben dann die Gleichungen

$$f_{\text{Filter}}^{\log}(x_{\text{Serum}}^{\log}) = 0,90849x_{\text{Serum}}^{\log} + 0,35826\text{U/ml} \quad (4.11)$$

$$f_{\text{Serum}}^{\log}(x_{\text{Filter}}^{\log}) = 0,93216x_{\text{Filter}}^{\log} + 0,88343\text{U/ml}. \quad (4.12)$$

Die euklidischen Normen der Residuen ergeben sich zu

$$\|e\|_{2_{\log}} = 3,9378 \log \text{U/ml} = 8665,6 \text{U/ml} \quad (4.13)$$

bzw.

$$\|e\|_{2_{\log}} = 3,9889 \log \text{U/ml} = 9474,7 \text{U/ml} \quad (4.14)$$

Log. Kennzahl	Serumwert (U/ml)	Filterpapierwert (U/ml)
Minimum	4,858	4,606
Maximum	9,663	9,543
Arithmetisches Mittel μ_l	7,949	7,58
Median	8,322	7,989
Standardabweichung s_l	1,503	1,484
Intervallbreite	4,805	4,937

Tabelle 4.4.: Deskriptive logarithmische Kennzahlen der Serum- und der Filterpapiermethode im Vergleich

für $f_{\text{Filter}}^{\log}(x_{\text{Serum}}^{\log})$ bzw. $f_{\text{Serum}}^{\log}(x_{\text{Filter}}^{\log})$. Die Linearität ist in beiden Fällen unterproportional gegenüber der Winkelhalbierenden, konvergiert aber in beiden Fällen deutlich stärker gegeneinander. Beide Geradensteigungen sind kleiner eins sowie beide Achsabschnitte sind positiv und ca. mit den Faktor 2,5 multiplikativ verknüpft (im Vgl. zu ca. 20 im nichtskalierten Fall). Dies führt zu einem überproportionalen Schätzverhalten für kleine Messwerte und einem unterproportionalen Verhalten gegenüber der perfekt linearen Lösung. Die euklidischen Normen sind in beiden Fällen deutlich kleiner als im unskalierten Fall und geben daher einen weiteren Hinweis auf die bessere Güte der logarithmisch skalierten Daten.

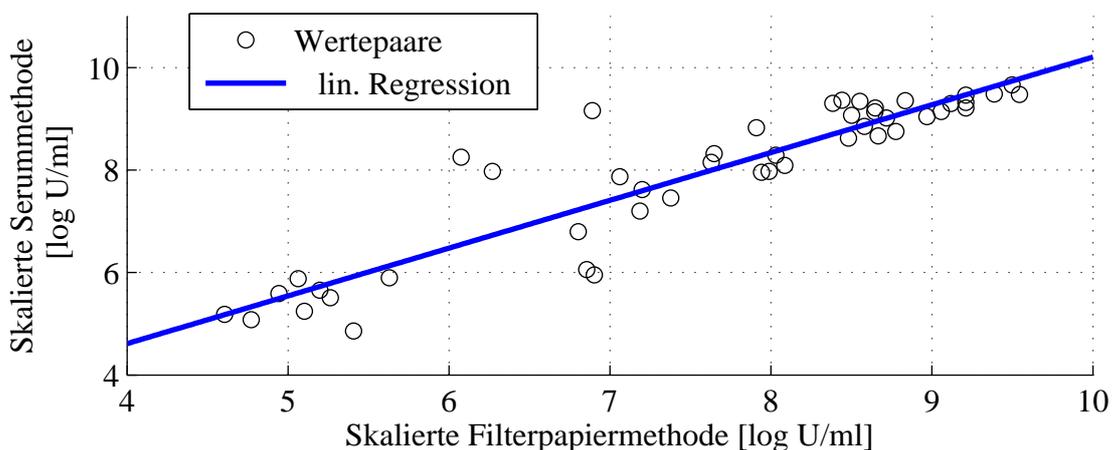


Abbildung 4.3.: Lineare Regression bezüglich der logarithmisch skalierten Wertepaare

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß aus der unskalierten Betrachtung sowohl auf einen rein statischen Bias als auch auf eine lineare Verzerrung geschlossen werden kann. Dabei unterschätzt die Filterpapiermethode die Serummethode hinsichtlich der

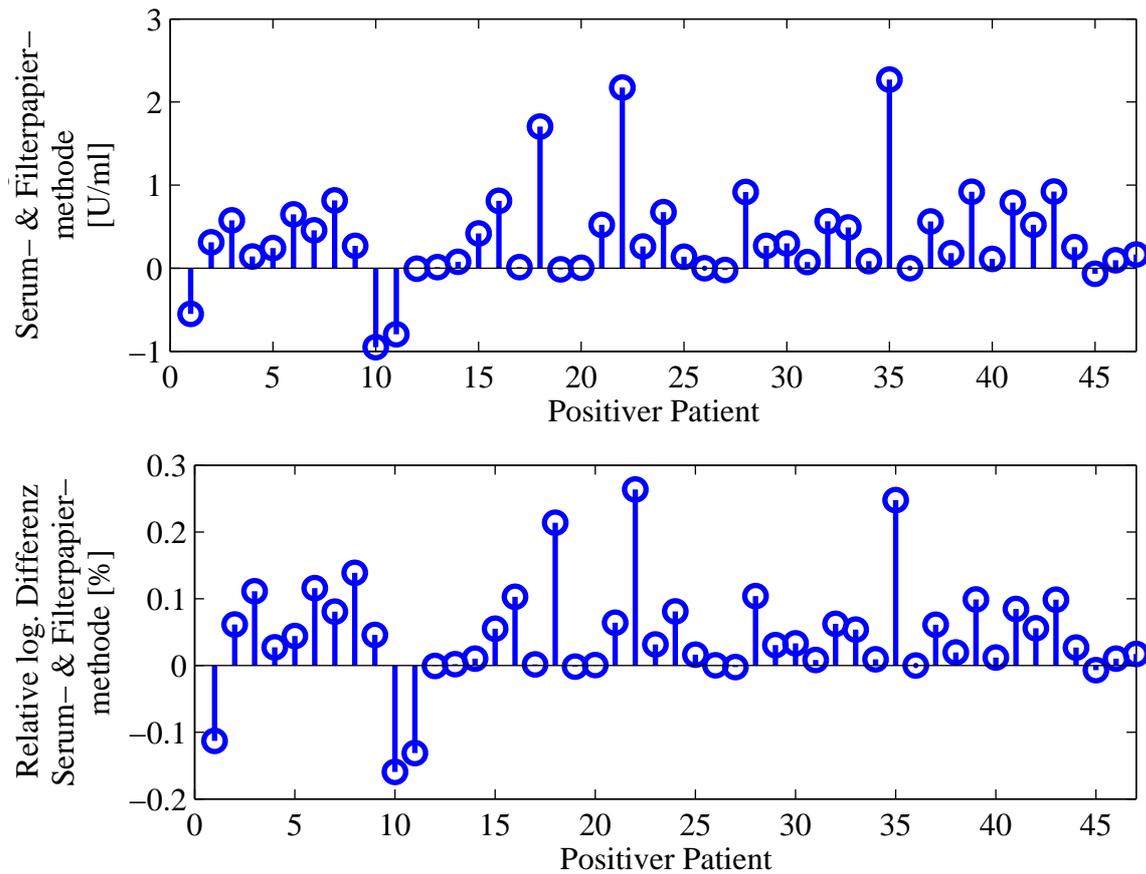


Abbildung 4.4.: Logarithmische Differenz aus Serum- und Filterpapiermethode

deskriptiven Kennzahlen. Die Verzerrung bewegt sich im relativen Mittel um ca. 20% der Meßergebnisse und liegt in der doppelten Größenordnung der Intraassayvarianz bezogen auf den CentAK Anti-TPO. Der beste Zusammenhang bezüglich der Kreuzkorrelation bzw. der normierten Kovarianz ergibt sich für einen logarithmisch skalierten Datensatz. Dabei ergibt sich dann ein übereinstimmendes Bild aus Kombination aus statischen Bias und linear unterproportionaler Verzerrung der Daten im Vergleich beider Meßreihen. Die absolute normierte Kovarianz ist aber mit über 0,92 signifikant hoch, die euklidische Norm der Residuen signifikant niedrig.

4.2.3. Induktive Betrachtung

4.2.3.1. Anpassungstest

Im folgenden soll mittels eines χ^2 -Anpassungstest gezeigt werden, daß die Ergebnisse der positiven Meßreihen als normalverteilt angenommen werden können um dann damit später Aussagen über den Zusammenhang beider Stichproben machen zu können. Dazu müssen die Daten entsprechend der Tabelle 4.5 klassifiziert werden. Als Konfidenzintervall gilt 0,05. Die Hypothesen lauten demnach:

i	Definitionsbereich	h_{iS}^0 : Anzahl Serummethode	h_{iF}^0 : Anzahl Filterpapiermethode
1	$x < 1000$ U/ml	12	15
2	$1000 < x < 3000$ U/ml	7	9
3	$4000 < x < 5000$ U/ml	5	6
4	$5000 < x < 7500$ U/ml	5	8
5	$7500 < x < 10000$ U/ml	8	6
6	$x > 10000$ U/ml	10	3

Tabelle 4.5.: Klassifizierung der positiv getesteten Patienten gemäß Tab. 4.1

H_0 : Die Meßreihen der Serummethode und der Filterpapiermethode sind normalverteilt.
 H_A : Die Meßreihen der Serummethode und der Filterpapiermethode sind nicht normalverteilt.

Als Prüfgrößen ergeben sich in diesem Fall

$$\chi_S^2 = \sum_{i=1}^6 \frac{(h_{iS}^0 - h_{iS}^e)^2}{h_{iS}^e} \quad (4.15)$$

$$\chi_F^2 = \sum_{i=1}^6 \frac{(h_{iF}^0 - h_{iF}^e)^2}{h_{iF}^e} \quad (4.16)$$

wobei h_{iF}^e die Werte gemäß Normalverteilung sind. Mit den Werten aus Tab. 4.3 kann eine standardisierte $N(0, 1)$ -Verteilung erzeugt werden durch

$$z_{iS}^0 = \frac{x_i^0 - \mu_S}{s_S} \quad (4.17)$$

$$z_{iF}^0 = \frac{x_i^0 - \mu_F}{s_F} \quad (4.18)$$

wobei x_i^0 die obere Klassengrenze ist. Die Tabelle 4.6 zeigt die numerischen Ergebnisse mit F_N als Normalverteilungsfunktion. Um auf die erwarteten absoluten Häufigkeiten h_{iS}^e, h_{iF}^e schließen zu können, die in der Prüfgröße benötigt werden müssen die relativen erwarteten Häufigkeiten f_{iS}^e, f_{iF}^e berechnet werden. Dabei gilt

$$f_{iS}^e = F_N z_{iS}^0 - F_N z_{(i-1)S}^0 \quad (4.19)$$

$$f_{iF}^e = F_N z_{iF}^0 - F_N z_{(i-1)F}^0 \quad (4.20)$$

mit $F_N(z_{0S}^0) = F_N(z_{0F}^0) = 0$. Die absoluten Häufigkeiten ergeben sich dann aus den relativen Häufigkeiten mit dem Stichprobenumfang $n = 47$ nach Tabelle 4.7. Damit können die Prüfgrößen berechnet werden. Allerdings verletzt die Klasse 6 bei der Filterpapiermethode die Anforderung einer erwarteten Merkmalsanzahl von ≥ 5 . Daher wird für

i	x_i^0	z_{iS}^0	z_{iF}^0	$F_N(z_{iS}^0)$	$F_N(z_{iF}^0)$
1	1000 U/ml	-1,0005	-0,7953	0,159	0,213
2	3000 U/ml	-0,5717	-0,2776	0,284	0,391
3	5000 U/ml	-0,1430	0,2402	0,443	0,595
4	7500 U/ml	0,3930	0,8873	0,653	0,813
5	10000 U/ml	0,9290	1,5345	0,824	0,938
6	∞ U/ml	∞	∞	1	1

Tabelle 4.6.: Werte der erwarteten Verteilungsfunktion für Serum- und Filterpapiermethode

i	f_{iS}^e	f_{iF}^e	h_{iS}^e	h_{iF}^e	h_{iS}^0	h_{iF}^0
1	0,159	0,213	7,451	10,021	12	15
2	0,125	0,177	5,885	8,340	7	9
3	0,159	0,204	7,493	9,599	5	6
4	0,210	0,218	9,855	10,230	5	8
5	0,171	0,125	8,023	5,875	8	6
6	0,175	0,062	8,243	2,935	10	3

Tabelle 4.7.: Werte der erwarteten relativen f_i^e und absoluten h_i^e erwarteten sowie beobachteten absoluten h_i^0 Häufigkeiten für Serum- und Filterpapiermethode

die Klassierung der Filterpapiermethode die Klasse 6 der Klasse 5 zugeschlagen. Damit sind alle anderen Klassierungen groß genug um mit den diskreten Werten weiter zu rechnen, ansonsten hätte auf die kontinuierliche Betrachtung des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest ausgewichen werden müssen. Die Freiheitsgrade für die χ^2 -Verteilung ergeben sich dann zu $\nu = k - m - 1$ mit k als Anzahl der Klassierungen, m als Anzahl der geschätzten Parameter der Stichprobe (Mittelwert und Standardabweichung) zu $\nu_S = 3$ für die Serummethode und $\nu_F = 2$ für die Filterpapiermethode. Aus einer Berechnung der χ^2 -Verteilung zum geg. Konfidenzintervall ergeben sich die kritischen Grenzwerte

$$\chi_{kS}^2 = 7,815 \quad (4.21)$$

$$\chi_{kF}^2 = 5,991. \quad (4.22)$$

Die Auswertung der Prüfgrößen unter Einbeziehung der verringerten Klassenanzahl bei den erwarteten Häufigkeiten der Filterpapiermethode ergeben im Vergleich dazu

$$\chi_S^2 = 6,561 \quad (4.23)$$

$$\chi_F^2 = 4,364. \quad (4.24)$$

Da in beiden Fällen $\chi^2 < \chi_k^2$ gilt kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Im folgenden wird daher eine Normalverteilung der Meßreihen unterstellt.

4.2.3.2. Unabhängigkeitstest

Im nächsten Schritt soll anhand des χ^2 -Unabhängigkeitstests die Unabhängigkeit beider Meßreihen geprüft werden. Dazu wird die bekannte Kontingenztabelle (Tab.4.8) verwendet. h_{iS}^0 ist dabei Anzahl der Beobachtungen bei der Serummethode, die in die Klassierung i nach Tab. 4.5 fallen, für h_{iF}^0 gilt das entsprechende. Als Konfidenzintervall wird abermals 0,05 verwendet. Die Hypothesen lauten:

	h_{1F}^0	h_{2F}^0	h_{3F}^0	h_{4F}^0	h_{5F}^0	h_{6F}^0	Σ	$f(S_i)$
h_{1S}^0	12	0	0	0	0	0	12	$\frac{12}{47}$
h_{2S}^0	3	4	0	0	0	0	7	$\frac{7}{47}$
h_{3S}^0	0	5	0	0	0	0	5	$\frac{5}{47}$
h_{4S}^0	0	0	5	0	0	0	5	$\frac{5}{47}$
h_{5S}^0	0	0	1	5	0	0	6	$\frac{6}{47}$
h_{6S}^0	0	0	0	3	3	6	12	$\frac{12}{47}$
Σ	15	9	6	8	3	6	47	1
$f(F_i)$	$\frac{15}{47}$	$\frac{9}{47}$	$\frac{6}{47}$	$\frac{8}{47}$	$\frac{3}{47}$	$\frac{6}{47}$	1	

Tabelle 4.8.: Kontingenztabelle zum Unabhängigkeitstest

H_0 : Beide Versuchsreihen sind voneinander unabhängig.

H_A : Beide Versuchsreihen sind voneinander abhängig.

Die Prüfgröße ist diesem Fall die erwartete Häufigkeit $f(S_i)$ die sich aus der Zeilensumme (rechte Spalte) geteilt durch die Zahl der Erhebungen n ergibt. Für die Filterpapiermethode gilt das Entsprechende. Die Gleichungen

$$f(S_i) = \frac{\sum_{\text{Zeile}} h_{iS}^0}{47} \quad (4.25)$$

$$f(F_i) = \frac{\sum_{\text{Spalte}} h_{iF}^0}{47} \quad (4.26)$$

geben daher die oben beschriebenen relativen Häufigkeiten an. Mit dem Multiplikationssatz für unabhängige Ereignisse, der auf Basis der Hypothese der Unabhängigkeit angewendet wird ergibt sich die relative Häufigkeit einer Merkmalskombination ($S_i \cap F_i$) als

Produkt aus den relativen Häufigkeiten

$$S_i \cap F_i = \frac{\sum_{\text{Zeile}} h_{iS}^0}{47} \frac{\sum_{\text{Spalte}} h_{iF}^0}{47}. \quad (4.27)$$

Daraus läßt sich die absolute erwartete Häufigkeit

$$h_{S_i, F_i}^e = \frac{\sum_{\text{Zeile}} h_{iS}^0 \sum_{\text{Spalte}} h_{iF}^0}{47}. \quad (4.28)$$

durch Multiplikation mit n ableiten. Da die Tabelle 4.8 eine nach unten verschobene Bandstruktur besitzt ergibt sich bei den erwarteten Häufigkeiten nach Tabelle 4.9 ein ganz anderes Bild, denn diese ist voll besetzt. Die Prüfgröße

	h_{1F}^e	h_{2F}^e	h_{3F}^e	h_{4F}^e	h_{5F}^e	h_{6F}^e	\sum
h_{1S}^e	3, 830	2, 298	1, 532	2, 043	0, 766	1, 532	12
h_{2S}^e	2, 234	1, 340	0, 894	1, 191	0, 447	0, 894	7
h_{3S}^e	1, 596	0, 957	0, 638	0, 851	0, 319	0, 638	5
h_{4S}^e	1, 596	0, 957	0, 638	0, 851	0, 319	0, 638	5
h_{5S}^e	1, 915	1, 149	0, 766	1, 021	0, 383	0, 766	6
h_{6S}^e	3, 830	2, 298	1, 532	2, 043	0, 766	1, 532	12
\sum	15	9	6	8	3	6	

Tabelle 4.9.: Relative Häufigkeit der Merkmalskombinationen zum Unabhängigkeitstest

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 \frac{(h_{ij}^0 - h_{ij}^e)^2}{h_{ij}^e} \quad (4.29)$$

und beträgt 137,2838. Die χ^2 -Verteilung hat dabei $\nu = 25$ Freiheitsgrade. Damit beträgt der kritische Grenzwert $\chi_k^2 = 37,6525$ und es gilt $\chi^2 > \chi_k^2$. Man kann daher nicht annehmen, daß beide Versuchsreihen voneinander unabhängig sind, was der Grundannahme des Experimentes entspricht.

4.2.3.3. Homogenitätstest

Abschließend soll die Hypothese verifiziert werden, daß beide Versuchsreihen der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Als Signifikanzniveau wird abermals $\alpha = 0,05$ verwendet. Die Hypothesen lauten:

H_0 : Beide Versuchsreihen entstammen der gleichen Grundgesamtheit.

H_A : Beide Versuchsreihen entstammen nicht der gleichen Grundgesamtheit.

i	h_{iS}^0	h_{iS}^e	h_{iF}^0	h_{iF}^e
1	12	13,5	15	13,5
2	7	8	9	8
3	5	5,5	6	5,5
4	5	6,5	8	6,5
5	8	7	6	7
6	10	6,5	3	6,5

Tabelle 4.10.: Tatsächliche und erwartete Häufigkeiten zum Homogenitätstest

Die erwarteten absoluten Häufigkeiten ergeben sich indem die die Anzahl Patienten in Tabelle 4.5 gleichmäßig über beide Gruppen aufteilt. Damit ergibt sich Tab. 4.10. Die Prüfgröße ist identisch zu (4.29) mit $\nu = 25$ Freiheitsgraden und $\chi_k^2 = 37,6525$. Die Prüfgröße folgt damit zu $\chi^2 = 5,421$. Damit kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Beide Versuchsreihen entstammen der gleichen Grundgesamtheit muß mit $\alpha = 0,05$ angenommen werden.

4.2.3.4. Zweistichprobentest für die absolute Differenz arithmetischer Mittel bei verbundenen Stichproben

Die Stichprobe der Tabelle 4.1 ist verbunden, da beide Meßreihen aus der gleichen Grundgesamtheit erhoben wurden, d.h. aus jeweils ein- und derselben Probe. Es seien x_{Si} bzw. x_{Fi} das i -te unskalierte Meßergebnis der Serum bzw. Filterpapiermethode. Die Testverteilung wird dadurch abgeleitet, daß angenommen wird, daß die Messwerte Realisationen von normalverteilten Zufallsvariablen X_{Si} bzw. X_{Fi} seien. Damit sind aber auch die Differenzen $D_i = X_{Si} - X_{Fi}$ und die durchschnittliche Differenz

$$\bar{D} = \frac{1}{47} \sum_{i=1}^{47} D_i \quad (4.30)$$

normalverteilt. Die Schätzfunktion für die unbekannte Varianz der Differenzen lautet

$$\sigma_D = \frac{1}{46} \sum_{i=1}^{47} (D_i - \bar{D})^2. \quad (4.31)$$

Die studentverteilte Prüfgröße mit $\nu = 46$ Freiheitsgraden folgt damit zu

$$T = \frac{\bar{D} - E(X_{Si}) + E(X_{Fi})}{\sqrt{\sigma_D/47}}. \quad (4.32)$$

Die Nullhypothese lautet dann entsprechend:

H_0 : Die Meßergebnisse beider Meßreihen sind im absoluten Mittel identisch ($E(X_{Si}) -$

$E(X_{Fi}) = 0$) (kein Bias).

Damit folgt die Alternativhypothese:

H_A : Die Filterpapiermethode unterschätzt den Meßwert im absoluten Mittel ($E(X_{Si}) - E(X_{Fi}) > 0$) (Bias).

Als Signifikanzniveau wird $\alpha = 0,05$ angenommen.

Unter diesen Annahmen ist die Prüfgröße

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\sigma_d/47}} = 4,931. \quad (4.33)$$

mit $\bar{d} = 1594,5$ U/ml und $\sigma_d = 4.9130 \cdot 10^6$ (U/ml)². Aus Tabellen kann der kritische Grenzwert $t_k = 1,678$ abgelesen werden. Da $t > t_k$ muß die Nullhypothese abgelehnt werden. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, daß die Meßergebnisse beider Meßreihen identisch sind, die Serummethode ergibt demnach höhere Ergebnisse als die Filterpapiermethode zum Konfidenzintervall 0,05, was auch durch die deskriptiven Daten bestätigt wird.

Alternativ kann aber die Nullhypothese wie folgt formuliert werden:

H_0 : Die Meßergebnisse beider Meßreihen sind identisch konstant versetzt, die Filterpapiermethode unterschätzt die Serummethode um einen konstanten Wert ($E(X_{Si}) - E(X_{Fi}) = \delta$).

Unter sonst gleichen Annahmen ist das minimale δ mit dem die Nullhypothese noch angenommen werden kann

$$t_k > \frac{\bar{d} - \delta}{\sqrt{\sigma_d/47}} \quad (4.34)$$

bzw.

$$\delta > \bar{d} - \sqrt{\sigma_d/47}t_k = 1052 \text{ U/ml}. \quad (4.35)$$

Damit muß um die Nullhypothese annehmen zu können von einer Differenz bezüglich der Mittelwerte in der Größenordnung von ca. 1050 U/ml zwischen Serummethode und Filterpapiermethode ausgegangen werden. Eine obere Grenze zum Konfidenzintervall 0,05 ergibt sich bei analoger Berechnung mit negativen t_k zu 2137 U/ml für die Differenz der Mittelwerte.

4.2.3.5. Zweistichprobentest für die relative Differenz arithmetischer Mittel bei verbundenen Stichproben

Wie bereits im deskriptiven Teil gezeigt ist die Intervallbreite bezogen auf den Minimalwert ca. mit dem Faktor 100 größer bei Betrachtung absoluter Zahlen. Daher wird anstatt der absoluten Differenz im Folgenden die relative Differenz $\tilde{D}_i = \frac{X_{Si} - X_{Fi}}{X_{Si}}$ verwendet. Bei analoger Verfahrensweise mit den Hypothesen H_0 : Die Meßergebnisse beider Meßreihen sind im relativen Mittel identisch ($\frac{E(X_{Si}) - E(X_{Fi})}{E(X_{Si})} = 0$) (kein lineare Verzerrung) und H_A : Die Filterpapiermethode verzerrt den Meßwert im relativen Mittel ($E(X_{Si}) - E(X_{Fi}) \neq 0$) (lineare Verzerrung) ergibt sich zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ unter diesen Annahmen ist die Prüfgröße

$$\tilde{t} = \frac{\tilde{d}}{\sqrt{\tilde{\sigma}_d/47}} = 3,332. \quad (4.36)$$

mit $\tilde{d} = 0,1976$ und $\tilde{\sigma}_d = 0,1652$. Da eine beidseitige Prüfung vorliegt (positive oder negative Verzerrung) ergibt sich $\tilde{t}_k = 2,013$. Da $\tilde{t}_k < \tilde{t}$ kann die Nullhypothese zu diesem Signifikanzniveau nicht angenommen werden.

Eine analoge Abschätzung zur Änderung der Nullhypothese ergibt in diesem Fall

$$\tilde{\delta} > \tilde{d} - \sqrt{\tilde{\sigma}_d/47} t_k \quad (4.37)$$

das Intervall $[0,0772, 0,318]$ bezüglich einer linearen Verzerrung des relativen Mittels. Zum Signifikanzniveau 0,05 kann daher die oben genannte Nullhypothese akzeptiert werden falls eine lineare Verzerrung in dem zuvor genannten Intervall vorausgesetzt wird.

Mit diesen beiden Zweistichprobentests bestätigen sich damit die Ergebnisse der deskriptiven Analyse und der Regressionsanalyse, die von einer Überlagerung von Bias und linearer Verzerrung ausgehen. Die Ergebnisse der deskriptiven Betrachtung entsprechen in etwa den Medianwertden der beiden Intervalle in denen die Nullhypothesen akzeptiert werden könnten.

Auf eine Betrachtung der logarithmierten Ergebnisse wurde verzichtet, da die Rechenregeln für Logarithmus-Funktionen auf diese auf Differenzen basierende Methode nicht angewendet werden können.

