
**Magnetische Resonanzspektroskopie
an Blutplasma als diagnostische Methode
in der Nachsorge von Patienten
mit Schilddrüsenkarzinomen**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Klaus Raffelt

aus Köln

Copy Team

Köln

2001

Berichterstatter:

Professor Dr. Josef Hahn

Professor Dr. Harald Schicha

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 6. Juli 2001

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von September 1996 bis März 2001 im Institut für Anorganische Chemie der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Josef Hahn am Lehrstuhl von Herrn Professor Dr. Dieter Naumann durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Dieter Naumann danke ich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Harald Schicha und Herrn Dr. Detlef Moka danke ich für das Zustandekommen dieser interdisziplinären Arbeit und für die Beratung in medizinischen Fragestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Josef Hahn für seine ständige Diskussionsbereitschaft bei der Betreuung dieser Arbeit, für die Freiheit, die er mir gelassen hat und seine charakteristische Art, die Dinge voranzubringen.

allen geduldigen Menschen, die sich auf diese Arbeit gefreut haben:

meinen Eltern

meinen Kollegen

meinen Freunden

I	Einleitung und Aufgabenstellung	3
1	NMR-Spektroskopie in Biologie und Medizin	3
2	Aufgabenstellung	4
II	Praktischer Teil: NMR spektroskopische Untersuchungen von Blutplasma	6
3	³¹ P-NMR-Spektroskopie der Phospholipide	6
3.1	Aufbau und physikalische Phasen der Phospholipide	6
3.2	Quantifizierung im Blutplasma	14
3.2.1	Standardisierung	16
3.2.2	Signalauflösung und Zuordnung	22
3.2.3	Spektrenaufnahme und Signalintegration	25
3.2.4	Statistische Auswertung	28
3.3	Quantifizierung im Gewebe	32
4	¹ H-NMR-Spektroskopie der Lipide	34
4.1	Blutplasmaspektren	35
4.1.1	Standardisierung	38
4.1.2	Das Pulsprogramm NOESYPR1D	39
4.1.3	Quantitative Auswertung mit AMIX	41
5	Anwendung der NMR-Spektroskopie auf die Diagnostik bei Schilddrüsenerkrankungen	47
5.1	Schilddrüsenerkrankungen	47
5.1.1	Physiologie	47
5.1.2	Ergebnisse	50
5.1.3	Diskussion	56
5.2	Das Schilddrüsenkarzinom	58
5.2.1	Physiologie	58
5.2.2	Ergebnisse	61

5.2.2.1	^{31}P -NMR-spektroskopische Untersuchungen	61
5.2.2.2	^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen	67
5.2.3	Diskussion	83
6	Zusammenfassung	88
III	Anhang	93
7	Technische Details	93
7.1	Geräte	93
7.2	Auswertungssoftware	93
7.3	Chemikalien	94
IV	Literaturverzeichnis	95

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AQ	Aquisitionszeit: Zeit, während der der FID aufgenommen wird.
ATP	Adenosyltriphosphat
BPA	n-Butylphosphonsäure
CDP-Cholin	Cytidindiphosphatcholin
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidintriphosphat
CW	Continuous Wave
D1	Relaxationsdelay D1
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxiribonucleinsäure
D₂O	Deuteriumoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FID	Free Induction Decay
fol.	follikulär
ft3	freies Triiodothyronin im Blutserum
ft4	freies Thyroxin im Blutserum
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrarot (Spektroskopie)
LCAT	Lecithin:Cholesterol Acetyltransferase
LB	Line Broadening
LDL	Low Density Lipoprotein
LPC1	Lysophosphatidylcholin 1 (1-Acyl-sn-glycero-3-phosphocholin)
LPC2	Lysophosphatidylcholin 2 (2-Acyl-sn-glycero-3-phosphocholin)
M_α	Magnetisierung nach einem α-Puls
MAS	Magic Angle Spinning, Rotation um den magischen Winkel
M_{gl}	Magnetisierung im Gleichgewichtszustand
min.	minimal
MRI	Magnetic Resonance Imaging
M_z	z-Magnetisierung
n	Anzahl, z.B. Anzahl der Proben
Na₂EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Magnetische Kernresonanz
NOE	Nuclear Overhauser Effect, Kern-Overhauser-Effekt
n.s.	nicht signifikant
p	Wahrscheinlichkeitswert eines Testes
P1	Messpuls P1
pap.	papillär
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin

