

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Gleichgewichtsdialyse-Verfahren zur Messung der freien Schilddrüsenhormonkonzentration
im Vergleich zu einem Einschnitt-Analog-Immunoassay im menschlichen Serum

Katharina Blobner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Peter B. Lippa

2. Prof. Dr. Jürgen Ruland

Die Dissertation wurde am 25.06.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 04.12.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Allgemeine hormonelle Regulation.....	6
1.2	Schilddrüsenhormone.....	8
1.2.1	Anatomie der Schilddrüse.....	8
1.2.2	Physiologie der Schilddrüse.....	9
1.2.2.1	Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone.....	9
1.2.2.2	Transport der Schilddrüsenhormone.....	12
1.2.2.3	Stoffwechselwirkung der Schilddrüsenhormone.....	12
1.3	Bewertung der Schilddrüsenhormondiagnostik.....	13
1.3.1	Euthyreose.....	13
1.3.2	Hyperthyreose.....	14
1.3.3	Hypothyreose.....	15
1.4	Analytische Verfahren für die freien Schilddrüsenhormone ft_3 und ft_4.....	15
2	Fragestellung.....	17
3	Studiendesign, Patienten, Material und Methoden.....	19
3.1	Studiendesign.....	19
3.2	Patientenauswahl.....	19
3.3	Material.....	19
3.3.1	Serum.....	19
3.3.2	Geräte und Assay.....	20

3.4	Methoden	21
3.4.1	Präanalytik.....	21
3.4.2	Elektrochemilumineszenz, Immunoassay-Elecsys fT3.....	22
3.4.2.1	Durchführung des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays	23
3.4.3	Gleichgewichtsdialyse.....	24
3.4.3.1	Durchführung der Gleichgewichtsdialyse	24
3.4.4	Radioimmunoassay.....	27
3.4.4.1	Durchführung des Radioimmunoassays	27
3.5	Statistik	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Biometrische Daten	30
4.2	Schilddrüsenerkrankungen	31
4.3	Nebendiagnosen	32
4.3.1	Nierenerkrankungen	33
4.3.2	Lebererkrankungen	33
4.3.3	Lungenerkrankungen.....	34
4.3.4	Herzkrankungen.....	34
4.3.5	Sonstige Nebendiagnosen.....	35
4.4	fT₃-Analysen	35
4.5	Explorative Analyse möglicher Einflussfaktoren	41
5	Diskussion	44

5.1	Limitierende Faktoren der gesamten laborchemischen Untersuchung	44
5.2	Euthyroid-Sick-Syndrom	45
5.3	Komplexität und Problematik der Gleichgewichtsdialyse	48
5.4	Schlussfolgerung	49
6	Kurzfassungen.....	50
6.1	Zusammenfassung.....	50
6.1.1	Hintergrund und Fragestellung	50
6.1.2	Methoden.....	50
6.1.3	Ergebnisse	50
6.1.4	Schlussfolgerung.....	51
6.2	Abstract	52
6.2.1	Background and Purpose.....	52
6.2.2	Methods.....	52
6.2.3	Results.....	52
6.2.4	Conclusion	53
7	Verzeichnisse	54
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	54
7.2	Tabellenverzeichnis.....	55
7.3	Literaturverzeichnis	56
8	Danksagung	61

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AG	Antigen
AK	Antikörper
Da	Dalton
Dia.	Dialysat
DIT	3,5-Dijodtyrosin
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
ESS	Euthyroid Sick Syndrom
ft3	freies Trijodthyronin
ft4	freies Thyroxin
MIT	3-Monojodtyrosin
MWCO	Molecular Weight Cutt Off
Pr.	Probe
RIA	Radioimmunoassay
S.	Serum
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TBG	Thyroxin bindendes Globulin
TBPA	Thyroxin bindendes Präalbumin
Tg	Thyreoglobulin
TPO	Thyroid Peroxidase, Schilddrüsenperoxidase
TRH	Thyreoliberin, Thyreotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyreotropin, Thyreoidea stimulierendes Hormon
Vv.	Venae

1 Einleitung

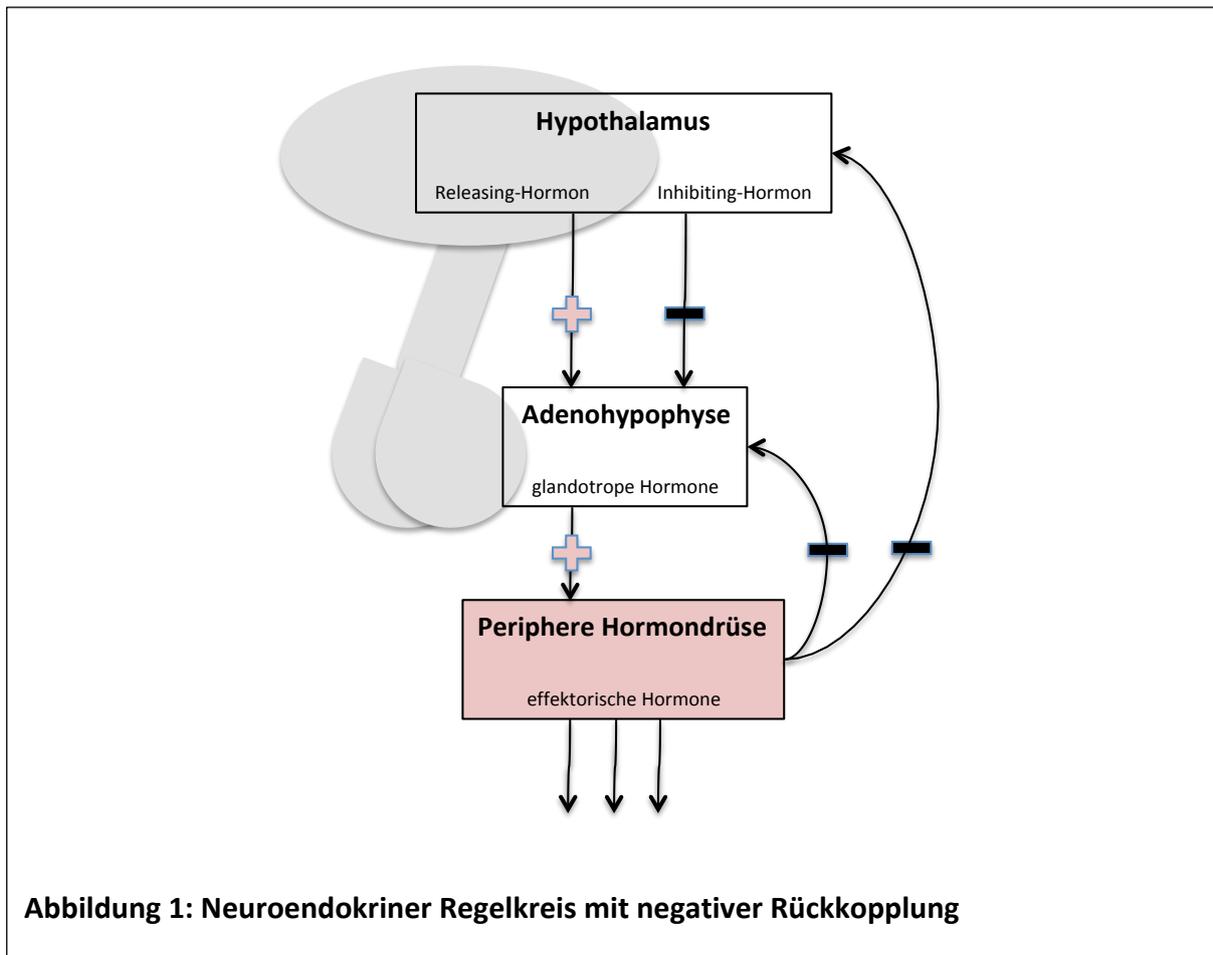
1.1 Allgemeine hormonelle Regulation

Das Wort *Hormon* stammt aus dem griechischem *ὁρμῶν hormōn* und bedeutet etwas in Bewegung setzen oder antreiben. Das beschreibt bereits die Funktion eines Hormons als Signal- oder Botenstoff zwischen Zellen im menschlichen Körper.

Man unterscheidet dabei zwischen effektorischen, glandotropen, Releasing- und Inhibiting-Hormonen. Ihre Ausschüttung wird durch einen oder mehrere Regelkreise reguliert, teilweise beeinflussen diese die Hormone selbst direkt oder indirekt, wie weiter unten anhand des neuroendokrinen Regelkreises beispielhaft erklärt wird (Schmidt, R and Lang, F 2007).

Die effektorischen Hormone wirken direkt auf ein bestimmtes Organ oder einen Stoffwechselprozess und entstehen meistens in einer peripheren Hormondrüse. Die Synthese der Hormone kann dabei in endokrinen Drüsen erfolgen, wie zum Beispiel das weibliche Geschlechtshormon Östrogen das in den Ovarien produziert wird, sowie Insulin das aus den Langerhans-Inseln des Pankreas freigesetzt wird oder aber die Schilddrüsenhormone die in der Thyroidea (Schilddrüse) entstehen. Theoretisch kann aber auch jede andere endokrine Zelle oder einzelne Nervenzelle im Körper Hormone produzieren.

Glandotrope Hormone, wie zum Beispiel das TSH (Thyreotropin, Thyroidea stimulierendes Hormon), dienen der Stimulierung von peripheren Hormondrüsen. Ihre Sekretion erfolgt in der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) und wird durch Releasing- und Inhibiting-Hormone gesteuert. Diese wiederum entstehen im Hypothalamus und können entweder die Hormonproduktion in der Adenohypophyse auslösen (engl.: to release) oder hemmen (engl.: to inhibit). Alle diese Hormone sind Teil des neuroendokrinen Regelkreises, welcher sich selbst und damit auch die Sekretion der einzelnen Hormone durch eine negative Rückkopplung in mehreren Rückkopplungsschleifen kontrolliert (Abbildung 1). Sind also zu viele effektorische Hormone im Blutkreislauf wird im Hypothalamus vermehrt das Inhibiting-Hormon sezerniert, sind zu wenig effektorische Hormone vorhanden entfällt diese Hemmung und das Releasing-Hormon wird freigesetzt und wirkt wiederum positiv verstärkend auf die Adenohypophyse. Damit werden glandotrope Hormone produziert.



Endokrin bedeutet dabei, dass ein Hormon in den Blutkreislauf sezerniert wird und sich somit im gesamten Körper verteilen kann. Hormone können aber auch auto- oder parakrin wirken (Schmidt, R and Lang, F 2007). Nach der Synthese kann eine unmittelbare Verwendung stattfinden. Häufig findet aber auch eine Hormonspeicherung statt. Dies kann zum einen direkt am Entstehungsort in Vesikeln sein wie beim Insulin oder aber extrazellulär an ein Protein gebunden werden wie bei den Schilddrüsenhormonen.

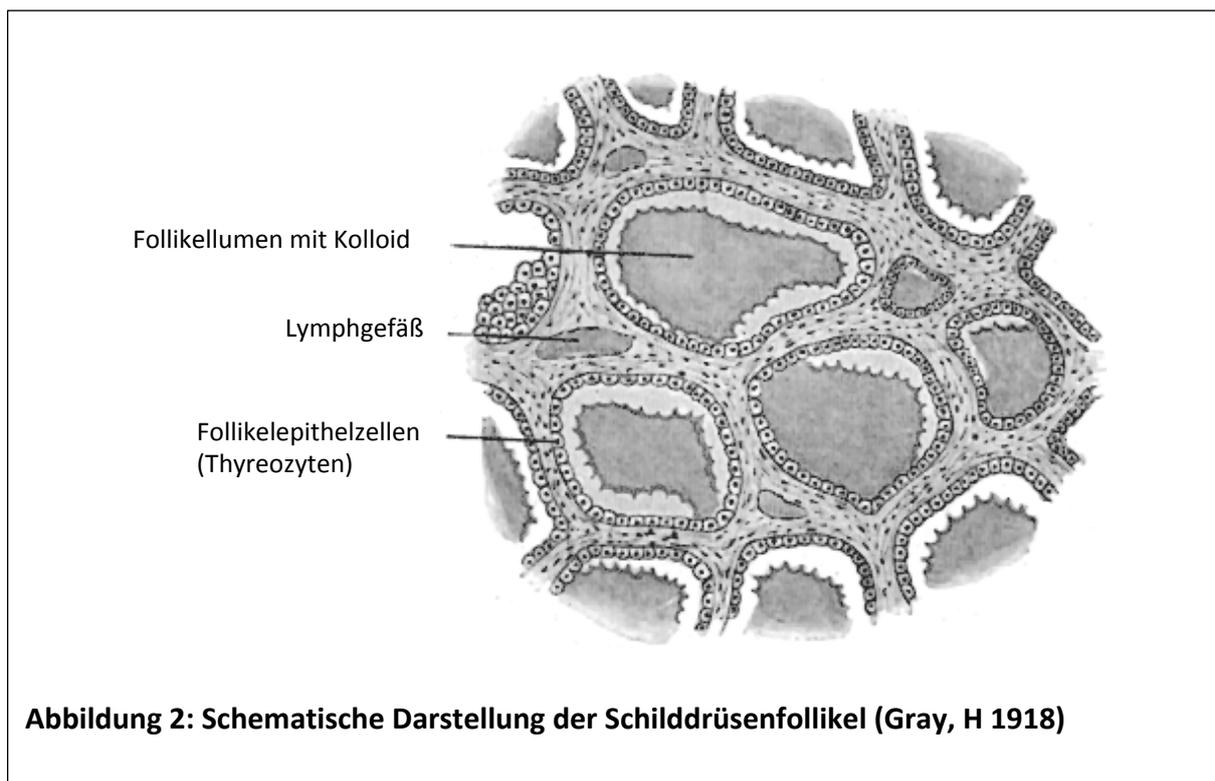
Hormone als Signal- bzw. Botenstoffe sind daher Teil einer Signalkette und wirken bereits in sehr niedrigen Konzentrationen. Einige Hormone diffundieren in die jeweilige Zielzelle Dank eines membranständigen Hormonrezeptors. Dies setzt eine intrazelluläre Kaskade in Gang welche Responsegene exprimiert, sogenannte second messenger. Die wiederum führen zur gewünschten Wirkung des jeweiligen Hormons.

Die Synthese, Sekretion, Aktivierung und Wirkung von Hormonen unterliegt dabei einem strengen hormonellen Regelkreis. Unter stimulierenden und hemmenden Einflüssen stellt sich in einem gesunden Individuum eine ausgeglichene Hormonsynthese ein. Bei den Schilddrüsenhormonen, Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3), handelt es sich um einen wie oben beschriebenen neuroendokrinen Regelkreis. Dieser Regelkreis bestimmt auch die Abgabegeschwindigkeit von T_4 und T_3 aus der Schilddrüse.

1.2 Schilddrüsenhormone

1.2.1 Anatomie der Schilddrüse

Die Schilddrüse ist ein schmetterlingsförmiges Organ das in der Embryogenese als Epithelknospe am embryonalen Mundboden ein sprosst. Sie liegt direkt vor der Trachea auf Höhe der Halswirbel C6/C7 und ist von einer faserigen Kapsel umgeben. Im ausgewachsenen



Zustand kann sie zwischen 15-60 g wiegen (je nach Literatur breit schwankende Werte). Die zwei großen Blätter, auch Lobus dexter und sinister glandulae thyroideae genannt, sind über dem Schilddrüsenisthmus miteinander verbunden. Im Inneren der Schilddrüse teilen Septen das

Organ in mehrere Läppchen. Die wiederum bestehen aus bis zu 200µm großen, runden Follikeln. Das Follikellumen ist gefüllt mit Kolloid, welches hauptsächlich aus Thyreoglobulin (Tg) bestehend. Abgrenzend verläuft hier eine einschichtige Reihe von einzelnen Follikelepithelzellen, den Thyreozyten (Abbildung 2). Umgeben sind diese funktionellen Einheiten von Calcitonin bildenden C-Zellen, sowie Lymphgefäßen und einem ausgedehnten Kapillarnetz. Dieses wird zum einen von der paarig angelegten A. thyroidea superior aus der A. carotis externa und zum anderen von der A. thyroidea inferior aus der A. subclavia gespeist. Der venöse Abfluss wird über die Vv. thyroidea superior, -inferior und -mediae garantiert. Parasympathisch wird die Schilddrüse über Äste des Nervus vagus innerviert und sympathisch über das Ganglion cervicale medium.

Je nach Aktivitätszustand der Schilddrüsen variiert die Größe der Follikel. Während der Synthesephase wird das Kolloid aufgebraucht, die Follikelepithelzellen sind hoch und prall gefüllt, aber insgesamt sind die Follikel klein. Bei der Sekretspeicherung sind die Follikel groß mit einem vollen Kolloidlumen und flachen Follikelepithelzellen (Saller, PPL-AHB 1999).