4.2.4. Präzision der Ergebnisse

Es wurden Tests zur Prüfung auf Präzision bei den Ergebnissen der Filterpapiermethode durchgeführt. Dabei wird die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse durch die Analyse

von Mehrfachansätzen einer Probe bestimmt. Die Streuung der Einzelmesswerte um ihren Mittelwert gilt als Maß für die Präzision der Methode, wobei zwischen Intraassay (Mehrfachansätze innerhalb eines Probendurchlaufes) und Interassay (Probendurchläufe zu verschiedenen Zeitpunkten) unterschieden wird.

Zur Ermittlung der Intraassayvarianz wurde von einem Patienten (p30) mit bekanntem Serumwert ($x_S = 8234$ U/ml) für TPO-AK Blut in ein EDTA-Röhrchen abgenommen und hinterher auf mehrere Filterpapierkarten aufgetropft. Die 10 identischen Proben wurden dann in einem Probendurchlauf gemessen. Zur Ermittlung der Interassayvarianz wurde jeweils eine Probe mit dem bekanntem p-30 Serumwert in 5 in einwöchigen Abständen aufeinander folgenden Ansätzen überprüft.

4.2.4.1. Intraassayvarianz

Beim Test der Intraassayvarianz ergaben sich die Ergebnisse nach Tabelle 4.11. Daraus

Patient	Filterpapierwert (U/ml): x_{ai}	$\frac{x_{F_{ai}} - \mu_{F_a}}{\mu_{F_a}}$	$\frac{x_{F_{ai}} - x_S}{x_S}$
a1	5549	-9,1207 %	-32,6087 %
a2	6246	2,2945 %	-24,1438 %
a3	6365	4,2434 %	-22,6986 %
a4	6278	2,8186 %	-23,7552 %
a5	5259	-13,8702 %	-36,1307 %
a6	6568	7,5681 %	-20,2332 %
a7	6586	7,8629 %	-20,0146 %
a8	5487	-10,1361 %	-33,3617 %
a9	6029	-1,2594 %	-26,7792 %
a10	6692	9,5989 %	-18,7272 %

Tabelle 4.11.: Meßergebnisse der Intraassayvarianzanalyse

ergibt sich ein Mittelwert von $\mu_{F_a} = 6105,9$ U/ml und eine Standardabweichung $s_{F_a} = 507,7$ U/ml sowie ein Median von $m_{F_a} = 6262$ U/ml. Die dritte und die vierte Spalte der Tabelle 4.11 ergibt die relative Abweichung in % bezüglich des Mittelwertes bzw. des Serumwertes x_S . Damit ergibt sich eine mittlere relative Abweichung von $\approx -25,84\%$ was den Ergebnissen der deskriptiven Betrachtung entspricht. Daraus folgt eine Intraassayvarianz von $\approx 8,1\%$.

Im nächsten Schritt soll die Intraclass Korrelation nach Bartko ermittelt werden. Dabei

gibt die Formel

$$\text{ICC} = \frac{\text{MSB} - \text{MSW}}{\text{MSB} + [C - 1]\text{MSW}} \quad (4.38)$$

den Korrelationskoeffizienten wieder. $C = 2$ ist die Zahl der Methoden, MSW der „mean square within subjects variance“ und MSB der „mean square between subjects variance“. Damit verknüpft der Ansatz nach Bartko die Konzepte von Kreuz- und Autokorrelation. Erstere ermittelt wie gut die Filterpapierergebnisse der Intraassaymethode mit den Ergebnissen der Serummethode zusammen passen, letztere dagegen wie gut die Autokorrelation innerhalb der 10 Filterpapierproben sind. Insgesamt gibt $N = 11$ Proben die ausgewertet wurden, diese wurden zu $k = 10$ Paaren zusammengesetzt.

Der gesamte Mittelwerte aus allen N Proben ergibt sich zu $\mu_{G_a} = 6299,4$ U/ml. Die Größen

$$\text{MSB} = \sum_i n_i (\mu_{i_a} - \mu_{G_a})^2 \quad (4.39)$$

$$\text{MSW} = \sum_i (N - k) s_{i_a}^2 \quad (4.40)$$

ergeben die beiden o.g. Rechengrößen. s_i ist dabei die Standardabweichung innerhalb einer der beiden $i = S, F$ Probenreihen, μ_{i_a} der Mittelwert innerhalb der Probenreihe und n_i der Umfang der Probenreihe. Es gilt $N = n_S + n_F = 1 + 10 = 11$. Dabei ist $\mu_{S_a} = x_S$ und $s_{S_a} = 0$. Es ergibt sich

$$\text{MSB} = 4.122.138,6(\text{U/ml})^2 \quad (4.41)$$

$$\text{MSW} = 257.759,29(\text{U/ml})^2. \quad (4.42)$$

Daraus folgt

$$\text{ICC}_a = 0,8822 \quad (4.43)$$

als Intraclasskorrelationskoeffizient nach Bartko. Die entsprechenden Standardabweichungen ergeben sich durch Division der mean square Werte durch Ihre Freiheitsgrade, d.h. $N - k$ innerhalb der Gruppe und $k - 1$ zwischen den Gruppen. Der Gesamtfreiheitsgrad ist damit $N - k + k - 1 = N - 1$. Zur Nullhypothese

H_0 : Die Mittelwerte der Meßreihen sind identisch. ergibt sich die Prüfgröße

$$F = \frac{\text{MSB}/(k - 1)}{\text{MSW}/(N - k)} = \frac{\text{MSB}/9}{\text{MSW}/1} = 1,777. \quad (4.44)$$

Mit dem Konfidenzintervall $\alpha = 0,05$ und den Freiheitsgraden 9, 1 ergibt sich der kritische Wert zu $F_k = 240,5$. Die Nullhypothese kann daher nicht abgelehnt werden.

Patient	Filterpapierwert (U/ml): x_{Fei}	$\frac{x_{Fei} - \mu_{Fe}}{\mu_{Fe}}$	$\frac{x_{Fei} - x_S}{x_S}$
e1	5549	-2,6867 %	-32,6087 %
e2	5853	2,6446 %	-28,9167 %
e3	6109	7,1341 %	-25,8076 %
e4	5985	4,9595 %	-27,3136 %
e5	5015	-12,0515 %	-39,0940 %

Tabelle 4.12.: Meßergebnisse der Interassayvarianzanalyse

4.2.4.2. Interassayvarianz

Analog zum Vorgehen bei der Intraassayvarianz wird die Interassayvarianz betrachtet. Die deskriptiven Kennzahlen lauten $\mu_{Fe} = 5702,2$ U/ml, $m_{Fe} = 5853$ u/ml und $s_{Fe} = 437$ U/ml. Die mittlere relative Abweichung beträgt $\approx -30,75\%$ und die Interassayvarianz $\approx 7,66\%$.

Der Korrelationskoeffizient mit $N = 6$, $k = 5$ und $C = 2$ gemäß (4.38) ergibt sich mit

$$\text{MSB} = 5.341.676(\text{U/ml})^2 \quad (4.45)$$

$$\text{MSW} = 190.969(\text{U/ml})^2. \quad (4.46)$$

sowie $\mu_{Ge} = 6124,2$ U/ml zu

$$\text{ICC}_e = 0,93. \quad (4.47)$$

Mit entsprechender Nullhypothese ergibt sich die Prüfgröße zu

$$F = \frac{\text{MSB}/4}{\text{MSW}/1} = 6,99. \quad (4.48)$$

Mit analogem Konfidenzintervall und $F_k = 224,6$ kann auch diese Nullhypothese nicht abgelehnt werden.

4.2.5. Zuverlässigkeit der Filterpapiermethode

Bei der Evaluation einer neuen Methode muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Methode falsch positive Ergebnisse liefert. Das bedeutet, dass der Test positiv ausfällt, obwohl keine TPO-AK vorliegen. Auch der umgekehrte Fall (negativer Test bei Vorliegen von TPO-AK), also falsch negative Ergebnisse, ist denkbar. Im Rahmen der Evaluation einer neuen Arbeitsmethode gilt es nun die Wahrscheinlichkeit solcher Fehlentscheidungen der Methode zu quantifizieren.

Dabei muss man berücksichtigen, dass der “wahre,, Zustand der Patienten (TPO-AK positiv oder TPO-AK negativ), nur mittels eines anderen Testverfahrens nachgewiesen werden kann. Dieses Testverfahren, das sich in der Routine bereits bewährt, hat nennt man auch Gold-Standard. In dieser Untersuchung wurde der Nachweis von TPO-AK durch einen Radioimmunoassay auf der Grundlage von Patientenserum als Gold-Standard benutzt.

Allerdings liefert der Radioimmunoassay auf Basis von Patientenserum, der hier als Referenzmethode verwendet wurde, nicht in allen Fällen eindeutige Ergebnisse. Laut [30] weisen 30% der Patienten mit Autoimmunthyreoiditis oder mit M. Basedow nur grenzwertige oder leicht erhöhte TPO-AK-Titer auf. Bei ca. 20% der Patienten mit einer nicht immunogenen Schilddrüsenerkrankung (beispielsweise Knotenstruma) sind ebenfalls leicht erhöhte bzw. grenzwertige Titer feststellbar. Selten wurde bei Schilddrüsengesunden (Frauen, älter als 60 Jahre) TPO-AK nachgewiesen.

Bei den hier vorliegenden Aussagen über die Zuverlässigkeit der Filterpapiermethode wurde diese nur an der Referenzmethode gemessen. Die genannten Ungenauigkeiten der etablierten Serummethode wurden dabei nicht berücksichtigt.

4.2.5.1. Spezifität der Filterpapiermethode

Die Spezifität eines Tests gibt die Wahrscheinlichkeit an mit der ein Gesunder als TPO-AK-negativ nachgewiesen wird. Sie ist also ein Maß für die Treffsicherheit eines Testverfahrens. Ein spezifischer Test wird keine TPO-AK nachweisen bei Patienten, die diese Antikörper nicht bilden. In einer Formel ausgedrückt kann dies durch

$$p_{\text{neg}} = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen}}{\text{Anzahl der richtig negativen plus falsch positiven}} \quad (4.49)$$

ausgedrückt werden. Dabei ist im Zähler die Anzahl der Gesunden mit negativen Test nach der Filterpapiermethode einzutragen. Im Nenner folgte die Anzahl der Gesunden mit negativen Test nach der Serummethode plus die Anzahl der Gesunden mit positiven Test nach der Filterpapiermethode.

Mit den Daten aus Tab. 4.13 ergibt sich eine Spezifität von $p_{\text{neg}} = 1$. Die Filterpapiermethode führt zur selben Einschätzung wie die Serummethode. Die Sensitivität der Gold-Standard-Methode ($p_{\text{neg}}^{\text{Gold}} = 0,815$) gilt daher gleichermaßen für die Filterpapiermethode.

TPO-AK	positiv Serumwert	negativ Serumwert
positiv Filterpapierwert	47	0
negativ Filterpapierwert	0	21

Tabelle 4.13.: Vierfelder-Tabelle

4.2.5.2. Sensitivität der Filterpapiermethode

Unter der Sensitivität eines Testes versteht man die Wahrscheinlichkeit, mit der man bei einem Patienten mit TPO-AK, diese auch positiv nachweist. In einer Formel ausgedrückt kann dies durch

$$p_{\text{pos}} = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{\text{Anzahl der richtig positiven plus falsch negativen}} \quad (4.50)$$

ausgedrückt werden. Dabei ist im Zähler die Anzahl der Erkrankten mit positiven Test nach Filterpapiermethode einzutragen. Im Nenner folgt die Summe aus Anzahl der Erkrankten mit positiven Test nach Serummethode und der Erkrankten mit negativen Test nach Filterpapiermethode. Man könnte also sagen dass die Sensitivität eines Testverfahrens dessen Empfindlichkeit angibt. Ist die Sensitivität einer Methodik hoch so ist das Risiko mit dieser Methode Kranke zu übersehen gering.

Mit den Daten aus Tab. 4.13 ergibt sich eine Sensitivität von $p_{\text{pos}} = 1$. Die Filterpapiermethode führt zur selben Einschätzung wie die Serummethode. Die Sensitivität der Gold-Standard-Methode ($p_{\text{pos}}^{\text{Gold}} = 0,923$) gilt daher gleichermaßen für die Filterpapiermethode.

4.2.5.3. Tetrachorische Korrelation

Da die Elemente der Tabelle 4.13 perfekt auf der Hauptdiagonalen liegen und alle Nebendiagonalelemente Null sind ergibt sich der Tetrachorische Korrelationskoeffizient

$$r_{\text{tet}} = \cos \frac{\pi}{1 + \sqrt{987/0}} \quad (4.51)$$

zu $\cos 0 = 1$, d.h. die dichotomen Merkmale bezüglich Serum- und Filterpapiermethode korrelieren perfekt. Dies läßt aber nur auf den Zusammenhang zwischen der Serum- und der Filterpapiermethode schließen. Für die gegebene Stickprobe vom Umfang 68 ergibt sich zwar perfekte Übereinstimmung. Falsche Testergebnisse der Serummethode im Vergleich auf die klinische Gesamtdiagnose werden daher von der Filterpapiermethode

genauso wiedergegeben. Daher ist die Filterpapiermethode hinsichtlich der tetrachorischen Korrelation zur Serummethode identisch, weist aber im Vergleich zur klinischen Gesamtdiagnose die gleichen Schwächen auf wie die Serummethode.

Der Fehler 1. Art zu der Nullhypothese "Beide Verfahren liefern identische Ergebnisse," kann mit Hilfe der χ^2 -Verteilung bestimmt werden. Dabei muß aber auf Grund der perfekten Korrelation das Signifikanzniveau gegen 0 gedrückt werden um den nötigen Wert in der einseitigen χ^2 -Verteilung mit einem (dichotom) Freiheitsgrad zu erhalten um die Nullhypothese zu verwerfen.

4.2.6. Referenzbereich

Die Klassifikation als richtig positiv und richtig negativ orientiert sich an der Empfehlung des Radioimmunoassay, bei dem Serumwerte größer 50 U/ml als positiv eingestuft werden. Stimmt die Klinik des Patienten mit diesem Ergebnis überein, kommt man, entsprechend der obigen Ausführungen, auf richtig positive Ergebnisse. Ist das Ergebnis nicht mit dem klinischen Zustand des Patienten vereinbar, so handelt es sich um ein falsch positives Ergebnis. Genauso verhält es sich bei den Ergebnissen die kleiner als 40 U/ml sind und dem Test zur Folge als negativ einzustufen sind. Auch hier entscheidet der Zustand des Patienten, oder ggf. Ergebnisse anderer Untersuchungen, über ein falsch oder richtig negatives Ergebnis.

Der vom Hersteller angegebene Referenzwert (mit dem Hinweis das ein jedes Labor diesen prüfen sollte) wurde für die Filterpapiermethode übernommen, nachdem sich in den Versuchsreihen ergab, daß so der Zustand des Patienten in den untersuchten richtig eingeschätzt wurde. Bei den 47 Proben, die anhand der Filterpapiermethode gemessen wurden, sind die Werte kleiner 40 U/ml als negativ oder Werte größer 50 U/ml als positiv kategorisiert worden.

Aus den Abbildungen zur Sensitivität und Spezifität wird ersichtlich, dass die Messung der Konzentration mit der Filterpapiermethode in 47 von 47 Fällen (100%) die gleiche diagnostische Einstufung erbringt wie die Messung der Serumkonzentration.

Auffällig sind jedoch vier Patienten, deren Antikörperkonzentrationen mit der Serummethode gemessen, über dem Referenzbereich liegen also positiv sind, deren Gesamtdiagnose aber nicht von einer immunogenen Erkrankung der Schilddrüse spricht. Trotzdem ergaben sich keine Fehleinschätzungen innerhalb dieser Studie, die sich nicht durch die Bestimmung mit Patientenserum ebenso ergeben hätten. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der dieser Stichprobe nur bedingt auf die Grundgesamtheit (die

Bevölkerung bzw. alle Patienten) geschlossen werden kann.

Teil II.

Veterinärmedizinischer Teil

5. Literatur

5.1. Vergleich der Schilddrüse der Katze mit der Schilddrüse des Menschen

Im Großen und Ganzen gelten für die Schilddrüse der Katze ähnliche Verhältnisse wie die für den Menschen beschriebenen. Dies gilt sowohl für den anatomischen und histologischen Bau der Schilddrüse, als auch für die Funktion der Schilddrüse sowie die physiologische Rolle der Schilddrüsenhormone (siehe Kap. 2.1 - 2.2).

Trotzdem gibt es einige Unterschiede, auf die an dieser Stelle eingegangen werden soll.

5.1.1. Vergleich der Anatomie

Die Bezeichnung Schilddrüse ist angelehnt an die anatomische Lage des Organs beim Menschen, wo sie tatsächlich auf dem Schildknorpel liegt. Bei der Katze liegt sie weiter distal den ersten 7-10 Trachealspangen dorsolateral auf. Bei vergrößerter Schilddrüse kann eine Palpation dadurch erschwert sein, dass das vergrößerte Organ ganz oder teilweise intrathorakal zu liegen kommt.

Die Schilddrüse der Katze ist wegen ihrer extrem flachen Form nur bei Vergrößerung zu palpieren. Sie ist etwa 2 cm lang aber nur 3-5 mm hoch. Ihr Gewicht beträgt durchschnittlich 80-120 mg pro kg Körpermasse [5, 23].

Die Schilddrüse der Katze stellt sich in zwei getrennten bilateralsymmetrischen Drüsenlappen dar, die an ihrem caudalen Ende nicht in jedem Fall durch einen 1-2 mm breiten, bindegewebigen Steg verbunden sind. Das heißt, es gibt keine direkte Verbindung des Drüsengewebes der beiden Schilddrüsenanteile. Während der Isthmus der Schilddrüse des Menschen eine aus Drüsengewebe bestehende Gewebebrücke darstellt, die den Lobus dexter mit dem Lobus sinister der Schilddrüse verbindet [45].

Die Katze verfügt nicht über eine kaudale Schilddrüsenarterie [44], die Hauptgefäßversorgung erfolgt über die kraniale Schilddrüsenarterie, A. thyroidea cranialis, die wie auch beim Menschen aus der A. carotis communis entspringt.

Der venöse Blutabfluss, die Lymphgefäße und die Innervation entsprechen anatomisch vergleichend den beschriebenen Verhältnissen beim Menschen (siehe Kap. 2.1.1).

Die Katze verfügt über sogenannte ektopische Schilddrüsenanteile, die bei einer Resektion der Schilddrüse für einen ausreichend hohen Spiegel an Schilddrüsenhormon sorgen können, sonst aber in der Regel hormonell inaktiv sind. Allerdings können diese verstreuten Schilddrüsenanteile, die von Brusteingang bis Herzbasis zu finden sind, genau wie die Schilddrüse selbst, tumorös entarten. Nachweisen kann man diese ektopischen Anteile mittels Szintigraphie, allerdings nur, wenn sie auch hormonell aktiv sind und somit Jod einlagern.

5.1.2. Vergleich der Physiologie

Der tägliche Jodbedarf der Katze für eine ausreichende Produktion an Schilddrüsenhormon beträgt 100 bis 150 μg /Katze [49]. Die Abläufe der Jodination, Jodisation, Hormonspeicherung und Hormonfreisetzung entsprechen denen beim Menschen. Allerdings ist die Menge an sezerniertem Schilddrüsenhormon bei der Katze größer als beim Menschen [9].

Nach der Sekretion des Thyroxins (T₄) aus der Schilddrüse bindet, dieses an Albumin und Präalbumin als Transportproteine und nur ein geringer Anteil der Hormone bleibt ungebunden (sogenanntes freies T₃ oder FT₃ bzw. freies T₄ oder FT₄). Wie beim Menschen auch, ist ausschließlich der freie Anteil der Schilddrüsenhormone verantwortlich für die Wirkungen auf den Gesamtorganismus. Die Bindungsverhältnisse der Jodhormon-bindenden Proteine sind bei der Katze von anderer Art als die beim Menschen [50]. Katzen verfügen nicht über Thyroxin-bindendes Globulin [35, 80].

Die Schilddrüsenhormonwirkung wird, genau wie beim Mensch, auch zum Großteil durch nukleäre T₃ Rezeptoren vermittelt, die die Regulation und Expression von Genen bewirken. Man unterscheidet α - und β -Rezeptoren, die jeweils in drei Unterarten gegliedert werden können. Diese Rezeptoren kommen je nach Gewebe in unterschiedlicher Anzahl vor. Die Expression der einzelnen T₃-Rezeptoren ist speziesspezifisch unterschiedlich [4].

5.2. Schilddrüsenerkrankungen der Katze

5.2.1. Morphologische Veränderungen der Schilddrüse

5.2.1.1. Euthyreote Strumen

Struma bedeutet, wie bereits in dem humanmedizinischen Kap. 2.4.1.1 erklärt, eine Vergrößerung der Schilddrüse unabhängig von deren Ursache.

Von einem euthyreoten Struma spricht man, wenn diese Vergrößerung ohne Einfluss auf den Hormonhaushalt bleibt. Die Hauptursache für solche auch als „blande“ Struma bezeichneten Veränderungen, bildet bei Mensch wie Tier der Jodmangel. Der ablaufende Wachstumsmechanismus entspricht dem für den Menschen geschilderten Prinzip, siehe 2.4.1.1. Das Vorkommen solcher Mangelercheinungen ist aufgrund des ausreichenden Jodgehalts von Fertignahrungsmitteln für Tiere sehr selten geworden.

Eine andere Ursache für die Kropfbildung sind sogenannte „strumigene“ Substanzen. Über die für den Menschen als strumigen bekannten Chemikalien (Kap. 2.4.1.1) hinaus, gibt es Studien die darauf hinweisen, dass der wechselnde Jodgehalt von Katzendosenfuttermitteln unterschiedlicher Geschmacksrichtungen, und die Verwendung von Katzenstreu das Risiko erhöhen, das Katzen eine Hyperthyreose entwickeln [39]. Ob dieser Zusammenhang jetzt durch den schwankenden Jodgehalt selbst oder das Vorhandensein strumigener Substanzen ausgelöst wird, ist noch nicht vollständig bekannt.

5.2.1.2. Schilddrüsentumoren

Euthyreote Schilddrüsentumoren bezeichnen benigne oder maligne Neoplasien der Schilddrüse, bei denen es weder zu einer Über- noch einer Unterfunktion der Schilddrüse kommt.

Adenome

Bei der Katze kommen Adenome vor, die zu keinerlei klinischen Symptomen führen und so nur als Zufallsbefunde bei Sektionen in Erscheinung treten. Häufig jedoch findet man unter den Adenomen sogenannte „toxische Adenome“, die dann mit einer übermäßigen Schilddrüsenhormonbildung einhergehen, und zum klinischen Bild der Hyperthyreose führen. Die Hyperthyreose wird in Kap. 5.2.3.3 erläutert. Follikelzellkarzinome, papilläre Karzinome und Mischformen, wie sie beim Hund häufiger zu finden sind, kommen bei der Katze nur selten vor. Die Karzinome sind meist funktionell nicht aktiv.

Über Neoplasien der Schilddrüse die zu einer Hypothyreose führen ist bei der Katze nichts bekannt [33].

Adenome der bzw. eine adenomatöse Hyperplasie der Schilddrüse lassen sich keineswegs eindeutig von den knotigen Hyperplasien unterscheiden [12]. Eine wichtige Erkenntnis ist, dass die Schilddrüsenadenome und durch eine Kapsel abgetrennte Schilddrüsenknoten überwiegend klonalen Ursprungs sind. Das bedeutet, dass es sich um echte benigne Tumore handelt, die sich von einer Ursprungszelle ableiten [2]. Allerdings lassen sich in einem Knotenstruma klonale und polyklonale Zellen häufig nebeneinander nachweisen, so dass insbesondere histologisch eine Differenzierung nur schwer möglich ist [37].

Als Ursache der gesteigerten funktionellen Aktivität von Knoten und autonomen Adenomen der Schilddrüse, sind in den letzten Jahren in der Humanmedizin aktivierende Mutationen des TSH-Rezeptors und auch Mutationen des $G_{s\alpha}$ -Gens identifiziert worden [15]. Bei der Katze ist daraufhin systematisch nach somatischen Mutationen des TSH-Rezeptor-Gens gesucht worden. Doch es konnten zunächst keine derartigen Mutationen bei der Katze festgestellt werden [64]. Eine neuere Studie von Watson et al, 2005 [92] weist jedoch auf möglicherweise bedeutsame Mutationen des TSH-Rezeptor-Gens hin. Einer anderen Studie zu Folge von Peeters, 2002 [65] hat die Mutation in einem $G_{s\alpha}$ -Gen gefunden, die bei einigen hyperthyreoten Katzen vorkam und möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung der adenomatösen Hyperplasie der Schilddrüse spielt.

In einer weiteren Studie von Merryman et al, 1989 [57] konnte eine hohe Expression des Oncogens c-ras in den adenomatös veränderten Bezirken der Schilddrüse immunhistologisch dargestellt werden. Möglicherweise hat dieses Oncogen mehrere Funktionen übernommen und spielt so vielleicht eine Rolle in der Pathogenese des Adenoms.

Die adenomatösen Zellen und ihre Kerne sind viel größer als gesunde Schilddrüsenzellen, und sie inkorporieren mehr Jod als diese. Sie wachsen, im Rahmen von entsprechenden Versuchen (Xenotransplantaten auf Nacktmäusen, genau wie in TSH-freier Lösung) *in vitro* ohne TSH-Stimulation. Sie unterscheiden sich also deutlich in Aussehen und Funktion von herkömmlichen Schilddrüsenzellen [24].

Die benignen Zubildungen lassen sich szintigraphisch darstellen. Zur Sicherung der Diagnose, und insbesondere zur Unterscheidung von Malignomen, sollte eine Biopsie entnommen werden. Da eine zytologische Untersuchung der Feinnadelbiopsie häufig nur unzureichend Aufschluss über die Art des Tumors liefert, empfiehlt sich die histologische Untersuchung der Schilddrüsenprobe.

Karzinome

Bei den Malignomen der Schilddrüse handelt es sich vornehmlich um folliculäre Karzinome.

Schilddrüsenkarzinome werden nur bei ein- bis zwei Prozent der betroffenen Katzen beobachtet [24] und sind somit ein eher seltenes Ereignis.