PET	Positronenemissionstomographie
P_i	anorganisches Phosphat
PI	Phosphatidylinositol
PLA₁	Phospholipase A ₁
PLA₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMG	Phosphonomethylglycin
PPi	Diphosphat
PS	Phosphatidylserin
r	Korrelationskoeffizient
σ	Standardabweichung
σ_x	Standardabweichung des Mittelwerts, Standardfehler
s²	Varianz
SD-Rest	Schilddrüsenrestgewebe
SI	Size, Zahl der Datenpunkte im prozessierten Spektrum
SM	Sphingomyelin
SW	Spektrbreite
T₁	Spin-Gitter-Relaxationszeit
T3	Triiodothyronin
T4	Thyroxin
TBG	Thyroxinbindendes Albumin, Protein im Blutplasma
TD	Time Domain
TMSP	Trimethylsilylpropionat
TG	Thyreoglobulin
t_R	Repetitionzeit
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
TSH	Thyrotropin, Thyroid Stimulating Hormone
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
\bar{x}	Mittelwert
$\sum x_i$	Summe über alle x-Werte

I Einleitung und Aufgabenstellung

1 NMR-Spektroskopie in Biologie und Medizin

Schon wenige Jahre nachdem Bloch¹ und Purcell² in ihren Arbeitsgruppen das erste Kernresonanzsignal nachgewiesen hatten, wurden Versuche unternommen, diese neue Technik auch in der Medizin zu nutzen. So hat eine schwedische Forschergruppe bereits im Jahr 1956 ¹H-NMR-Spektren von Erythrocyten³ und im Jahr 1957 von menschlicher Muttermilch bei 21 MHz aufgenommen.⁴

Seitdem haben sich die Techniken bei der NMR-Spektroskopie stark gewandelt: Mit der Einführung der Fourier-Transformations-Spektroskopie durch Ernst,⁵ bei der Magnetisierungen durch hochfrequente Radioimpulse angeregt werden, wurden auch die Aufnahmen mehrdimensionaler Spektren möglich,⁶ die heute routinemäßig zur Strukturaufklärung in der chemischen Analytik genutzt werden. Die enormen Fortschritte bei der Entwicklung starker supraleitender Magnete brachten einen deutlichen Intensitätsgewinn der NMR-Signale und die Möglichkeit, Spektren von Stoffen, die in sehr geringer Konzentration vorliegen, zu messen. Durch schnelle Rotation um den sogenannten magischen Winkel ist es heute auch möglich, NMR-Spektren mit Signalen geringer Linienbreite von Feststoffen aufzunehmen.

In der medizinischen Diagnostik wird die kernmagnetische Resonanz heute vor allem zur Bildgebung (Kernspintomographie) und zur in-vivo Spektroskopie am lebenden Objekt genutzt. Damadian beispielsweise beobachtete im Jahr 1971, dass man unter Umständen Tumore von gutartigem Gewebe nicht-invasiv anhand der Relaxationszeiten der Protonensignale unterscheiden kann.⁷ Griffiths et al. nahmen Anfang der 80er Jahre die ersten ³¹P-NMR-Spektren von menschlichen Tumoren auf.⁸

Die ³¹P-NMR-Spektroskopie eignet sich besonders zur Untersuchung von Fragestellungen zum Energiestoffwechsel. Im in-vivo Spektrum von Muskelgewebe findet man die Signale von anorganischem Phosphat, Phosphocreatin und ATP.⁹ Im in-vitro Spektrum von Erythrocyten detektiert man darüberhinaus eine Vielzahl anderer an der Glycolyse beteiligter phosphorhaltiger Substanzen.¹⁰ Ein weiterer Themenkomplex ist die Analyse der phosphorhaltigen Membranbestandteile, der Phospholipide.