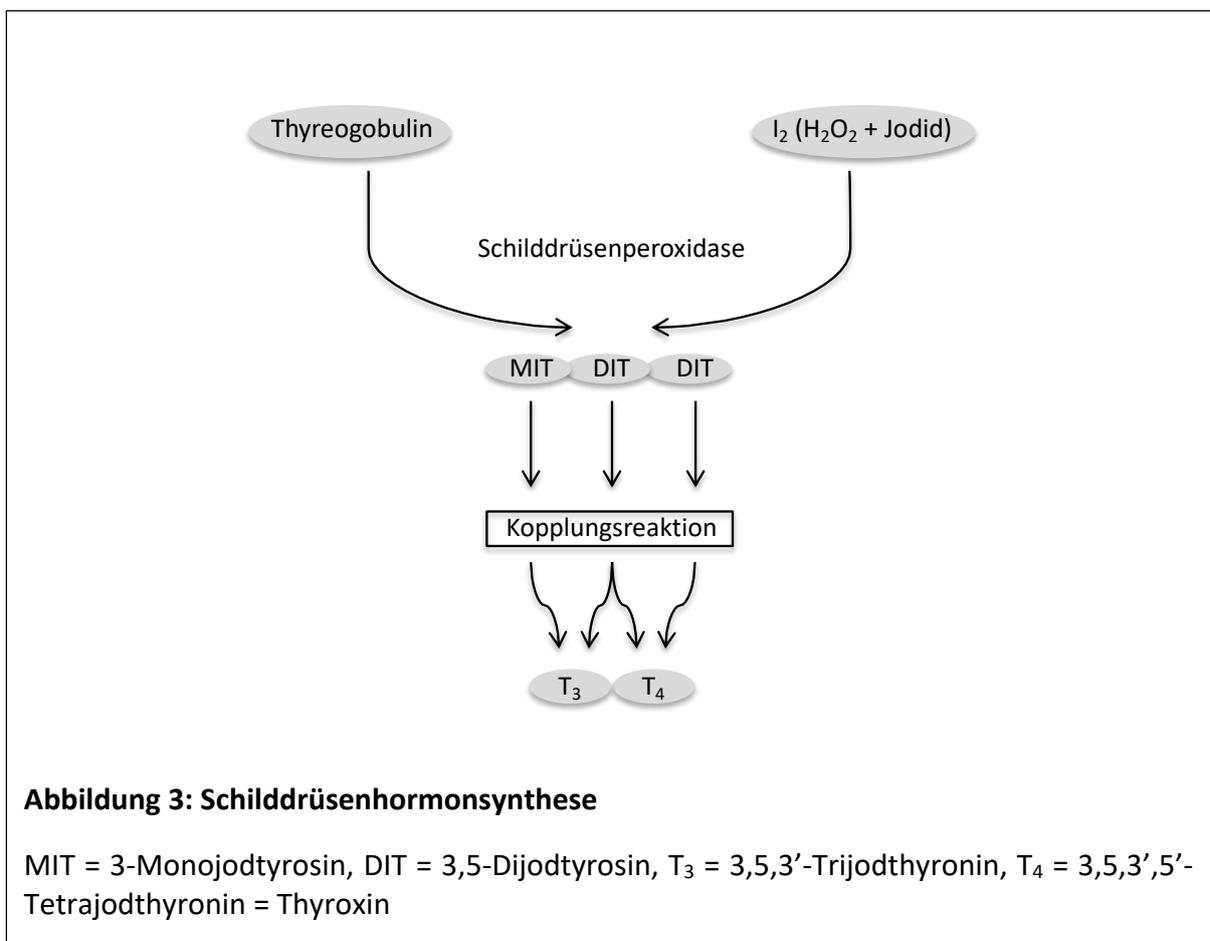
1.2.2 Physiologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse ist der Synthese- und Speicherort von Thyroxin (T₄) und Trijodthyronin (T₃). Durch ihre Beeinflussung des Stoffwechsels und des Energieumsatzes im Körper ist sie damit maßgeblich für die körperliche und geistige Entwicklung verantwortlich sowie für die Leistungsfähigkeit eines menschlichen Individuums.

1.2.2.1 Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone

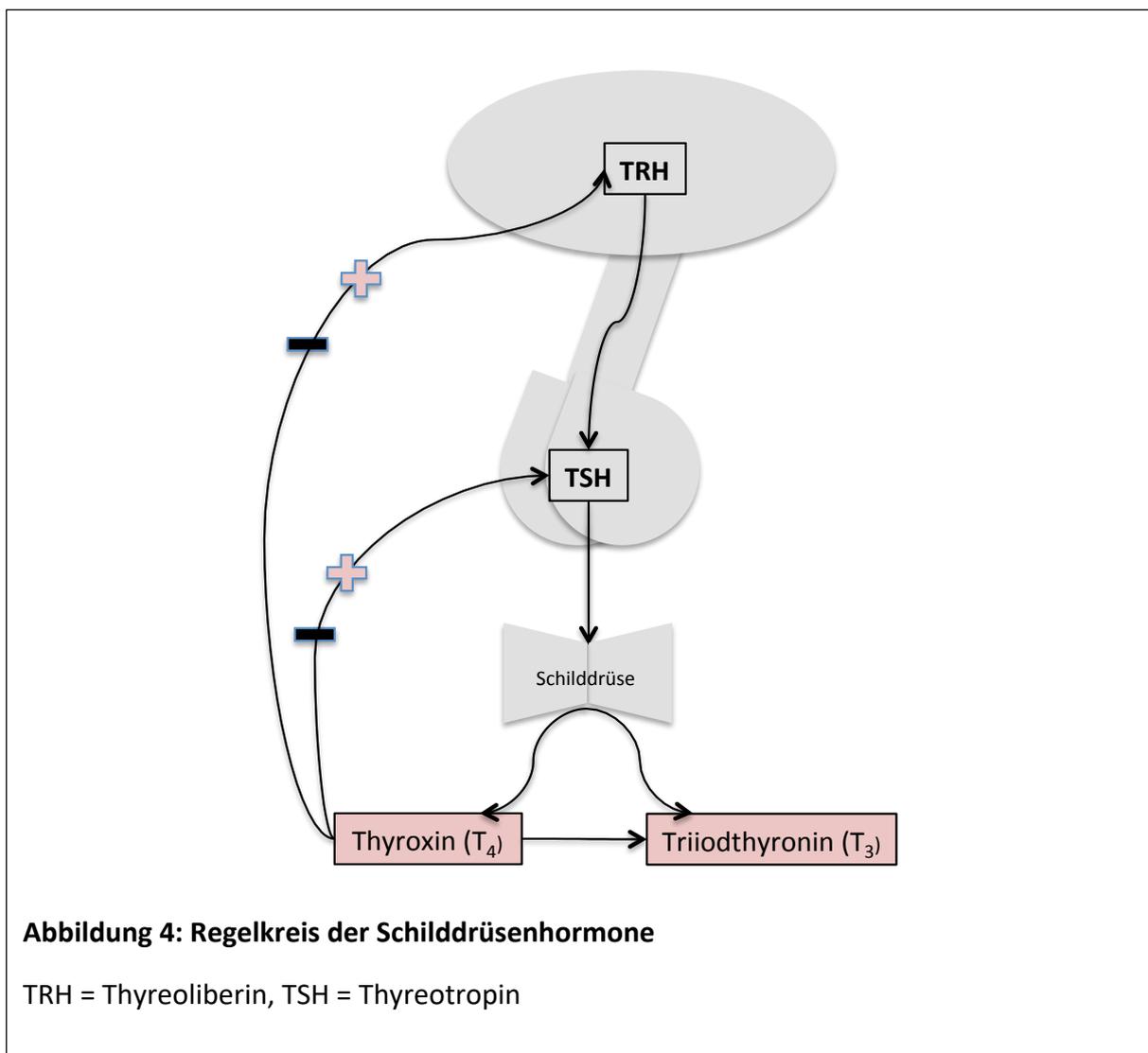
Für die Synthese von T₄ und T₃ ist eine ausreichende Aufnahme des Spurenelements Jod über die Nahrung erforderlich. Die zur Verfügung stehende Menge an Jod entscheidet über die Morphologie und Leistung der Schilddrüse. Daher wurde von der Weltgesundheitsorganisation der tägliche Bedarf eines Erwachsenen auf etwa 150-200 µg Jod berechnet (Zimmermann, MB 2014). Nahezu der gesamte Bedarf an Jod gelangt über den Dünndarm als Jodid in die Blutbahn. Nur ein kleiner Anteil wird von Thyreozyten selbst abgegeben oder durch den Abbau von Schilddrüsenhormonen wieder freigesetzt. Durch ein Konzentrationsgefälle gelangt das Jodid über den Na⁺-Jodid-Cotransporter in die Epithelzellen der Schilddrüse, den Thyreozyten.

Das anorganische Jodid wird anschließend an der apikalen Zellmembran mit Hilfe der Schilddrüsenperoxidase (Thyroid Peroxidase = TPO) oxidiert und organisch an das Tyrosyl des Thyreoglobulins (Tg) gebunden, ein Aminosäurerest von Tyrosin. Dabei entstehen die beiden Hormonvorläufer 3-Monojodtyrosin (MIT) und 3,5-Dijodtyrosin (DIT). Das Thyreoglobulin selbst, ein tyrosinreiches Glykoprotein, wird direkt in der Schilddrüse von den Thyreozyten gebildet. Durch eine Kopplungsreaktion über eine Etherbrücke und unter Abspaltung von Alanin entsteht aus zwei DIT-Molekülen das Schilddrüsenhormon 3,5,3',5'-Tetrajodthyronin = Thyroxin = T₄. Dabei bleibt das Hormon weiterhin an Thyreoglobulin gebunden. Ebenfalls durch eine Kopplung kann aus einem MIT- und einem DIT-Molekül das Schilddrüsenhormon 3,5,3'-Trijodthyronin = T₃ gebildet werden, oder aber seine inaktive Form 3,3',5'-Trijodthyronin = reverses Trijodthyronin = rT₃ (Abbildung 3). Die Schilddrüse sezerniert überwiegend T₄ und der Hauptanteil des T₃ entsteht durch extrathyreoidale 5'-Dejodierung von T₄ zu T₃ (in der Zielzelle), ebenfalls mit Hilfe eines Enzyms, der Thyroxindeiodinase. Diesen



Vorgang nennt man auch Konversion oder periphere Dejodierung (Gross, J and Pitt-Rivers, R 1952).

Wie bereits weiter oben geschildert steht die Ausschüttung der Schilddrüsenhormone unter der Kontrolle des Hypothalamus. Je nach Stimulation durch TRH und nachfolgend durch TSH wird das Wachstum der Schilddrüse im Allgemeinen beeinflusst. Die Hormone T_4 und T_3 werden unter Stimulation zunächst durch Endozytose aus dem Follikellumen in die Thyreozyten aufgenommen und anschließend von Lysosomen von dem Thyreoglobulinmolekül getrennt, sodass eine Freisetzung in die Blutbahn möglich ist. Durch die negative Rückkopplung hemmt eine zu hohe Konzentration von T_4 im Blut die Bildung von TRH und TSH. Damit bleibt die



Konzentration von T_3 und T_4 stets konstant (Schmidt, R and Lang, F 2007). Abbildung 4 zeigt schematisch den Regelkreis der Schilddrüsenhormone (Saller, PPL-AHB 1999).

1.2.2.2 Transport der Schilddrüsenhormone

Deutlich weniger als 1% der Schilddrüsenhormone liegen frei im Blut vor. Der Hauptanteil von T_3 und T_4 sind an Plasmaproteine gebunden. Dazu zählen vor allem in steigender Bedeutung Albumin, Thyroxin bindendes Präalbumin (TBPA) und Thyroxin bindendes Globulin (TBG). Die Bindung an Plasmaproteine verlängert die Halbwertszeit der Schilddrüsenhormone, auf ca. 1 Tag für T_3 und 7 Tage für T_4 (Schmidt, R and Lang, F 2007), und verhindert somit zudem eine zu rasche Ausscheidung. Außerdem sind proteingebundene Schilddrüsenhormone biologisch inaktiv, erst das freie T_3 oder T_4 kann den Stoffwechsel beeinflussen.

Wegen einer geringeren Affinität zu TBG und TBPA liegt T_3 zu einem höheren Anteil als T_4 frei in der Blutbahn vor. Das bedeutet im Umkehrschluss eine wesentlich kürzere Halbwertszeit. Da es zudem extrathyreoidal durch Dejodierung aus dem Prohormon T_4 entsteht, ist es aber auch meistens in der Zielzelle an intrazelluläre Proteine und Rezeptoren gebunden (Hollenberg, AN 2016). Das inaktive rT_3 zeigt sogar eine noch geringere Serumproteinbindung und intrazelluläre Proteinbindung und kürzere Halbwertszeit als T_3 (Saller, PPL-AHB 1999).

Wichtig bei der Beurteilung der Gesamtkonzentration der Schilddrüsenhormone bei einem intakten, hormonellen Regelkreis ist, dass diese von der Konzentration der Bindungsproteine beeinflusst wird. Von Bedeutung ist dies zum Beispiel bei veränderter Konzentration oder Zusammensetzung der Transportproteine bei Krankheit. Die biologisch aktiven, freien Hormone jedoch sind von der Konzentration der Bindungsproteine unabhängig (Saller, PPL-AHB 1999).

1.2.2.3 Stoffwechselwirkung der Schilddrüsenhormone

Die Hauptaufgabe der Schilddrüsenhormone ist die Entwicklung und Unterstützung der Leistung einiger Organe wie Gehirn, Herz und Niere (Taylor, PN et al. 2018).

Nach Aufnahme der freien Schilddrüsenhormone in die Zielzelle wird die eigentliche Wirkung über die intrazelluläre Bildung eines Rezeptor-Hormon-Komplexes eingeleitet. Dieser kann

Dank seiner Zinkfinger, welche in Form von Dimeren direkt an die DNA anbinden können, die Transkription von Genen beeinflussen. Damit wird vor allem die Synthese von Enzymen, Rezeptoren, Transport- und Strukturproteinen stimuliert (Berghold, S and Horn, F 2009). Die wiederum sind für Erhalt und Funktion der jeweiligen Zielzelle erforderlich.

Damit wird im Bereich des Nervensystems die intellektuelle Entwicklung durch Bildung von Synapsen, Myelinscheiden, Axonen und Dendriten beeinflusst. Im Bereich des Stoffwechsels wird sowohl der Kohlenhydratabbau und die Lipolyse gesteigert, als auch der Abbau von schlechten Fetten und der Umbau von Cholesterin gefördert. Der gesteigerte Energieverbrauch wiederum führt zu einer Vasodilatation mit gesteigerter Herzfrequenz und Herzkraft, womit Kreislauf und Blutdruck beeinflusst werden. In der Niere werden der renale Blutfluss und damit die glomeruläre Filtrationsrate gesteigert.

Insgesamt steigern die Schilddrüsenhormone an vielen Stellen im Körper den Energieverbrauch, womit der Grundumsatz und die Wärmebildung zunehmen (Schmidt, R and Lang, F 2007).

1.3 Bewertung der Schilddrüsenhormondiagnostik

1.3.1 Euthyreose

Unter einer Euthyreose versteht man eine normale Schilddrüsenfunktion, die sich sowohl durch einen normalen klinischen Untersuchungsbefund auszeichnet, als auch normale laborchemische Parameter aufzeigt. Die Summe der Laborparameter wird auch als Status der Schilddrüsenfunktion verwendet (Herold, G 2011). Wichtig ist jedoch der Hinweis, dass unter einer Euthyreose nicht die anatomische Erscheinung der Schilddrüse gemeint ist.

Ein euthyreoter Zustand ist Voraussetzung für ein korrektes Wachstum und Entwicklung der wichtigen Organe wie Gehirn, Herz und Niere (Hollenberg, AN 2016). In einem erwachsenen, gesunden Individuum sorgt ein euthyreoter Zustand für eine gesicherte und geregelte Funktion dieser Organe, siehe Kapitel 1.2.2.3. Die Funktion wiederum wird über die Konzentration der Schilddrüsenhormone reguliert. Außerdem reguliert die Schilddrüse sich über den neuroendokrinen Regelkreis selbst, wie in Kapitel 1.2.2.1 beschrieben.

Laborchemisch wird eine Euthyreose, je nach individuellen Laborreferenzwerten, definiert durch:

TSH	0,40 - 4,20 mIU/L
T ₃ gesamt:	0,78 - 1,82 ng/ml
frei:	2,30 - 4,30 pg/ml
T ₄ gesamt:	5,60 - 12,3 µg/dl
frei:	0,99 - 1,62 ng/dl

Die aktuellen regionalen Referenzintervalle für Schilddrüsenhormone im süddeutschen Raum (Ganslmeier, M et al. 2014) sind folgendermaßen definiert:

TSH	0,58 - 3,49 mIU/L
fT ₃	3,56 - 5,88 pmol/L
fT ₄	11,58 - 20,46 pmol/L

1.3.2 Hyperthyreose

Eine Hyperthyreose ist definiert als eine Überfunktion der Schilddrüse, welche mit einer Überproduktion und einem Überangebot an Schilddrüsenhormonen einhergeht. Im klinischen Befund zeichnet sich dieser hyperthyreote Zustand durch einen erhöhten Grundumsatz aus, dies führt nicht selten zu einem Gewichtsverlust und gleichzeitiger Hyperthermie. Im Nervensystem herrscht eine Übererregbarkeit, was häufig von psychomotorischer Unruhe begleitet wird. Es kann dabei ein Tremor entstehen oder sogar zu Zeichen einer Myopathie kommen. Kardial ist eine Tachykardie zu messen, manchmal auch Herzrhythmusstörungen. Ursachen für einen hyperthyreoten Zustand könne zum einen ein M. Basedow oder aber eine Schilddrüsenautonomie sein (Herold, G 2011).