Das folliculäre Karzinom stellt sich histologisch wenig differenziert mit wenig Kolloid dar. Kapseleinbrüche und Gefäßeinbrüche gelten als weitere typische Kennzeichen dieses Karzinoms.

Das weitaus seltenere papilläre Karzinom ist durch seine farnwedelartigen, fibrovaskulären Bindegewebsstrukturen gekennzeichnet. Auch hier ist mit Kapseleinbrüchen zu rechnen.

Man kann z.B. anhand einer sonographischen Untersuchung bzw. einer Szintgraphie eine Verdachtsdiagnose auf Schilddrüsenkarzinom stellen. Diese Verdachtsdiagnose muss jedoch durch eine Feinnadelbiopsie oder auch histologisch nach Exstirpation des Schilddrüsenlappens abgesichert werden.

Metastasen der Schilddrüsenkarzinome findet man bevorzugt in ektopischem Schilddrüsen- und in der Lunge.

5.2.1.3. Weitere morphologische Veränderungen der Schilddrüse

Neben der Ausbildung von Adenomen und Karzinomen ist die Ausbildung anderer Tumorarten, wie in Kap. 2.4.1.2 für den Mensch beschrieben, auch bei der Katze grundsätzlich möglich. Da sie aber bisher extrem selten diagnostiziert wurden, soll an dieser Stelle nicht näher auf sie eingegangen werden.

Erwähnenswert ist bei der Katze zusätzlich noch die Möglichkeit von leukotischen Infiltrationen der Schilddrüse, die ebenfalls zu deren Vergrößerung führen kann.

Abgesehen von tumorösen Entartungen der Schilddrüse gibt es noch andere morphologische Veränderungen. Zu nennen wären hier die Amyloidose [16] der Schilddrüse sowie Zystenbildungen der Schilddrüse [12].

5.2.2. Thyreoditiden

Über Entzündungen der Schilddrüse ist bei der Katze noch fast nichts bekannt. Obwohl das Krankheitsbild bisher extrem selten nachgewiesen wurde, gibt es vereinzelt Hinweise auf eine lymphozytäre Thyreoiditis bei der Katze.

Es gibt einen Fall beschrieben von Rand, 1993 von spontaner lymphozytärer Thyreoiditis bei der Katze [72]. Ein weiterer Fall von Arnold, 1984 [3] stellt eine primäre juvenile Hypothyreose bei der Katze fest. Eine Untersuchung von Schummm-Draeger, 1996 [82] berichtet über eine hereditäre Autoimmunthyreoiditis vom Typ Hashimoto bei der Katze. Neben den typischen Anzeichen des Kretinismus (Kap. 5.2.3.1) fielen die Tiere in der Studie durch signifikant erniedrigte TT4 und TT3-Werte auf. Darüber hinaus wurden Antikörper gegen mikrosomale Strukturen und Thyreoglobulin nachgewiesen. Die bei der histologischen Untersuchung gemusterten Katzenschilddrüsen imponierten durch deutliche lymphozytäre Infiltration. Bei 2 Jahre älteren erkrankten Tieren konnte eine ausgeprägte zystische Degeneration mit Vernarbungen bei nur noch spärlicher lymphozytärer Infiltration festgestellt werden. Weitere Hinweise auf die lymphozytäre Thyreoiditis bei der Katze ergaben sich durch die histologische Untersuchung von Katzenschilddrüsen. Offenbar kommt es infolge der Entzündung nur selten zur klinisch manifesten Hypothyreose, weshalb die Erkrankung bisher eher post mortem diagnostiziert werden konnte.

5.2.3. Funktionsstörungen

5.2.3.1. Die Hypothyreose der Katze

Die Hypothyreose der Katze ist eine extrem seltene Erkrankung. In der Literatur wird nur von Einzelfällen berichtet.

In einer Studie von Rand, 1993 [72] wird ein Fall von spontaner lymphozytärer Thyreoiditis bei der Katze beschrieben. In einer weiteren Studie von Arnold, 1984 [3] wird eine primäre juvenile Hypothyreose bei der Katze festgestellt. Mehrere Forschungsgruppen [82] und [86] berichten unabhängig voneinander, über das Auftreten von kongenitaler Hypothyreose, die dann das Bild des Kretinismus nach sich ziehen. Häufiger als das spontane Entstehen der Hypothyreose werden in der Literatur iatrogene Hypothyreosen diskutiert, die in Folge einer Thyreoidektomie, einer Radioiodtherapie oder einer Überdosis an Thyreostatika entstehen.

Bei der Hypothyreose der Katze handelt es sich, genau wie für den Mensch bereits definiert, um einen Mangel an Schilddrüsenhormon, hervorgerufen durch eine Unterfunktion

der Schilddrüse.

Die Ätiologie ist aufgrund der Seltenheit der Erkrankung bei der Katze noch nicht restlos geklärt. Vermutet wird eine lymphozytäre Thyreoiditis [82] und [72], so wie sie vom Hund und auch vom Menschen her bekannt ist. Bisher konnten lymphozytäre Infiltrationen in der Schilddrüse der Katze nur post mortem, als Zufallsbefunde im Rahmen von Sektionen nachgewiesen werden. Als Ursache der kongenitalen Hypothyreose beschreiben Studien an einer Abessinierkatzenfamilie [38] und [86] einen Defekt der thyreoidalen Peroxidase, der sich autosomal rezessiv vererbt. In seltenen Fällen kann eine Hypothyreose bei Katzenwelpen auch durch einen alimentären Jodmangel hervorgerufen werden.

Die Einteilung der Hypothyreosen, bei der man zwischen primären Hypothyreosen, die von der Schilddrüse selbst ausgehen und sekundären Hypothyreosen, die von einer Störung der Hypophyse verursacht werden, unterscheidet, entspricht der Einteilung der Humanmedizin.

Klinisch stellt sich die Hypothyreose bei der Katzen mit den, im Folgenden genannten, Hauptsymptomen dar: Tonnenförmiger Körperbau, Ausbildung von Welpenhaar, Dickenzunahme der spröden und zu Ekzemen neigenden Haut, vielfach mit Hyperpigmentation, Seborrhöen und Dermatitisen. Möglich ist auch die Ausbildung eines Myxödems, insbesondere im Bereich der Vordergliedmaßen und des Kopfes. Die Tiere fallen häufig durch Bewegungsunlust und ein erhöhtes Schlafbedürfnis auf. Das Herz erscheint bradykard und die Körpertemperatur ist erniedrigt. Es kommt häufig zu Obstipationen. Labordiagnostisch lässt sich neben dem niedrigen Wert für T4 oft noch eine hypochrome Anämie nachweisen. Fortpflanzungsstörungen können auftreten. Besonders auffällig sind neben Adipositas und Apathie, die zunehmende Haarkleidverfilzung und der beidseitige symmetrische Haarverlust.

Von kongenitaler Hypothyreose betroffene Katzenwelpen erscheinen zunächst normal, bleiben jedoch im Alter von sechs bis acht Wochen im Wachstum zurück. Sie entwickeln in den folgenden Monaten typische Symptome von Kretinismus: unproportionierten Zwergwuchs, Lethargie, mentale Retardierung, verzögerter Zahnwechsel, Hypothermie, Bradykardie und persistierendes Welpenfell. Typische röntgenologische Befunde bei jungen Tieren sind ein unausgereiftes Skelettsystem mit teilweise komplett fehlenden epiphysealen Ossifikationszentren [3].

5.2.3.2. Die Ätiologie der Hyperthyreose der Katze

Die Ätiologie der Hyperthyreose der Katze ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die adenomatöse Hyperplasie ist die häufigste Veränderung, die mit der Hyperthyreose der Katze einhergeht. Schilddrüsenkarzinome hingegen, wie sie beim Hund vielfach zu finden sind, stellen bei der Katze eine Ausnahme dar.

Histologisch weist das Schilddrüsengewebe knotige Hyperplasien auf, die von normalem Schilddrüsengewebe umgeben sind. Die Übergänge zwischen den teilweise stark veränderten Zellen der Knoten und dem normalen Schilddrüsengewebe können fließend sein. Die histologischen Veränderungen erinnern an den Morbus Basedow des Menschen und an die funktionelle Autonomie der Schilddrüse. Morbus Basedow ist eine Autoimmunkrankheit des Menschen. Die Überproduktion von Schilddrüsenhormonen entsteht hierbei durch stimulierende Autoantikörper, die anstelle des TSH an dessen Rezeptor andocken und so einen Produktionsreiz darstellen, der der negativen Rückkopplung nicht mehr unterliegt, siehe Kap. 2.4.4.3.

Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem Morbus Basedow des Menschen hat es zahlreiche Studien gegeben, in denen man versucht hat, die entsprechenden stimulierenden Antikörper bei der Katze nachzuweisen. In einer Studie von Peterson, 1986 [68] hat man die Erhöhung der CAMP-Konzentration in Schilddrüsenzellen der Ratte gemessen, die dem Serum von gesunden, dem Serum von hyperthyreoten Katzen und Morbus Basedow Patienten ausgesetzt wurden. Sie konnten hierbei keine Erhöhung des CAMP-Spiegels nach Zugabe des hyperthyreoten Katzenserums feststellen. Damit ergibt sich aus dieser Untersuchung kein Hinweis auf Antikörper, die den TSH-Rezeptor stimulieren.

In einer weiteren Studie von Nguyen, 2002 [61] hat man den TSH-Rezeptor der Katze geklont, was tierartspezifische Unterschiede als Fehlerquelle ausschließt. Anschließend sind Seren von 16 hyperthyreoten Katzen mit dem geklonten TSH-Rezeptor in Kontakt gebracht worden. Auch in diesem Versuch konnten keine stimulierenden Antikörper nachgewiesen werden.

In einer anderen Studie von Kennedy, 1988 [40] wurden mikrosomale Antikörper und antinukleäre Antikörper festgestellt. Diese Antikörper richten sich nicht gegen den TSH Rezeptor sondern gegen die thyreoidale Peroxidase. Ihr Nachweis könnte man als einen Hinweis auf eine immunologische Ätiologie der Hyperthyreose der Katze deuten. Das ist aber bisher noch nicht weiter untersucht worden.

Man hat festgestellt [66], dass das Schilddrüsengewebe hyperthyreoter Katzen, wenn

man es auf Nacktmäuse transplantiert, weiter wächst und auch funktioniert. Genauso verhält sich Gewebe von Menschen, die unter einem hyperthyreoten Knotenstruma leiden. Beim Mensch hat man als Ursache hierfür Mutationen des TSH-Rezeptorgens ermittelt. Bei der Katze konnten jedoch zunächst keinerlei Mutationen des TSH-Rezeptor-Gens nachgewiesen werden. Erst neuere Untersuchungen [92] haben gezeigt, dass doch Mutationen bestehen, die für die Entstehung der adenomatösen Hyperplasie eine Rolle spielen könnten.

In einer weiteren Studie [10] zur Ursache der Hyperthyreose bei Katzen wurden erhöhte Spiegel von wachstumstimulierenden Immunglobulinen bei der Katze festgestellt. Da diese aber nur das Wachstum, nicht jedoch die Aktivität der Zellen erhöhen, bleibt ihre Rolle in der Pathogenese der Hyperthyreose unklar.

Möglicherweise spielen Mutationen in der Signaltransduktion eine Rolle bei der Entstehung der Hyperthyreose. In einigen Untersuchungen [92, 65] wurden bei einigen hyperthyreoten Katzen Mutationen des $G_{s\alpha}$ Gens gefunden.

In einer Studie [57] hat man das Schilddrüsengewebe hyperthyreoter Katzen auf Onkogene hin untersucht und eine erhöhte Expression von c-ras ermittelt. Möglicherweise ist es an der Entstehung der Hyperthyreose beteiligt.

Die Hyperthyreose wird erst seit 1979 häufiger diagnostiziert, und die Zahl der klinisch diagnostizierten Fälle von feliner Hyperthyreose nimmt seither zu. Die Gründe dafür nicht ausschließlich auf die erhöhte Aufmerksamkeit der Untersucher, die vermehrt eingesetzten Screening-Untersuchungen auf T4, die gestiegene Lebenserwartung der Katzen und der Anstieg der Katzenpopulation insgesamt zurückzuführen [48]. Sondern Studien, wie die von Merchant 1997 [56], beleuchten vielmehr nutritive und umgebungsabhängige Faktoren, die möglicherweise das Risiko an einer Hyperthyreose zu erkranken erhöhen.

Nach einer Studie [39] erhöht sich das Risiko der Erkrankung zwei- bis dreifach bei der Fütterung von Dosenfutter gegenüber Trockenfutter und dreifach bei der Verwendung von Katzenstreu. Auch die Geschmacksrichtung des Dosenfutters kann Einfluss auf die Erkrankung nehmen [54], da der Jodgehalt der einzelnen Geschmacksrichtungen erheblich schwankt. Des Weiteren werden als mögliche nutritive und umgebungsabhängige Risikofaktoren verschiedene strumigene Substanzen genannt, wovon die meisten durch Glukoronidierung metabolisiert werden. Dieser Prozess ist bei Katzen erschwert und fördert aus diesem Grund eine Akkumulation der Substanzen [21].

In einer anderen Studie [91] werden Zusammenhänge mit Kastrationen und Impfun-

gen, Anästhetika, oder sogar auch mit dem Reaktorunfall in Tschernobyl im April 1986 vermutet.

5.2.3.3. Klinische Befunde der Hyperthyreose der Katze

Eine Hyperthyreose ist eine Stoffwechselstörung, die durch die Überproduktion der Schilddrüsenhormone T3 und T4 entsteht.

Es handelt sich, wie bereits eingangs erwähnt, um die häufigste Endokrinopathie der Katze. Sie tritt vermehrt bei älteren Katzen auf. Das Durchschnittsalter beträgt 13 Jahre [59]. Es besteht keine Geschlechtsdisposition für diese Erkrankung. Siam Katzen und Himalaya Katzen erkranken weniger häufig als andere Hauskatzenrassen.

Das klinische Erscheinungsbild einer Hyperthyreose ist so vielfältig wie die Wirkungen der im Überschuss produzierten Schilddrüsenhormone. Im Vordergrund stehen Symptome, die durch die Steigerung des Stoffwechsels entstehen. Durch die Steigerung des Grundumsatzes kommt es zu einer erhöhten chemischen Wärmebildung, und damit zu einer gesteigerten Körpertemperatur.

Die gesteigerte Wärmebildung ist teilweise verantwortlich für die Entstehung der Symptome Polydipsie und Polyurie und das vermehrte Aufsuchen von kühlen Plätzen der betroffenen Katzen. Hauptursache für die Polyurie (PU) und Polydipsie (PD) bilden jedoch die gesteigerte Nierendurchblutung, die gesteigerte Resorptionskapazität und die vermehrte Sekretionskapazität des Tubulus. Der Abfall des medullären Konzentrationsgradienten resultierend aus dem erhöhten Blutfluss in der Niere, führt zu dieser Symptomatik. In einigen Fällen ist es möglich, dass durch die gesteigerte Nierendurchblutung bei Hyperthyreose eine chronische Nierenerkrankung maskiert wird.

Äußerlich auffällig sind die Veränderungen des Haarkleids. Sie reichen in ihrer Ausprägung von einem schlicht matten, ungepflegten Fell bis hin zur Alopezie.

Die ständige Unruhe und Bewegung der Katze ist auf die übersteigerte Ansprechbarkeit auf Katecholamine zurückzuführen. Dadurch und durch den erhöhten Grundumsatz entsteht ein insgesamt sehr hoher Energieverbrauch. Dies führt zur Polyphagie. Die vermehrte Nahrungsaufnahme reicht aber nicht aus, um den erhöhten Energiebedarf zu decken und so entsteht ein kachektisches äußeres Erscheinungsbild. Durch den damit einhergehenden Abbau des Unterhautfettgewebes kann die Hautelastizität herabgesetzt sein.

Magen-Darmtrakt-Symptome, wie Vomitus und Diarrhoe, entstehen zum einen sicherlich durch die hektische Nahrungsaufnahme, zum anderen aber auch durch den verstärkten Einfluss der Katecholamine, die für eine schlechtere Durchblutung des Magen-Darm-Traktes sorgen. Betroffen ist davon auch die Leber. Die schlechte Durchblutung in Verbindung mit der, durch den chronischen Stress ausgelösten, Hyperglykämie, sorgt hier für Laborwertveränderungen der Leberenzyme. Biopsien der Leber zeigen geringgradige zentrilobuläre Lipidosen und Nekrosen. In seltenen Fällen entsteht auch ein Ikterus.

Durch die erhöhten Mengen an Schilddrüsenhormonen kann sich eine hypertrophe Kardiomyopathie, oder in einzelnen Fällen auch eine dilatative Kardiomyopathie entwickeln [46]. Symptome für hypertrophe Kardiomyopathie sind Tachykardie und pochender Herzschlag. Galopprrhythmen, Pulsdefizit und Thoraxergüsse werden seltener festgestellt. Durch das häufig derart vorgeschädigte Herz und den gesteigerten Sauerstoffbedarf des Organismus, kommt es bei Aufregung schnell zur Dekompensation des Herzens und in der Folge zu Atemnot, Maulatmung sowie Muskelzittern.

Gewichtsverlust
Ungepflegtes Haarkleid
Unruhe, Aggression
Temperaturerhöhung
Polyphagie, Polyurie und Polydipsie
Diarrhö, Vomitus, gesteigerte Darmmotilität
hypertrophe Kardiomyopathie, Tachykardie, Extrasystolie, Hypervoltage, Herzgeräusche, harter, schneller Puls und ausgeprägter Herzspitzenstoß
Dyspnoe, Maulatmung
Muskelzittern, Schwäche
Schilddrüsenvergrößerung

Tabelle 5.1.: Übersicht über die Symptome der Hyperthyreose

5.3. Diagnose von Schilddrüsenerkrankungen - Labordiagnostik

Zur Diagnose von Schilddrüsenerkrankungen ist es wichtig, eine gründliche Anamnese zu erheben, da die Beurteilung z. B. von Verhaltensweisen der Katze, bei der Vorstellung des Tieres häufig durch die Untersuchung selbst stressbedingt verfälscht wird.

Neben der sorgfältigen klinischen Untersuchung auf die bereits beschriebenen Symptome der einzelnen Schilddrüsenerkrankungen, kann eine Palpation der Schilddrüse hinweisend sein, um eine Hyperthyreose festzustellen. Dabei muss man wissen, dass die Schilddrüse der Katze häufig bei Vergrößerung zum Teil intrathorakal zu liegen kommt, und so nicht mehr tastbar ist [6].

Geben Anamnese und klinische Untersuchung Hinweise auf das Vorliegen einer Schilddrüsenerkrankung, sollte weiterführende Diagnostik eingeleitet werden. Zu diesem Zweck werden labordiagnostische und auch bildgebende Verfahren herangezogen. Zu den bildgebenden Verfahren, die an der Schilddrüse der Katze angewendet werden, gehören ganz allgemein Szintigraphie, Ultraschall und Röntgen. Auf die bildgebende Diagnostik soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Die Labordiagnostik der Schilddrüsenerkrankungen wird im Folgenden detailliert erörtert.

5.3.1. Schilddrüsenhormonbestimmung

5.3.1.1. Gesamt-Thyroxin (TT4)

Die Bestimmung des Thyroxinwertes aus Serum gilt als die zuverlässigste Methode zur Bestimmung von hyperthyreoten Zuständen. Die RIA und ELISA-Testkits der Humanmedizin sind auch für Katzen validiert worden. Klinische Symptome, gemeinsam mit einem erhöhten TT4-Wert, gelten als beweisend für eine Hyperthyreose [63].

Beim Radioimmunoassay (RIA) konkurrieren radioaktives T₄, und das T₄ aus der Serumprobe der fraglichen Katze um Bindungsorte eines T₄-Antikörpers. Nicht gebundenes radioaktives T₄ wird an einem weiteren Bindungsort fixiert und gemessen. Anhand einer Eichkurve bekannter T₄-Konzentrationen, lässt sich das T₄ im Serum berechnen.

Der Enzyme linked immunosorbant Assay (ELISA) funktioniert ähnlich wie der RIA, nur dass hier das T₄ des Testsystems mit einem Enzym markiert ist. Gemessen wird hier das an den T₄-Antikörper gebundene, durch enzymatische Farbreaktion fotometrisch erfasste T₄. Die T₄-Serumwerte werden auch hier anhand einer Eichkurve ermittelt.

Der Referenzbereich liegt bei 1,5 – 4,0 mg/dl, wobei die verschiedenen Labore unterschiedliche Referenzbereiche angeben [50].

Zu den Vorteilen von T₄ zählt sicherlich die Stabilität des Hormons, so verträgt es Prozesse wie Einfrieren und Auftauen ohne Schaden zu nehmen. Es lässt sich bei –20 °C bis zu einem Jahr, und bei 4 °C immerhin noch zwei Wochen lagern ohne Veränderungen

aufzuweisen [70].

Nachteile der T4-Messung sind die zahlreichen Faktoren, die auf T4 -Konzentration im Blut Einfluss nehmen. Eine Verfälschung der klinischen Situation tritt im Fall der sogenannten „okkulten Hyperthyreosen“ auf. Die T4 Werte liegen hier im hochnormalen Referenzbereich, obwohl eine Hyperthyreose vorliegt. Hervorgerufen wird die Abweichung durch sogenannten nicht thyreoidal bedingten Erkrankungen (NTI). Das sind Allgemeinerkrankungen, die den T4 -Wert und den T3 Wert senken. Bei stark erhöhten TT4-Ausgangswerten, wie sie bei der Hyperthyreose der Katze meistens vorkommen, fällt das nicht weiter ins Gewicht. Allerdings ist dieser Sachverhalt bei den grenzwertigen hyperthyreoten und (hypothyreoten) Katzen relevant. Nach einer Studie [58] wird nur das TT4 aber nicht das freie T4 (FT4) von den NTI beeinflusst. In einer weiteren Studie [18] ist festgestellt worden, dass nicht die Art der Erkrankung die Veränderung des T4-Wertes beeinflusst, sondern der Schweregrad der Erkrankung.

Verantwortlich für die veränderte TT4-Konzentration und T3 Konzentrationen sind vermutlich mehrere Faktoren. Eine erniedrigte Deiodaseaktivität, die die Bildung von T3 aus T4 vermindert, ist ein wichtiger Grund. Außerdem wird die Rückbildung von inaktivem rT3 erniedrigt. Zusätzlich ist bei schweren Allgemeinerkrankungen die Proteinbindung an TBG erniedrigt. In der Hypophyse wird durch die Deiodase 2 weniger T4 in T3 umgewandelt. Durch die geringere Menge an T3 (Kontrolle der Hypophysenfunktion durch intrahypophysäres T3) wird weniger TRH und TSH aus Hypothalamus und Hypophyse ausgeschüttet [14]. In Versuchen an Ratten hat man zusätzlich zeigen können [84], dass nach langen Hungerzuständen bei den Tieren die mRNA für TRH abnimmt, was vermutlich durch eine stressinduzierte erhöhte Freisetzung von Zytokinen und Glukokortikoiden zusätzlich unterstützt wird.

Ein weiterer Grund für zweifelhafte Ergebnisse bei Bestimmung der Gesamtthyroxinkonzentration stellt die Fluktuation des TT4-Blutspiegels dar. Bei einer milden Hyperthyreose können die Werte daher in und aus dem Referenzbereich schwanken, wobei diese Schwankungen pro Tag wesentlich größer sind als pro Stunde [67]. Eine wiederholte Messung sollte demnach nicht am gleichen Tag, sondern frühestens eine Woche später vorgenommen werden. Kraft, 2005 [50] empfiehlt eine erneute Messung sogar erst nach ein bis zwei Monaten.

Eine zusätzliche Rolle spielt vielleicht die TT4 senkende Wirkung von bestimmten Medikamenten¹. Allerdings ist dieser Sachverhalt für die Katze kaum untersucht. Aus

¹Diese Medikamente sind: Androgene, Diazepam, Dopamin, Flunixin, Furosemid, Heparin, Imidazol, hoch dosiert Jod, Kortikosteroide, Mitotane, Methamizol, Penizillin, Phenobarbital, Phenylbutazon,

Veröffentlichungen der Humanmedizin geht ein solcher Effekt aber deutlich hervor und Feldmann, 2003 [20] geht von einer ähnlichen Entwicklung bei der Katze aus.

Die Interpretation der TT4 -Werte erfolgt unter Berücksichtigung der oben Beschriebenen Effekte wie folgt: TT4-Werte $1,5 - 2,8 \mu\text{g}/\text{dl}$ bedeuten wahrscheinlich das Vorliegen einer Euthyreose. Bei Werten $2,9 - 4,0 \mu\text{g}/\text{dl}$ ist eine Hyperthyreose möglich. Ein T3-Suppressionstest sollte zur Absicherung der Diagnose angeschlossen werden. Bei TT4-Werten über $4 \mu\text{g}/\text{dl}$ ist von einer Hyperthyreose auszugehen. Wenn TT4 unter $1,5 \mu\text{g}/\text{dl}$ ermittelt wird ist nur in Ausnahmefällen mit einer Hypothyreose zu rechnen, wahrscheinlicher ist das Vorliegen einer NTI.

5.3.1.2. Freies Thyroxin (FT4)

Das freie nicht proteingebundene Thyroxin (FT4) ist in der Lage, in die Zielzellen einzudringen, und nach Umwandlung in T3 dort die Wirkungen der Schilddrüsenhormone auszulösen.

Es ist ebenso gut in der Lage, über die Funktion der Schilddrüse Auskunft zu geben wie das TT4. Liegt das Ergebnis der Untersuchung auf TT4 im hochnormalen Referenzbereich kann man den FT4 -Wert bestimmen, um einen weiteren Hinweis zu erlangen. Da das FT4 nach einer Studie [58] durch NTI weniger beeinflusst wird.

Wenn man den FT4- Wert mittels der Dialyse-Methode bestimmt ist das Ergebnis weitaus zuverlässiger als wenn man seine Bestimmung mit einem ELISA durchführt. [58, 69].

Der Referenzbereich für FT4 bei der Katze liegt bei 0,5 bis 2,6 ng/dl dieser Wert differiert aber auch in unterschiedlichen Laboren.

5.3.1.3. Trijodthyronin (T3) und freies Trijodthyronin (FT3)

Die Bestimmung von Trijodthyronin (T3) hingegen ist weniger zuverlässig. Da bei Katze noch kein Fall von isolierter T3 Hyperthyreose bekannt geworden ist, bringt die Messung von T3 gegenüber der T4-Bestimmung keine weiteren Vorteile. Nach einer Studie [69] weisen 20% der hyperthyreoten Katzen, (gemeint sind hier Katzen mit klinischer Symptomatik und erhöhten TT4-Werte), T3-Werte im Referenzbereich auf. T3 wird jedoch zur Kontrolle der Medikamenteneingabe im T3-Suppressionstest bestimmt.

Phenytoin, Primidon, Propanolol, Salizylate, Sulfonamide [50]

Das freie Trijodthyronin ist die Form in der die Schilddrüsenhormone tatsächlich wirken. Man kann es zur Bestätigung einer Hyperthyreose bestimmen.

Das Testprinzip ist hier ein ELISA. Es wird ein Sandwich-Komplex gebildet aus dem FT3 des Serums, einem enzymmarkierten Antikörper und einem zweiten Antikörper, der an anderer Stelle bindet und der so das Hormon mit der Gefäßwand verbindet. Die Höhe des FT3-Wertes ist direkt proportional zur gemessenen Farbintensität.

Der Referenzbereich liegt bei 1,6 – 4,9 pg/ml, wobei die verschiedenen Labors unterschiedliche Referenzbereiche angeben [50].

5.3.1.4. TSH-Bestimmung

In einer Studie[71] wurde der Chemilumineszenzimmunoassay ACS:180 der Firma Bayer validiert. Es ergab sich ein Referenzbereich für Serum-TSH von 0,24 mU/l \pm 0,20 bei hyperthyreoten Katzen wurden hingegen Werte um 0,02 mU/l \pm 0,5 festgestellt. Der Test zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus und der TSH-Wert von Katzen kann damit zuverlässig bestimmt werden.

5.3.2. Suppressions-/Stimulationstests

5.3.2.1. Trijodthyroninsuppressionstest

Dieser ist nur bei zweifelhaften Thyroxinwerten und eindeutigem klinischem Bild der Hyperthyreose von praktischem Interesse. Zur Durchführung wird nach Bestimmung des Basalwertes von T3 und T4, zwei Tage lang T3 in der Dosis von dreimal täglich 25 μ g/Tier gegeben. Durch diese hohe Dosis an T3 wird bei einem gesunden Tier die Hypophyse an der Ausschüttung von TSH gehindert und der T4-Wert sinkt. Bei Euthyreose sollte der T4-Wert bei der Bestimmung von T3 und T4 am dritten Tag, unter 1,5 μ g/dl (Der Wert kann laborbedingt abweichen)absinken. Der T3 -Wert muss ebenfalls ermittelt werden, um die ordnungsgemäße T3 -Applikation durch den Besitzer zu kontrollieren. Bei Hyperthyreose produziert die Schilddrüse unabhängig vom TSH weiter T4 und ein Absinken des T4-Wertes ist dann nicht festzustellen.

5.3.2.2. TSH-Stimulationstest

Nach Mooney [83] ist der TSH-Stimulationstest bei der Katze zur Diagnose nicht sehr zuverlässig. Außerdem kommt noch die Schwierigkeit der TSH-Beschaffung hinzu. Bovines TSH steht nicht mehr zur Verfügung und rekombinates, humane TSH ist sehr teuer. Deshalb wird der TSH-Stimulationstest bei der Katze kaum durchgeführt. Der Test wird

angewandt, um niedrignormale oder verminderte T4- oder FT4-Werte zu überprüfen. Der Test findet daher beim Hund Anwendung, wo die Hypothyreose ein häufiges Problem ist, im Gegensatz zur Katze.

Die einzelnen Durchführungsprotokolle variieren. Möglich wäre folgender Ablauf:

- Blutentnahme zur Bestimmung des Ausgangswertes an T4 (FT4)
- Injektion von 1 IU/kg KM TSH i. m. (CAVE: Unverträglichkeitsreaktion bei i. v. Applikation möglich)
- Acht Stunden nach TSH- Gabe müsste der Serumthyroxinwert (oder FT4-Wert) bei einer gesunden Katze im oder sogar deutlich über dem Referenzbereich (1,5 – 4,0 µg/dl) liegen während bei einem hypothyreoten Tier wenig Veränderungen zu erwarten wären, das heißt das der T4-Wert (FT4) unterhalb des Referenzbereiches bleibt.

5.3.2.3. TRH-Stimulationstest

Dieser Test wird hauptsächlich dann durchgeführt, wenn TSH nicht zur Verfügung steht. Sein Effekt ist aber deutlich schwächer und die Ergebnisse sind nicht unbedingt konstant. Wie der TSH-Test wird er zur Diagnose der Hypothyreose eingesetzt und ist wegen deren seltenen Vorkommen bei der Katze nicht von großer Bedeutung.

- Zur Durchführung des TRH-Testes wird ähnlich wie beim TSH -Test zunächst der T4-Ausgangswert bestimmt.
- Anschließend nimmt man die Injektion von 100 µg TRH/Katze, i. v. vor.
- Nach vier Stunden müsste der T4 Wert im oder über dem Referenzbereich liegen, bei T4- Werten unterhalb von 1,5 µl/dl liegt eine Hypothyreose vor. Allerdings können die Nebenwirkungen (starke Salivation, Vomitus und Maulatmung) drastisch sein Außerdem sind die Ergebnisse wenig spezifisch, da eine Erniedrigung des Serumthyroxinwertes auch infolge einer nicht thyreoidalen Erkrankung entstanden sein kann.

5.3.2.4. Weitere Schilddrüsentests

Außer den bisher genannten Verfahren gibt es noch weitere Tests, zu denen gehören z. B. die Cholesterinbestimmung (Cholesterinwerte sind bei Hyperthyreose erhöht) und die K- wert -Bestimmung. Da diese Methoden, aufgrund ihrer geringen Aussagekraft, entbehrlich bzw. zum Teil in ihren Aussagen sogar irreführend sind, sollen sie hier nicht näher erläutert werden.

5.3.3. Schilddrüsenautoantikörper

5.3.3.1. Messung von Antikörpern gegen Thyreoglobulin (Hund)

Für den Hund gibt es bereits einen Test zum Nachweis von Schilddrüsenautoantikörpern. Das entsprechende Testkit weist Thyreoglobulin-Antikörper (Tg-Ak) nach. Der Test wird zur ätiologischen Diagnose einer Hypothyreose verwendet. Antikörper gegen Thyreoglobulin weisen auf eine autoimmune Genese der Thyreoiditis hin. Das entspricht dem Krankheitsbild der Hashimoto-Thyreoiditis des Menschen. Allerdings ist der Nachweis von Tg-Ak alleine nicht zur Diagnose einer Hypothyreose geeignet [60]. Nur wenn der Hund klinische Symptome und entsprechende Schilddrüsenhormonwerte aufweist, spricht der Nachweis von Tg-Ak für das Vorliegen einer lymphozytären Thyreoiditis. Es werden auch immer wieder bei euthyreoten Hunden oder bei Hunden mit nicht thyreoidalen Erkrankungen Schilddrüsenautoantikörper nachgewiesen. Bisher ist nicht geklärt, ob das Auftreten von Tg-Ak als erstes Anzeichen einer Hypothyreose oder als zufälliger, vorübergehender Befund zu werten ist. Bei familiärer Häufung von Hypothyreose könnte der Test allerdings einen frühzeitigen Hinweis auf betroffene Tiere geben, die man dann von der Zucht ausschließen könnte.

5.3.3.2. Untersuchungen zu Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor bei der Katze

Ähnlich wie beim Hund ist auch bei der Katze nach Schilddrüsenautoantikörpern gesucht worden. Da die Hyperthyreose der Katze vom Erscheinungsbild her an den Morbus Basedow des Menschen erinnert, hat man bei der Katze hauptsächlich nach Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor gesucht. Bei Menschen mit Morbus Basedow entsteht die Überproduktion von Schilddrüsenhormonen durch stimulierende Autoantikörper, die anstelle des TSH an dessen Rezeptor andocken und so einen Produktionsreiz darstellen, der der negativen Rückkopplung nicht mehr unterliegt (siehe 2.4.4.3).

In einer Studie [68] wurde die CAMP -Konzentration in Schilddrüsenzellen der Ratte gemessen, die dem Serum von gesunden und dem Serum von hyperthyreoten Katzen ausgesetzt wurden. Sie konnten hierbei keine Erhöhung des CAMP -Spiegels nach Zugabe des hyperthyreoten Katzenserums feststellen. Setzte man die Zellen jedoch humanem Serum von Morbus Basedow Patienten aus, das die stimulierenden Antikörper enthielt, war eine deutliche Erhöhung des CAMP -Spiegels zu messen. Aufgrund dieser Untersuchung geht man davon aus, dass stimulierende Antikörper am TSH -Rezeptor bei der Katze nicht die Ursache der Erkrankung bilden.

Die Forschungsgruppe [61] geht ebenfalls von der Existenz von stimulierenden Autoimmunantikörpern gegen den TSH -Rezeptor aus. Diese Gruppe geht sogar soweit

den felines TSH-Rezeptor zu klonen, was sichert, dass tierartsspezifische Unterschiede nicht die Ursache eines negativen Ergebnisses sein können. Nach dem Klonen des TSH-Rezeptors der Katze, wurden Seren von 16 hyperthyreoten Katzen mit dem geklonten TSH-Rezeptor in Kontakt gebracht und es konnten keine stimulierenden Antikörper nachgewiesen werden. Aber sowohl bovines TSH als auch humane Seren von Morbus Basedow Patienten waren in der Lage eine Stimulation (CAMP-Erhöhung) zu erzeugen. Der Versuch Antikörper gegen den TSH -Rezeptor bei der Katze nachzuweisen, war demzufolge nicht erfolgreich.

5.3.3.3. Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase (TPO)

Die TPO spielt, wie bereits in Kap. 2.3.1 erwähnt eine Schlüsselrolle in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone. Deshalb führen Defekte der thyreoidalen Peroxidase zu Störungen der Schilddrüsenhormonsynthese. Die TPO katalysiert die Oxidation von Jod zu dem reaktiveren elementarem Jod. Sie katalysiert weiter den Einbau von elementarem Jod in die Tyrosinreste des Thyreoglobulins. Anschließend erfolgt die Kopplung der Hormonvorläufer Monojodthyronin und Dijodthyronin zu den Schilddrüsenhormonen T3 und T4, ebenfalls durch die Katalyse der thyreoidalen Peroxidase. Zu diesem Zweck ist sie in der apikalen Membranwand der Schilddrüsenfollikelzelle gelegen. Sie liegt mit den katalytischen Regionen zum Follikellumen hin orientiert [78].

Das TPO-Gen liegt auf dem Chromosom 2 p25.3 und besteht aus 17 Exons, wovon die Exons 8, 9 und 10 für das katalytische Zentrum des Enzyms kodieren. Durch alternatives Spleißen resultieren zwei verschiedene cDNA, die für zwei unterschiedliche Proteinvarianten kodieren.

In Studien [53] konnte anhand der übereinstimmenden Proteinsequenz gezeigt werden, dass das sogenannte mikrosomale Antigen und die TPO identisch sind. In der Humanmedizin nutzt man die Antikörper gegen die TPO zur Diagnose einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung. Beim Vorliegen einer Autoimmunthyreoiditis findet man zu 90% Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase. Bei 70% der Patienten, die unter einem Morbus Basedow leiden sind TPO-Antikörper stark erhöht. Allerdings muss man sagen, dass auch bei 20% der nichtimmunogenen Schilddrüsenerkrankungen (Knotenstruma) leicht erhöhte Antikörpertiter zu finden sind und dass in seltenen Fällen TPO-Antikörper auch bei Schilddrüsengesunden vorkommen.

Die Schilddrüsenautoantikörper werden mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt (siehe 2.5.5.3). Im Testsystem liegt die humane TPO als vollständiges Protein vor. Verschiedene Untersuchungen haben ermittelt, welche Epitope von den Autoantikörpern

gegen die TPO erkannt werden. [22, 79, 7, 53, 19]

In einer Studie aus dem Jahr 1995 [90] war nach TPO- Antikörpern beim Hund gesucht worden. Zu diesem Zeitpunkt war es nicht gelungen TPO-Antikörper bei hypothyreoten Hunden nachzuweisen. Laut einer neueren Studie [87] ist es gelungen TPO beim Hund zu isolieren und Antikörper gegen die TPO nachzuweisen. Die Bedeutung des Nachweises für die Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen muss in weiteren Studien noch untersucht werden.

Über die TPO der Katze ist bisher fast nichts bekannt. Es existiert allerdings eine Studie [40], in der 29 hyperthyreoten Katzen untersucht wurden und in 34% der Fälle Autoantikörper gegen Strukturen der Schilddrüse nachgewiesen worden sind. In diesem Artikel wiesen die Autoren mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz mikrosomale Antikörper, also TPO-AK, und antinukleäre Antikörper bei den Katzen nach. Aus einer weiteren Quelle [13] geht hervor, dass einige betroffene Katzen antinukleäre Antikörper und schilddrüsenpezifische Antikörper zeigen. Außerdem wurde eine lymphozytäre Infiltration der Schilddrüse, deren Bedeutung für die Pathogenese bisher unbekannt ist, festgestellt.

6. Material und Methoden

Um Aussagen über die mögliche Anwendung des in der Humanmedizin gebräuchlichen Radioimmunoassay, CentAK-Anti-TPO Testset, in der Veterinärmedizin zutreffen, muss man zunächst die Frage beantworten, ob der Humantest, der mit humaner TPO als Antigen ausgestattet ist, überhaupt in der Lage ist, die felines Antikörper zu erkennen.

Der Radioimmunoassay besteht, wie bereits in Teil I Kapitel 3.2 erläutert, aus vollständiger humaner TPO, die mit Jod-125 als Tracer verknüpft ist. An die humane TPO bindet der humane Antikörper aus dem Serum des Patienten, an dessen Fc-Fragment bindet wiederum Protein A (siehe dazu Abbildung 6.1).

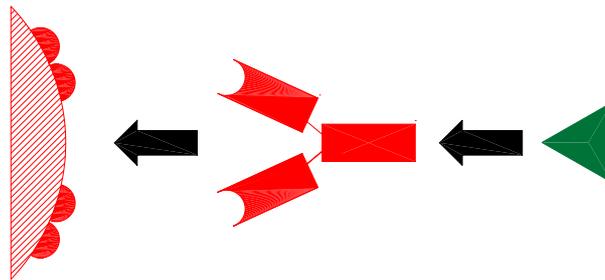


Abbildung 6.1.: Bindungen im humanmedizinischen Radioimmunoassay bei Nachweis von TPO-Antikörpern: Der humane Antikörper bindet an die humane TPO und über seinen Fc-Teil wird Protein A gebunden.

Der Test fällt nur dann positiv aus, wenn der Antikörper, gewissermaßen als Brücke, den Tracer und Protein A bindet. Nun stellt sich die Frage, ob die Bindungen zwischen dem Fab -Teil des felines Antikörpers und der humanen TPO auf der einen Seite und zwischen dem Fc- Teil des felines Antikörpers und Protein A auf der anderen Seite möglich sind (siehe Abbildung 6.2).

Zur Bindung von Protein A und feline IgG ist aus zahlreichen Beispielen in der Literatur bekannt [88], dass Protein A an den Fc-Teil der felines Antikörper problemlos bindet.

Deutlich schwieriger nachzuweisen ist es, dass die Bindung zwischen feline Antikörper und dem humanen Enzym des Testsystems funktioniert. Der Nachweis wird dadurch

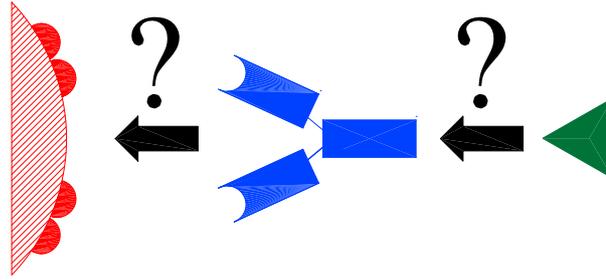


Abbildung 6.2.: Theoretische Bindungen beim Anwenden des humanmedizinischen Radioimmunoassay zur Untersuchung von schilddrüsenkranken Katzen: Es gilt zu klären, ob die Bindung zwischen dem feline Antikörper und dem humanen Antigen-Tracer-Komplex möglich ist.

erschwert, dass die katzenspezifischen Antikörper nicht zur Verfügung stehen, da man kein sicher TPO positives Tier kennt, dem man Serum entnehmen könnte. Vielmehr noch nicht mit Sicherheit bekannt ist, ob Katzen überhaupt Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase bilden. In der Literatur ist eine immunologische Genese der Hyperthyreose zwar wiederholt diskutiert worden (siehe Kapitel 5.3.3.2), aber bisher konnten keine Antikörper gegen den TSH-Rezeptor nachgewiesen werden und außer der bereits genannten Studie [40] ist über das Vorkommen von Antikörpern gegen die TPO nichts bekannt. Man steht nun vor dem Problem die Funktionsfähigkeit eines Testsystems zu prüfen, von dem man nicht weiß, ob die Substanz, auf die getestet wird tatsächlich existiert. Um dessen Funktionsfähigkeit zu demonstrieren ist es aber nötig, den positiven Nachweis von feline Antikörper zu führen.

Da kein feline Antikörper zur Verfügung steht, muss ein realisierbarer Ansatz gefunden werden, der einen anderen Weg beschreitet, die Frage zu beantworten, ob das im humanmedizinischen Test verwendete Antigen (humane -TPO) von feline TPO-Antikörper gebunden werden kann. Im Folgenden soll dieser so entstandene Ansatz kurz erläutert werden: Der humane Antikörper, der sich gegen die humane TPO richtet, soll im Rahmen einer Immunhistologischen Untersuchung mit der feline TPO aus der Katzenschilddrüse (Paraffinschnitt) konfrontiert werden (siehe dazu Abbildung 6.3). Der verwendete Sekundärantikörper markiert dabei die Verbindung von dem humanen Antikörper mit dem feline Antigen.

Ziel der Untersuchungen ist herauszufinden ob eine Bindung zwischen humanem Antikörper und feline-TPO zustande kommt. Natürlich kann von der Bindung der thyreoidalen Peroxidase der Katze mit dem humanen Antikörper gegen das Enzym, nicht direkt auf eine umgekehrte Reaktion (Feline-Autoantikörper und humane TPO aus dem Testkit) geschlossen werden. Aber man könnte im Fall einer Bindung immerhin davon

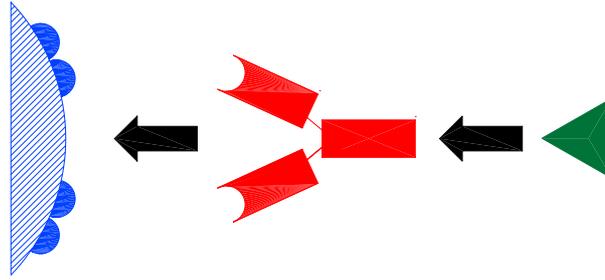


Abbildung 6.3.: Bindungsverhältnisse im folgenden immunhistologischen Ansatz: Bindet der humane-TPO-Antikörper an die feline TPO ?

ausgehen, dass beide Enzyme mindestens ein gemeinsames Epitop aufweisen. Damit wäre eine Erkennung des felines Autoantikörpers durch den Humantest, wenn auch nicht gesichert, so doch wenigstens wahrscheinlicher geworden.

Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit zwischen dem humanen TPO-Antikörper und dem feline TPO-Antigen

6.1. Immunhistologie

Die Immunhistologie ist eine Technik, die zum Erkennen von Zellen oder Gewebebestandteilen (Antigene) benutzt wird. Dies beruht auf der spezifischen Bindung zwischen Antikörper und Antigen. Die Bindung wird sichtbar gemacht, indem man entweder den Antikörper direkt markiert, oder einen Sekundärantikörper mit Markierung einsetzt, der sich gegen den gesuchten Primärantikörper richtet.

Das Antigen ist ein Molekül, das die Antikörperbildung induziert und über ein oder mehrere Stellen zur Antikörperbindung verfügt. Diese Bindungsstellen bestehen aus einer kleinen Anzahl von spezifischen Aminosäuren oder Monosacchariden, bei deren Anordnung es nicht nur um die Reihenfolge sondern insbesondere auch auf die dreidimensionale Topographie ankommt. Sie werden auch Epitope oder Antigen determinante genannt.

Antikörper sind Immunglobuline. Die Grundeinheiten eines jeden Antikörpers sind Monomere, die sich in unterschiedlicher Form zusammenlagern können. So entstehen bei den Säugetieren die unterschiedlichen Formen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. IgG ist der häufigste und gebräuchlichste Antikörper der in der Immunhistologie zur Anwendung kommt. Seine Grundeinheit besteht aus zwei leichten Ketten und zwei schweren Ketten, die über eine Disulfidbrücke zu einer y-förmigen Struktur zusammengehalten werden. Die Endregion der beiden y-Arme, auch Fab-Teil genannt, enthält eine in ihrer Aminosäuresequenz variable Region. Die Variabilität der Aminosäuren ist die Grund-

lage der Spezifität des Antikörpers für ein bestimmtes Epitop. Erst das ermöglicht es dem Antikörper ausschließlich das Antigen zu erkennen und zu binden, für das er hergestellt wurde. Die Seitenketten der variablen Region des Antikörpers bilden eine Form die chemisch und strukturell komplementär zu einer einzigen Epitop-Form ist. In der Literatur wird oft das Bild des Schlüssel-Schloß-Prinzip bemüht, um den Sachverhalt zu verdeutlichen. Die genaue Passform, die benötigt wird um eine Bindung zu ermöglichen, erklärt den hohen Grad der Spezifität der Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Die Bindung wird durch eine Kombination von Kräften zusammengehalten, die sich aus Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen Kräften und van der Waals Kräften zusammensetzen.

Im Rahmen der Immunhistologie unterscheidet man zwischen sogenannten polyklonalen Antikörpern und monoklonalen Antikörpern. Bei ersteren handelt es sich um ein durch die Immunisierung von Tieren erzeugte Antikörper, die aus dem immunglobulinreichen Serum der Tiere gewonnen werden. Solche Antiseren enthalten mehrere Antikörper, die sich gegen verschiedene Epitope des Antigens richten. Kreuzreaktionen und unerwünschte Hintergrundfärbungen können in der Immunhistologie die Folge sein. Monoklonale Antikörper hingegen werden durch die Fusion von in Kultur gezüchteten Tumorzellen mit Immunglobulin-produzierenden B-Lymphozyten hergestellt. Diese Hybrid-Technik kombiniert die Fähigkeit des transformierten B-Lymphozyten einen spezifischen Antikörper zu produzieren mit der in vitro Unsterblichkeit neoplastischer Myelomzellen. Eine aus dieser Fusion gewonnene Zellkultur produziert unaufhörlich den durch Testverfahren selektierten Antikörper. Dieser ist dann ausschließlich gegen ein Epitop des Antigens gerichtet. Durch sorgfältiges Selektieren der gewünschten und Eliminieren der unerwünschten Klone kann man so Antikörper mit einer bekannten Spezifität erzeugen. Dies steigert die Spezifität der Immunhistologie erheblich.

Für den Nachweis der Bindung zwischen Antigen und Antikörper stehen zwei unterschiedliche Nachweisprinzipien zur Auswahl. Die direkte Nachweismethode, bei der der primäre Antikörper selbst mit einem Makermolekül beladen ist und dadurch sofort sichtbar ist, und die indirekte Nachweismethode, wo der primäre Antikörper mittels eines sogenannten Sekundärantikörpers über eine weitere Antigen-Antikörperreaktion gefunden wird und durch dessen Makermolekül sichtbar gemacht wird.

Die direkte Methode ist nicht so empfindlich, was sich besonders bei kleinen Antigenmengen bemerkbar macht. Die indirekte Methode ermöglicht hingegen auch die Verstärkung des Nachweissignals. Diese Amplifikation wird erreicht indem mehrere Makermoleküle über den Sekundärantikörper an das gesuchte Epitop binden.

Bei denen oben allgemein als Markermoleküle bezeichneten Substanzen handelt es sich entweder um Enzyme, die einen farblosen Farbstoff umsetzen und so zu einer Färbung führen (zum Beispiel Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase) oder fluoreszierende Farbstoffe, die man mit einem Auflichtmikroskop nachweist. Auch kolloidales Gold das sich Rot darstellt ist als Marker geeignet. Zur Verstärkung des Signals eignen sich ausschließlich Substanzen mit mehreren Bindungsstellen beispielsweise Avidin -Biotin Komplexe.

6.2. Entnahme der Katzenschilddrüse im Rahmen einer Sektion

Die Präparat-Serie der Katzen-Schilddrüsen stammt aus dem Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig Universität Giessen. Die dafür verwendeten Schilddrüsen wurden im Rahmen von Routinesektionen wie im folgenden beschrieben entnommen: Der Tierkörper wurde in Rückenlage fixiert. Der Hals überstreckt. Die Haut an der ventralen Halsseite von kranial des Kehlkopfes bis zum Brusteingang durch einen Longitudinalschnitt eröffnet. Anschließend wird die Haut durch zwei Entlastungsschnitte in transversaler Richtung entfernt. Im Anschluss werden die Muskeln Mm. sternohyoidei, Mm. sternothyroidei und sternomastoidei stumpf durchtrennt. Danach ist die Schilddrüse sichtbar. Diese wird nun vorsichtig aus dem umliegenden Fett und Bindegewebe freipräpariert, gelöst und entnommen.

Bei den seziierten Tieren war in keinem Fall eine Erkrankung der Schilddrüse bekannt.

6.3. Fixierung der Schilddrüsen

Durch die chemische Fixierung der Katzenschilddrüse in Formalin kommt es zu einer Stabilisation des Gewebes durch Eiweißfällung und Vernetzung der Moleküle. Die Katzenschilddrüsen wurden folgendermaßen behandelt

1. Es wurden Organstücke mit einer Kantenlänge von ca.0,5 cm aus der entnommenen Schilddrüse herausgeschnitten
2. Diese wurden in 37%ige Formaldehydlösung, die 1:10 mit PBS verdünnt wurde für 24h fixiert (über Nacht im Kühlschrank gelagert).
3. Am nächsten Tag wurden die Organstücke in pures PBS umgegossen

Ziel der Fixierung ist es Zerfall und Autolyse des Gewebes zu verhindern und das Material zu härten, um es besser schneidbar zu machen.