Laborchemisch wird eine Hyperthyreose definiert durch:

TSH	erniedrigt
fT ₃	erhöht
fT ₄	erhöht

1.3.3 Hypothyreose

Die Hypothyreose ist genau das Gegenteil, nämlich eine Unterfunktion der Schilddrüse. Sie ist entweder angeboren oder erworben. Die Mangelversorgung des Körpers mit Schilddrüsenhormonen zeigt sich klinisch durch einen eingeschränkten und reduzierten Stoffwechsel. Je nachdem zu welchem Zeitpunkt, also Alter, der hypothyreote Zustand eintritt haben die nachfolgend, aufgelistete klinischen Zeichen größeren und schwerwiegenderen Einfluss auf den Organismus. Zum Beispiel sind Zeichen eines körperlichen Leistungsabfalls Bewegungsarmut, reduzierte Muskelreflexe oder auch Obstipation. Häufig wird eine Bradykardie mit im schlimmsten Fall Herzinsuffizienz verzeichnet. Müdigkeit, aber auch Antriebsarmut, sowie Desinteresse und allgemeine Verlangsamung sind Zeichen des geistigen Leitungseinbruchs, sogar eine geistige Retardierung ist möglich (Herold, G 2011).

Laborchemisch wird eine Hypothyreose definiert durch:

TSH	erhöht
fT ₃	erniedrigt
fT ₄	erniedrigt

1.4 Analytische Verfahren für die freien Schilddrüsenhormone fT₃ und fT₄

Die ungebundenen, freien Schilddrüsenhormone und nicht die proteingebundenen Formen lassen eine wahrere Abschätzung über das intrazelluläre Angebot von Schilddrüsenhormonen und damit über die Schilddrüsenfunktion zu. Daher ist es das oberste Ziel möglichst unabhängig von probenabhängigen Konzentrationen und Bindungseigenschaften von T₃/T₄-bindenden Proteinen die fT₃/fT₄-Konzentration im Serum zu messen. Die Art des verwendeten Assays, ob es sich um ein Dialyseverfahren, Antikörper- oder unspezifische Bindungsverfahren handelt, und darüber hinaus auch die unterschiedliche Messabläufe beeinflussen die Validität der Messungen (Midgley, JE 2001). Weitere Einflussfaktoren sind die Konzentration und Affinität der verwendeten Antikörper oder Bindungsreagenzien, die verwendete Pufferlösung für möglichst physiologische Konditionen, die Inkubationszeit und die Inkubationstemperatur (Nelson, JC and Weiss, RM 1985; Ross, HA and Benraad, TJ 1992; van der Sluijs Veer, G et al. 1992; Docter, R et al. 1993).

Alle diese Faktoren zeigen auf, warum unterschiedliche Methoden zur Messung der freien Schilddrüsenhormone miteinander verglichen werden und die Validität jeder einzelnen Methode untersucht wird. Man unterscheidet bei den neueren Methoden zwischen einem Zweischnitt-Immunoassay und einem Einschnitt-Analog-Immunoassay. Bei dem Zweischnitt-Immunoassay wird zunächst das Serum mit einem T_3/T_4 spezifischen Antikörper inkubiert und bei Erreichen des Gleichgewichts werden das Serum und die Antikörper durch ein mehrfaches Auswaschverfahren voneinander getrennt. Danach wird der Antikörperkomplex wiederum mit einem markierten T_3/T_4 inkubiert und anschließend mit einem Immunoassay gemessen (Ekins, RP et al. 1980).

Um die Ungenauigkeit bei einem mehrteiligen, getrennten Messverfahren zu reduzieren, wurde der Einschnitt-Analog Immunoassay eingeführt (Wilkins, TA et al. 1986; Christofides, ND, Sheehan, CP, and Midgley, JE 1992). In diesem Verfahren wird ein chemisch modifiziertes T_3/T_4 Analogon zu dem Antikörperkomplex gegeben, welches eine höhere Affinität und Bindungsstärke gegenüber dem Antikörper aufweist und daher das Auswaschverfahren zur Entfernung der Bindungsproteine überflüssig macht.

In jedem der genannten Verfahren ist ein Faktor von besonderer Bedeutung; die Albumin-Konzentration. Sie beeinflusst das Messergebnis auf mehreren Ebenen und kann in allen Verfahren zu Messfehlern und falschen Interpretationen führen. Allerdings ist es auch das einzige Protein, das den Heparineffekt auf die fT_3 -Spiegel aufheben kann. Heparin erhöht die Aktivität der Lipoprotein-Lipase und damit die Konzentration freier Fettsäuren, die mit fT_3 um die Plasmaproteinbindung konkurrieren (Stockigt, JR and Lim, CF 2009). Albumin bindet die freien Fettsäuren und verhindert damit die Erhöhung des freien Anteils des T_3 . So mildert Albumin die Interaktion und Beeinflussung der Messung der freien Schilddrüsenhormone bei heparinisierten Patienten oder Patienten mit einem Euthyroid-Sick-Syndrom (Chopra, IJ et al. 1979; Chopra, IJ et al. 1980).

2 Fragestellung

In der Klinik sind nicht selten Patienten, die diskrepante Befunde zwischen Schilddrüsenhormonwerten, TSH-Spiegeln und klinischen Untersuchungsbefunden aufweisen. Am häufigsten ist dabei eine Befundkonstellation mit niedrigen Serumspiegeln mit fT_3 , normalen TSH-Spiegeln und einem klinischen Untersuchungsbefund der eher mit einer euthyreoten, gelegentlichen hypothyreoten Stoffwechsellage übereinstimmt. Diese Befundkonstellation wird in der Literatur so auch als Euthyroid-Sick-Syndrom bezeichnet (Ganesan, K and Wadud, K 2018). Die Gesamt- T_3 Erniedrigung entsteht dabei durch eine geringere Konversion von T_4 zu T_3 , zugunsten von rT_3 , dem unwirksameren Dejodat des T_4 . Typisch für dieses Krankheitsbild ist über weite Strecken des Krankheitsverlaufs, dass die TSH-Spiegel auf einen intrazellulär normothyreoten Zustand hinweisen.

Eine alternative Erklärung für die Diskrepanz zwischen einem normalen TSH-Spiegel und einem niedrigen fT_3 -Wert kann eine erhöhte Plasma-Eiweiß-Bindung des T_3 sein. Auch in dieser Konstellation würde man eine euthyreote Klinik und normale TSH-Spiegel als Zeichen einer „normalen“ intrazellulären T_3 -Wirkung sehen können. Um das zu verbessern wurde die T_3 -Bestimmung durch die fT_3 -Bestimmung im Serum ersetzt, um so unabhängig von den Konzentrationen der T_3 -bindenden Proteine die biologisch wirksame Konzentration des T_3 zu bestimmen.

Besonders bei Patienten mit endokrinologischen und immunologischen Erkrankungen ist es jedoch möglich, dass weitere, möglicherweise pathologische, teilweise unbekannte, zumindest in der Routine nicht bestimmbar Proteine im Serum das T_3 in vitro binden und damit zu niedrige fT_3 -Spiegel simulieren. Mit anderen Worten, das zu niedrig gemessene fT_3 wäre kein biologischer Effekt, sondern ein laborchemisches Messproblem bei solchen „Problemseren“. Allerdings wäre dann die Diskrepanz nicht der fT_3 -Analytik selbst geschuldet, sondern der pathologischen Zusammensetzung des Serums.

Da Immunoassay-Systeme für die Messung von freien Hormonen wie fT_3 und fT_4 nur Abschätzungsmethoden sind und keine unmittelbaren Messungen der Analyten darstellen, wären oben genannte Beeinflussungen in einem Einschnitt-Analogverfahren, wie dem routinemäßig benutzten Elecsys Elektrochemilumineszenz Verfahren von Roche Diagnostics,

durchaus vorstellbar. Um dies zu verifizieren kann nur ein Referenzverfahren zur Messung von freien Hormonkonzentrationen im Serum eingesetzt werden. Dieses Referenzverfahren ist in dieser Arbeit die Gleichgewichtsdialyse.

Die Gleichgewichtsdialyse ist ein Verfahren bei dem auf der einen Seite der Kammer die Probe eines solchen Problemserums eingesetzt wird. Auf der anderen Seite, also in der Dialysekammer, befindet sich Serum mit bekannten Konzentrationen der thyroxinbindenden Proteine und mutmaßlich keine pathologischen Bindungsproteine für T_3 . Unter konstanter Rotation und strikter Temperaturkontrolle in Reaktionszeiten bis zu 24 h wird das Gleichgewicht der jeweiligen Hormonkonzentration in einer umgebenden Dialyseflüssigkeit hergestellt. Nach Konzentrationsausgleich von T_3 zwischen beiden Kammern, kann im Serum der Dialysekammer, die fT_3 -Konzentration ungestört von potenziellen pathologischen Bindungsproteinen bestimmt werden. Dieses aufwendige Verfahren greift nicht in die Thermodynamik der Liganden-Bindungsprotein-Interaktion ein und kann zusammen mit einem Detektionsverfahren eine direkte Messung der freien Hormone ermöglichen. Im vorliegenden Fall ist als zweites Detektionsverfahren eine Messung des T_3/T_4 mittels Radioimmunoassays durchzuführen. Die fT_3 -Konzentration der Dialysekammer müsste dann mit dem klinischen Untersuchungsbefund und den TSH-Spiegeln übereinstimmen.

In insgesamt 70 solchen „Problemseren“ wurde daher vor und nach einer Gleichgewichtsdialyse mit dem derzeitigen Standardverfahren dem Elecsys und mit dem klassischen Radioimmunoassay fT_3 -Spiegel gemessen und damit die Übereinstimmung beider Verfahren analysiert. Gleichzeitig wurden aus dem Krankenhausinformationssystem die klinischen Daten dieser Patienten gesammelt um in einer sekundären explorativen Analyse nach möglichen klinischen Einflussfaktoren für die Diskrepanz zwischen Schilddrüsenhormonstatus und klinischem Untersuchungsbefund zu suchen.

3 Studiendesign, Patienten, Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Es handelt sich bei der durchgeführten Studie um eine monozentrische, experimentelle Studie.

3.2 Patientenauswahl

Zwischen Juni 2010 und Januar 2011 wurden in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin am Klinikum rechts der Isar der Technische Universität München, 258 Patienten untersucht. Es wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen und Patientenserum (Problemserum) gesammelt, welche bei einem klinischen Befund einer Euthyreose laborchemisch zu niedrige fT_3 -Werte hatten. Referenzwerte für fT_3 waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung 2,50 - 4,30 pg/ml. Für TSH galten die Referenzwerte 0,4 - 4,2 μ U/ml. Die Routinebefunde wurden durch das Institut für Klinische Chemie und Pathochemie am Klinikum rechts der Isar der Technische Universität München erhoben.

Die Erhebung aller weiteren biometrischen Daten erfolgte mit Hilfe unseres Krankenhausinformationssystems (SAP IsHmed). Hierbei wurden alle Krankenakten der später eingeschlossenen Patienten eingesehen und systematisch untersucht. Eine Diagnose oder Erkrankung galt dabei dann als gesichert, wenn sie bei Durchsicht aller Akten in einer Diagnoseliste erstmals erschienen ist. Falls die gesuchte Diagnose nicht aufgelistet wurde, galt der Patient automatisch als gesund bezüglich der gesuchten Erkrankung.

3.3 Material

3.3.1 Serum

Da für die gesamten Untersuchungen und Messungen mindestens jeweils 1500 μ l (800 μ l Gleichgewichtsdialyse, 500 μ l Routinelabor, 200 μ l Radioimmunoassay) an Patientenserum zur Durchführung notwendig waren wurden unter dem oben beschriebenen Patientenkollektiv 70 Proben mit ausreichendem Probenmaterial ausgewählt. Außerdem wurden zwei Mal 50 ml Nullserum, fT_3 und fT_4 freies Serum verwendet. Freundlicherweise wurde das Nullserum von Roche Diagnostics GmbH, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

3.3.2 Geräte und Assay

Im Routinelabor wurde zur Messung der fT_3 Werte das Cobas® 6000 analyzer series von Roche Diagnostics GmbH, Deutschland, verwendet mit dem Analysesystem Elecsys® fT_3 . Hierbei handelt es sich um einen Elektrochemilumescenz-Immunoassay (ECLIA) zur quantitativen fT_3 In-vitro Bestimmung.

Bei der Gleichgewichtsdialyse wurde die Dialyseapparatur und die Zellulosemembran von DIANORM G. Maierhofer GmbH, München, verwendet. Die Apparatur wurde während der 24 stündigen Dialysezeit in einem Wasserbad von Kottermann Labortechnik, Hänsigen, befestigt.

Das Problemserum und die nach der Gleichgewichtsdialyse gewonnenen Proben wurden zuletzt noch mit dem Gamma-Counter Gerätetyp 1470 Wizard von Perkin Elmer, Rodgau, gemessen. Hierfür wurde das Radioimmunoassay Biomarker Kit für die Bestimmung von fT_3 von Thermo Scientific, BRAHMS, Henningsdorf, Deutschland verwendet. Das gebrauchsfertige Kit enthält jeweils eine 105 ml Flasche mit einem rot eingefärbten ^{125}I -Trijodthyronin Tracer, 2 x 50 Stück der mit anti- T_3 -Antiserum (Kaninchen) beschichteten Teströhrchen, eine 0,8 ml Flasche fT_3 -Nullstandard (Humanserum), sechs 0,8 ml fT_3 -Standards (Humanserum) in aufsteigenden Konzentrationen, sowie drei 0,8 ml Flaschen Kontrollseren (Humanserum).

Material und Zubehör:

Mikroliterpipetten (100 - 1000 μ l)	Eppendorf Reference
Dispenser (0,5 - 2 ml)	Dispenzette, Brand
Millipore Wasser	Milli-Q Plus, Millipore
Reagenzglasschüttler	IKA ® Vortex, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
PCC-54 Reinigungsmittelkonzentrat	Thermo Scientific (Thermo-Fisher)
Horizontalschüttler	IKA-Vibrax-VXR (K electronics)

3.4 Methoden

3.4.1 Präanalytik

Zur Vorbereitung der eigentlichen experimentellen Arbeit zur Gleichgewichtsdialyse diente die Arbeit von Frau Katharina Dietz mit dem Titel „Entwicklung einer Referenzmethode zur Bestimmung von freiem Trijodthyronin bei Patientenseren mit klinisch unstimmgiger Konzentration“, Januar 2012. Hier wurde die Gleichgewichtsdialyse gegen Puffer und gegen Nullserum verglichen nachdem die Konzentration mit einem Radioimmunoassay ermittelt wurde. Bei der Dialyse gegen Puffer konnten weder fT_3 noch fT_4 nachgewiesen werden. Jedoch bei der Dialyse gegen Nullserum konnte nach einer Dialysezeit von 44 h ein Gleichgewicht zwischen der Serum- und Nullserumprobe gemessen werden, allerdings nur für fT_3 . Insgesamt wurde gezeigt, dass die Gleichgewichtsdialyse bei der fT_3 Bestimmung anwendbar ist, jedoch bei sehr hohem Aufwand nicht als Referenzmethode einsetzbar ist.

Zur weiteren Vorbereitung und um Vertrauen mit dem Verfahren zu gewinnen wurden zunächst Nicht-Problemseren verwendet. Dabei wurden insgesamt 30 Nicht-Problemseren verwendet. Eine der Schwierigkeiten die sich dabei aufzeigte war es die erforderliche Menge an Probenmaterial für die Gleichgewichtsdialyse zu gewährleisten. Es zeigte sich, dass eine Menge von 800 μ l an Probenmaterial für die erfolgreiche Durchführung notwendig ist. Daher wurden teils Patientenseren gemischt um mehr Probenmaterial zu erhalten. Von diesen Mischseren wurde deshalb vor den weiteren experimentellen Messungen ein Routinelabor zur Bestimmung der Ausgangskonzentration von fT_3 durchgeführt. Sowohl Nicht-Problemseren, Problemseren und Nullserum wurden jeweils für die nachfolgenden Untersuchungen (Elektrochemilumenszenz-Immunoassay, Gleichgewichtsdialyse, Radioimmunoassay) bei Raumtemperatur aufgetaut, beschriftete und gekennzeichnet, nachdem sie bei mindestens -20°C gelagert wurden.