6.4. Einbetten der Schilddrüsen

Damit von den Schilddrüsenstücken dünne Schnitte angefertigt werden können, werden sie nach der Fixierung in Paraffin eingebettet. Zur Paraffineinbettung muss das Gewebe einer längeren Behandlung unterzogen werden. Dies ist erforderlich, da Paraffin nicht wasserlöslich ist. Zunächst wird aus der Schilddrüse das Fixierungsmittel herausgewaschen. Danach folgt eine sogenannte Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Das Gewebe wird dabei schrittweise in Alkoholbäder von 70% bis 100% Äthylalkohol eingelegt. Da Paraffin auch nicht in Alkohol gelöst werden kann, wird dieser anschließend in Bädern mit Xylol I und Xylol II durch die genannten Stoffe herausgewaschen. Nun kann die Schilddrüse in flüssiges Paraffin eingebettet werden. Dabei werden die Lösungsmittel durch Paraffin ersetzt, dass alle Spalten durchtränkt und das Präparat wird in einer Gießform in einem Paraffinblock eingeschlossen.

6.5. Das Schneiden der Präparate

Das Schneiden der eingebetteten Präparate erfolgt auf einem Mikrotom. Nach dem Schneiden werden die Schnitte im warmen Wasserbad (entionisiertes Wasser) auf einen Objektträger aufgezogen. Zum Aufnehmen der feinen Präparatscheiben eignet sich ein Pinsel. Die Objektträger werden zuvor mit einer feinen Eiweißschicht überzogen um ein Abschwimmen der Präperatestreifen zu vermeiden. Lichtmikroskopisch verwendbare Schnitte haben eine Schichtdicke von 5-20 μm . Zur Immunhistochemie wurden 5 μm dicke Schnitte vom Paraffinblock hergestellt. Die Schnitte werden gewöhnlich bei einer Temperatur von höchstens 60 ° C wärmegetrocknet.

6.6. Das Färben der Schnitte

Zur Färbung wurde eine gewöhnliche Hämatoxylin-Eosin-Färbung angewandt. Zu diesem Zweck muss der Schnitt nun wieder entparaffiniert werden. Dies geschieht mittels einer absteigenden Alkoholreihe(Rehydratation). In der Reihenfolge Rothistol I, Rothistol II, Isopropanol (für jeweils 5 min) und 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70%Ethanol, destilliertes Wasser (für jeweils 3min). Dann kann der Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt werden. Im Anschluss steht dann eine aufsteigende Alkoholreihe, die den oben genannten Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge entspricht. Danach wird das Präparat eingedeckt und ist nun fertig für die Beobachtung im Lichtmikroskop.

6.7. Demaskierung der Antigene

Zur Immunhistologischen Untersuchung die in Paraffin eingebetteten Präparate, genau wie vor der Färbung, einer Entparaffinierung und Rehydrierung unterzogen werden (siehe dazu 6.6). Das wird durch ein Bad in Xylol und eine absteigende Alkoholreihe erreicht. Danach wurden die Präparate zweimal in TRIS -gepufferter NaCl-Lösung gespült.

Die Fixierung der Präparate führt zu einer Denaturierung oder zum Ausfällen von Proteinen, was zu einer Maskierung antigener Strukturen führen kann. Daher müssen Formaldehyd-fixierte in Paraffin eingebettete Präparate entsprechend vorbehandelt werden um eine Demaskierung der Antigen-Strukturen zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde das Präparat einer dreimaligen Mikrowellenbehandlung bei 600 W für jeweils 5 min unterzogen. Das ganze wurde mit einem Citrat- Puffer (pH6) durchgeführt. Nach dem Demaskierungsarbeitsschritt müssen die Objektträger mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur in der Pufferlösung verbleiben.

6.8. Durchführung der Immunhistologie an der Schilddrüse der Katze

Nach dem oben beschriebenen Einbetten in Paraffin und der Routine Hämatoxilin-Eosin-Färbung, wurde die Immunhistologische Untersuchung durchgeführt. Um Einflüsse von potentiellen Schilddrüsenautoantikörpern der Katze nach Möglichkeit auszuschließen, wurden nur Schilddrüsen von Katzen verwendet, die vorberichtlich keine Anzeichen einer Schilddrüsenenerkrankung aufwiesen. Für die Immunhistologie wurden Paraffinschnitte von 5 μ m Dicke verwendet. Die Schnitte wurden auf 75 μ m Glasobjektträger (ChemMate microscope slides; Dako) aufgezogen. Die Präparate wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren Entparaffiniert und es wurde die oben beschriebene Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene durchgeführt. Anschließend erfolgte das Aufbringen des Antikörpers, dies wurde in einem automatischen Immunostainer (TechMate 500, Dako) durchgeführt. Zum Nachweis wurde ein Detection Kit (ChemMate Detection Kit LSAB Mouse; Dako) verwendet.

Dabei wurde der monoclonalen Antikörper BM734, der Firma Abcam, der sich gegen die humane thyreoidale Peroxidase richtet, benutzt. Der TPO Antikörper mit der Klonnummer 6 H 7, produziert in der Maus, wurde dabei in der Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Es wurde die Verdünnungssubstanz Dako REAL Antibody Diluent, Code-Nr S2022 des Herstellers verwendet. Der Antikörper ist ein spezifischer, monoclonaler Antikörper, des Isotypes IgG1, der nach Herstellerangaben, keine Kreuzaktivität mit anderen

menschlichen Serumproteinen zeigt.

Die immunhistologisch untersuchten Schnitte wurden fotografiert und digitalisiert.

7. Ergebnisse

7.1. Ergebnisse der Immunhistologie

Zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit von humanen TPO Antikörper und feliner TPO, wurde der humane monoklonale Antikörper, der sich gegen ein spezifisches Epitop der humanen thyreoidalen Peroxidase richtet auf einen Paraffinschnitt der Katzenschilddrüse aufgebracht. Ziel des Versuches ist es herauszufinden, ob eine Antigen-Antikörperreaktion zwischen dem felinen Antigen und dem humanen Antikörper möglich ist. Die allgemeine Histologie der Schilddrüse ist bereits ausführlich beschrieben worden (siehe dazu Teil I, Kapitel 2.1.2). Auf der Übersichtsaufnahme (siehe Bild 7.1) sind die Schilddrüsenfollikel zu erkennen. Diese werden durch das zwischen den Follikeln verlaufende Bindegewebe (2) voneinander getrennt. Das Bindegewebe geht nach außen in die Bindegewebskapsel (3) des Organs über. In den Aufnahmen sind auch mehrere Gefäße (6) sichtbar, die die Schilddrüse versorgen. Die Zellkerne (1) werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt. Die Follikelendokrinozyten (4) sind in dieser Übersichtsvergrößerung nur als Randsaum zu erkennen, der sich um das mit Kolloid (5) gefüllte Follikellumen gruppiert. Am Übergang von Follikelepithelzellen hin zum Follikellumen sieht man einen braunen Niederschlag. Dieser braune Farbniederschlag markiert die Bindung des Primärantikörpers am erkannten Zielantigen (8). Bei dem Primärantikörper handelt es sich um den bereits genannten monoklonalen Antikörper BM734 der sich gegen das humane Enzym TPO richtet. In dem verwendeten Nachweissystem Dako REAL Detection System wird als Farbsubstrat das Diaminobenzidin verwendet, was die braune Farbe letztendlich hervorruft.

Besser zu erkennen ist die Lokalisation des braunen Farbniederschlags (8) in den folgenden Abbildungen mit stärkeren Vergrößerungen (siehe Bild 7.2 und Bild 7.4).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Lage des Enzyms TPO, um dessen Nachweis oder vielmehr dessen Bindung durch den humanen Antikörper hier zusehen ist.

Die TPO ist ein Typ I glykosiliertes Transmembranprotein, das im apikalen Zellpol der Schilddrüsenfollikelepithelzelle lokalisiert ist [11]. Die TPO wird mit Hilfe der Polyribosomen gebildet und in die Membran des endoplasmatischen Retikulums eingebracht, wo es glykosiliert wird. Die TPO wird anschließend, gemeinsam mit Thyreoglobulin in exo-

Nummer	Bezeichnung
1	Zellkern
2	Bindegewebssepten
3	Bindegewebskapsel
4	Follikelendokrinozyten
5	Kolloid
6	Gefäß
7	Gefäßendothel
8	TPO

Tabelle 7.1.: Legende zu der Nummerierung in den Abb. 7.1, 7.2, 7.4, 7.5, 7.6

cytose Vesikeln zum Golgiapparat gebracht, wo die Glycolisierung abgeschlossen wird. Danach wird sie zum apikalen Zellpol der Thyreozyten gebracht. Der katalytisch-aktive Teil des Enzyms, der mit der Hämgruppe verbunden ist, zeigt dabei zum Follikellumen hin [78]. Die TPO katalysiert die Iodination von Thyrosinresten und die Kopplung von Jodthyrosinen zu T3 und T4. Diese Schlüsselrolle der TPO in der Schilddrüsenhormonsynthese wird in Teil I in Kapitel 2.3.1 bereits erläutert.

Die beschriebene Lage des funktionsfähigen Enzyms ist also in der apikalen Zellmembran zum Follikellumen hin gewandt, also genau dort, wo auch der braune Farbniederschlag zusehen ist. Durch die deutliche Farbreaktion an dieser Stelle lässt sich auf eine intakte Antigen-Antikörperreaktion schließen. Offensichtlich ist der humane monoklonale Antikörper, der sich spezifisch gegen ein Epitop auf der menschlichen thyreoidalen Peroxidase richtet, in der Lage das gleiche Epitop auch auf dem feline Enzym wiederzufinden.

7.2. Kontrolle

Kontrollen validieren immunhistologische Resultate. Es ist deshalb erforderlich, dass man in der Immunhistochemie Kontrollen mit einbezieht, um die Spezifität des genutzten Antikörpers einschätzen zu können. Obwohl monoklonale Antikörper sich definitionsgemäß nur gegen ein Epitop richten, gibt es trotzdem Epitopähnlichkeiten zwischen manchen Molekülen und ungewollte Kreuzreaktionen können die Folge sein. Generell gilt, um die Spezifität des Antikörpers nachzuweisen, es darf keine Färbung ohne den Primäantikörper entstehen. Diese negativ Kontrolle zur Prüfung der Spezifität der immunhistochemischen Reaktion, wurde in dieser Arbeit durch das Auslassen des Primäantikörpers

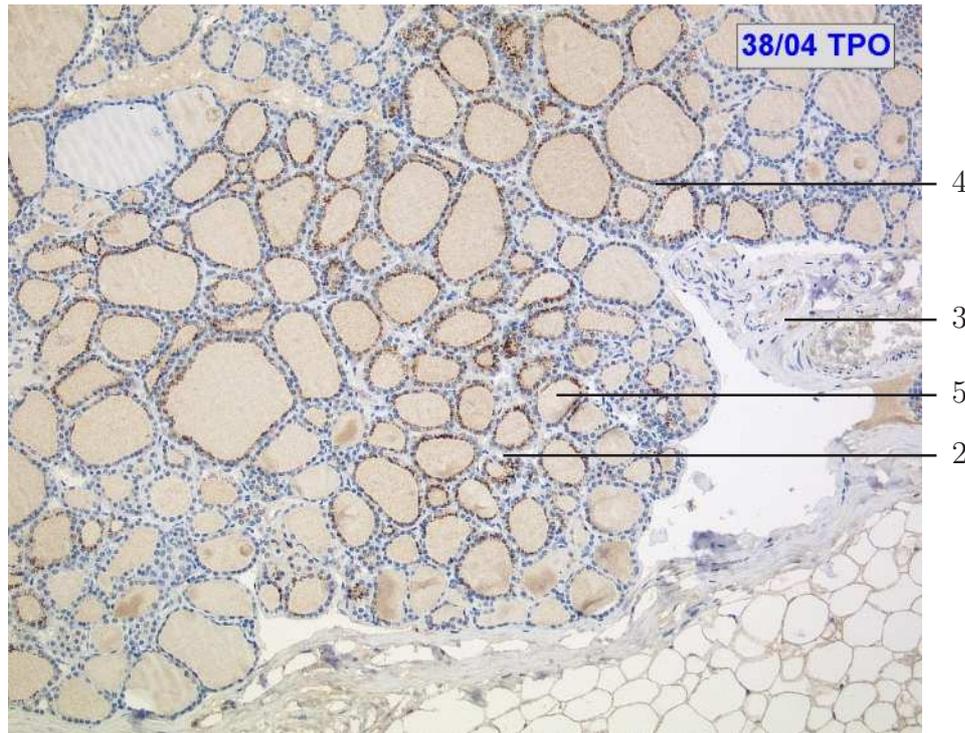


Abbildung 7.1.: Übersichtsaufnahme des felines Schilddrüsengewebes. Der Primärantikörper (BM734, anti Thyroid Peroxidase) wurde mit dem Dako REAL Detection System nachgewiesen. Das darin enthaltene Diaminobenzidin erzeugt am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein braunes Endprodukt. (Vergrößerung: 100x)

überprüft (siehe Bild 7.5). Zur Kontrolle wird einmal im Ablauf des Standardprotokolls auf den Primärantikörper verzichtet, um sicher zu gehen das der Sekundärantikörper auch nicht mit anderen Strukturen kreuzreagiert. Eine unspezifische Reaktion stellt sich als diffuse Braunfärbung dar, die in Bild 7.5 nicht zu sehen ist. Alternativ könnte man den Primärantikörper durch ein Immunglobulin ersetzen, das sich gegen ein nicht relevantes Antigen richtet.

Da das nicht Zustandekommen einer Färbung im Test nicht notwendigerweise bedeutet, dass das Antigen nicht vorhanden ist, ist eine Positiv-Kontrolle angezeigt. Zur Positiv-Kontrolle eignen sich Antikörper, die sich gegen Elemente richten, deren Vorkommen im Gewebeschnitt als gesichert gilt. Die gelungene Positiv-Kontrolle bestätigt regulär erhaltener Epitope. In dieser Arbeit (siehe Bild 7.6) wurde ein monoklonaler Anti-Vimentin Antikörper (KlonV9, DAKO) mit einer Konzentration von 1:50 eingesetzt. Vimentin ist ein Intermediärfilamentprotein, das ausschließlich in mesenchy-malem Gewebe genauer in Fibroblasten und Endothelzellen vorkommt. Für die Vimentin-Immunhistochemie wurde das Chem Mate Detection Kit APAAP Mouse; der Firma Dako eingesetzt. Das in der Positiv-Kontrolle verwendete Chromogen erzeugt am Ort

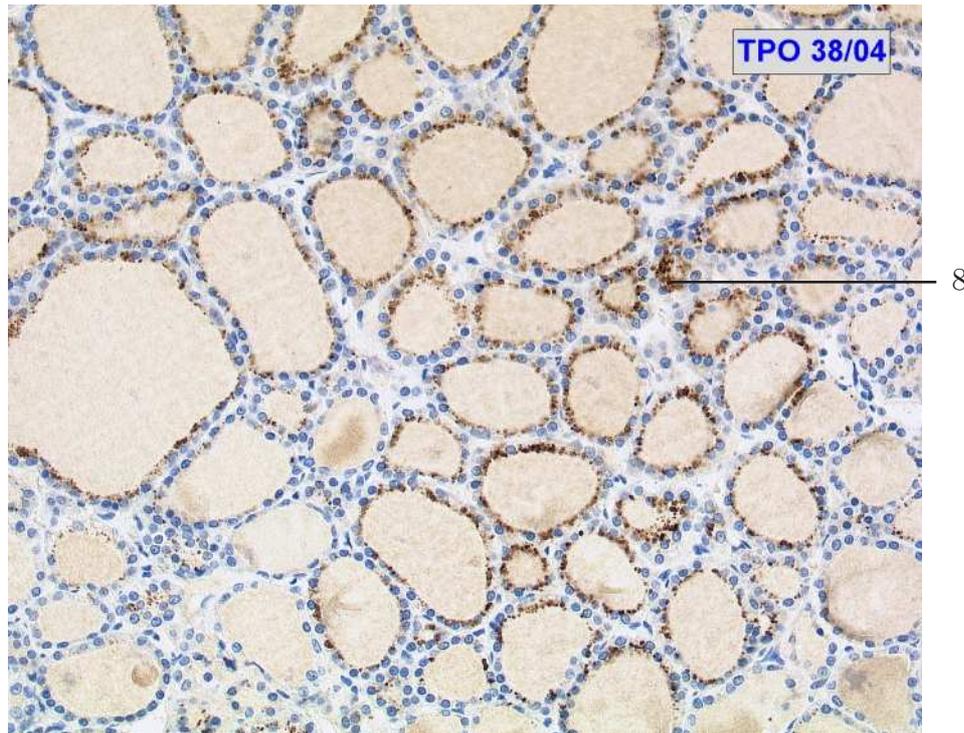


Abbildung 7.2.: Immunhistologisches Präparat des felines Schilddrüsengewebes 320. Der Primärantikörper (BM734, anti Thyroid Peroxidase) wurde mit dem Dako REAL Detection System nachgewiesen. Die Diaminobenzidin enthaltende Lösung erzeugt am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein braunes Endprodukt. Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt. Vergrößerung: 320x

des Vimentins eine rote Färbung. Wie in Bild 7.6 gut zu erkennen färbt sich ausschließlich das Gefäßendothel (7) rot an, was bedeutet, dass es sich um eine gelungene positiv Kontrolle handelt.

Die Ergebnisse der Immunhistologie zeigen, dass eine Bindung zwischen dem humanen Antikörper und der felines TPO zustande gekommen ist.

7.3. Strukturvergleich der Gensequenz der TPO des Menschen und der Katze

In der Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass die TPO von Mensch und Katze gewisse Übereinstimmungen aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörper gegen die humane-TPO ein Epitop auf dem felines Enzym erkennt. Um zu untersuchen wie groß die Gemeinsamkeiten der beiden Proteine sind, sollen zusätzlich die Gensequenzen, der beiden Proteine und auch deren Aminosäuresequenzen miteinander verglichen

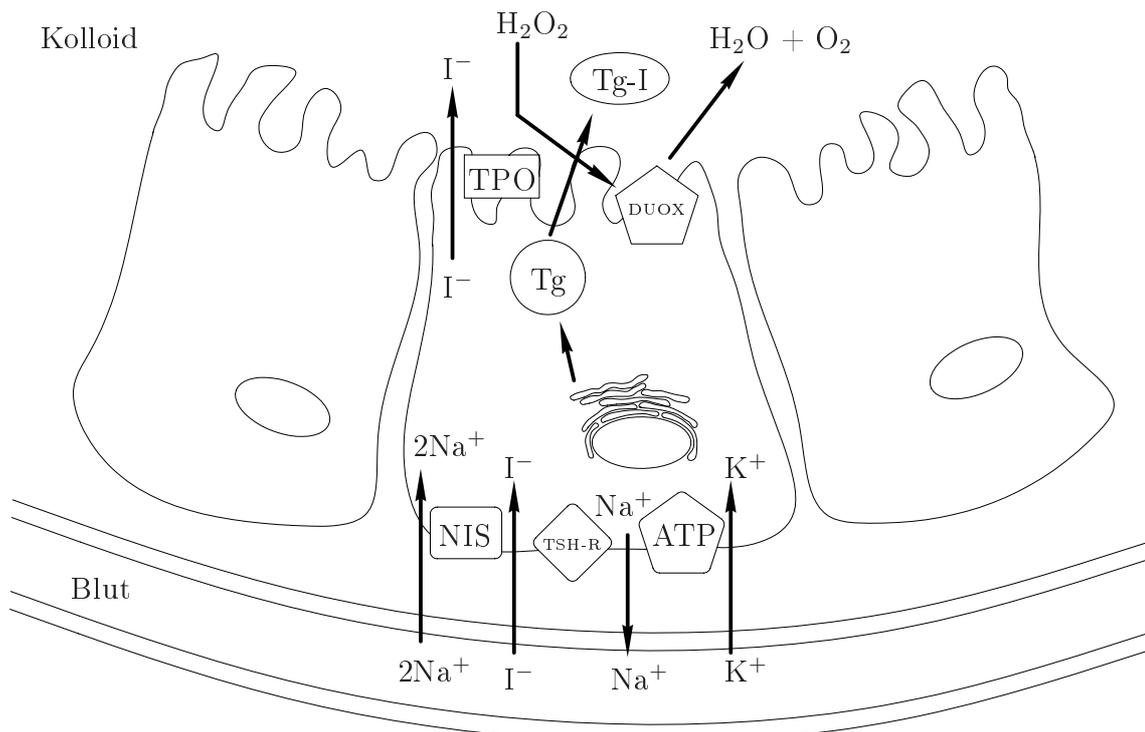


Abbildung 7.3.: Schematische Darstellung der Schilddrüsenepithelzelle und Lokalisation der TPO nach [11]

werden.

Die Gensequenz der TPO des Menschen ist bereits vollständig aufgeklärt. Sie ist unter verschiedenen Bezeichnungen bei unterschiedlichen Gendatenbanken hinterlegt (siehe dazu Tabelle 7.2). Die Sequenz des humanen TPO-Gens und die genauen Kenntnisse des humanen Proteins machen den direkten Vergleich mit dem Genom der Katze möglich. Die Gensequenz, die im menschlichen Genom für die Informationen über das Protein TPO kodiert, liegt auf 2p25.3. Das bedeutet die Information liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 im Abschnitt 25 vom Centromer aus gezählt und dort im Unterabschnitt 3. Sie startet auf Position 1,396,242 bp pter und endet auf Position 1,525,502 bp von pter und umfasst damit 129,261 Basen. Sie besteht aus 17 Exons und 16 Introns. Die Richtung ist als Plusstrang angegeben. Die cDNA setzt sich aus 3048 Basenpaaren zusammen.

Die Gensequenz codiert für das Protein TPO. Dieses setzt sich aus 933 Aminosäuren zusammen. Es besteht eine starke Homologie zur Myeloperoxidase, weshalb die TPO zur Familie der Myeloperoxidasen gezählt wird. Aufgrund von Übereinstimmungen in den Gensequenzen, geht man davon aus, dass sich die TPO des Menschen, genau wie die Myeloperoxidase, aus den Domänen MPO (Myeloperoxidase), CCP (Complement

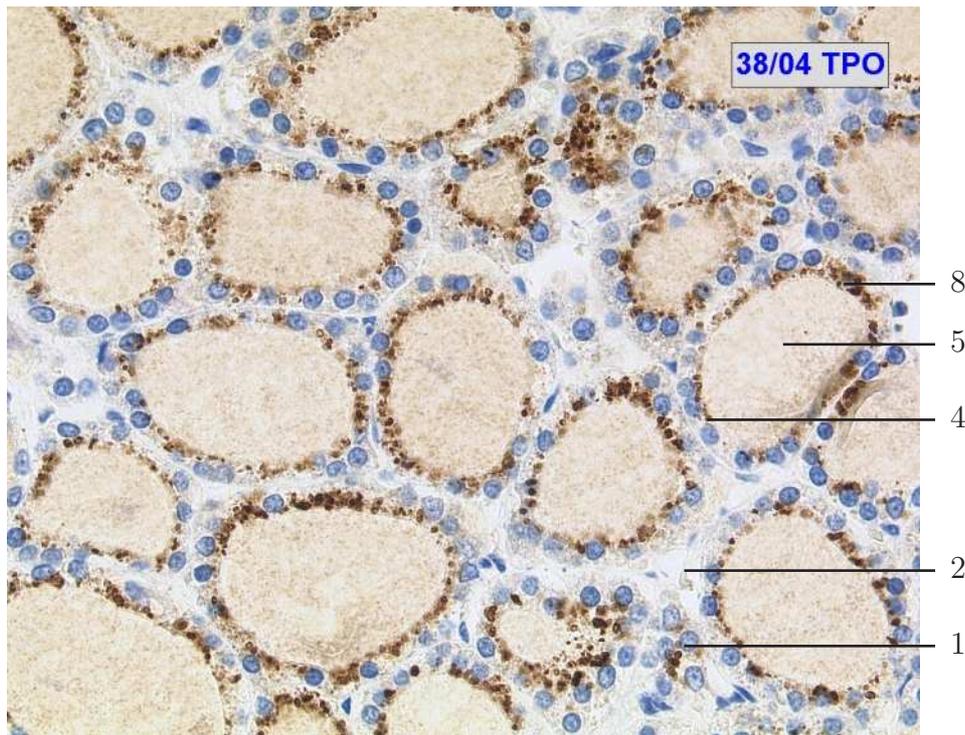


Abbildung 7.4.: Immunhistologisches Präparat des felines Schilddrüsengewebes. Der Primärantikörper (BM734, anti Thyroid Peroxidase) wurde mit dem Dako REAL Detection System nachgewiesen. Die Diaminobenzidin enthaltende Lösung erzeugt am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein braunes Endprodukt. Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt. Vergrößerung: 630x

control Protein) und EGF (Epidermal growth factor) zusammensetzt. Domänen sind kompakte Bereiche im Faltungsmuster einer Molekülkette, bei denen es den Anschein hat als könnten sie auch unabhängig von den übrigen Strukturen stabil sein. Die dreidimensionale Struktur der Myeloperoxidase ist durch Kristallographie bekannt. Davon abgeleitet, geht man davon aus, dass sich die Sekundärstruktur der TPO hauptsächlich aus α -Helices und wenig β -Faltblattstruktur zusammensetzt. Die TPO verfügt über ein Eisenprotoporphyrin-IX-Derivat als prosthetische Gruppe und bindet ein Calciumion pro Heterodimer. Die Hämgruppe, im Zentrum des Enzyms, ist verantwortlich für seine katalytischen Leistungen. Auf die Schlüsselrolle der TPO in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone wurde in Kapitel 2.3.1 bereits hingewiesen.

Es wurden bisher 8 Isoformen des Enzyms in menschlichen Zellen nachgewiesen. Nur die Isoform TPO-1 verfügt über die volle m-RNA Länge bei allen anderen Isoformen, fehlen ein oder mehrere Exons. Fast alle Isotypen sind jedoch so schlecht gefaltet, dass sie nicht in der Lage sind die Zelloberfläche zu erreichen. Die Lokalisation des Membranproteins, am apikalen Zellpol der Schilddrüsenfollikelendothelzelle, wurde im Zusammenhang mit der Immunhistologie in Kapitel 7.1 beschrieben und ist in Abb.7.7 verdeutlicht.

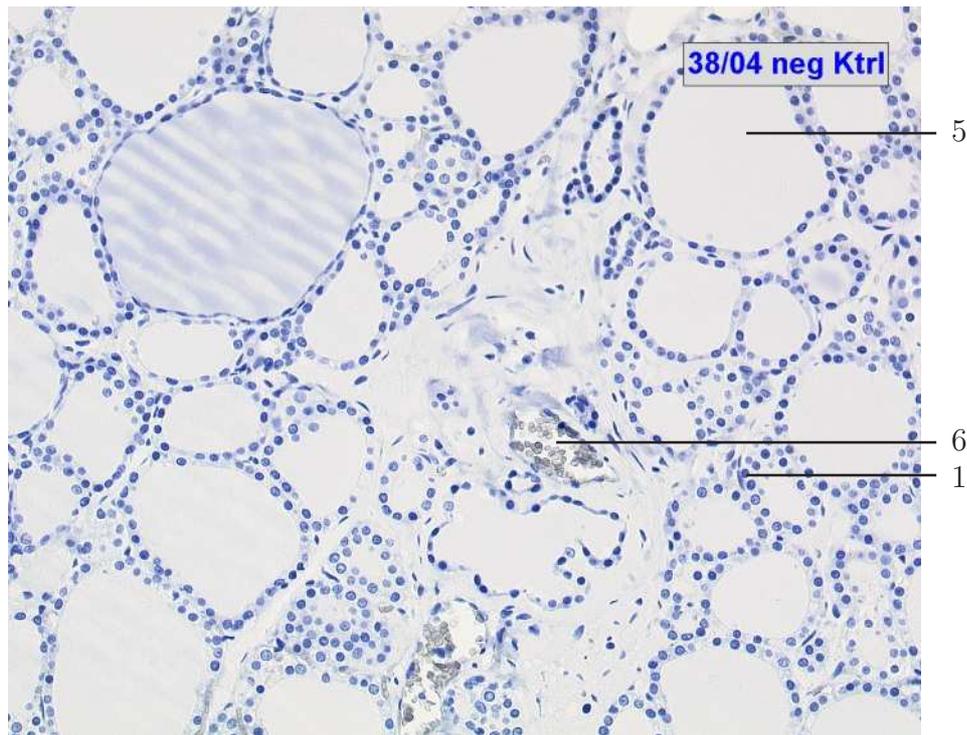


Abbildung 7.5.: Immunhistologisches Präparat des felines Schilddrüsengewebes, Negativkontrolle; Vergrößerung: 320x

Außer der TPO-1 sind nur die TPO-3 und die TPO-4 katalytisch aktiv, wobei die pathophysiologische Rolle der Isoformen drei und vier bisher nicht bekannt ist.

Polyklonale TPO-Antikörper, der Unterklasse IgG₁ und IgG₄, wie sie in Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen vorkommen, reagieren mit verschiedenen Epitopen, die auf der Oberfläche der humanen TPO lokalisiert sind. Diese immun-dominante Region (IDR), die von den Antikörpern erkannt wird, beschränkt sich auf bestimmte Domänen. Die genaue Lokalisation und die exakte Struktur des diskontinuierlichen IDR muss noch bestimmt werden. Fest steht, dass es sich um stark konformationelle Epitope handelt, das heißt, dass sie stark abhängig sind von der dreidimensionalen Struktur des Proteins. Unterschiedliche Studien [7, 8, 11, 19, 22, 26, 27, 53, 55, 74, 77, 79, 94] haben Fragmente identifiziert, die an der Bildung von Epitopen der humanen TPO beteiligt sind. Das sind die folgenden Peptide: 210-225, 353-363, 549-563, 599-617, 713-720 und 766-775. Diese Verteilung unterstreicht den diskontinuierlichen Charakter der Epitope und verdeutlicht die Bedeutung der dichten Proteinfaltung, ohne die die entsprechenden Stellen räumlich zu weit voneinander entfernt liegen würden, um an einem Epitop beteiligt zu sein.

Über die TPO der Katze ist im Vergleich zu der Fülle von Information über das

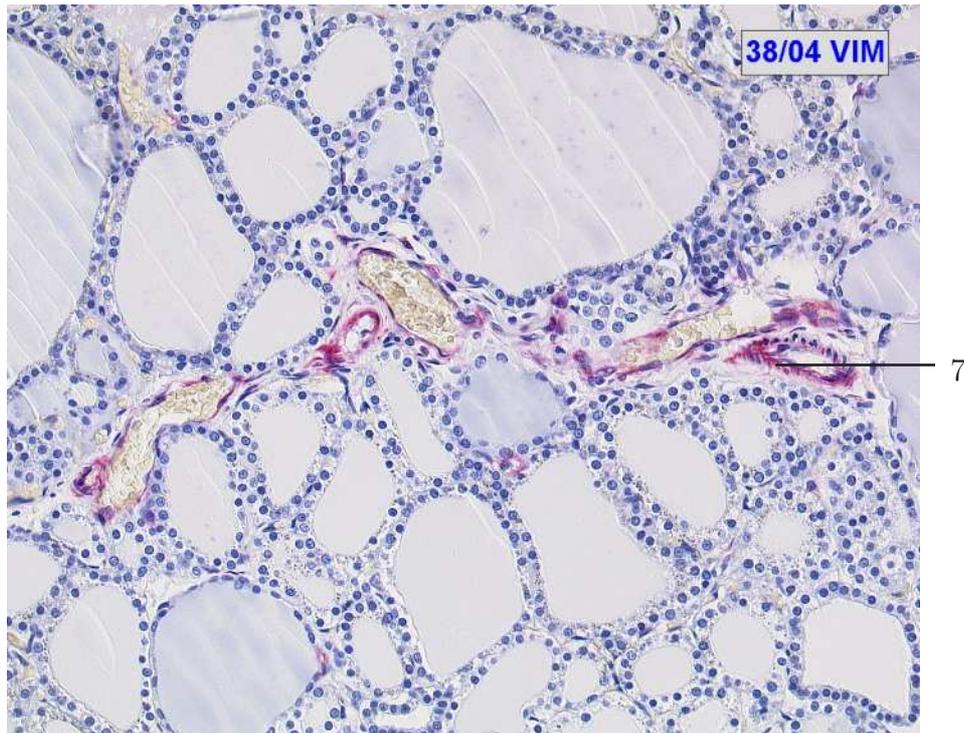


Abbildung 7.6.: Immunhistologisches Präparat des felines Schilddrüsengewebes. Der zur Positiv Kontrolle eingesetzte Antikörper (Vimentin) wurde mit dem Chem Mate Detection Kit APAAP Mouse (Dako) nachgewiesen. Das verwendete Chromogen erzeugt am Gefäßendothel ein rotes Endprodukt. Vergrößerung: 400x

menschliche Protein relativ wenig bekannt. In der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ist die Sequenz vorhanden, allerdings ist sie dort nicht als TPO benannt. Das TPO-Transkript der Katze besteht aus 2730 Basenpaaren. Das Gen enthält 17 Exons und 16 Introns. Die 3′untranslatierte Region ist 52 bp lang. Die 5′untranslatierte Region ist 50 bp lang. Das daraus resultierende Protein besteht aus 910 Aminosäuren. Die Informationen über die DNS-Sequenz des felines TPO-Gens sind im Ensembl Genome Browser (Griffith University, Southport, Queensland, Australien) mit der Accessionnummer ENSFCAG00000002875 hinterlegt. Das Genom der Katze liegt dort als Gene-scaffold vor. Um zu verstehen was das für den



Abbildung 7.7.: Lage der human TPO auf Chromosom 2, [11]

Name der Gendatenbank	Accessionnummern und Bezeichnungen für die TPO
1 HGNC	120151
2 Entrez Gene,	71732
3 UniProt/Swiss-Prot	P07202
4 Refseq	NM000547
5 OMIM	606765
6 Vega	OTTHUMG00000090271
7 Ensembl	ENSG000001157057

Tabelle 7.2.: Bezeichnungen der einzelnen Gendatenbanken für das Enzym TPO

Informationsgehalt bedeutet, muss man sich über die Schritte zur Entschlüsselung eines Eukaryonten-Genoms informieren. Die Sequenzierungsarbeit für die in Ensembl veröffentlichten Sequenzen wurde von Agnecourt Bioscience Corporation mit Unterstützung des Broad Instituts durchgeführt. Um die gesamte DNA der Katze zu sequenzieren, muss diese in geeigneten Fragmenten vorliegen. Je nach Sequenzierungsstrategie werden dabei Segmente unterschiedlicher Länge benötigt. Besonders bei großen komplexen Genomen, wie dem der Katze, werden möglichst große Fragmente in geeignete Vektoren z. B. BAC-Vektoren (bacterial artificial chromosomes, BACs) kloniert. Die Inserts dieser Vektoren werden nun ebenfalls in zufällige Fragmente zerlegt und in Plasmidvektoren kloniert. Alle überlappenden Sequenzen, die vom Insert eines BACs stammen, werden dann zu einem Contig (contiguous sequenz) zusammengesetzt. Ein Contig (engl. contiguous: angrenzend, zusammenhängend) ist ein Set überlappender DNA-Stücke, die von derselben genetischen Quelle stammen. Die erhaltenen Contigs können anschließend zu größeren Contigs zusammengelagert werden. Viele Contigs können schließlich zu sog. scaffolds (engl. Gerüst) zusammengebaut werden, wenn die Endsequenzen eines Inserts in zwei verschiedenen Contigs liegen. Auf diese Weise können die Contigs in der richtigen Reihenfolge angeordnet werden. Auch wenn zwischen ihnen noch Sequenzierungslücken bestehen, gelangt man so zu einer feinen Genkartierung. Die Sequenz für die TPO der Katze liegt auf GeneScaffold 1388 auf Position 9,912-52,326. Der Startpunkt des Transkript liegt auf Contig 190434.

Da die reine DNA-Sequenz eines Genoms noch nicht viel über deren Informationsgehalt verrät, ist eine sog. Annotation nötig. Die Annotation ordnet bestimmten Sequenzabschnitten biologische Bedeutung zu. Dabei werden transkribierte Sequenzen ermittelt, proteincodierende Sequenzen erfasst und Exon-Intron-Grenzen bestimmt. Bei sehr großen Genomen wird meist zuerst eine automatische Annotation durchgeführt. Dabei

werden unter anderem Homologien mit bereits bekannten Genen durch Vergleich mit öffentlich zugänglichen Datenbanken durchgeführt. Eine derartige Annotation ist auch für die Sequenz der Katze vorgenommen worden, die in Folge dessen als TPO hinterlegt ist. Die TPO-Gensequenz der Katze in der Ensembl Genome Browser-Datenbank wurden durch ein whole genome alignment (WGA) zu einem annotiertem Referenzgenom, dem Genom des Menschen, durch Projektion ermittelt. Die Transkripte ergaben sich durch ein BalstZ Sequenzalignment mit dem menschlichen Genom.

Das Sequenzalignment ist ein paarweiser Vergleich einzelner Positionen zweier oder mehrerer Sequenzen. Dieser Vorgang stellt die Grundlage der Sequenzanalyse dar. Mit diesem Vergleich kann man darüber entscheiden, ob ähnliche Tertiärstrukturen, vergleichbare Funktionen oder phylogenetische Gemeinsamkeiten bestehen. Beim Alignment ordnet man die einzelnen Sequenzen so an, dass die Reihenfolge der Sequenz erhalten bleibt und jede Base/Aminosäure einer Base/Aminosäure der anderen Sequenz oder einem gap (Lücke) zugeordnet wird. Eine Fehlpaarung in einem Alignment entspricht einer Mutation. Gaps weisen dagegen auf Deletionen beziehungsweise Insertionen hin.

Der Wert für die Identität der Sequenzen beschreibt die Zahl von Sequenzpositionen, die in einem Alignment identisch sind. Die Identität wird in Prozent der Alignmentlänge angegeben. Abhängig ist diese Größe zum einen von den verglichenen Sequenzen selbst und vom festgelegten Scoring-system. Das Scoring-system legt hierbei positive Zahlenwerte für Übereinstimmung einzelner Positionen und negative Werte für nicht übereinstimmende Positionen fest. Auch gaps werden mit negativen Zahlenwerten bestraft. Allgemein gilt der Gesamtscore ist die Summe aller Zahlenwerte. Je nach dem in welcher Weise man die Sequenzen jetzt aneinander lagert, entstehen unterschiedliche Werte. Das Alignment mit dem höchsten score ist das optimale Alignment. Dieses zu finden ist ein Optimierungsproblem, dass man mit Hilfe von verschiedenen Algorithmen numerisch lösen kann.

Mit dem online verfügbaren Sequenzalignment-Programm T-Coffee (Tree-based Consistency Objective Function for alignment Evaluation) des Schweizer Instituts für Bioinformatik, wurden die Aminosäure-Sequenz (ENSFCAP00000002649) der Katze im Rahmen dieser Arbeit auf Identität zum TPO-Isoform a (NP 000538) des Menschen untersucht. Der in diesem Programm verwendete Algorithmus ist progressiver Natur. Die im Programm zugrunde gelegten Heuristiken sind im Paper von Notredam, C. [62] beschrieben. Die Identität der TPO-Sequenz der Katze und der humanen TPO insgesamt lag bei einem Score von 98 %. Das vollständige Sequenzalignment ist dem Anhang dieser Arbeit zu entnehmen. In der gewählten Darstellung kennzeichnet ein Sternchen unter den Sequenzen eine Position, die in beiden Sequenzen identisch, und im Vergleich mit weiteren

TPO-Organismus	Gen-Identität	Protein Identität	NCBI Accessions-Nr.(%)
Canis familiaris	76,49	71,29	NM001003009.1; NP001003009.1%
Bos taurus	77,7	75,44	XM603356.3; XP603356.3%
Rattus norvegicus	77,38	76,24	NM019353.1; NP062226.1%
Mus musculus	76,83	-	NM009417.2; NP033443.1%

Tabelle 7.3.: Übereinstimmung (%) der einzelnen TPO-Gene/Proteine der Spezies mit der TPO des Menschen (Isoform-1)

TPO Molekülen als konserviert anzusehen ist. Ein Doppelpunkt weist auf Positionen hin bei der beide Sequenzen Reste mit sehr ähnlichen physikalisch-chemische Eigenschaften haben. Ein Punkt bedeutet, dass es sich um einen Rest mit mäßig ähnlichem physikalisch-chemischen Eigenschaften handelt. Die Quantifizierung der Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen setzt die Definition einer Ähnlichkeitsmetrik voraus, die festlegt, wie ähnlich sich die einzelnen Aminosäuren aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften sind. Es ist sinnvoll den Abgleich auf Aminosäureniveau zuführen, da die Codonvariabilität durch die Evolution wesentlich höher ist als die Aminosäurevariabilität. Außerdem ist aufgrund der Fragestellung in dieser Arbeit hauptsächlich die Ähnlichkeit der TPO-Proteine von Mensch und Katze von Interesse. Besonders für die immunologische Wechselwirkung bedeutsam ist, wie oben bereits ausgeführt wurde, das Gebiet zwischen der Aminosäure 599-617. Aus diesem Grund ist das nochmal gesondert untersucht worden. Der Score lag für diesen Bereich bei 94%. Die Bedeutung von Alignments lässt sich nach [51] so beschreiben, dass wenn man ein optimales Alignment voraussetzt, mindestens 45% der Aminosäuren übereinstimmen müssen, um ähnliche Strukturen und wahrscheinlich auch ähnliche Funktionen von zwei Proteinen erwarten zu können. Durch systematische Untersuchung der Strukturunterschiede zwischen Paaren verwandter Proteine konnte man eine qualitative Beziehung zwischen der Unterschiedlichkeit der Aminosäuresequenzen und den Unterschieden der Struktur definieren. Je weiter sich die Sequenzen voneinander entfernen, desto stärker werden die Verformungen in der Konformation. Solange der Anteil der der identischen Aminosäuren nicht unter 40-50% fällt, wirken sich die Veränderungen in der Konformation jedoch nur geringfügig aus. Eine weitere Hilfe zur Beurteilung der Übereinstimmung der untersuchten Sequenzen bietet das multiple Alignment. Dieses hat gegenüber der isolierten Betrachtung der untersuchten Sequenzen den Vorteil, dass ein multiples Alignment Gesetzmäßigkeiten über die Konservierung von Aminosäuren erkennen lässt. Auf diese Weise unterscheidet sich das gesuchte Alignment deutlich von einer zufälligen Übereinstimmung der Sequenzen. Die Tabelle 7.3 zeigt die Übereinstimmung der Gene und Proteine einzelner homologer Spezies im Vergleich zum

Exon	Übereinstimmung(%)
1	33%
2	44%
3	88%
4	97%
5	100%
6	100%
7	0%
8	0%
9	48%
10	48%
11	60%
12	56%
13	50%
14	46%
15	0%
16	52%
17	44%

Tabelle 7.4.: Übereinstimmung (%) der einzelnen Exons der TPO der Katze mit der TPO des Menschen (Isoform-1)

human-TPO-Gen oder zur human-TPO. Die Identität mit der menschlichen TPO bewegt sich zwischen 71,29 bis 77,70.

7.4. Untersuchung von Katzenseren auf Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase

Aufgrund der ermutigenden Ergebnisse aus dem Bereich der Immunhistochemie und die relativ hohe Übereinstimmung der Proteinsequenzen von feliner- und humaner-TPO, wurde der in der Humanmedizin gebräuchlichen CentAk-Anti-TPO Radioimmunoassay nun an einer Gruppe von 60 Katzenseren durchgeführt, um diese auf Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase zu untersuchen.

Die 60 Proben stammen aus dem Vet Med Labor in Ludwigsburg. Proben werden dort hin von Tierkliniken und Tierpraxen aus ganz Deutschland zur Untersuchung eingeschendet. Auf diese Weise handelt es sich um eine heterogene Patientengruppe mit männlichen

und weiblichen Katzen, unterschiedlicher Altersgruppen, die aus verschiedenen Regionen stammen und unterschiedlichen Bedingungen gehalten werden. Für diese Untersuchung wurden speziell 60 Katzenserum mit veränderten T4- und FT4 -Werten ausgewählt. Zur Untersuchung wurden 50 μl Serum verwendet. (Fünf weitere Proben stammen aus der Kleintierklinik der Justus von Liebig Universität in Giessen. Es handelt sich dabei um fünf Blutproben, die von Katzen entnommen wurden, bei denen zur Behandlung ihrer manifesten Hyperthyreose eine Radiojod-Therapie durchgeführt wurde. Die Hyperthyreose wurde aufgrund des klinischen Bildes und stark erhöhten T4 und FT4- Werten festgestellt. Die Blutproben wurden jeweils vor und nach Abschluss der Radiojod-Therapie entnommen. Zur Untersuchung wurde je 50 μl Serum verwendet).

Die Blutproben der Katzen wurden in den handelsüblichen Plastikröhrchen eingesendet. Nach vollständiger Gerinnung des Vollblutes wird es bei 3000U/min zentrifugiert. Das Serum wird sofort im Anschluss abpipettiert. Das Serum wurde tiefgefroren gelagert ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) und mit Hilfe einer Trockeneiskühlung verschickt.

Die Durchführung des Radioimmunoassay zur Untersuchung der genannten Katzenserum erfolgte im Labor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsklinik der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Da bezüglich der Untersuchung von Katzenserum mit diesem Radioimmunoassay noch keinerlei Daten vorliegen, entspricht das Versuchsprotokoll den für den Menschen vom Hersteller gelieferten Daten. Diese sind im Kapitel 3.2 und im Kapitel 3.2.3 dieser Arbeit ausführlich beschrieben worden und deshalb sei an dieser Stelle auf die genannte Beschreibung der Arbeitsschritte zur Durchführung des RIA verwiesen. Das Aufbereiten der Blutproben zur Durchführung entspricht dem in Kapitel 3.2.3 beschriebene Vorgehen der Referenzmethode.

Nr. der Katze	TT4-Wert (0,8-3,9 $\mu\text{g}/\text{dl}$)	FT4-Wert (0,5-2,6 ng/dl)
1	4,97	3,68
2	6,57	4,98
3	6,98	5,64
4	5,42	4,09
5	11,04	7,77
6	4,77	3,64
7	13,93	7,77
8	4,72	3,45
9	7,56	5,6
10	8,8	7,75

Nr. der Katze	TT4-Wert (0,8-3,9 $\mu\text{g}/\text{dl}$)	FT4-Wert (0,5-2,6 ng/dl)
11	10,23	7,77
12	17,49	7,77
13	18,05	7,77
14	4,55	3,35
15	5,74	4,18
16	4,82	3,93
17	5,55	4,12
18	19,93	7,77
19	19,16	7,77
20	24,86	7,77
21	9,76	7,77
22	5,25	2,99
23	14,34	7,77
24	23,15	7,77
25	4,54	3,55
26	11,85	7,77
27	9,53	7,77
28	8,94	6,61
29	21,17	7,77
30	3,96	2,71
31	7,67	6,26
32	14,8	7,77
33	14,2	7,77
34	9,13	7,54
35	5,23	4,41
36	3,95	2,25
37	7,07	5,15
38	18,23	7,77
39	9,33	7,71
40	4,07	2,86
41	5,15	3,82
42	5,5	3,71
43	4,98	3,85
44	13,22	7,77
45	4,65	3,25
46	9,46	7,56
47	10,24	7,77

7.5. Ergebnisse der Untersuchung von Katzenserum auf Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase

Nr. der Katze	TT4-Wert (0,8-3,9 $\mu\text{g}/\text{dl}$)	FT4-Wert (0,5-2,6 ng/dl)
48	19,65	7,77
49	4,55	3,06
50	4,11	2,79
51	8,31	6,01
52	12,73	7,77
53	4,9	3,89
54	22,39	7,77
55	6,3	5,3
56	8,36	7,77
57	5,01	3,99
58	16,13	7,77
59	4,27	3,79
60	7,6	6,06

Tabelle 7.5.: T4- und FT4-Werte der zur Untersuchung verwendeten Katzenserum aus dem Vet Med Labor

7.5. Ergebnisse der Untersuchung von Katzenserum auf Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase

Nr. der Katze	TPO-Antikörperwert
1	0,01
2	0,01
3	0,01
4	0,01
5	0,01
6	0,01
7	0,01
8	0,01
9	0,01
10	0,01
11	0,01
12	0,01
13	0,01
14	0,01

Nr. der Katze	TPO-Antikörperwert
15	0,01
16	0,01
17	0,01
18	0,01
19	0,01
20	0,01
21	0,01
22	0,01
23	0,01
24	0,01
25	0,01
26	0,01
27	0,01
28	0,01
29	0,01
30	0,01
31	0,01
32	0,01
33	0,01
34	0,01
35	0,01
36	0,01
37	0,01
38	0,01
39	0,01
40	0,01
41	0,01
42	0,01
43	0,01
44	0,01
45	0,01
46	0,01
47	0,01
48	0,01
49	0,01
50	0,01
51	0,01

Nr. der Katze	TPO-Antikörperwert
52	0,01
53	0,01
54	0,01
55	0,01
56	0,01
57	0,01
58	0,01
59	0,01
60	0,01

Tabelle 7.6.: TPO-Werte der mit dem CentAk-AntiTPO untersuchten Katzenserum

Wie sich aus der Tabelle 7.6 entnehmen lässt, waren bei keiner der Katzen TPO-AK nachweisbar.

8. Diskussion

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin den Radioimmunoassay der für die Bestimmung von TPO-AK in Patientenserum entwickelt worden ist, zu modifizieren und auf seine Eignung für die Trockenblutbestimmung zu überprüfen. Zusätzlich zur Evaluation des Trockenblutverfahrens für die TPO-Bestimmung in der Humanmedizin, sollte die Prüfung des Testsystems für seinen Einsatz in der Veterinärmedizin erfolgen.

Die in der Humanmedizin zur Diagnostik eingesetzten Radioimmunoassays zum Nachweis von TPO-AK, die zur Diagnose der Autoimmunkrankheiten der Schilddrüse herangezogen werden, erfolgen durch Entnahme einer Vollblutprobe, die entsprechend aufbereitet wird, um die Menge der Antikörper zu bestimmen. Die in dieser Arbeit vorgestellte veränderte Methodik ersetzt die Vollblutprobe durch eine Filterpapierkarte auf die Kapillarblut aufgetropft wurde. Die veränderte Aufbereitung (siehe Kapitel 3.3.2 und der zuverlässige Nachweis der TPO- Antikörper mit der Trockenblutmethode werden in dieser Arbeit vorgestellt.

Die Bestimmung von TPO-Antikörpern ist erforderlich um eine autoimmune Erkrankung der Schilddrüse nachzuweisen. Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase zirkulieren im Blut von Patienten, die unter einer Hashimotothyreoiditis, einem Morbus Basedow, einer subakuten oder idiopathischen Thyreoiditis leiden (siehe dazu Kapitel 2.5.5.3). Eine besondere Rolle spielt die Diagnose eines Morbus Basedow während der Schwangerschaft, da bei erkrankten Patientinnen, die gebildeten (hemmenden) Antikörper diaplazentar auf das Kind übertragen werden können. Beim unbehandelten Neugeborenen entwickelt sich eine schwere irreversible Debilität. Durch Screeninguntersuchungen beim Neugeborenen bisher nur auf TSH und ft4 mit Hilfe von Fersenblutstropfen am 5. Tag postpartum, kann die Erkrankung erkannt und Folgeschäden durch eine Thyroxin-substitutionsbehandlung vermieden werden. Durch die in hier vorgestellte veränderte Methodik besteht die Möglichkeit Fersenblutstropfen ebenfalls auf Antikörper gegen die thyreoidale TPO zu testen. Um Aussagen über die Verbreitung von Autoimmunkrankheiten in der Bevölkerung liefern können, sind breitgestreute Feldversuche nötig. Die Trockenblutbestimmung ist zu diesem Zweck besonders geeignet, da Blut aus der Fingerbeere leichter und schneller entnommen werden kann als aus einer Vene. Außerdem ist der Transport, der hinsichtlich der Temperaturunterschiede und Lagerungszeiten (siehe Kapitel 3.4.6) recht robusten Filterpapierkarten wesentlich einfacher als der von Serum.

Verlaufsuntersuchungen von Patienten, die bekanntermaßen unter einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung leiden, könnten aus den gleichen Gründen ebenfalls vereinfacht durchgeführt werden.

Aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der TPO-AK bei der Diagnostik von autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen und der noch zu erforschenden Rolle dieser Antikörper in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, erscheint es sinnvoll eine Methodik zu evaluieren, die genauso zuverlässig ist wie die bestehende Methode mit Serum, allerdings wesentlich einfacher in der Handhabung und viel stressfreier für den Patienten.