Die Beschriftung der Proben wurde am Beispiel von Problemserum Nummer 1 folgendermaßen festgelegt:

- Pr.1 S. \cong unbehandeltes Problemserum
- Pr.1 Dia. \cong dialysiertes Serum aus LID-Zelle

- Pr.1 \cong dialysiertes Serum aus BASE-Zelle

Das Nullserum, welches zweimal in jeweils 50 ml Mengen geliefert wurde, wurde jeweils für einen Dialysedurchgang in 1 ml Portionen abgefüllt, sodass nicht immer die gesamte Menge aufgetaut und wieder eingefroren werden musste. Wir entschieden uns wegen der praktikableren Durchführung für eine Dialysezeit von 24 h.

Nachfolgend sind in chronologischem Ablauf die einzelnen Schritte der experimentellen Arbeit im Allgemeinen und die selbstständig durchgeführten Experimente erläutert.

3.4.2 Elektrochemilumineszenz, Immunoassay-Elecsys fT_3

Grundlage dieses immunologischen Analyseverfahrens ist es die Bindung eines Antigens an einen Antikörper quantitativ zu messen. Bei dem Elektrochemilumineszenz (ECL) Verfahren werden stabile Ausgangsstoffe, so zum Beispiel Patientenserum, mit einem lumineszierenden Molekül inkubiert. Beispiele für solche Moleküle sind Ruthenium, Osmium oder Rhenium. Erst in Verbindung mit dem Anlegen einer Spannung kommt es dann zu einer Lichtemission nach einer chemischen Oxidation. Das so entstandene Licht wird von einem Fotomultiplier gemessen. Später erfolgt die Umrechnung in Konzentrationen. Es handelt sich bei diesem Verfahren um eines der mit am häufigsten Angewendeten in der Labormedizin (Hu, L and Xu, G 2010).

Bei dem Analysesystem Elecsys fT_3 handelt es sich um einen kompetitiven Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) zur quantitativen fT_3 In-vitro-Bestimmung. Das kompetitive Prinzip ist im Vergleich zum Sandwich- oder Brückenverfahren zu bevorzugen, da hiermit das zu analysierende Material, wie in unserem Fall das fT_3 , mit einem sehr geringen Molekulargewicht gemessen werden kann.

Der Test beinhaltet drei Schritte, in welchem drei unterschiedliche biochemische Anteile zusammengeführt werden. Zuerst werden 15 μ l des Patientenserums mit einem ruthenylierten Antikörper gegen T_3 für 9 Minuten inkubiert. Hierbei werden bereits Verbindungen zwischen dem fT_3 -Antigen und dem Antikörper eingegangen. Um noch freie Bindungsstellen der Antikörper zu besetzen wird ein biotinyliertes T_3 Antigen hinzugegeben (Abbildung 5).

Mit Hilfe von Streptavidin Mikropartikeln und einem Magnet werden dann die Antigen-

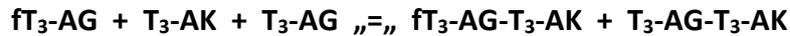


Abbildung 5: Kompetitives Bindungsprinzip

Das fT_3 -Antigen (fT_3 -AG) aus der Serumprobe und der rutheniumylierte T_3 spezifischen Antikörper (T_3 -AK) gehen eine Verbindung ein. Das hinzu gegebene biotinylierte T_3 -Antigen (T_3 -AG), belegt dann die noch freien Bindungsstellen an den Antikörperkomplexen.

Antikörper-Komplexe an eine Platinelektrode fixiert. Die ungebundenen Antigene werden anschließend mit einer Pufferlösung von der Elektrode und der Messzelle ausgewaschen. Dieser Ablauf dauert weitere 9 Minuten und wird als Bound from Free-Trennung bezeichnet. Der Magnet wird ausgeschaltet. Erst dann wird eine Spannung angelegt, wodurch Licht emittiert und über einen Fotomultiplier gemessen wird. Das Signal wird zuletzt in eine Konzentration umgerechnet (Liappis, N 1985; Smith, J and Osikowicz, G 1993; Bruhn, HD et al. 2008). Dies ist dann die eigentliche ECL-Reaktion. Danach erfolgt durch eine Reinigungslösung und einem mehrmaligen Spannungswechsel an der Elektrode die Reinigung der Messzelle von den Mikropartikeln. (Robbins, J and Rall, JE 1957; Oppenheimer, JH 1968; Ekins, R 1990)

3.4.2.1 Durchführung des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays

Alle Proben, ob aus der Versuchsreihe mit den Nicht-Problemseren oder die 70 Problemseren, wurden mit dem Analysesystem Elecsys fT_3 in ein und demselben Gerät nach der ersten Blutentnahme auf ihre fT_3 Konzentration gemessen. Eine zweite Messung nach dem Auftauen sollte den Einfluss des Einfrierens und Auftauens auf die Konzentration untersuchen. Es waren pro Messung ein Volumen von mindestens 500 μ l Serum erforderlich.

Bei den Nicht-Problemseren in der Vorbereitungsphase, die zur Gewinnung von mehr Probenmaterial zusammengegeben wurden, gibt es nur einen Konzentrationswert durch das Analysesystem Elecsys fT_3 .

3.4.3 Gleichgewichtsdialyse

Die Dialyse einer Flüssigkeit dient zur Trennung oder zum Austausch von Makromolekülen und ist zudem die erste Verarbeitung der Flüssigkeit vor der eigentlichen Messung durch ein diagnostisches Verfahren. Bei der Gleichgewichtsdialyse wird besonderes Augenmerk auf eine mögliche Wechselwirkung gelegt, zwischen Makromolekülen und potenziellen Bindungsstellen, meist Proteinen (Kariv, I, Cao, H, and Oldenburg, KR 2001). Mit Hilfe einer (semi-) permeablen Membran, welche zwei Kompartimente trennt, soll versucht werden durch einen konzentrationsgetriebenen Prozess ein Gleichgewicht zwischen den Kompartimenten herzustellen (Albert, C 2009). Es handelt sich dabei um eine Separationsmethode. Je nach Durchlässigkeit der Membran können kleinere oder größere Moleküle zwischen den Kompartimenten wandern. Die Porengröße wird durch eine Ausschlussgrenze angegeben, auch Molecular Weight Cut Off (MWCO) bezeichnet und in der Einheit Dalton (Da) angegeben. Nur Teilchen mit geringerem Molekulargewicht können die Membran passieren (Bisswanger, H 2006). In dem einen Kompartiment befindet sich in der Regel Serum mit dem zu untersuchenden Molekül in unserem Fall fT_3 . In dem zweiten Kompartiment befindet sich molekülfreies Serum, das als Nullserum bezeichnet wird. Um physiologische Verhältnisse zu simulieren, findet die Gleichgewichtsdialyse in einem Wasserbad bei 37°C statt.

3.4.3.1 Durchführung der Gleichgewichtsdialyse

Für einen Messdurchgang wurden jeweils fünf zu analysierende Seren sowie fünf in 1 ml portionierte Nullseren aufgetaut und auf Raumtemperatur erwärmt. Während dieser Zeit konnte mit der Vorbereitung der Membranen begonnen werden. Diese werden in trockener Form vom Hersteller geliefert und müssen daher zunächst rehydriert werden. Es müssen fünf Membranen bei 37°C in Millipore-Wasser bei einer Geschwindigkeit von 40 U/min für 15 Minuten equilibriert werden. Dieser Vorgang muss für jede Membran fünf Mal wiederholt werden. Dabei wird jedes Mal das Wasser komplett ausgetauscht. Außerdem ist darauf zu achten, dass die Membran am besten mit stumpfen Pinzetten und nur in den äußeren Bereichen berührt wird, um mögliche Beschädigungen zu vermeiden. Weiter soll die glänzende Fläche der Membran während der Rehydrierung nach unten zeigen. Die verwendeten Cellulose-Membranen haben einen MWCO von 5 kDa.

In der Zwischenzeit wurden vor jedem Messdurchgang die verwendeten Teflon-Dialysezellen, Stöpsel, Ein- und Auslassrohre untersucht und gegebenenfalls mit Hilfe einer Pipette mit Luft von Wasser- und Reinigungsresten befreit. Der Reinigungsprozess wurde nach jeder erfolgten Gleichgewichtsdialyse durchgeführt. Dafür wurden alle verwendeten Teile in ein großes Gefäß gelegt mit einer Reinigungstextur aus 1 l Millipore-Wasser und 20 ml der Reinigungslösung PCC-54 Detergent Concentrate. Für 24 h wurden die Teile gespült und anschließend eingeweicht. Die Trocknung der einzelnen Dialysebestandteile erfolgte in einer Wärmekammer.

Zunächst wurde jeweils eine Membran zwischen eine breite BASE-Zelle und eine dünne LID-Zelle zentriert und zu einer Zelleinheit verbunden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass sich die drei Öffnungen für die Stöpsel, Ein- und Auslassrohre jeweils auf derselben Höhe befanden. Immer abwechselte wurde dann ein Abstandshalter und eine Zelleinheit in die Trägerapparatur mit Führungsstangen zur Fixierung eingespannt. Die Träger wurden dann an einer Seite fest verschlossen. Dann wurden jeweils die beiden nahe beieinander liegenden Öffnungen mit Stöpseln verschlossen und die dritte Öffnung mit dem Einlassrohr an jeder Dialysezelle besetzt (Abbildung 6).



Abbildung 6: Teile einer Zelleinheit

LID-Zelle (rechts), BASE-Zelle (links) mit Stöpseln an den Öffnungsstellen der Teflon-Dialysezellen verschlossen und ein Ein- und Auslassrohr (Mitte) (The Nest Group, I)

In der Arbeit von Katharina Dietz zeigte sich, dass 800 µl die optimale Menge pro Zelleinheit ist, bei einem Fassungsvermögen von 1 ml laut Hersteller. Es wurden dann jeweils 800 µl von den Nicht-Problemseren und den Problemseren in die breite BASE-Zelle pipettiert. In die dünne LID-Zelle wurde jeweils 800 µl Nullserum pipettiert. Die Seren wurden vorher mit einem Horizontalschüttler durchmischt. Nachdem alle Zelleinheiten befüllt und mit einem Stöpsel verschlossen sind, wird die Trägerapparatur in das dafür vorgesehene Stativ eingeklemmt (Abbildung 7). Das ganze Stativ kommt dann in ein Wasserbad bei 37°C um physiologische Bedingungen zu schaffen. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 3 U/min läuft die Gleichgewichtsdialyse für genau 24 h.



Abbildung 7: Dialyse-Stativ mit zwei Trägerapparaturen (The Nest Group, I)

Nach den 24 h müssen die dialysierten Seren wieder aus den Zelleinheiten abgelassen werden. Dafür wird an der Einlassstelle das Auslassrohr eingesteckt und an der gegenüberliegenden Seite einer der Stöpsel entfernt und hierüber mit der Pipette mit leichtem Druck Luft in die Zelleinheit eingegeben. Am Auslassrohr wird das Dialysat in einem frischen Eppendorf Gefäß aufgefangen und sofort beschriftet wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Vor der weiteren Verarbeitung der Proben wurden sie erneut bei mindestens -20°C eingefroren.

3.4.4 Radioimmunoassay

Es handelt sich bei dem Radioimmunoassay (RIA) ebenfalls wie bei dem ECLIA um ein quantitatives immunologisches Analyseverfahren bei welchem ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Da hier mit radioaktiven Stoffen gearbeitet wird, ist ein sorgsamer Umgang zwingend erforderlich. Bei dem kompetitiven RIA wird ein natürliches Antigen, ein radioaktiv markiertes Antigen, auch Tracer genannt, mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Die beiden Antigene konkurrieren dabei um die Bindungsstellen an den Antikörpern. Je nachdem wie hoch der natürliche Antigengehalt ist, entstehen bei hohen Konzentrationen wenige radioaktive Antigen-Antikörper-Komplexe und bei niedrigen Konzentrationen viele radioaktive Antigen-Antikörper-Komplexe. Danach wird die Radioaktivität gemessen und über eine Standardkurve ausgewertet (Smith, J and Osikowicz, G 1993; Liappis, N 1985). Je geringer die gemessene Radioaktivität, desto mehr natürliches Antigen liegt vor.

3.4.4.1 Durchführung des Radioimmunoassays

Für die RIAs bei den Nicht-Problemseren und den Problemseren wurden für einen Durchgang jeweils 15 Proben gesammelt. Die jeweils durch die Gleichgewichtsdialyse gewonnenen Proben, sowie die unbehandelten Problemseren und die Nullseren wurden dafür erneut eingefroren und wieder aufgetaut.

Die Proben wurden auf Raumtemperatur temperiert und vor der weiteren Verarbeitung durchmischt mit einem Horizontalschüttler. Die fT_3 -Null- und fT_3 -Standards aus dem Biomarker Kit, unter 3.3.2 genauer beschrieben, wurden ebenfalls vor der Verteilung auf die Teströhrchen durchmischt. Als nächstes erfolgte die wie unter 3.4.1 beschriebene Beschriftung der mit anti- T_3 -Antiserum beschichteten Teströhrchen für die Proben, Standards und Kontrollseren, jeweils für eine Doppelbestimmung. Es wurden dann strikt nach der Arbeitsanleitung von BRAHMS fT_3 RIA (Version R016de) zunächst in zwei Teströhrchen jeweils 100 μ l fT_3 -Nullstandard pipettiert. Danach wurde dasselbe mit den sechs aufsteigenden Konzentrationen von fT_3 -Standards und den drei Kontrollseren gemacht. Die ersten vierzehn Teströhrchen mit den Standards sowie zwei weitere mit T gekennzeichnete Teströhrchen, zur Messung der Totalaktivität, dienen der Erstellung einer Standardkurve.

In die folgenden Teströhrchen wurden dann jeweils in doppelter Ausführung 100 µl der unbehandelten Seren, der dialysierten Seren aus LID-Zelle und der dialysierten Seren aus BASE-Zelle pipettiert. In jedes Teströhrchen wurde anschließend 1 ml des rot gefärbten ¹²⁵I-Trijodthyronin Tracers pipettiert. Auf einem Horizontalschüttler bei einer Geschwindigkeit von 170-250 U/min soll nun die so entstandene Antigen-Antikörper-Tracer-Verbindung bei mit Klebefolien verschlossenen Teströhrchen und Raumtemperatur für 2 h inkubieren. Die Teströhrchen T, welche nur fT₃-Antiserum und Tracer befüllt sind, benötigen diesen Zwischenschritt nicht. Nach den zwei Stunden wurde aus allen Teströhrchen, außer den T Teströhrchen, die Antigen-Antikörper-Tracer-Verbindung vorsichtig abgesaugt. Letzte Flüssigkeitsreste können durch Abtropfen über Kopf oder durch Zellstoff aufgesaugt werden.

Zuletzt erfolgte die Messung der Radioaktivität im Gamma-Counter über 1 Minute (Thermo Scientific, BG, Henningsdorf).

3.5 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit IBM SPSS Statistics für MacOS, Version 23 (IBM, Armonk, NY, USA) gerechnet. Stetige Variablen sind als Mittelwert und Standardabweichung oder als Median sowie dem Minimum und dem Maximum präsentiert. Kategoriale Variablen sind als Anzahl und in Prozent der Gesamtheit angegeben. Der Vergleich der unterschiedlichen Methoden die fT₃-Werte zu messen wurde mit Bland-Altman-Plots dargestellt. Die mittlere Abweichung (BIAS) ist für die Differenzen der jeweiligen verglichenen Verfahren angegeben. Die Entscheidung über die Bedeutung der BIAS wurde ausschließlich klinisch getroffen. Nach systematischen Abweichungen wurde mit linearen Regressionen zwischen den Mittelwerten der verglichenen Verfahren und deren Differenzen gesucht. Signifikante Koeffizienten sind bei den Abbildungsbeschreibungen der jeweiligen Bland-Altman-Plots angegeben.

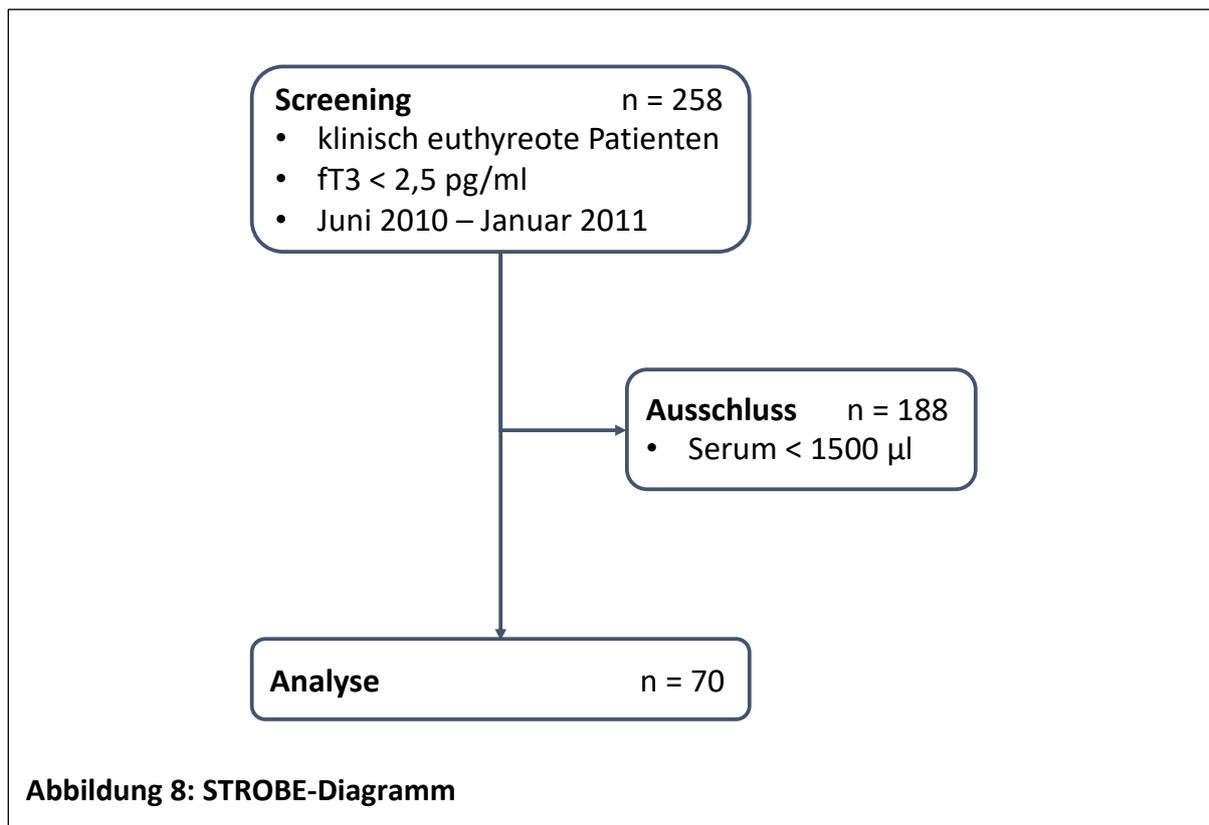
Schließlich wurden mit einem explorativen Ansatz mögliche Faktoren für ein Euthyroid-Sick-Syndrom mit linearen Regressionen gesucht. Dabei war der mit dem Elecsys-Verfahren bestimmte fT₃-Wert die abhängige Variable und alle bekannten klinischen Beobachtungen und Diagnosen die unabhängigen Variablen. Angesichts der 70 Patienten wurden die unabhängigen Variablen in einer ersten Analyse schrittweise in das Modell aufgenommen. In einer zweiten Analyse wurden die Variablen schrittweise aus dem vollen Modell entfernt.

Einschlusskriterium war jeweils $p < 0,05$ und Ausschlusskriterium $p > 0,1$. Zur Absicherung wurden nochmals alle Variablen, die in den beiden Ansätzen mit $p < 0,2$ nahe an der Grenze zum Einschluss waren, einzeln geprüft, ob durch ihre Aufnahme das Modell die $fT3$ -Werte exakter vorhersagen kann.

4 Ergebnisse

4.1 Biometrische Daten

Aus dem großen Patientenkollektiv wurden in dieser Arbeit 70 Patienten eingeschlossen. Von 188 Patienten war weniger als 1500 μl Serum verfügbar. Da das Volumen dieser Seren für den geplanten Versuch nicht ausreichte konnten sie in dieser Arbeit nicht eingeschlossen werden



(Abbildung 8).

Davon waren 17 männlich (24%) und 53 weiblich (76%). Die Patienten waren zwischen 28-85 Jahre alt. Das mittlere Alter betrug damit 56 ± 15 Jahre. Das Gewicht lag bei 69 ± 16 kg. Zum Zeitpunkt der Probeentnahme waren 16 Patienten (23%) normalgewichtig, 15 Patienten (21%) untergewichtig und 39 Patienten (56%) übergewichtig. (Tabelle 1).

Tabelle 1: Biometrische Daten			
Geschlecht			
Männlich	Anzahl (%)	17 / 70	(24%)
weiblich	Anzahl (%)	53 / 70	(76%)
Alter (Jahre)	MW ± SD (Min-Max)	56 ± 15	(28 – 85)
Gewicht (kg)	MW ± SD (Min-Max)	69 ± 16	(38 – 153)
Body Mass Index			
< 17,5 kg/m²	Anzahl (%)	15 / 70	(21%)
17,5 – 25 kg/m²	Anzahl (%)	16 / 70	(23%)
≥ 25 kg/m²	Anzahl (%)	39 / 70	(56%)
MW = Mittelwert SD = Standardabweichung Min = Minimum Max = Maximum			

4.2 Schilddrüsenerkrankungen

Die Patienten deren Seren gesammelt wurden, hatten in 4% - 29% der Fälle mindestens eine Schilddrüsenerkrankung. Die fT₃- und fT₄-Werte weisen auf eine Hypothyreose hin, was jedoch nur bei einem Patienten mit dem TSH-Spiegel korrelierte. Dagegen hatten 9 Patienten trotz fT₃-Werten im hypothyreoten Messbereich supprimierte TSH-Spiegel, die auf das Gegenteil, nämlich eine Hyperthyreose, hinweisen. Die klinischen Befunde verstärken diese Diskrepanz zusätzlich. Danach wären sogar 12 Patienten hypothyreot vermutet worden. 34% der Patienten wurden medikamentös mit Thyroxin, Thyreostatika oder Jodid behandelt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Schilddrüsenstatus

Schilddrüsenwerte			
fT₃ [pg/ml]	MW ± SD (Min-Max)	2,0 ± 0,4	(0,4 – 2,7)
fT₄ [ng/ml]	MW ± SD (Min-Max)	1,2 ± 0,3	(0,1 – 2,1)
TSH [µIU/ml]	MW ± SD (Min-Max)	1,6 ± 1,2	(0,1 – 6,8)
Schilddrüsenfunktion (basierend auf TSH-Werten bei Blutentnahme)			
Hypothyreose	Anzahl (%)	1 / 70	(1%)
Hyperthyreose	Anzahl (%)	9 / 70	(13%)
Schilddrüsenanamnese			
Hypothyreose (klinisch)	Anzahl (%)	14 / 70	(20%)
Hyperthyreose (klinisch)	Anzahl (%)	12 / 70	(17%)
Hashimoto	Anzahl (%)	3 / 70	(4%)
M. Basedow	Anzahl (%)	7 / 70	(10%)
Struma	Anzahl (%)	20 / 70	(29%)
Hyperparathyroidismus	Anzahl (%)	15 / 70	(21%)
Schilddrüsen-Antikörper	Anzahl (%)	3 / 70	(4%)
Z.n. Radio-Jod-Therapie	Anzahl (%)	5 / 70	(7%)
Schilddrüsenmedikation			
L-Thyroxin	Anzahl (%)	22 / 70	(31%)
Thyreostatika	Anzahl (%)	4 / 70	(6%)
Jodid	Anzahl (%)	2 / 70	(3%)
TSH = Thyreotropin MW = Mittelwert SD = Standardabweichung Min = Minimum Max = Maximum			

4.3 Nebendiagnosen

Mit Hilfe der elektronischen Patientenakte aus dem Krankenhausinformationssystem konnten die Nebendiagnosen aller Patienten nachvollzogen werden.

4.3.1 Nierenerkrankungen

Immerhin knapp die Hälfte, 46% des Patientenkollektivs, zeigte eine Niereninsuffizienz was sich in der schlechten Nierenfunktion mit teils deutlich erhöhten Kreatinin-Werten und reduzierter Kreatinin-Clearance wieder spiegelte. Bei 17 Patienten bestand daher eine Dialysepflicht (Tabelle 3).

Tabelle 3: Nierenerkrankungen			
Nierenfunktion			
Kreatinin (mg/dl)	MW ± SD (Min-Max)	2,3 ± 2,5	(0,4 – 13,4)
Krea-Cl (ml/min)	MW ± SD (Min-Max)	60 ± 42	(4 – 184)
Niereninsuffizienz	Anzahl (%)	32 / 70	(46%)
Dialyse	Anzahl (%)	17 / 70	(24%)

MW = Mittelwert
SD = Standardabweichung
Min = Minimum
Max = Maximum
Krea-Cl = Kreatinin-Clearance

4.3.2 Lebererkrankungen

Tabelle 4 listet die Lebererkrankungen und Leberfunktionswerte der untersuchten Kohorte auf. Die Leberfunktionswerte INR, Bilirubin und Albumin lagen grob im Normbereich bis auf einzelne Ausreiser, trotz einer Steatosis hepatis bei 29% oder einer Hepatomegalie bei 20%. Bei 4 Patienten lag eine Hepatitis vor und 9 Patienten litten an einer Cholezystolithiasis.

Tabelle 4: Lebererkrankungen

Tabelle 4: Lebererkrankungen			
Leberfunktion			
INR	MW ± SD (Min-Max)	1,2 ± 0,4	(0,8 – 2,6)
Bilirubin (mg/dl)	Median (Min-Max)	0,4	(0,1 – 29,6)
Albumin (mg/dl)	MW ± SD (Min-Max)	3,5 ± 0,9	(1,6 – 4,7)
Child-Pugh Score	Median (Min-Max)	5	(5 – 12)
Steatosis hepatis	Anzahl (%)	20 / 70	(29%)
Hepatomegalie	Anzahl (%)	14 / 70	(20%)
Hepatitis	Anzahl (%)	4 / 70	(6%)
Cholezystolithiasis	Anzahl (%)	9 / 70	(13%)
INR = International Normalized Ratio MW = Mittelwert SD = Standardabweichung Min = Minimum Max = Maximum			

4.3.3 Lungenerkrankungen

Besonders auffällig in Tabelle 5 sind die 26% an respiratorischer Insuffizienz. Hier kann möglicherweise eine Korrelation zwischen der erhöhten Intensivpflicht und dem teils schweren Erkrankungsgrad im Patientenkollektiv hergestellt werden. Sowohl ein Asthma bronchiale, als auch eine chronische obstruktive Lungenerkrankung waren eher weniger häufig vertreten.

Tabelle 5: Lungenerkrankungen

Tabelle 5: Lungenerkrankungen			
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	Anzahl (%)	6 / 70	(9%)
Asthma bronchiale	Anzahl (%)	4 / 70	(6%)
Respiratorische Insuffizienz	Anzahl (%)	18 / 70	(26%)

4.3.4 Herzerkrankungen

Tabelle 6 zeigt die Herzerkrankungen des Kollektivs. Wie anzunehmen bei einem Patientengut aus einem westlichen Industriestaat, liegt mit 33 eine hohe Zahl an arterieller Hypertonie

erkrankten Patienten vor. Bei 9 Patienten war eine koronare Herzerkrankung bereits aufgetreten.

Tabelle 6: Herzerkrankungen			
Arterielle Hypertonie	Anzahl (%)	33 / 70	(47%)
Koronare Herzkrankheit	Anzahl (%)	9 / 70	(13%)
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	Anzahl (%)	4 / 70	(6%)
Vorhofflimmer	Anzahl (%)	4 / 70	(6%)

4.3.5 Sonstige Nebendiagnosen

Tabelle 7 listet die sonstigen Nebendiagnosen auf. Neben der hohen Prozenzahl an Diabetes mellitus erkrankten Patienten, 29%, standen 21% der Patienten unter einer Antikoagulation mit Heparin.

Tabelle 7: Weitere Diagnosen			
Diabetes mellitus	Anzahl (%)	20 / 70	(29%)
Antikoagulation – Heparin	Anzahl (%)	15 / 70	(21%)
Antinukleäre Antikörper	Anzahl (%)	5 / 70	(7%)
Hyperlipidämie	Anzahl (%)	13 / 70	(19%)
Lupus erythematoses	Anzahl (%)	4 / 70	(6%)
Candida Infektion	Anzahl (%)	6 / 70	(9%)
Schwangerschaft	Anzahl (%)	4 / 70	(6%)

4.4 fT₃-Analysen

Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte der einzelnen fT₃ Analysen mit den unterschiedlichen Verfahren und nach unterschiedlichen Analyseschritten. Hier zeigt sich zum Beispiel dass das Einfrieren der Seren fast keinen Einfluss auf den gemessenen Wert hat.

Tabelle 8: fT₃-Analysen mit unterschiedlichen Techniken und deren Differenzen

Variable	Verfahren	Material	Analyseschritt	MW ± SD
fT ₃ [pg/ml]	Elecsys	vor Frieren	-	1,97 ± 0,41
fT ₃ [pg/ml]	Elecsys	nach Frieren	-	2,02 ± 0,47
ΔfT ₃ [pg/ml]	Elecsys	-	nach Frieren - vor Frieren	0,05 ± 0,14
fT ₃ [pg/ml]	RIA	nach Frieren	-	2,11 ± 0,99
ΔfT ₃ [pg/ml]	RIA - Elecsys	nach Frieren	Verfahrensdifferenz	0,1 ± 0,72
fT ₃ [pg/ml]	RIA	-	-	1,01 ± 0,05
fT ₃ [pg/ml]	RIA	nach Frieren	nach Dialyse in Serumkammer	1,38 ± 0,73
fT ₃ [pg/ml]	RIA	nach Frieren	nach Dialyse in Dialysekammer	1,16 ± 0,27
ΔfT ₃ [pg/ml]	RIA	nach Frieren	vor Dialyse: Patientenserum - Nullserum	1,1 ± 0,97
ΔfT ₃ [pg/ml]	RIA	nach Frieren	nach Dialyse: Serumkammer - Dialysekammer	0,23 ± 0,62
fT ₃ [pg/ml]	RIA	nach Frieren	nach Dialyse	2,31 ± 0,54

RIA = Radioimmunoassay
 MW = Mittelwert
 SD = Standardabweichung

Die Serumproben wurden im Verlauf des Versuchs wiederholt tiefgefroren und aufgetaut. Diese Prozedur hatte einen klinisch vernachlässigbaren Einfluss auf die Ergebnisse der Experimente, wie der Vergleich der fT_3 -Werte vor und nach dem Gefrieren gemessen mit der Elecsys-Technik zeigt (Abbildung 9).

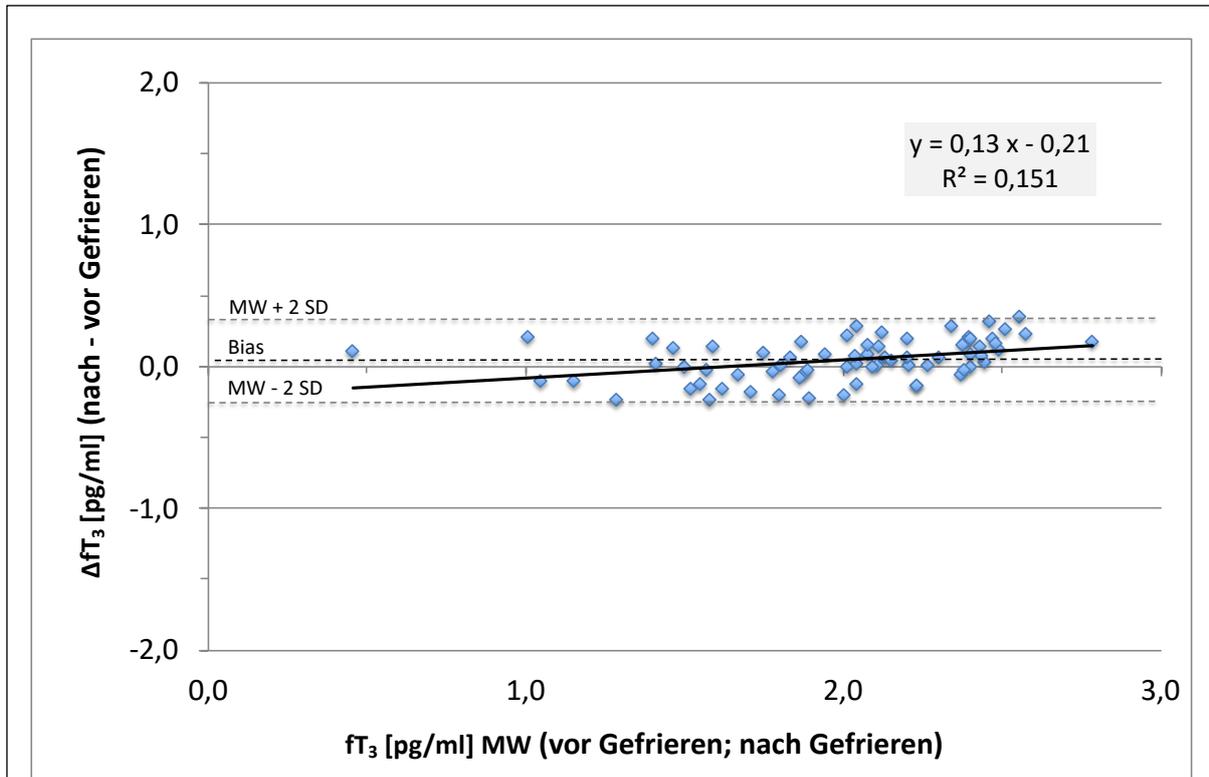


Abbildung 9: Bland-Altman-Plot. fT_3 (pg/ml) mit Elecsys vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen gemessen.