Die Zuverlässigkeit der veränderten Methodik wurde in dieser Arbeit geprüft. Als Maßstab für die Richtigkeit der Ergebnisse, wurden die in der Routinediagnostik angewendeten RIA-Testsysteme herangezogen. Die dabei verwendete Serummethode wurde als sogenannter Gold-Standard gewertet und die Bewertung der Filterpapiermethode richtet sich ausschließlich daran aus und berücksichtigt dabei nicht die Fehler der Referenzmethode. In diesem Zusammenhang werden Ergebnisse nicht als falsch berücksichtigt, die labor diagnostisch mit beiden Testsystemen einen erhöhten TPO-Ak-Spiegel nachgewiesen haben, aber im klinischen Gesamtbild nicht als Autoimmunerkrankung gewertet wurden.

Es wurden 147 Blutproben untersucht. Die Proben stammten zu 87% von Frauen mit unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen (siehe Kapitel 3.1.3) und sie wurden, mit Ausnahme der zur Langzeitlagerung untersuchten 11 Proben, alle in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität in Bonn entnommen und getestet. Die hier vorgestellten Ergebnisse beruhen auf der Grundlage des Radioimmunoassays der Firma Medipan 3.2 und gelten nur für das Filterpapier 2992 der Firma Schleicher und Schuell.

Die Trockenblutmethode wurde hinsichtlich verschiedener Parameter geprüft. Zunächst wurde die geeignete Anzahl von Filterpapierblättchen ermittelt. Jede vom Patienten mit Kapillarblut betroffene Filterpapierkarte enthält neun Tropfkreise von denen drei ausgestanzte Kreise in Lösung gehen müssen, um ein Ergebnis zu erzielen was dem der Standardmethodik entspricht (siehe Kapitel 3.4.1). Anschließend wurde in Verdünnungsreihen das optimale Blut/Puffer-Verhältniss ermittelt (siehe Kapitel 3.4.2). Das hinsichtlich der Reproduzierbarkeit beste Ergebniss wurde mit einer Verdünnung in $300\mu\text{l}$ festgestellt. Die Inkubationszeit der in Lösung gegangenen Blättchen wurde variiert und besonders unter dem Gesichtspunkt der Praktikabilität und Zeitersparnis wurde eine Inkubationszeit von 30 min festgelegt (siehe Kapitel 3.4.3). Um in den Testreihen vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen wurden mit Antikoagulanzen versehene Blutproben einzelner Patienten auf Filterpapierkarten aufgebracht. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Antikoagulanzen auszuschließen, wurden Proben mit und ohne Antikoagulanzen vergli-

chen. Es konnte keine Beeinflussung durch die Gerinnungshemmer festgestellt werden. Da aus Untersuchungen zur Trockenblutbestimmung von TSH [31] bekannt ist, dass sich das TSH ungleichmäßig im Trockenblutfleck verteilt, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob Unterschiede im Verteilungsmuster der TPO-Antikörper existieren, je nach dem ob der Tropfkreis randständig oder mittig ausgestanzt wurde. Ein solcher Konzentrationsunterschied wurde nicht festgestellt (siehe Kapitel 3.4.5). Erstaunlich robust erwiesen sich die Filterpapierkarten hinsichtlich der Lagerung. Die Lagerung der Filterpapierkarten wurde unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen bei Zimmertemperatur (22°C), im Kühlschrank (4°C) und im Tiefkühlschrank (-30°C) getestet. Am effektivsten erwies sich die Lagerung bei -20°C. Bei den Proben zur Langzeitlagerung lagen zwischen dem Entnahmedatum und dem Untersuchungsdatum ein Zeitraum von mindestens einem halben und höchstens einem ganzen Jahr (siehe Kapitel 3.12). Als Vergleichswert dient der am Probenentnahmetag bestimmte Serumwert. Der Untersuchungswert wurde mit Hilfe der Filterpapiermethode ermittelt. Obwohl bei diesen sehr langen Lagerzeiten und einer Lagerung bei Zimmertemperatur der TPO-Antikörper-Wert deutlich absinkt, ist es trotzdem bei diesen Proben nicht zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen gekommen. Von einer Probenlagerung über eine Zeitspanne von länger als drei Wochen bei Zimmertemperatur, muss auf Grund der erniedrigten Werte abgeraten werden, aber in der in diesem Zusammenhang bewiesenen Unempfindlichkeit der Trockenblutmethode gegenüber Umwelteinflüssen liegt sicherlich ein großer Vorteil dieser Vorgehensweise.

Um die Ergebnisse der statistischen Auswertung einordnen zu können muss man sich vergegenwärtigen, dass alle Messungen das direkte Ergebnis der Anzahl der radioaktiven Zerfälle im Gammacounter sind. Da radioaktiver Zerfall ein zufälliges Ereignis ist, können die Zahlenwerte niemals absolut betrachtet werden. Deshalb müssen die Werte innerhalb definierter Grenzen positiv oder negativ eingeordnet werden. Werte kleiner als 40 U/ml wurden als TPO-negativ bezeichnet, Ergebnisse über 50 U/ml wurden als positiv bewertet. Diese definierten Grenzen entsprechen den Angaben des Herstellers für die Serummethode und wurden für die Trockenbluttechnik für geeignet befunden und deshalb so beibehalten.

Alle 136 getesteten Proben, die zur Kontrolle jeweils mit dem Trockenblutverfahren und anhand von Serumproben untersucht wurden, sind mit beiden Verfahren in die gleichen Gruppen eingeordnet worden. Die Serummethode und die Filterpapiermethode kamen labordiagnostisch bei allen Patienten zum jeweils identischen Ergebnis. In der statistischen Auswertung der Ergebnisse konnte das anhand der Spezifität, der Sensitivität und des tetrachorischen Korrelationskoeffizienten gezeigt werden.

Das quantitative Ergebnis der Filterpapiermethode lag im Mittel um 20% unter denen

der Serummethode. Dies zeigte sich bereits in der deskriptiven Analyse, der Regressionsanalyse und der Zweistichprobentests. Diese Unterschätzung durch die Filterpapiermethode führt zu einem kritischen Bewertungsbereich zwischen 50 U/ml und 63U/ml. Um Fehldiagnosen in diesem sehr kleinen Bereich zu vermeiden wird ein Doppelansatz empfohlen und die labordiagnostischen Daten sollten unbedingt im klinischen Gesamtkontext kritisch bewertet werden. Die Abhängigkeit der beiden Vorgehensweisen voneinander konnte anschaulich durch den Unabhängigkeitstest nachgewiesen werden, der zeigt wie ein hoher Serumwert einen hohen Filterpapierwert nach sich zieht. Der Homogenitätstest hingegen hat bestätigt, dass beide Versuchsreihen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Bei der Betrachtung der Präzision der Ergebnisse fällt auf, dass die Intraassayvarianz der Filterpapiermethode mit ca. 8% kleiner ist als bei der Standardmethode, wo die Intraassayvarianz vom Hersteller mit 10% angegeben wird. Das bestätigt auch der Korrelationstest nach Bartko. Die Interassayvarianz ergibt 7,6% und liegt damit deutlich unter den Ergebnissen der Standardmethode (20%). im Rahmen dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass die Filterpapiermethode zum Nachweis von TPO-Antikörpern ebenso geeignet ist, wie die bestehende Methode. In der statistischen Betrachtung wird das bestätigt.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht ob das beschriebene modifizierte und evaluierte Trockenblutverfahren auch in der Tiermedizin zum Einsatz kommen kann.

Die Katze ist das Säugetier, bei dem eine Hyperthyreose mit großer Inzidenz auftritt, ähnlich wie beim Mensch. Ein besseres Verständnis der Pathogenese dieser häufigsten endokrinologischen Erkrankung der Katze ist durchaus von veterinärmedizinischem Interesse. Die Ätiologie dieser Erkrankung der Katze ist nicht bekannt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Sowohl eine Schilddrüsenautonomie als auch ein autoimmunes Geschehen werden als Ursache der Erkrankung postuliert. In Anlehnung an Parallelen zum Morbus Basedow des Menschen wurde nach den TSH-Rezeptor stimulierenden Antikörpern bei der Katze gesucht, in dem man den geklonten TSH-Rezeptor der Katze benutzt hat um nach Antikörpern in Seren von Katzen zu suchen, die diesen Rezeptor stimulieren. Es konnten mit diesem Ansatz keine den TSH-Rezeptor stimulierenden Antikörper bei Katzen nachgewiesen werden [61]. In der Humanmedizin werden zum Nachweis des Morbus Basedow jedoch nicht alleine Antikörper gegen den TSH- Rezeptor herangezogen, sondern auch Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase. Ein Nachweissystem für Autoantikörper bei Schilddrüsenenerkrankungen existiert bisher für die Katze nicht. Nur für den Hund gelang es bisher Antikörper gegen Thyreoglobulin nachzuweisen und schließlich auch Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase.[87]. Einer Literaturquelle zur Folge [40] wurden mikrosomale Antikörper bei der Katze nachgewiesen. Um Aussagen über die mögliche Anwendung des Trockenblutverfahrens für die Spezies *felis catus*

zutreffen, muss man zunächst feststellen ob das für die Humanmedizin geeignete Radioimmunoassay in der Lage ist die feline Antikörper zu erkennen. Da bisher mangels eines Nachweissystems kein Tier gibt, von dem zweifelsfrei feststeht, dass es Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase bildet, konnte kein direkter Anwendungstest des Radioimmunoassays erfolgen.

Essentiell zum funktionieren des Nachweissystems ist die Bindung von Antigen und Antikörper. In dieser Arbeit konnte durch eine durchgeführte Immunhistologie gezeigt werden, dass der humane monoklonale Antikörper, der sich spezifisch nur gegen ein Epitop der humanen TPO richtet, in der Lage war dieses Epitop auf dem feline TPO-Enzym wiederzufinden und eine deutlich sichtbare Bindung mit demselben einzugehen (siehe Kapitel 7.1 und Abbildung 7.4). Durch entsprechende Kontrollen konnten die immunhistologischen Resultate validiert werden. Eine unspezifische Färbung konnte ausgeschlossen werden. Der Einsatz eines Antikörpers, der sich gegen Vimentin richtet, als positiv Kontrolle bestätigte regulär erhaltene Epitope. Der charakteristische braune Farbniederschlag lies sich unter räumlich funktionalen Aspekten sehr genau der Lokalisation der TPO, am apikalen Zellpol der Schilddrüsenepithelzelle zuordnen (vergleiche Abbildung 7.3).

Polyklonale TPO-Antikörper, die in Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen vorkommen, reagieren mit verschiedenen Epitopen, die auf der Oberfläche der humanen TPO lokalisiert sind. Diese immundominante Region (IDR), die von den Antikörpern erkannt wird, beschränkt sich auf bestimmte Domänen. Die genaue Lokalisation und die exakte Struktur des diskontinuierlichen IDR muss noch bestimmt werden. Fest steht, dass es sich um stark konformationelle Epitope handelt, das heißt, dass sie stark abhängig sind von der dreidimensionalen Struktur des Proteins. Die nachgewiesene Bindung zwischen dem monoklonalen humanen Antikörper und dem feline Protein bedeutet, dass das Epitop der feline TPO, dem Epitop der human TPO sehr ähnlich sein muss.

Bestätigt wird diese Tatsache durch den Vergleich der Gensequenzen. In der Gendatenbank Ensembl Genome Browser (Griffith University, Southport, Queensland, Australien) mit der Accessionnummer ENSFCAG00000002875 sind die Informationen über die TPO der Katze hinterlegt. Das Genom der Katze liegt dort als Gene-scaffold vor. Ein Sequenzalignment der ins fasta Format übertragenen Proteinsequenzen humaner TPO (TPO-Isoform a (NP 000538) der NCBI) und feline Protein TPO (ENSFCAP00000002649) zeigte eine Übereinstimmung von 98 % der Proteine. Der paarweise Vergleich der einzelnen Positionen der beiden Proteine wurde mit dem online verfügbaren Sequenzalignment-Programm T-Coffee (Tree-based Consistency Objective Function for alignment Evalua-

tion) des Schweizer Instituts für Bioinformatik, durchgeführt (siehe Anhang). Da eine Antigen-Antikörperreaktion in der Immunhistochemie stattgefunden hatte und eine relativ hohe Übereinstimmung von 98% der Proteinsequenzen von feliner- und humaner-TPO anhand des Sequenzalignments gezeigt werden konnte, wurde im Anschluss, der in der Humanmedizin gebräuchlichen CentAk-Anti-TPO Radioimmunoassay nun an einer Gruppe von 60 Katzenseren durchgeführt, um diese auf Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase zu untersuchen. Die Proben stammen von VetMedLabor in Ludwigsburg und wurden von Katzen mit veränderten Schilddrüsenwerten entnommen (siehe Kapitel 7.5). Das Ergebnis war in allen 60 Fällen negativ. Es konnte bei keiner der untersuchten Katzen Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase mit dem Radioimmunoassay nachgewiesen werden.

Das negative Testergebnis kann zum einen bedeuten, dass alle im Rahmen dieser Dissertation untersuchten schilddrüsenauffälligen Katzen keine Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase bilden oder zum anderen aussagen, dass der verwendete Test, trotz der großen Ähnlichkeit beider Proteine, nicht in der Lage ist die feline Antikörper nachzuweisen. Obwohl es mindestens ein gemeinsames Epitop zwischen dem feline und dem humanen Protein geben muss, da eine Bindung in der Immunhistologie nachweisbar war, könnte es sein, dass die Katzen, die Antikörper in einer heterogenen Antikörpergruppe bilden, nun ausgerechnet keine gegen das gemeinsame Epitop ausbilden. Deshalb gibt dieses negative Ergebnis alleine noch keine abschließende Antwort. Auf jeden Fall bedarf dieser Umstand der weiteren Klärung, bevor man eine immunogene Pathogenese der Hyperthyreose letztendlich ausschließt [6].

Um letzte Sicherheit zu erlangen könnte man ein diagnostisches System in Form eines TPO -Elisa etablieren. Auf diesem Elisa befinden sich dann Antikörper gegen die humane TPO. Diese werden dann als positiv Kontrolle mit humaner markierter TPO zur Bindung gebracht. Dann gibt man Seren von Patienten dazu, die Antikörper gegen die TPO bilden. Die Antikörper werden ebenfalls an die TPO binden, was bedeutet dass weniger markierte Bindungen zustande kommen und das Bindungssignal des Elisa schwächer ausfällt. Als negativ Kontrolle nimmt man die Seren nachweislich TPO negativer Patienten, die keine oder nur geringen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit haben. Im Anschluss werden die Seren von Katzen in diesem System überprüft, wenn hier eine Bindung stattfindet, wäre sogleich ein Beweis für die Bindung an einem pathogenese relevanten Epitop erbracht.

Obwohl es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen ist Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase bei der Katze nachzuweisen, denke ich, ähnlich wie die in dieser Arbeit mehrmals zitierten Autoren [61], dass die Ätiologie der Hyperthyreose heterogener Natur

ist und die immunogene Entstehung sicherlich einen Teil der Krankheitsfälle ausmacht. Auch wenn fest steht, dass sich der hier untersuchte Radioliganden-Assay (Medipan, CentAK anti- TPO) in dieser Form nicht zum Nachweis eignet.

9. Zusammenfassung

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine veränderte Methodik zum Nachweis von Antikörpern gegen die thyreoidale Peroxidase für die Humanmedizin evaluiert. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die mögliche Anwendung des untersuchten Testsystems in der Veterinärmedizin speziell für Katzen untersucht. Die Bestimmung von TPO-Antikörpern ist erforderlich um eine autoimmune Erkrankung der Schilddrüse nachzuweisen. Die in der Humanmedizin zur Routinediagnostik eingesetzten Radioimmunoassays zum Nachweis von TPO-AK erfolgen durch Entnahme und Aufbereitung einer Vollblutprobe. Für hier vorgestellte veränderte Verfahren genügt als Ausgangsmaterial die Gewinnung von wenigen Tropfen Kapillarblut, die auf eine Filterpapierkarte aufgetropft werden. Die veränderte Aufbereitung und der Nachweis, dass die Filterpapiermethode Ergebnisse mit der gleichen Zuverlässigkeit wie die bereits etablierte Methodik liefert, ist Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden 60 Katzenseren auf Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase untersucht. Obwohl anhand einer Immunhistologischen Untersuchung und aufgrund einer Gensequenzalignments eine hohe Ähnlichkeit der felines und humanen TPO nachgewiesen werden konnte, gelang es nicht Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase bei der Katze mit diesem Testsystem nachzuweisen. Um eine immunogene Pathogenese der felines Hyperthyreose mit Sicherheit auszuschließen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

A. Gensequenzvergleich

A. Gensequenzvergleich

http://tcoffee.vital-it.ch/Tmp/TCOR/tcfTCOR68341_21629.clustalw_aln

CLUSTAL FORMAT for T-COFFEE Version_6.07 [<http://www.tcoffee.org>] [MODE: unspecified], CPU=0.64 sec, SCORE=98, Nseq=2, Len=1054

```
Ktz      MRVLTVLGVALLVACSHRLLPFIQTGQDLLWGRA-ESAVTRAVEESRRMVDEAIYHTMKR
msch     mralavlsvtlvmacteaffpfisrgkellwgkpeesrvssvleeskrldvtamyatmqr
          **.*:**.*:**:***. ::**. *:*:**:.. ** * : .:**:*:** *:* **:*

Ktz      DLSERESPSPSQLLSFSKLEPTSRVARAAEIMEASVQAVKTRVYGLRRSQPPTDVLP
msch     nlkkgilspaqlsfskpeptsgviaraaeimetsiqamkrkvnltkqgshptdals
          :*.:* **:*:**:***. ::**:***:*:**:* * * ::** ***.*.

Ktz      EDVLSSTIANLSGCLPHMLPPTCPDTCLANKYRLITGACTNRDHPRWGASNTALARWLPPA
msch     edllsiianmsgclpymppkpcntclankyrpitgacnrdhprwgasantalarwlpv
          **:* **:*:**:***.*:*:**:*** **:*:**:***.***.***.***.***.***.

Ktz      YEDGISEARGWNPVLYNGFPLPPXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
msch     yedgfsqprgwnpgflyngfplpp-----
          **:*:**.*:**.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.

Ktz      XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXT-----
msch     -----vrevtrhviqvsnevvtddd
          .

Ktz      -----SGR
msch     rysdllmawgqyidhdiaftpqstskaafgggadcqmtcenqnpcfpiqlpeearpaagt
          :*

Ktz      SCLPFYRSSAACGTGIQGAFFGNLTSANPRQQMNGLTSFLDASTVYGSSPALEKQLRNWT
msch     aclpfyrssaacgtgdqgalfgnlstanprqqmngltsfldastvygsspalerqlrnt
          :***** **:*:**:***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.

Ktz      SAEGLLRVNTRHWDAGRAYLPFARPPGPTGCAPEPGTRGTAQAPCFLAGDGRASEVPALT
msch     saegllrvharlrdsgraylpfvpprapaacapepgipgetrgpcflagdgrasevpslt
          **:*:**:* **:*:**:***.*.*:*:**:*** **:*:**:***.***.***.***.

Ktz      ALHTLWLREHNRLAVALKALNAHWSANTAYQEARKVVGALHQIITMRDYIPKVLGPEAFQ
msch     alhtlwlrehnrlaaalkalnahwsadavyqearkvvgalhqiiitlrdyiprilgpeafq
          **:*:**:***.*:**:***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.

Ktz      QHVGPEYEGYDPTVDPTVSNVSTAAFRFGHATVHPLVRRLDASFREHPALPPLRLQDAFF
msch     qyvgpeyegydstanptvsnvstaafrfghatihplvrrldasfrehpdlpglwlhqaff
          *:*:**:***.*.*:**:***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.

Ktz      SPWRVL---GLDPLVRGLLSRPAKLQVQDQLMNEELTERLFVLGSSGMLDLASINLQRGR
msch     spwtllrggldplirgllarpaklqvqdqlmneelterlfvlsnsstldlasinlqrgr
          *** :* **:*:**:***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.

Ktz      DHGLPGYNARRFCGLPALETRAHLRTATANASIAGRMMMDLYGHPDNIDVWLGGLAETFL
msch     dhglpgynewrefcglprletpadlstaiarsvadkildlykhpndidvwlgglaenfl
          **:*:**:***.*:**:***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
```

http://tcoffee.vital-it.ch/Tmp/TCOR/tcfTCOR68341_21629.clustalw_aln (1 von 2)31.10.2008 17:23:51

```
Ktz          PRARTGPLFACLIGRQMKALRDGDRFWWESSGVFTEAQRRLARHSLSRVICDNTGLPSV
msch        prartgplfacligkqmkalrdgdwfwenshvftdaqrrelekhslsrvicdntgltrv
          *****:***** * **.* ***:****:* :*****. *

Ktz          PPDAFLVGRFPRDFESCENIPGLNLDAWREVL PQGDACGLQGGVDNGDWALCGEPGQRVL
msch        pmdafqvgkfpedfescdsitgmnleawretfpqddkcgfpesvengdfvhceesgrrvl
          * ** * **:* **.* *****:.*.* ***:****.* **:* .*:****:. * *.*:***

Ktz          VFSCHHGFRLLHGPEQVPCSPRGRFQPPVC-----
msch        vyscrhgyelqgreqltctqegwdfqplckdvnecadgahppchasarcrintkggfqcl
          *:***:***:.*:* **:*.* * ***:**

Ktz          -----RXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
msch        cadpyelgddgrtcvd-----

Ktz          XSGRLPKASWVSVALGALLVGGLAGLTWTVVCRWTHAGRKSSLPVQTGGACPP-----
msch        -sgrlprvtwismslaalligfagltstvicrwtrtgtkstlpisetgggtpelrcgkh
          *****:.*:***:.*.* ***:***:**** ***:****:.* ***:*** :***. *

Ktz          -GPGTSPETGAQPGACTRGAG-----Q
msch        qavgtspqraaaqdseqesagmegrdrhlpral
          . *****: .* .: . **
```


cons * : **** : : ***** : : ***** : : ***** : : *

Ktz WDAGRAYLPFARPPGPTGCAPEPGTRGTAQAPCFLAGDGRASEVPALTALHTLW
msch rdsgraylpfvpprapaacaapepgipgetrgpcflagdgrasevpsltalhtlw

cons * : ***** . * . * : . ***** * : : . ***** : *****

Ktz LREHNRLAVALKALNAHWSANTAYQEARKVVGALHQIITMRDYIPKVLGPEAFQ
msch lrehnrllaaalkalnahwsadavyqearkvvgalhqiiitlrdyiprilgpeafq

cons ***** . ***** : : . ***** : ***** : *****

Ktz QHVGPEYEGYDPTVDPTVSNVSTAAFRFGHATVHPLVRRLDASFREHPALPPLR
msch qyvgpyegydstanptvsnvfstaafrfghatihplvrrldasfgehpdplglw

cons * : ***** . * . : ***** : ***** : ***** : *** ** *

Ktz LQDAFFSPWRVL---GLDPLVRGLLSRPAKLQVQDQLMNEELTERLFLVGGSSGM
msch lhqaffspwtllrgggldplirgllarpaklqvqdqlmneelterlflvlsnsst

cons * : ***** : * ***** : ***** : ***** : ***** . * .