Nach Gefrieren werden die fT_3 -Werte geringfügig höher gemessen mit einer mittleren Abweichung (Bias) von 0,05 pg/ml. Bei höheren fT_3 -Werte wird nach Gefrieren ein zusätzlich erhöhter fT_3 -Wert gemessen (Koeffizient: 0,13 [0,06 bis 0,20]; $p = 0,001$). Insgesamt liegen jedoch 95% der Differenzen zwischen den fT_3 -Messwerten nach und vor Gefrieren in einem Intervall von -0,24 pg/ml und 0,33 pg/ml, was klinisch akzeptabel ist. MW = Mittelwert. SD = Standardabweichung

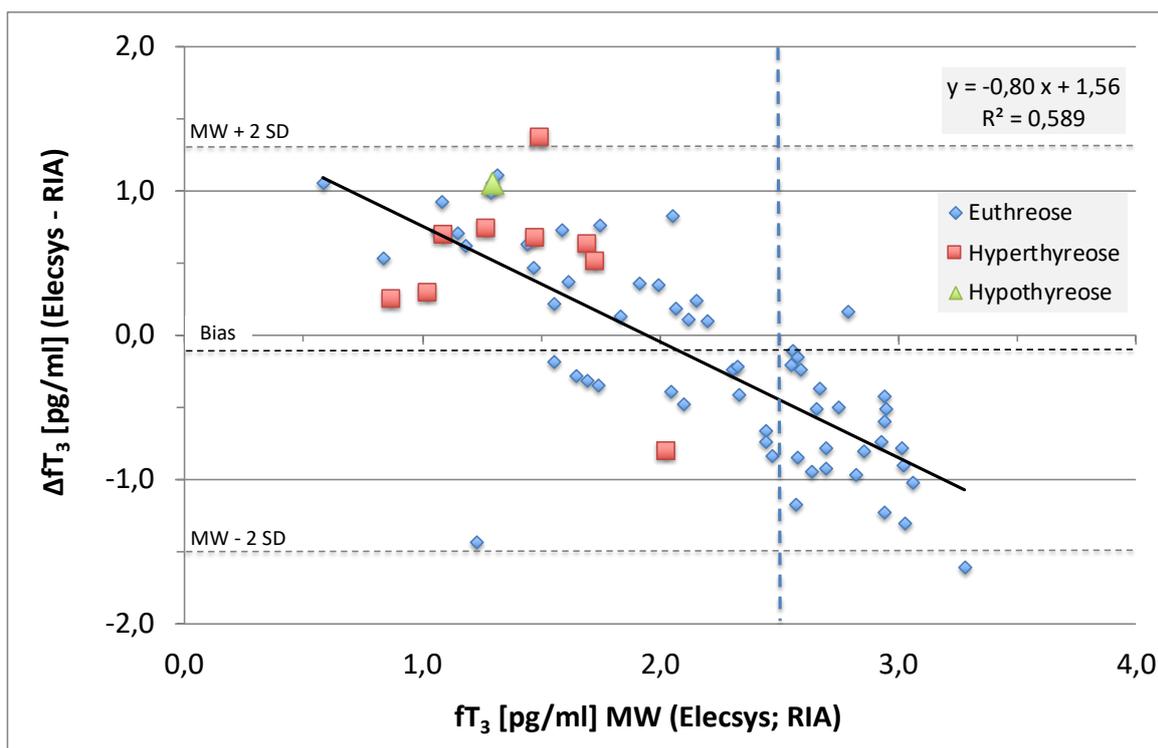


Abbildung 10: Bland-Altman-Plot. fT_3 (pg/ml) mit Elecsys bzw. RIA gemessen nach dem Auftauen von Seren mit primär hypothyreoten fT_3 -Werten ohne klinisches Korrelat.

Die Werte gemessen mit der RIA unterscheiden sich von den Ergebnissen der Elecsys-Messung mit einer mittleren Abweichung (Bias) von $-0,10$ pg/ml. 95% der Differenzen zwischen RIA- und Elecsys-Messung liegen in einem Intervall von $-1,50$ pg/ml und $1,31$ pg/ml, was klinisch nicht akzeptabel ist. Dieses breite Intervall beruht wesentlich auf einem konzentrationsabhängigen und daher vermutlich systematischen Unterschied beider Messverfahren bei den primär fT_3 -hypothyreoten Seren. Die Mehrzahl der Patienten hatte weder klinische Befunde noch TSH-Spiegel, die auf eine Hypothyreose hinwiesen (siehe Farbkodierung). Bei sehr guter Korrelation zwischen beiden Messverfahren ($r = 0,735$, $p < 0,0001$) misst das Elecsys-Verfahren im hypothyreoten Bereich bei fT_3 -Werten $< 2,0$ pg/ml höhere Werte als das RIA-Verfahren und im normothyreoten Bereich bei fT_3 -Werten $> 2,5$ pg/ml niedrigere Werte (Koeffizient: $-0,80$ [$-0,64$ bis $-0,97$]; $p < 0,001$). Die vertikale gestrichelte Linie zeigt die untere Grenze des Referenzwertes für fT_3 an. MW = Mittelwert. SD = Standardabweichung

Der RIA misst niedrigere Werte für fT_3 als die Elecsys bei Werten $< 2,0$ pg/ml und verstärkt damit die Diskrepanz zwischen klinischem Befund einer Normothyreose und dem laborchemischen Ergebnis, das den Verdacht auf eine Hypothyreose lenkt. (Abbildung 10).

Entsprechend unserer Hypothese wurde daher vor der RIA-Messung die Gleichgewichtsdialyse durchgeführt und aus den fT_3 -Konzentrationen in der Dialysatkammer die fT_3 -Serumwerte

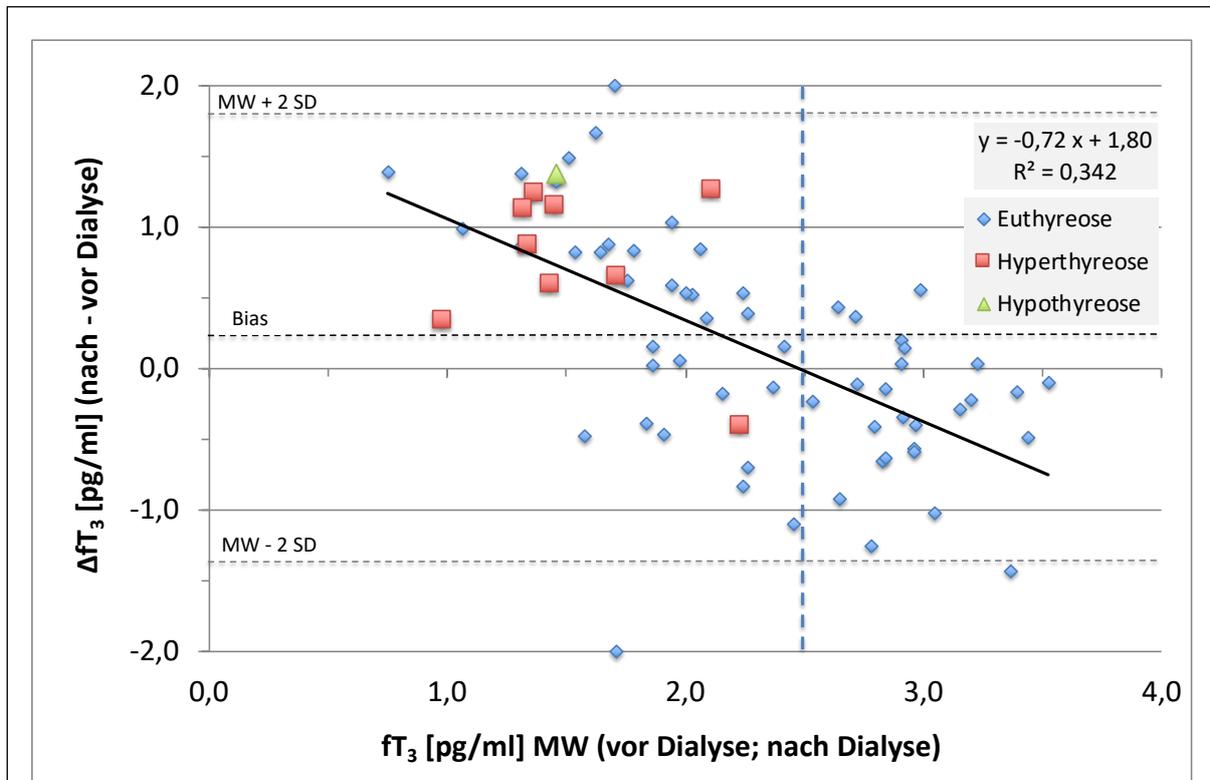


Abbildung 11: Bland-Altman-Plot. fT_3 in dem aufgetauten Serum mit RIA nach und vor Gleichgewichtsdialyse gemessen in Seren mit primär hypothyreoten fT_3 -Werten ohne klinisches Korrelat.

Die Werte gemessen nach der Gleichgewichtsdialyse unterscheiden sich von den Ergebnissen vor Gleichgewichtsdialyse mit einer mittleren Abweichung (Bias) von 0,20 pg/ml. 95% der Differenzen zwischen den beiden RIA-Messungen vor und nach Gleichgewichtsdialyse liegen in einem Intervall von -1,39 pg/ml und 1,78 pg/ml. Die höheren Werte insbesondere im hypothyreoten Bereich waren gewünscht und als Folge der Gleichgewichtsdialyse erwartet worden, ebenso wie das breite Intervall. Die konzentrationsabhängig höheren fT_3 -Werte im hypothyreoten Bereich sind jedoch bei höheren fT_3 -Werten wieder niedriger ($r = 0,735$; Koeffizient -0,74 [-0,96 bis -0,51]; $p < 0,0001$). Der Effekt der Gleichgewichtsdialyse reicht insgesamt nicht aus, die fT_3 -Werte der klinisch hyperthyreoten und euthyreoten Patienten mehrheitlich wenigstens in dem euthyreoten Bereich zu messen (siehe Farbkodierung). Die vertikale gestrichelte Linie zeigt die untere Grenze des Normalwertes für fT_3 an. MW = Mittelwert. SD = Standardabweichung.

errechnet. Wie erwartet erhöht die Gleichgewichtsdialyse die besonders niedrigen fT_3 -Werte. Die Erhöhung reicht jedoch nicht aus, die fT_3 -Werte im Referenzbereich zu messen, was angesichts der normalen TSH-Spiegel zu erwarten wäre (Abbildung 11). Insbesondere sind die fT_3 -Werte der Patienten mit supprimierten TSH-Werten also dem Hinweis auf eine Hyperthyreose sowohl vor als auch nach Dialyse unterhalb des Normalwertes.

Der maßgebliche Vergleich ist der zwischen dem klinischen Standardverfahren mit Elecsys und dem aufwändigen Verfahren mit Gleichgewichtsdialyse und nachfolgendem RIA. Es interessiert dabei erneut insbesondere, ob die besonders auffälligen fT_3 -hypothyreoten Seren bei TSH-Spiegeln, die eher auf eine normo- bis hyperthyreote Stoffwechsellage hinweisen, wenigstens nicht mehr im hypothyreoten Bereich gemessen werden. Die fT_3 -Werte gemessen mit RIA nach Dialyse unterscheiden sich nicht von den fT_3 -Werten gemessen mit dem Elecsys-Verfahren. Bestehen bleibt mit beiden Verfahren jedoch die gemessen an den TSH-Werten niedrigen Werte des fT_3 , insbesondere auch bei den Patienten mit supprimierten TSH-Spiegeln, die eher erhöhte fT_3 -Werte erwarten ließen (Abbildung 12).

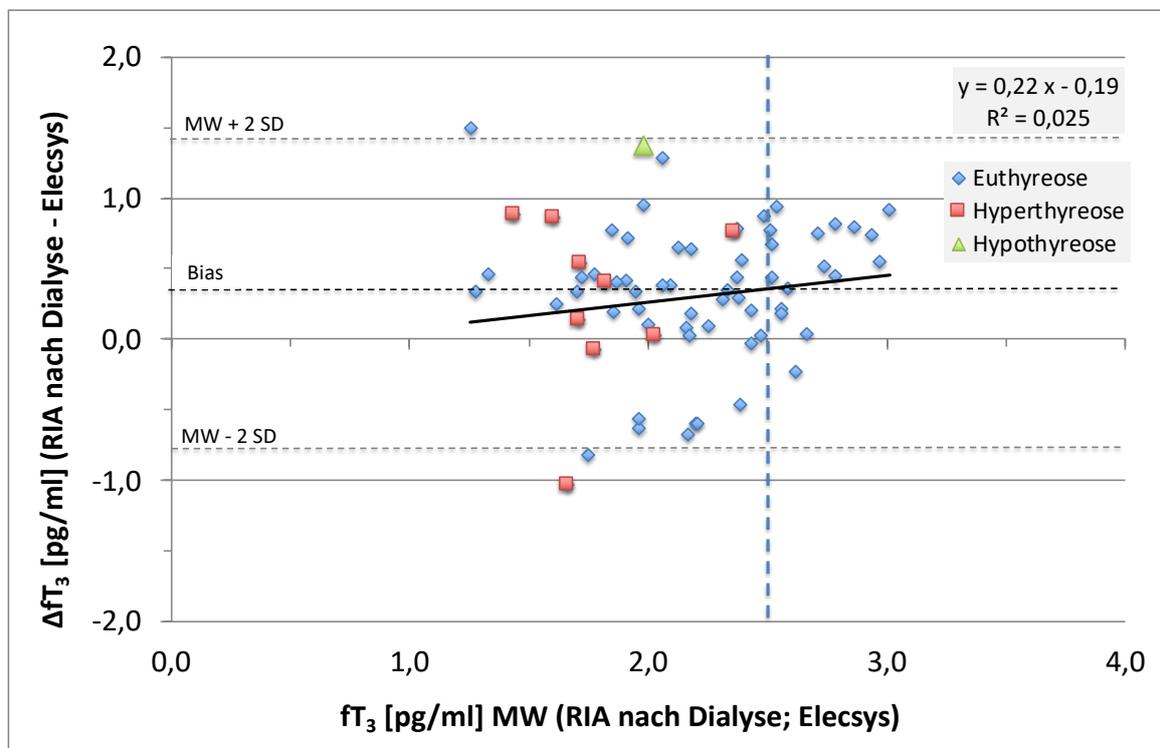


Abbildung 12: Bland-Altman-Plot. fT_3 nach Dialyse mit RIA und mit Elecsys gemessen in den aufgetauten Seren mit primär hypothyreoten fT_3 -Werten ohne klinisches Korrelat.

Die Werte gemessen mit dem RIA nach der Gleichgewichtsdialyse sind im Mittel um 0,29 pg/ml größer als die mit dem Elecsys-Verfahren gemessenen (Bias). 95% der Differenzen beider Methoden liegen in einem Intervall von -0,82 pg/ml und 1,41 pg/ml. Allerdings gibt es keinen weiteren signifikanten Trend die „falsch“ hypothyreoten fT_3 -Werte höher zu messen, sondern eher eine Tendenz zu weniger erhöhten Werten ($r = 0,140$; Koeffizient 0,19 [-0,14 bis 0,52]; $p = 0,3$). Der Effekt der Gleichgewichtsdialyse reicht also nicht aus, die mit dem Elecsys-Verfahren hypothyreot gemessenen fT_3 -Werte der klinische hyperthyreoten und euthyreoten Patienten wenigstens in dem euthyreoten Bereich zu messen (siehe Farbkodierung). Die vertikale gestrichelte Linie zeigt die untere Grenze des Normalwertes für fT_3 an. MW = Mittelwert. SD = Standardabweichung.

4.5 Explorative Analyse möglicher Einflussfaktoren

Da die offensichtliche Diskrepanz zwischen klinischem Befund und TSH-Spiegeln mit starken Hinweisen auf eine euthyreote Stoffwechsellage und den fT_3 -Werten, die

verfahrensunabhängig hypothyreot waren oder im unteren Grenzbereich hin zur Hypothyreose lagen, durch laborchemische Ansätze nicht aufgelöst werden konnte, wurde nach möglichen klinischen Faktoren gesucht, die mit den fT_3 -Werten korreliert sein könnten. Dazu wurden mit den klinischen Faktoren, die in den Kapiteln 4.2 und 4.3 dargestellt sind, lineare Regressionen berechnet, wobei die klinischen Faktoren schrittweise in das Modell zur Voraussage der fT_3 -Werte des Elecsys-Verfahrens eingeschlossen wurden (Tabelle 9). Danach besteht ein Zusammenhang zwischen „falsch“ niedrigen fT_3 -Werten und der Behandlung mit Heparin sowie dem Vorliegen einer fortgeschrittenen Leberzirrhose. Bei dem schrittweisen Ausschluss wurde das Ergebnis errechnet. Die Aufnahme der nicht eingeschlossenen Variablen mit $p < 0,2$ haben in keinem Fall das Modell verbessert.

Tabelle 9: Explorative Analysen zur Identifikation möglicher Einflussfaktoren der „falsch“ hypothyreoten fT_3 -Werte (Elecsys-Verfahren)

Ausgeschlossene Faktoren	Koeffizient	p-Wert
Gewicht [kg]	0,013	0,9
Nierenversagen	-0,027	0,9
Morbus Basedow	-0,04	0,8
NYHA	-0,044	0,8
Autoantikörper	-0,051	0,7
Dialyse	-0,069	0,7
Diabetes	0,071	0,6
Infektion	-0,078	0,6
Enzephalopathie	0,118	0,6
Aszites	-0,123	0,5
Akute respiratorische Insuffizienz	-0,12	0,5
Schwangerschaft	0,122	0,4
Struma	0,132	0,4
SD-Status nach TSH	-0,153	0,3
SD-Hormontherapie	0,161	0,3
Geschlecht [weiblich]	-0,205	0,1
Alter [Jahre]	-0,21	0,1
Signifikante Faktoren	Koeffizient [95% CI]	p-Wert
Heparin	-0,407 [-0,73 bis -0,09]	0,013
Child Pugh Score	-0,118 [-0,23 bis -0,01]	0,036

5 Diskussion

In dieser prospektiven experimentellen Studie wurde geprüft, ob die niedrigen fT_3 -Spiegel bei Seren von klinisch euthyreoten Patienten laborchemische Fehlmessungen sind. Die Annahme, dass diese Fehlmessungen im Serum der betroffenen Patienten begründet sind, konnte nur teilweise bestätigt werden. Deutlich erniedrigte fT_3 -Werte gemessen mit einem RIA (< 1 pg/ml) wurden nach der zusätzlichen Durchführung einer Gleichgewichtsdialyse zwar höher gemessen, jedoch in den allermeisten Fällen noch immer im laborchemisch hypothyreoten Bereich ($< 2,5$ pg/ml). Damit unterschieden sich die im RIA gemessenen Werte nach Dialyse nicht von den Werten, die mit dem Elecsys-Verfahren gemessen wurden. Weder das aufwändige Verfahren mit Gleichgewichtsdialyse und RIA noch das derzeitige Standardverfahren mit Elecsys sind daher geeignet, die niedrigen fT_3 -Werte bei Patienten ohne klinische Zeichen einer Hypothyreose und normalen bis erniedrigten TSH-Werten zu erklären.

In einem explorativen Ansatz fand sich dagegen ein Zusammenhang zwischen niedrigen fT_3 -Werten und einer fortgeschrittenen Leberzirrhose (Child-Pugh-Score) sowie der Tatsache einer Heparintherapie. Diese Beobachtungen kann am ehesten im Zusammenhang stehen mit dem bekannten Euthyroid-Sick-Syndrom.

5.1 Limitierende Faktoren der gesamten laborchemischen Untersuchung

Bereits bei der vorbereitenden Präanalytik wurde deutlich, dass für die Durchführung der Gleichgewichtsdialyse mit anschließendem RIA viel Patientenmaterial, also Serum benötigt wird. Pro Messung 800 μ l Patientenserum und zusätzlich 800 μ l eines Nullserums. Im Vergleich hierzu wird bei der Messung mittels Elecsys nur 15 μ l Serum benötigt und es können gleichzeitig noch weitere Parameter gemessen werden, zum Beispiel TSH und fT_4 . Das würde also bedeuten, dass man für das wesentlich zeitaufwendigere Verfahren mit der Gleichgewichtsdialyse zusätzlich mehr Probenmaterial gewinnen müsste. Leider war es auch in unserem Patientenkollektiv teils schwierig mit genug Probenmaterial in die Untersuchungen zu starten. Daher konnten auch viele der ausgewählten Patienten nicht eingeschlossen werden. Das hat wiederum zur Konsequenz, dass das untersuchte Kollektiv mit 70 von 258 gescreenten Patienten sehr klein war. Damit steigt das Risiko eines Selektionsbias und schränkt zusätzlich die Aussagekraft unserer Untersuchung nicht unwesentlich ein.

Vor der Analyse der Patientenserum wurde das „Nullserum“ der Firma Roche Diagnostics GmbH, Deutschland, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentration von fT_3 mit der RIA-Messung bei etwa 1,083 pg/ml lag. Für die Analyse der Patientenserum haben wir eine weitere Charge eines „Nullserums“ benötigt, dessen fT_3 -Konzentration bei 0,974 pg/ml lag. Sehr viel wichtiger als diese sehr gute Übereinstimmung der fT_3 -Spiegel ist für die Gleichgewichtsdialyse, dass die Proteinzusammensetzung der „Nullserum“ identisch ist. Da wie bereits unter 1.2.2.2 beschrieben veränderte Konzentrationen von Transportproteinen, wie vor allem das TBG und TBPA, die Konzentration von T_3 und T_4 beeinflussen, wäre es bezüglich der Gleichgewichtsdialyse wichtig gewesen, deren Konzentrationen im „Nullserum“ zu überprüfen. Zu Beginn der Untersuchungen haben wir diese Notwendigkeit nicht gesehen und uns auf die Angaben des Herstellers des Nullserums verlassen.

Noch bedeutsamer ist jedoch, dass das Volumen der Patientenserum weder für die Bestimmung der Transportproteine TBG und/oder TBPA noch für die Bestimmung von rT_3 ausreichen. Daher können mit den Ergebnissen der Analysen zwar Aussagen zur Bedeutung der Analysetechniken für das Euthyroid-Sick-Syndrom gemacht werden, jedoch nicht zu möglichen anderen Ursachen, wie eine veränderte Bindungskapazität oder eine veränderte intrazelluläre Dejodierung des T_4 zu rT_3 , im Sinne des klassischen Low- T_3 -Syndroms.

5.2 Euthyroid-Sick-Syndrom

Nicht zu vernachlässigen bei der Analyse unseres Patientenkollektivs ist die Beurteilung der laborchemischen Auffälligkeiten bezüglich eines Euthyroid-Sick-Syndrom, auch bekannt als Non-thyroidal illness syndrome oder auch Low- T_3 -Syndrom.

Bei dem Euthyroid-Sick-Syndrom, handelt es sich um eine Gesamt- T_3 -Erniedrigung bei Patienten, welche sich in einem schweren Krankheitszustand oder sogar in einer Behandlung auf einer Intensivstation befinden. Laborchemisch weisen diese Patienten neben niedrigen T_3 Werten auch niedrige fT_3 Werte auf, neben meistens normalen T_4 und TSH-Werten (Lee, YJ et al. 2018; Akbas, T, Sahin, IE, and Ozturk, A 2018; Gutch, M, Kumar, S, and Gupta, KK 2018). Das Euthyroid-Sick-Syndrom wird in 4 Gruppen eingeteilt, jedoch die häufigste laborchemische Abweichung ist bezüglich des Gesamt- T_3 zu verzeichnen. Es betrifft nahezu 70% der hospitalisierten Patienten. Zu Krankheitsbildern die zu einem Euthyroid-Sick-

Syndrom führen können, zählen Sepsis, Pneumonie, Stress, Traumata, kardiopulmonale Entgleisungen, Myokardinfarkte, große chirurgische Eingriffe, Nierenversagen oder auch eine diabetische Ketoazidose (El-Ella, SSA, El-Mekkawy, MS, and El-Dihemey, MA 2018). Auch unser Patientenkollektiv wies eine große Anzahl an schwerstens erkrankten Patienten auf.

Bezüglich der Pathogenese gibt es mehrere Erklärungsansätze. Einer davon ist, dass aufgrund der Anwesenheit eines Inhibitors gegen Thyroxin-bindende-Proteine (TBG, TBPA, Albumin) im Blut Schilddrüsenhormone nicht mehr an Transportproteine gebunden werden und somit auch nicht in den extrathyroidalen Raum gelangen können. Eine andere Erklärung für ein Euthyroid-Sick-Syndrom bieten Zytokine. Die regulatorischen Proteine dienen der Signalübertragung zwischen Zellen. In diesem Fall beeinflussen Interleukin 1, Interleukin 6, der Tumornekrose Faktor alpha und Interferon beta den Hypothalamus und die Hypophyse, und hemmen damit die Produktion und Ausschüttung von TSH, TRH, Thyreoglobulin, T₃, und TBG, TBPA. Damit wird der neuroendokrine Regelkreis gestört, welcher sich ansonsten durch verstärkende oder hemmende Rückkopplung selbst reguliert. Außerdem wird die Deiodinase Typ 1 durch Zytokine gehemmt, womit weniger T₃ durch periphere Dejodierung entsteht. Ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Deiodinasen, insbesondere wieder vom Typ I, haben hohe Cortison-Spiegel im Blut und Steroidtherapien. Aber auch kardiovaskuläre Behandlungen mit Amiodaron und Propranolol zeigen ähnliche Effekte (Ganesan, K and Wadud, K 2018).

Insgesamt anfälliger für ein Euthyroid-Sick-Syndrom scheinen Patienten zu sein, die anamnestisch eine Schilddrüsenerkrankung jeglicher Art aufweisen. Zudem kann ein aktives Euthyroid-Sick-Syndrom die typischen Symptome einer Hypo- oder Hyperthyreose verschleiern. Auch in unserem Patientenkollektiv waren einige Patienten mit einer Schilddrüsenerkrankung, teils auch unter Therapie, zum Beispiel L-Thyroxin.

Die Behandlung eines Euthyroid-Sick-Syndroms besteht vorrangig in der Therapie des primären, akuten Krankheitsbildes, welches das Syndrom ausgelöst hat, manchmal mit intensivmedizinischer Betreuung. Eine Schilddrüsenhormon Substitution ist nicht erforderlich, da sich im besseren Allgemeinzustand die Schilddrüsenfunktion nach ein paar Wochen wieder von selbst reguliert (Ganesan, K and Wadud, K 2018).

Die explorative Analyse unserer 70 Patienten mit niedrigem fT_3 bei sonst fehlenden Zeichen einer Hypothyreose zeigte einen engen Zusammenhang mit einer Heparin-Antikoagulation und mit dem Ausmaß der Leberzirrhose eingeteilt nach Child-Pugh. Die Tatsache, dass ein Patient unter einer Heparin-Antikoagulation stand, war mit einem um 0,4 pg/ml signifikant verminderten fT_3 -Wert korreliert, jeder Child-Pugh-Scoring-Punkt mit 0,12 pg/ml, also bei den krankesten Patienten mit einem Child-Pugh-Score von 12 und gleichzeitiger Heparin-Prophylaxe um $1,4 \text{ pg/ml} + 0,4 \text{ pg/ml} = 1,8 \text{ pg/ml}$.

Tabelle 10: Child-Pugh-Score. Der Child-Pugh-Score kann Werte von 5 -15 annehmen, wobei Child A mit 5-6 Score-Punkten, Child B mit 7-9 Score-Punkte und Child C mit 10-15 Score-Punkten in der klinischen Literatur definiert ist.

Kriterien	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Serum-Bilirubin	< 2,0 mg/dl	2,0 – 3,0 mg/dl	> 3,0 mg/dl
Serum-Albumin	> 3,5 g/dl	2,8 – 3,5 mg/dl	< 2,8 g/dl
INR	< 1,7	1,7 - 2,2	> 2,2
Aszites	keiner	leicht	mittelgradig
hepatische Enzephalopathie	keine	Stadium I–II	Stadium III–IV

Der Zusammenhang zwischen Schweregrad der Leberzirrhose und niedrigen fT_3 -Werten war eindeutiger als die geringfügige Erhöhung der fT_3 -Werte durch das Gleichgewichtsdialyseverfahren. Damit legt diese explorative Analyse nahe, zukünftige Forschung eher auf die Begleiterkrankungen im Zuge eines Euthyroid-Sick-Syndroms zu fokussieren als auf weitere laborchemische Ansätze um solche Wertekonstellationen zu erklären.

Die Erniedrigung der fT_3 -Spiegel bei Patienten mit Heparin-Prophylaxe steht sogar im Widerspruch zur bekannten Erhöhung der freien Anteile beider Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 durch Heparin (Stockigt, JR and Lim, CF 2009). Dieser Zusammenhang wurde mit der Heparin-induzierten Aktivierung der Lipoprotein-Lipasen erklärt, die ihrerseits die

Konzentration nichtveresterter Fettsäuren erhöhen (Stockigt, JR and Lim, CF 2009). Die freien Fettsäuren binden an die gleichen Bindungsproteine wie die Schilddrüsenhormone und erhöhen damit deren ungebundene also freie Konzentration in-vitro (Stockigt, JR and Lim, CF 2009). Offensichtlich überwiegt aber auch hier der Effekt der „Critical Illness“ und die damit verbundenen Effektoren für ein „Euthyroid-Sick-Syndrom“ die Effekte einer veränderten Proteinbindung deutlich bzw. kehren sie im Fall der Heparin-Prophylaxe sogar um. Die Heparin-Prophylaxe wird in unserem Patientengut ausschließlich bei den schwer erkrankten Patienten obligatorisch durchgeführt, da alle anderen aktiv mobilisiert werden.

5.3 Komplexität und Problematik der Gleichgewichtsdialyse

Bei der experimentellen Arbeit wurden einige Faktoren deutlich, die nicht nur den Aufwand der Durchführung der Gleichgewichtsdialyse, sondern auch Probleme und Schwierigkeiten des Verfahrens aufzeigen. Leider ergibt sich nämlich aus dieser Kombination eine hohe Stör- und Fehleranfälligkeit.

Es beginnt beim mechanischen Aufbau des Verfahrens. Bereits bei der Hydratisierung der Membranen können folgenschwere Verletzungen in dem sensiblen Material entstehen, durch feine Berührungen mit der Pinzette. Mit dieser wird die Membran im nassen Zustand zwischen die Zelleinheiten positioniert. Durch so entstandene Risse in der Membran können Fehlmessungen entstehen. Ein sauberes und prägnantes Arbeiten beim Befüllen der Zelleinheiten und Aufbau des Dialysestativs ist entscheidend. Danach muss immer eine physiologische Wassertemperatur von 37°C gewährleistet werden, sowie eine stetige Bewegung in dem Halteapparat in angemessener Geschwindigkeit. Sobald die imitierten physiologischen Zustände sich verändern bei Abweichungen des Ablaufs, zum Beispiel in Bezug auf die Temperatur oder Geschwindigkeit, kann es zu pH-Abweichungen kommen. Auch diese können zu verfälschten Messergebnissen führen (Kochansky, CJ et al. 2008). Zusätzlich ist entscheiden welchen Fettgehalt das Serum hat, da bei einem zu lipämischen Material die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen den beiden Kammern beeinflusst wird und damit kein zuverlässiges Messergebnis garantiert werden kann (Oravcova, J, Bohs, B, and Lindner, W 1996).

Ebenfalls ist entscheidend, dass die Zeit von 24 h bis zur Gleichgewichtseinstellung bei der Dialyse eingehalten wird. Auch hier darf es zu keinen Abweichungen kommen um die Messergebnisse nicht zu verfälschen. Damit erscheint bei einer 24 h dauernden Dialysezeit ein routinemäßiger Einsatz von diesem Verfahren als nicht sehr praktikabel (Albert, C 2009).

5.4 Schlussfolgerung

Das Problem „falsch niedrig“ gemessener fT_3 -Werte im Blut beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf einem Messproblem der laborchemischen Methoden, sondern beruht vermutlich auf der nicht identischen Hormon- und Rezeptorkomposition von intra- und extrazellulärem Kompartiment. Die untersuchten „Problemseren“ konnten keine Hinweise darauf liefern, dass pathologische Bindungsproteine für die Diskrepanz zwischen fT_3 -Werten und klinischer Normothyreose aber auch normalen TSH-Spiegeln bei diesen oft schwer kranken Patienten eine Erklärung liefern könnten. Vielmehr konnten explorativ eingesetzte Regressionsanalysen den bekannten Zusammenhang zwischen schwerer Krankheit und Euthyroid-Sick-Syndrom bestätigen.

Nicht zuletzt wegen der deutlich zeitaufwendigeren Hormonkonzentrationsbestimmung ist die Gleichgewichtsdialyse mit anschließendem Radioimmunoassay dem Routinemessverfahren mit dem Elecsys von Roche Diagnostics unterlegen. Die Messdauer beträgt mehr als 24 h und ist damit nicht in den klinischen Alltag integrierbar.