Ktz LDLASINLQGRDHGLPGYNARREFCGLPALETRAHLRTATANASIAGRMMMDLY
msch ldlasinlqgrdhgldpgynarrefcglprletpadlstaiasrsvadkildly

cons ***** ***** ** . ***** ** * . * ** * . * : . : : *****

Ktz GHPDNIDVWLGGLAETFLPRARTGPLFACLIGRQMKALRDGDRFWWESSGVFTE
msch khpdnidvwlgglaenflprartgplfacligkqmkalrdgdwfwwenshvftd

cons ***** . ***** : ***** ***** . * *** :

Ktz AQRRLARHSLSRVICDNTGLPSVPPDAFLVGRFPRDFESCENIPGLNLDAWRE
msch aqrrelekhslsruvicdntgltrvpmdafqvgkfpedfescdsitgmleawre

cons ***** : * : ***** . ** *** ** : ** . ***** : . * . * : *****

Ktz VLPQGDACGLQGGVDNGDWALCGEPGQRVLVFSCHHGFRLHGPEQVPCSPRGGR
msch tfpqddkcgfpesvengdfvhceesgrrvlvyscrhgyelqgreqltctqegwd

cons . : ** . * ** : . * : ***** : . * * . * : ***** : ** : ** : . * : * ** : . * : . *

Ktz FQPPVC-----RXX
msch fqpplckdvnecadgahppchasarcntkggfqclcadpyelgddgrtcvd--

cons ***** : * █

A. Gensequenzvergleich

http://tcoffee.vital-it.ch/Tmp/TCOR/tefTCOR5435_8809.clustalw_aln

**

```
ENSFCAP0000002649/1-910
ALHTLWLREHNRLAVALKALNAHWSANTAYQEARKVVGALHQIITMRDYIPKVLGPEAFQ
ENSP00000329869/1-933
ALHTLWLREHNRLAAALKALNAHWSADAVYQEARKVVGALHQIITLRDYIPRILGPEAFQ
*****
*****
```

```
ENSFCAP0000002649/1-910
QHVGPYEGYDPTVDPTVSNVSTAAFRFGHATVHPLVRRLDASFREHPALPPLRLQDAFF
ENSP00000329869/1-933
QYVGPYEGYDSTANPTVSNVSTAAFRFGHATIHPLVRRLDASFQEHDPPLGLWLHQAFF
*****
*****
```

```
ENSFCAP0000002649/1-910 SPWRVL---
GLDPLVRGLLSRPAKLQVQDQLMNEELTERLFLVSSGMLDLASINLQRGR
ENSP00000329869/1-933
SPWTLRGGGLDPLIRGLLARPAKLQVQDQLMNEELTERLFLVLSNSSTLDLASINLQRGR
*****
*****
```

```
ENSFCAP0000002649/1-910
DHGLPGYNAWRRFCGLPALETRAHLRTATANASIAGRMMDLYGHPDNIDVWLGGLAETFL
ENSP00000329869/1-933
DHGLPGYNEWREFCGLPRLETPADLSTAIASRSVADKILDLYKHPDNIDVWLGGLAENFL
*****
*****
```

**

```
ENSFCAP0000002649/1-910
PRARTGPLFACLIGRQMKALRDGDRFWWESSGVFTEAQRRLARHSLSRVICDNTGLPSV
ENSP00000329869/1-933
PRARTGPLFACLIGKQMKALRDGDFWFWENSHVFTDAQRELEKHSLSRVICDNTGLTRV
*****
*****
```

*

```
ENSFCAP0000002649/1-910
PPDAFLVGRFRDFESCENIPGLNLDAREVLPQGDACGLQGGVDNGDWALCGEPGQRVL
ENSP00000329869/1-933
PMDAFQVGKFPEDFESCDSITGMNLEAWRETFPQDDKCGFPESVENGFVHCEESGRRVL
*****
*****
```

```
ENSFCAP0000002649/1-910
VFSCHHGFRHLHGPEQVPCSPRGGRFQPPVC-----
ENSP00000329869/1-933
VYSCRHGYELQGREQLTCTQEGWDFQPPLCKDVNECADGAHPPCHASARCRNTKGGFQCL
*****
*****
```

*

```
ENSFCAP0000002649/1-910 -----
RXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
ENSP00000329869/1-933
CADPYELGDDGRTCVD-----
```

http://tcoffee.vital-it.ch/Tmp/TCOR/tefTCOR5435_8809.clustalw_aln (2 von 3) 31.10.2008 19:29:25

http://tcoffee.vital-it.ch/Tmp/TCOR/tcfTCOR5435_8809.clustalw_aln

```
ENSFCAP0000002649/1-910
XSGRLPKASWVSVALGALLVGGLAGLTWTVVCRWTHAGRKSSLPIVQTGGACPP-----
ENSP00000329869/1-933      -
SGRLPRVTWISMSLAALLIGGFAGLTSTVICRWTRTGTKSTLPISETGGGTPELRCGKH
                        *****: .: * : * : * . * * : * * : * * * * * * * * * * * : * * * : * * * * * : * * * .
*
```

```
ENSFCAP0000002649/1-910  -GPGTSPETGAQPGACTRGAG-----Q
ENSP00000329869/1-933   QAVGTSPQRAAAQDSEQESAGMEGRDTHRLPRAL
                        . * * * * : . * . : . . * *
```

http://tcoffee.vital-it.ch/Tmp/TCOR/tcfTCOR5435_8809.clustalw_aln (3 von 3)31.10.2008 19:29:25

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierenden-Zelle
CD	Differenzierungscluster
cpm	counts-per-minute
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FT3	freies Trijodthyronin
FT4	freies Thyroxin
HLA	human leucocyte antigen
ICMA	immuno-chemiluminometrischer Assay
Ig	Immunglobulin
IRMA	immunradiometrische Assay
LATS	long-acting thyreoid stimulator
MAK	Mikrosomale Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
RIA	Radioimmunoassay
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TAK	Thyreoglobulin-Antikörper
Tg	Thyreoglobulin
TH1	T-Helferzellen Typ 1
TH2	T-Helferzellen Typ 2
TPO	thyreoidale Peroxidase

TRAK TSH-Rezeptor-Antikörper

TRH Thyreotropin-releasing-Hormon

TSBII TSH-binding inhibitory immunoglobulins

TSH Thyreostimulierendes Hormon

Literaturverzeichnis

- [1] ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. ; PILLAI, S.: *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders, 2007
- [2] APEL, R.L. ; EZZAT, S. ; BAPAT, B.V. ; PAN, N. ; LIVOLSI, V.A. ; ASA, S.L.: Clonality of thyroid nodules in sporadic goiter. In: *Diagnostic Molecular Pathology* 4 (1995), Nr. 2, S. 113–121
- [3] ARNOLD, U. ; OPITZ, M. ; GROSSER, I. ; BADER, R. ; EIGENMANN, J.E.: Goitrous hypothyroidism and dwarfism in a kitten. In: *Journal of the American Animal Hospital Association* 20 (1984), S. 753–758
- [4] BLANGE, I. ; DRVOTA, V. ; YEN, P.M. ; SYLVEN, C.: Species differences in cardiac thyroid hormone receptor isoforms protein abundance. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 20 (1997), S. 1123–1129
- [5] BORER, C.W.: *Zur topographischen Anatomie der Glandula thyreoidea und der Glandulae parathyreoideae bei Hund und Katze im Welpen- und Erwachsenenalter*, Veterinärmedizinische Universität Zürich, Diss., 1990
- [6] BORETTI, F.S. ; SIEBER-RUCKSTUHL, N.S. ; GERBER, B. ; LALUHA, P. ; BAUMGARTNER, C. ; HOFMANN-LEHMANN, R. ; REUSCH, C. E.: Thyroid enlargement and its relationship to clinicopathological parameters and t4 status in suspected hyperthyroid cats. In: *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11 (2009), S. 286–292
- [7] BRESSON, D. ; CERUTTI, M. ; DEVAUCHELLE, G. ; PUGNIERE, M. ; ROQUET, F. ; BES, C. ; BOSSARD, C. ; CHARDES, T. ; PERALDI-ROUX, S.: Localization of the Discontinuous Immundominant Region Recognized by Human Anti-thyroperoxidase Autoantibodies in Autoimmune Thyroid Diseases. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 11, S. 9560–9569
- [8] BRESSON, D. ; REBUFF, S.R. ; PÉRALDI-ROUX, S.: Localization of the immunodominant region on human thyroid peroxidase in autoimmune thyroid diseases: an update. In: *Journal of Autoimmune Diseases* 22:2 doi:10.1186/1740-2557-2-2 (2005), S. 2:2 doi:10.1186/1740-2557-2-2
- [9] BROOME, M.R. ; HAYS, M.T. ; TURREL, J.M.: Peripheral metabolism of thyroid hormones and iodide in healthy and hyperthyroid cats. In: *American Journal of Veterinary Research* 48 (1987), Nr. 8, S. 1286–1295
- [10] BROWN, R.S. ; KEATING, P. ; LIVINGSTON, P.G. ; BULLOCK, L.: Thyroid growth immunoglobulins in feline hyperthyroidism. In: *Thyroid* 2 (1992), Nr. 2, S. 125–130
- [11] CZARNOCKA, Barbara: Thyroid Peroxidase - Enzyme and Antigen. In: *Thyroid International* 3 (2006), S. 1–20

- [12] DAHME, E. ; WEISS, E.: *Grundriß der speziellen Pathologie der Haustiere*. Ferdinand Enke, 1999
- [13] DAY, M.J.: *Atlas der klinischen Immunologie bei Hund und Katze*. Schlütersche, 2004
- [14] DEGROOT, L.J.: The Non-Thyroidal Illness Syndrome. In: *Endocrinology* 5 (2008), S. 1–17
- [15] DERWAHL, M. ; STUDER, H.: Hyperplasia versus adenoma in endocrine tissues: are they different? In: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13 (2002), Nr. 1, S. 23–31
- [16] DiBARTOLA, S. ; TARR, M.: Tissue distribution of amyloid deposits in Abyssinian cats with familial amyloidosis. In: *Journal of Comparative Pathology* 96 (1986), S. 387–398
- [17] DIETLEIN, M. ; DRESSLER, J. ; GRÜNWARD, F. ; JOSEPH, K. ; LEISNER, B. ; MOSER, E. ; REINERS, J. C. and R. C. and Rendl ; SCHICHA, H. ; SCHNEIDER, P. ; SCHÖBER, O.: Leitlinie zur Schilddrüsendiagnostik. In: *Nuklearmedizin* 3 (2003), S. 109–115
- [18] DÜRR, B.: *Einfluss nichtthyreoidaler Krankheiten auf die Schilddrüsenhormone bei der Katze*, LMU München, Diss., 2001
- [19] DUBSKA, M. ; BANGA, J.P. ; PLOCHOCKA, D. ; HOSER, G. ; KEMP, E.H. ; SUTTON, B.J. ; GARDAS, A. ; GORA, M.: Structural Insights into Autoreactive Determinants in Thyroid Peroxidase Composed of Discontinuous and Multiple Key Contact Amino Acid Residues Contributing to Epitopes Recognized by Patients Autoantibodies. In: *Endocrinology* 147 (2006), Nr. 12, S. 5995–6003
- [20] FELDMAN, R.W. E.C. and N. E.C. and Nelson: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction (3rd edition)*. W B Saunders Co, 2003
- [21] FERGUSON, D.C. ; PETERSON, M.E.: In search of a cause of feline hyperthyroidism. In: *Proceedings of the 8th American College of Veterinary Internal Medicine Forum* (1990), S. 765
- [22] FISFALEN, M.E. ; PALMER, E.M. ; SEVENTER, G.A. van ; SOLTANI, K. ; SAWAI, Y. ; KAPLAN, E. ; HIDAKA, Y. ; OBER, C. ; DEGROOT, L.J.: Thyrotropin-Receptor and Thyroid Peroxidase-Specific T Cell Clones and Their Cytokine Profile in Autoimmune Thyroid Disease. In: *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82 (1997), Nr. 11, S. 3655–3663
- [23] FREWEIN, J. ; VOLLMERHAUS, B.: *Anatomie von Hund und Katze*. Blackwell, 1994
- [24] GERBER, H. ; PETER, H. ; FERGUSON, D.C. ; PETERSON, M.E.: Etiopathology of feline toxic nodular goiter. In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 24 (1994), Nr. 3, S. 541–65

- [25] GEROK, F. W. and H. W. and Hartmann ; SCHUSTER, H. P. ; HESCH, R. D.: *Innere Medizin der Gegenwart-Endokrinologie*. Bd. 4. Urban & Fischer, 1989
- [26] GUO, J. ; MCINTOSH, R. S. ; CZARNOCKA, A. P. Rapoport B. B. Weetman W. B. Weetman ; MCLACHLAN, S. M.: Relationship between autoantibody epitopic recognition and immunoglobulin gene usage. In: *Clin Exp Immunol* 11 (1998), S. 408–4014
- [27] GUO, J. ; MCLACHLAN, S. M. ; RAPOPORT, B.: Localization of the thyroid peroxidase autoantibody immunodominant region to a junctional region containing portions of the domains homologous to complement control protein and myeloperoxidase. In: *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* M205524200 (2002), S. 1–21
- [28] GUTERL, K.: *Bestimmung des freien Thyroxins im Vollblut, getrocknet auf Filterpapier als Suchtest auf angeborene Hypothyreose*, Universität Saarbrücken, Diss., 1987
- [29] HINTZE, S.: *Prüfung eines Radioimmunoassay zur simultanen Bestimmung von TSH und T₄ für das Hypothyreose-Screening bei Neugeborenen*, Universität Heidelberg, Diss., 1989
- [30] HORN, A. ; VOSBERG, H. ; WAGNER, H.: *Schilddrüse konkret Rationelle Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen*. Thieme, 1999
- [31] HÖPFNER, S.: *Inzidenz, Ätiologie sowie körperliche und geistige Entwicklung bei congenitaler Hypothyreose*, Universität Heidelberg, Diss., 2001
- [32] HÖRMANN, R.: *Schilddrüsenerkrankungen*. Blackwell, 2001
- [33] HUTCHISON, M.: *Kompendium der Endokrinologie Hund und Katze*. Schlütersche, 1996
- [34] JAMESON, J. L. ; WEETMAN, A. P. ; DIETEL, M. (Hrsg.) ; DUDENHAUSEN, J. (Hrsg.) ; SUTTORP, N. (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin 2*. ABW Wissenschaftsverlag, 2003
- [35] JANSSEN, S.: *Charakterisierung der Schilddrüsenfunktion und Nachweis eines Promotordefektes als Ursache des kompletten Thyroxin-bindenden Globulinmangels beim Hund*, Justus-Liebig-Universität Gießen, Diss., 2007
- [36] JANEWAY, C. A. ; TRAVERS, P.: *Immunologie*. Spektrum, 2002
- [37] JANSSEN, E. ; GANTEN, D. (Hrsg.) ; RUCKPAUL, K. (Hrsg.): *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien*. Springer, 2001
- [38] JONES, B.R. ; GRUFFYDD-JONES, T.J. ; SPARKES, A.H. ; LUCKE, V.M.: Preliminary studies on congenital hypothyroidism in a family of Abyssinian cats. In: *The Veterinary Record* 131 (1992), Nr. 7, S. 145–153

- [39] KASS, P.H. ; PETERSON, M.E. ; LEVY, J. ; JAMES, K. ; BECKER, D.V. ; COWGILL, L.D.: Evaluation of Environmental, Nutritional, and Host Factors in Cats with Hyperthyroidism. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13 (1999), Nr. 4, S. 323–329
- [40] KENNEDY, R.L. ; THODAY, K.L.: Pathogenesis of feline hyperthyroidism. In: *Veterinary Internal Medical* 13 (1988), S. 323–329
- [41] KÜHNEL, W.: *Taschenatlas Histologie*. Thieme, 2008
- [42] KHOURY, E. L. ; BOTTAZZO, G. F. ; ROITT, I. M.: The thyroid microsomal antibody revisited. Its paradoxical binding in vivo to the apical surface of the follicular epithelium. In: *The Journal of Experimental Medicine* 159 (1984), S. 577–591
- [43] KÜHR, U. J. T.: *Anti-Thyreoglobulin-Autoantikörper und Anti-Thyreoidale-Peroxidase-Autoantikörper im Verlauf einer sequenziellen Hormon-Jodid-Strumatherapie*, Universität Bonn, Diss., 2000
- [44] KÖNIG, H.E.: *Anatomie der Katze*. Fischer, 1992
- [45] KÖNIG, H.E. ; LIEBICH, H.G.: *Anatomie der Haussäugetiere, Lehrbuch und Farb-atlas für Studium und Praxis*. Bd. 2. Schattauer, 1999
- [46] KOBAYASHI, D.L. ; PETERSON, M.E. ; GRAVES, T.K. ; NICHOLS, C.E. ; LESSER, M.: Hypertension in Cats With Chronic Renal Failure or Hyperthyroidism. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4 (1990), Nr. 2, S. 58–62
- [47] KOSUGI, S. ; OKAJIMA, F. ; BAN, T. ; HIDAKA, A. ; SHENKER, A.: Substitutions of different regions of the third cytoplasmic loop of the TSH receptor have selective effects on constitutive, TSH-, and TSH receptor autoantibody-stimulated phosphoinositide and cAMP signal generation. In: *Molecular Endocrinology* 7 (1993), S. 1009–1020
- [48] KRAFT, J. W. and H. W. and Hirschberger ; LOEFFLER, K. (Hrsg.) ; STRAUCH, D. (Hrsg.): *Kleintierkrankheiten Innere Medizin*. Bd. 1. UTB, 2000
- [49] KRAFT, W. ; DÜRR, U.M.: *Katzenkrankheiten: Klinik und Therapie*. Schaper, 1996
- [50] KRAFT, W. ; DÜRR, U.M.: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. FK Schattauer, 2005
- [51] LESK, A. M.: *Bioinformatik*. Spektrum, 2003
- [52] LÖFFLER, G. ; PETRIDES, E.: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, 1998
- [53] LIBERT, F. ; RUEL, J. ; LUDGATE, M. ; SWILLENS, S. ; ALEXANDER, N. ; VASSART, G. ; DINSART, C.: Thyroperoxidase, an auto-antigen with a mosaic structure made of nuclear and mitochondrial gene modules. In: *European Molecular Biology Organization Journal* 6 (1987), Nr. 13, S. 4193–4196

- [54] MARTIN, K.M. ; ROSSING, M.A. ; RYLAND, L.M. ; DIGIACOMO, R.F. ; FREITAG, W.A.: Evaluation of dietary and environmental risk factors for hyperthyroidism in cats. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217 (2000), Nr. 6, S. 853–859
- [55] MCLACHLAN, S. M. ; RAPOPORT, B.: Thyroid peroxidase autoantibody epitopes revisited. In: *Clinical Endocrinology* (2008)
- [56] MERCHANT, S.R. ; TABOADA, J.: Endocrinopathies Thyroid and adrenal disorders. In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 27 (1997), Nr. 6, S. 1285–1290
- [57] MERRYMAN, J.I. ; BUCKLES, E.L. ; BOWERS, G. ; NEILSEN, N.R.: Overexpression of c-Ras in hyperplasia and adenomas of the feline thyroid gland: an immunohistochemical analysis of 34 cases. In: *Veterinary Pathology* 36 (1999), S. 117–124
- [58] MOONEY, C.T. ; LITTLE, C.J. ; MACRAE, A.W.: Effect of illness not associated with the thyroid gland on serum total and free thyroxine concentrations in cats. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208 (1996), Nr. 12, S. 2004–2012
- [59] NELSON, R.W. ; COUTO, C.G.: *Innere Medizin der Kleintiere*. Urban & Fischer, 2006
- [60] NELSON, R.W. ; TURNWALD, G.H. ; WILLARD, M.D. ; WILLARD, M.D. (Hrsg.) ; TVEDTEN, H. (Hrsg.): *Labordiagnostik in der Kleintierpraxis*. Urban and Fischer, 2006
- [61] NGUYEN, L.Q. ; ARSEVEN, O.K. ; GERBER, H. ; STEIN, B.S. ; JAMESON, J.L. ; KOPP, P.: Cloning of the Cat TSH Receptor and Evidence Against an Autoimmune Etiology of Feline Hyperthyroidism. In: *Endocrinology* 143 (2002), Nr. 2, S. 395–402
- [62] NOTREDAM, C. ; HIGGINS, D. G. ; HERINGE, J.: T-Coffee: A novel Method for Fast and Accurate multiple Sequence Alignment. In: *Journal of Molecular Biology* 302 (2000), S. 205–217
- [63] PARADIS, M. ; PAGE, N. ; LARIVIERE, N. ; FONTAINE, M.: Serum-free thyroxine concentrations, measured by chemiluminescence assay before and after thyrotropin administration in healthy dogs, hypothyroid dogs, and euthyroid dogs with dermatopathies. In: *The Canadian Veterinary Journal* 37 (1996), Nr. 5, S. 289–294
- [64] PEARCE, S.H. ; FOSTER, D.J. ; IMRIE, H. ; MYERSCOUGH, N. ; BECKETT, G.J. ; THODAY, K.L. ; KENDALL-TAYLOR, P.: Mutational analysis of the thyrotropin receptor gene in sporadic and familial feline thyrotoxicosis. In: *Thyroid* 7 (1997), Nr. 6, S. 923–930
- [65] PEETERS, M.E. ; TIMMERMANS-SPRANG, E.P.M. ; MOL, J.A.: Feline Thyroid Adenomas are in Part Associated with Mutations in the $G_{S\alpha}$ Gene and not with Polymorphisms Found in the Thyrotropin Receptor. In: *Thyroid* 12 (2002), Nr. 7, S. 571–575

- [66] PETER, H.J. ; GERBER, H. ; STUDER, H. ; BECKER, D.V. ; PETERSON, M.E.: Autonomy of growth and of iodine metabolism in hyperthyroid feline goiters transplanted onto nude mice. In: *The Journal of Clinical Investigation* 80 (1987), Nr. 2, S. 491–498
- [67] PETERSON, M.E.: Serum Thyroid Hormone Concentrations Fluctuate in Cats with Hyperthyroidism. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1 (1987), Nr. 3, S. 142–146
- [68] PETERSON, M.E. ; LIVINGSTON, P. ; BROWN, R.S.: Lack of circulating thyroid stimulating immunoglobulins in cats with hyperthyroidism. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 16 (1986), Nr. 3-4, S. 277–82
- [69] PETERSON, M.E. ; MELIÁN, C. ; NICHOLS, R.: Measurement of serum concentrations of free thyroxine, total thyroxine, and total triiodothyronine in cats with hyperthyroidism and cats with nonthyroidal disease. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218 (2001), Nr. 4, S. 529–536
- [70] PRÉLAUD, P. ; ROSENBERG, D. ; FORNEL, P. de ; ALEXANDER, G. (Hrsg.): *Endokrinologische Diagnostik in der Kleintierpraxis*. Schlütersche Verlag, 2005
- [71] PUILLE, M. ; AUCH, D. ; SPILLMANN, T. ; BIRK, L. ; BAUER, R.: Bestimmung von TSH und freien Schilddrüsenhormonen in der Hyperthyreosedagnostik der Katze. In: *Tierärztliche Praxis* (2000)
- [72] RAND, J.S. ; LEVINE, J. ; BEST, S.J. ; PARKER, W.: Spontaneous adult-onset hypothyroidism in a cat. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7 (1993), Nr. 5, S. 272–278
- [73] RAUBER, A. ; KOPSCH, F.: *Anatomie des Menschen*. Thieme, 1987
- [74] REBUFFAT, S.A. ; D., Bresson ; B., Nguyen ; PÉRALDI-ROUX, S.: The key residues in the immunodominant region 353-363 of human thyroid peroxidase were identified. In: *International Immunology* 18 (2006), Nr. 7, S. 1091–2000
- [75] RENZ-POLSTER, H. ; KRAUZIG, S. ; BRAUN, J.: *Basislehrbuch Innere Medizin*. Urban & Fischer, 2004
- [76] RIEDE ; SCHÄFER: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme, 1993
- [77] RUF, J. ; CARAYON, P.: Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445 (2005), S. 269–277
- [78] RUF, J. ; CARAYON, P.: Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445 (2006), Nr. 2, S. 269–277
- [79] RUF, J. ; TOUBERT, M.E. ; CZARNOCKA, B. ; DURAND-GORDE, J.M. ; FERRAND, M. ; CARAYON, P.: Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase. In: *Endocrinology* 125 (1989), S. 1211–1218
- [80] SCHELLING, J.: *Vergleich von Thyroxin-bindendem Globulin verschiedener Spezies*, LMU München, Diss., 2002

- [81] SCHEITTLER, G. ; GRETEN, H.: *Innere Medizin*. Bd. 2. Thieme, 1998
- [82] SCHUMM-DRAEGER, P.M. ; LÄNGER, F. ; CASPAR, G. ; RIPPEGATHER, K. ; HERRMANN, G. ; FORTMEYER, H.P. ; USADEL, K.H. ; HÜBNER, K.: Spontaneous Hashimoto-like thyroiditis in cats. In: *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 80 (1996), S. 297–301
- [83] SHIEL, R. ; MOONEY, C.: Testing for Hyperthyroidism in Cats . In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 37 (2001), Nr. 4, S. 671–691
- [84] SHUPNIK, M.A. ; RIDGWAY, E.C.: Thyroid hormone control of thyrotropin gene expression in rat anterior pituitary cells. In: *Endocrinology* 121 (1987), Nr. 2, S. 619–624
- [85] SIEGENTHALER ; BLUM: *Klinische Pathophysiologie*. Thieme, 2006
- [86] SJOLLEMA, B.E. ; HARTOG, M.T. den ; VIJLDER, J.J. de ; DIJK, J.E. van ; RIJNBEEK, A.: Congenital hypothyroidism in two cats due to defective organification: data suggesting loosely anchored thyroperoxidase. In: *Acta Endocrinologica* 125 (1991), Nr. 4, S. 435–440
- [87] SKOPEK, E. ; PATZL, M. ; NACHREINER, R.F.: Detection of autoantibodies against thyroid peroxidase in serum samples of hypothyroid dogs. In: *American Journal of Veterinary Research* 67 (2006), Nr. 5, S. 809–823
- [88] SNYDER, H. W. J. ; ERNST, N. R. ; GROSMARE, L. S. ; BALINT, J. P. ; YOSHIDA, L. H. ; JONES, F. R.: Selective removal of antigen-complexed IgG from cat plasma by adsorption onto a protein A-silica matrix. In: *Journal of Immunological Methods* 101 (1987), Nr. 2, S. 209–17
- [89] TAKAICHI, Y. ; TAMAI, K. H. and H. H. and Honda ; NAGAI, K. ; KUMA, K. ; NAKAGAWA, T.: The significance of antithyroglobulin and antithyroidal microsomal antibodies in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease treated with antithyroidal drugs. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 6 (1989), S. 1097–1100
- [90] THACKER, E.L ; DAVIS, J.M. ; REFSAL, K.R. ; BULL, R.W.: Isolation of thyroid peroxidase and lack of autoantibodies to the enzyme in dogs with autoimmune thyroid disease. In: *American Journal of Veterinary Research* 56 (1995), Nr. 1, S. 34–38
- [91] TRIBE, G.W.: Hyperthyroidism in cats. In: *Vet Records* 129 (1991), Nr. 11, S. 252
- [92] WATSON, S.G. ; RADFORD, A.D. ; KIPAR, A. ; IBARROLA, P. ; BLACKWOOD, L.: Somatic mutations of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in feline hyperthyroidism: parallels with human hyperthyroidism. In: *Endocrinology* 186 (2005), Nr. 3, S. 523–537
- [93] WUTTKE, W. ; SCHMIDT, R. F. (Hrsg.) ; THEWS, G. (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. Springer, 1997

- [94] ZEITLIN, A. A. ; SIMMONDS, M. J. ; GOUGH, S. C. L.: Genetic developments in autoimmune thyroid disease: an evolutionary process. In: *Clinical Endocrinology* 68 (2008), S. 671–682

Erklärung gemäß §10(5) der Promotionsordnung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Obertshausen, den 3. Juni 2012

Daniela Dey

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Moritz und Herrn Prof. Dr. med. Biersack für die geduldige Betreuung der Arbeit. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Samer Ezziddin und Herrn Dr. Kim Biermann für das aufmerksame Lesen meiner Dissertation.

Im Rahmen der Entstehung dieser Dissertation möchte ich noch vielen einzelnen Menschen danken ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: Prof. Dr. H. P. Elsässer vom Institut für Zytobiologie und Zytopathologie in Marburg für die Unterstützung bei den ersten Versuchen die TPO der Katze zu isolieren, Prof. Dr. Bohle aus der (Human-)Pathologie in Gießen für die Bereitstellung der Geräte zur Erstellung der immunhistochemischen Schnitte, dem Institut für Veterinär-Pathologie in Gießen für die Bereitstellung der Schilddrüsen, der Klinik für Kleintiere in Gießen, dem Vetmed Labor, und der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin in Bonn für die Bereitstellung der Blutproben. Besonderer Dank gilt dem Team aus dem Labor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin für deren tatkräftige Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinem Vater Otto Dey bedanken, der diese Arbeit finanziert hat und mich auch sonst in jeder Hinsicht unterstützt und bei meinem Freund Dr. Florian Fischer ohne den ich diese Arbeit niemals abgeschlossen hätte.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5911-8



9 17 8 3 8 3 5 19 5 9 1 1 8

Cover Photos: © biglama (front); © vladstar (back) - Fotolia.com