6 Kurzfassungen

6.1 Zusammenfassung

6.1.1 Hintergrund und Fragestellung

Bei der quantitativen Messung von freien Schilddrüsenhormonen werden in der klinischen Routine Immunoassay-Systeme verwendet. Dabei handelt es sich um Abschätzungsmethoden. Ihre Validität wird vor allem von den Bindungsproteinen im Serum beeinflusst. Bei den in der Arbeit untersuchten Patienten war bei der Untersuchung ein klinischer Befund einer Euthyreose bei laborchemisch zu niedrigen fT_3 -Werten auffällig. Um die oben genannte Beeinflussungen in einem Einschnitt-Analogverfahren, wie dem routinemäßig benutzten Elecsys Elektrochemilumineszenz Verfahren zu verifizieren, wurde ein Referenzverfahren zur Messung von freien Hormonkonzentrationen im Serum eingesetzt. Dieses Referenzverfahren ist die Gleichgewichtsdialyse mit einer anschließenden fT_3 Konzentrationsmessung. Es wurden beide Verfahren durchgeführt und deren Übereinstimmung analysiert.

6.1.2 Methoden

Es wurden 70 Patientenserum in die Arbeit eingeschlossen, die ohne klinische Zeichen einer Hypothyreose und mit normalen TSH-Werten ($1,6 \pm 1,2$ IU/ml) zu niedrige fT_3 -Spiegel ($1,97 \pm 0,41$ pg/ml) hatten. Da es sich um einen Vergleich verschiedener Messmethoden handelt, wurden alle Seren auf ihr fT_3 Konzentration im Routinelabor mit einem Einschnitt-Elektrochemilumineszenz-Immunoassay untersucht (Elecsys Immunoassay von Roche Diagnostics). Zusätzlich wurde nach einer 24 h Gleichgewichtsdialyse die Konzentration mittels einem klassischen Radioimmunoassay (RIA) gemessen.

6.1.3 Ergebnisse

Die Annahme, dass verfahrensabhängige Fehlmessungen im Serum der betroffenen Patienten die Diskrepanz zwischen klinischem Befund einer Euthyreose und der laborchemischen Hypothyreose erklären, konnte nur teilweise bestätigt werden. Deutlich erniedrigte fT_3 -Werte gemessen mit dem RIA (< 1 pg/ml) wurden nach der zusätzlichen Durchführung einer Gleichgewichtsdialyse zwar höher gemessen, jedoch in den allermeisten Fällen noch immer im

laborchemisch hypothyreoten Bereich ($< 2,5$ pg/ml). Damit unterschieden sich die im RIA gemessenen Werte nach Dialyse nicht von den Werten, die mit dem Elecsys-Verfahren gemessen wurden. Die Werte gemessen mit dem RIA nach der Gleichgewichtsdialyse sind im Mittel um $0,29$ pg/ml größer als die mit dem Elecsys-Verfahren gemessenen. 95% der Differenzen beider Methoden liegen in einem Intervall von $-0,82$ pg/ml und $1,41$ pg/ml. Weder das aufwändige Verfahren mit Gleichgewichtsdialyse und RIA noch das derzeitige Standardverfahren mit Elecsys sind daher geeignet, die niedrigen fT_3 -Werte bei Patienten ohne klinische Zeichen einer Hypothyreose und normalen bis erniedrigten TSH-Werten zu erklären.

6.1.4 Schlussfolgerung

Die untersuchten Patientenserien lieferten keine Hinweise darauf, dass pathologische Bindungsproteine für die Diskrepanz zwischen fT_3 -Werten und klinischer Normothyreose bei diesen oft schwer kranken Patienten eine Erklärung liefern könnten. Es konnte allerdings durch Regressionsanalysen der bekannte Zusammenhang zwischen schwerer Krankheit und einem Euthyroid-Sick-Syndrom bestätigt werden. Daher stellt das hier verglichene Messverfahren mit zusätzlicher Gleichgewichtsdialyse keine Alternative zum Einschritt-Elektrochemilumineszenz-Immunoassay dar. Die Messdauer beträgt mehr als 24 h und ist damit zudem nicht in den klinischen Alltag integrierbar.

6.2 Abstract

6.2.1 Background and Purpose

For a quantitative measurement of the free thyroid hormones classic Immunoassay methods are used in the clinical daily routine. Though it's about an estimation method. A huge impact on its validity cause particularly the binding proteins in the serum. The analyzed patients of this work showed a mismatch between the clinical euthyroid findings during examination and the laboratory test, which showed low fT_3 concentrations. To verify the aforementioned influence of the binding proteins in a one-step-Immunoassay, like in the routinely used Elecsys Electrochemiluminescence-Immunoassay, a reference method to measure the free thyroid hormones in serum was assembled. This reference method is the equilibrium dialysis with a following concentrations measurement of fT_3 . Both methods were performed and the congruence of the methods was analyzed.

6.2.2 Methods

In this work 70 samples were included. All samples had no clinical signs of hypothyroidism and normal TSH values ($1,6 \pm 1,2$ IU/ml) with a low fT_3 level ($1,97 \pm 0,41$ pg/ml). Because it's a comparison of different measurement methods all samples were analyzed regarding to their fT_3 concentration with the routinely Elecsys Immunoassay by Roche Diagnostics. A one-step-Electrochemiluminenscence-Immunoassay. Furthermore a 24 h equilibrium dialysis was performed with a following concentrations measurement by a classic Radioimmunoassay.

6.2.3 Results

The assumption that incorrect measurements of the samples depending on process could explain the discrepancy between the clinical findings of an euthyroidism and the laboratory hypothyroidism was only partly confirmed. Obviously to low fT_3 values measured with RIA (< 1 pg/ml) showed higher concentrations after the equilibrium dialysis was additionally performed, but in most cases the concentrations were still in an laboratory hypothyroid range ($< 2,5$ pg/ml). Thereby the concentrations measured with RIA after equilibrium dialysis do not

differ from measurements by the routinely Elecsys Immunoassay. But the fT_3 concentrations measured with RIA after equilibrium dialysis are on average 0,29 pg/ml higher than with Elecsys Immunoassay. 95% of the differences between both methods range in the interval of -0,82 pg/ml to 1,41 pg/ml. Neither the elaborate RIA with additional previous equilibrium dialysis nor the current routinely procedure by the Elecsys are appropriate to explain the low fT_3 concentrations in patients with no signs of hypothyroidism and normal to low TSH values.

6.2.4 Conclusion

The analyzed blood samples gave no evidence that any pathological bindings proteins could be the reason for the discrepancy between the low fT_3 concentrations and the clinical euthyroid status in these often critically ill patients. But by using regression analysis a correlation between severe disease and the Euthyroid-Sick-Syndrome could be approved. In conclusion the compared measurement method is no favoured alternative to the routinely procedure by the Elecsys. At least because of the measuring period of more than 24 h, which is not capable of being integrated into the clinical daily routine.

7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neuroendokriner Regelkreis mit negativer Rückkopplung	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schilddrüsenfollikel (Gray, H 1918).....	8
Abbildung 3: Schilddrüsenhormonsynthese	10
Abbildung 4: Regelkreis der Schilddrüsenhormone	11
Abbildung 5: Kompetitives Bindungsprinzip	23
Abbildung 6: Teile einer Zelleinheit.....	25
Abbildung 7: Dialyse-Stativ mit zwei Trägerapparaturen (The Nest Group, I)	26
Abbildung 8: STROBE-Diagramm.....	30
Abbildung 9: Bland-Altman-Plot. fT_3 (pg/ml) mit Elecsys vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen gemessen.	37
Abbildung 10: Bland-Altman-Plot. fT_3 (pg/ml) mit Elecsys bzw. RIA gemessen nach dem Auftauen von Seren mit primär hypothyreoten fT_3 -Werten ohne klinisches Korrelat. ...	38
Abbildung 11: Bland-Altman-Plot. fT_3 in dem aufgetauten Serum mit RIA nach und vor Gleichgewichtsdialyse gemessen in Seren mit primär hypothyreoten fT_3 -Werten ohne klinisches Korrelat.	39
Abbildung 12: Bland-Altman-Plot. fT_3 nach Dialyse mit RIA und mit Elecsys gemessen in den aufgetauten Seren mit primär hypothyreoten fT_3 -Werten ohne klinisches Korrelat.	41

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biometrische Daten.....	31
Tabelle 2: Schilddrüsenstatus	32
Tabelle 3: Nierenerkrankungen.....	33
Tabelle 4: Lebererkrankungen	34
Tabelle 5: Lungenerkrankungen	34
Tabelle 6: Herzerkrankungen.....	35
Tabelle 7: Weitere Diagnosen.....	35
Tabelle 8: fT ₃ -Analysen mit unterschiedlichen Techniken und deren Differenzen	36
Tabelle 9: Explorative Analysen zur Identifikation möglicher Einflussfaktoren der „falsch“ hypothyreoten fT ₃ -Werte (Elecsys-Verfahren)	43
Tabelle 10: Child-Pugh-Score. Der Child-Pugh-Score kann Werte von 5 -15 annehmen, wobei Child A mit 5-6 Score-Punkten, Child B mit 7-9 Score-Punkte und Child C mit 10-15 Score-Punkten in der klinischen Literatur definiert ist.	47

7.3 Literaturverzeichnis

Akbas, T, Sahin, IE, and Ozturk, A. 2018. 'Alterations in thyroid hormones in brain-dead patients are related to non-thyroidal illness syndrome', *Endokrynol Pol*, 69: 545-49.

Albert, C. 2009. 'Die kontinuierliche Ultrafiltration als Screeningtechnik zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen', Monographie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Berghold, S, and Horn, F. 2009. 'Schilddrüsenhormone.' in F. Horn (ed.), *Biochemie des Menschen* (Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York).

Bisswanger, H. 2006. 'Methoden zur Untersuchung von Ligandenbindungen: Gleichgewichtsdialyse', Accessed 09.08.2017.

Bruhn, HD, Mönig, H, Schäfer, H, Schambeck, CM, Sieg, I, and Fölsch, UR. 2008. 'Quantitative immunologische Analyseverfahren.' in Hans D. Bruhn, Ulrich R. Fölsch and Heiner Schäfer (eds.), *Labormedizin* (Schattauer: Stuttgart New York).

Chopra, IJ, Solomon, DH, Hepner, GW, and Morgenstein, AA. 1979. 'Misleadingly low free thyroxine index and usefulness of reverse triiodothyronine measurement in nonthyroidal illnesses', *Ann Intern Med*, 90: 905-12.

Chopra, IJ, Van Herle, AJ, Tecu, GN, and Nguyen, AH. 1980. 'Serum free thyroxine in thyroidal and nonthyroidal illnesses: a comparison of measurements by radioimmunoassay, equilibrium dialysis, and free thyroxine index', *J Clin Endocrinol Metab*, 51: 135-43.

Christofides, ND, Sheehan, CP, and Midgley, JE. 1992. 'One-step, labeled-antibody assay for measuring free thyroxin. I. Assay development and validation', *Clin Chem*, 38: 11-8.

Docter, R, van Toor, H, Krenning, EP, de Jong, M, and Hennemann, G. 1993. 'Free thyroxine assessed with three assays in sera of patients with nonthyroidal illness and of subjects with abnormal concentrations of thyroxine-binding proteins', *Clin Chem*, 39: 1668-74.

Ekins, R. 1990. 'Measurement of free hormones in blood', *Endocr Rev*, 11: 5-46.

Ekins, RP, Filetti, S, Kurtz, AB, and Dwyer, K. 1980. 'A simple general method for the assay of free hormones (and drugs); its application to the measurement of serum free thyroxine levels and the bearing of the results on the „free thyroxine“ concept.', *J Endocrinol*, 85: 29-30.

El-Ella, SSA, El-Mekkawy, MS, and El-Dihemey, MA. 2018. '[Prevalence and prognostic value of non-thyroidal illness syndrome among critically ill children]', *An Pediatr (Barc)*.

Ganesan, K, and Wadud, K. 2018. 'Euthyroid Sick Syndrome.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).

Ganslmeier, M, Castrop, C, Scheidhauer, K, Rondak, I-C, and Luppä, PB. 2014. 'Regional adjustment of the thyroid hormone reference intervals', *Journal of Laboratory Medicine - De Gruyter*, 38: 281-87.

Gray, H. 1918. *Anatomy of the human body* (Lea & Febiger: Philadelphia).

Gross, J, and Pitt-Rivers, R. 1952. 'The identification of 3:5:3'-L-triiodothyronine in human plasma', *Lancet*, 1: 439-41.

Gutch, M, Kumar, S, and Gupta, KK. 2018. 'Prognostic Value of Thyroid Profile in Critical Care Condition', *Indian J Endocrinol Metab*, 22: 387-91.

Herold, G. 2011. *Innere Medizin* (Unimedica im Narayana Verlag GmbH: Kandern).

Hollenberg, AN. 2016. 'The Endocrine Society Centennial: The Thyroid Leads the Way', *Endocrinology*, 157: 1-3.

Hu, L, and Xu, G. 2010. 'Applications and trends in electrochemiluminescence', *Chemical Society Reviews*, 39: 3275-304.

Kariv, I, Cao, H, and Oldenburg, KR. 2001. 'Development of a high throughput equilibrium dialysis method', *J Pharm Sci*, 90: 580-87.

Kochansky, CJ, McMasters, DR, Lu, P, Koeplinger, KA, Kerr, HH, Shou, M, and Korzekwa, KR. 2008. 'Impact of pH on plasma protein binding in equilibrium dialysis', *Mol Pharm*, 5: 438-48.

Lee, YJ, Lee, HY, Ahn, MB, Kim, SK, Cho, WK, Lee, JW, Chung, NG, Cho, B, and Suh, BK. 2018. 'Thyroid dysfunction in children with leukemia over the first year after hematopoietic stem cell transplantation', *J Pediatr Endocrinol Metab*, 31: 1241-47.

Liappis, N. 1985. '[Fluorescence polarization immunoassay, a new measuring technic in routine clinicochemical diagnosis of drug levels]', *Klin Padiatr*, 197: 302-4.

Midgley, JE. 2001. 'Direct and indirect free thyroxine assay methods: theory and practice', *Clin Chem*, 47: 1353-63.

Nelson, JC, and Weiss, RM. 1985. 'The effect of serum dilution on free thyroxine (T4) concentration in the low T4 syndrome of nonthyroidal illness', *J Clin Endocrinol Metab*, 61: 239-46.

Oppenheimer, JH. 1968. 'Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones', *N Engl J Med*, 278: 1153-62.

Oravcova, J, Bohs, B, and Lindner, W. 1996. 'Drug-protein binding sites. New trends in analytical and experimental methodology', *J Chromatogr B Biomed Appl*, 677: 1-28.

Robbins, J, and Rall, JE. 1957. 'The interaction of thyroid hormones and protein in biological fluids', *Recent Prog Horm Res*, 13: 161-202; discussion 02-8.

Ross, HA, and Benraad, TJ. 1992. 'Is free thyroxine accurately measurable at room temperature?', *Clin Chem*, 38: 880-6.

Saller, PPL-AHB. 1999. *Schilddrüsen-Krankheiten, Diagnose und Therapie* (Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH).

Schmidt, R, and Lang, F. 2007. *Physiologie de Menschen mit Pathophysiologie*.

Smith, J, and Osikowicz, G. 1993. 'Abbott AxSYM random and continuous access immunoassay system for improved workflow in the clinical laboratory', *Clin Chem*, 39: 2063-9.

Stockigt, JR, and Lim, CF. 2009. 'Medications that distort in vitro tests of thyroid function, with particular reference to estimates of serum free thyroxine', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 753-67.

Taylor, PN, Albrecht, D, Scholz, A, Gutierrez-Buey, G, Lazarus, JH, Dayan, CM, and Okosieme, OE. 2018. 'Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism', *Nat Rev Endocrinol*, 14: 301-16.

The Nest Group, I. 'Equilibrium Dialysis', Accessed 08.08.2017. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/NestGroup_EquilDial.pdf.

Thermo Scientific, BG, Henningsdorf. 'Arbeitsanleitung ft3 RIA'. Version R016de.

van der Sluijs Veer, G, Vermes, I, Bonte, HA, and Hoorn, RK. 1992. 'Temperature effects on free-thyroxine measurements: analytical and clinical consequences', *Clin Chem*, 38: 1327-31.

Wilkins, TA, Midgley, JE, Stevens, RA, Caughey, I, and Barron, N. 1986. 'Assay performance and tracer properties for two analog-based assays of free triiodothyronine', *Clin Chem*, 32: 465-9.

Zimmermann, MB. 2014. 'Iodbedarf und Risiken und Nutzen einer Korrektur des Iodmangels in Populationen', *Perspectives in Medicine*, 2: 56-67.

8 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Ruland, Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München, für die zur Verfügung gestellten Rahmenbedingungen und die Unterstützung innerhalb der Klinik bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Lupp, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München, für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung bei der Analyse der Proben, bei der Diskussion der Ergebnisse und schließlich für die kritische Durchsicht meiner Promotionsschrift.

Ganz herzlich danke ich, Anita Schreiegg für ihre Hilfe bei der Analyse der Proben. Die klinischen Zusammenhänge konnte ich nach Diskussion der Fälle mit Frau Dr. Claudia Castrop, Klinik für Nuklearmedizin der Technischen Universität München besser einschätzen. Dafür möchte ich mich bei ihr bedanken.