Die in-vitro ^1H -NMR-Spektroskopie fand in der medizinischen Diagnostik lange Zeit nur wenig Beachtung. Das änderte sich, als Fossel, Carr und McDonagh im Jahr 1986 ihre Arbeit zur ^1H -NMR-Spektroskopie an Blutplasma veröffentlichten, in der Unterschiede der Lipidsignale zwischen gesunden Probanden und Krebspatienten beschrieben wurden.⁴⁴

Auch wenn die großen Erwartungen, die diese Publikation weckte, zunächst enttäuscht wurden, so war sie trotzdem der Auslöser für eine Vielzahl weiterer Untersuchungen mit dem Ziel, pathologische Veränderungen in Körperflüssigkeiten NMR-spektroskopisch nachzuweisen und die NMR-Spektroskopie für die klinische Diagnostik nutzbar zu machen. Momentan wird die Entwicklung in diesem Bereich von einer Vielzahl von NMR-Arbeitsgruppen auf der ganzen Welt vorangetrieben. Die vorliegende Arbeit ist als Baustein zu werten, auf einem ausgewählten Themengebiet einen Beitrag für den zukünftigen Einsatz der NMR-Spektroskopie als Standardmethode in der klinischen Diagnostik zu leisten.

2 Aufgabenstellung

Eine wichtige Voraussetzung, um Krankheiten besser diagnostizieren und therapieren zu können, ist die Erforschung der molekularbiologischen Mechanismen und biochemischen Zusammenhänge im Organismus. Die NMR-Spektroskopie ist eine geeignete Methode, um Substanzen zu quantifizieren, und den Stoffwechsel in gesunden oder pathophysiologisch verändertem Zustand zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde das Schilddrüsenkarzinom als Beispiel einer definierten malignen Tumorerkrankung ausgewählt und der Einfluss des Schilddrüsenkarzinoms auf die (Phospho-) Lipidzusammensetzung des Blutplasmas bestimmt. Dabei wurden Patienten mit differenzierten (papillären und follikulären) Schilddrüsenkarzinomen, die gut behandelbar und heilbar sind, untersucht.

In bisherigen Arbeiten konnten zwar Unterschiede in der Lipidzusammensetzung zwischen gesundem Schilddrüsengewebe und bösartigen Schilddrüsentumoren aufgezeigt werden.^{73,99} Untersuchungen an Blutplasma ergaben bisher jedoch keine Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Schilddrüsenkarzinom.⁷³

Die Primärtherapie beim Schilddrüsenkarzinom besteht generell in der chirurgischen Entfernung der Schilddrüse (Thyreodektomie). Eine Ausnahme bilden lediglich papilläre Mikrokarzinome, bei denen die Resektion des befallenen Lappens genügt. Für die Therapie und Diagnostik in der Nachsorge (Radioiodtherapie und Ganzkörperszintigraphie) ist bei thyreodektomierten Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom eine Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose) erforderlich. Dazu wurde bei diesen Patienten für mindestens zwei Wochen die Gabe des künstlich hergestellten Hormons Thyroxin eingestellt. Zusätzlich zu den karzinomabhängigen Blutveränderungen musste daher auch der Einfluss der Schilddrüsenhormone auf die Lipidzusammensetzung des Blutplasmas bestimmt werden. Die Untersuchung des Hormoneinflusses wurde der Untersuchung am Schilddrüsenkarzinom vorangestellt.

Um quantitative Aussagen über die Lipidkonzentrationen treffen zu können, wurde die ³¹P-NMR-Spektroskopie an Blutplasma zur Phospholipidbestimmung standardisiert und die Empfindlichkeit der Messungen optimiert. Ferner wurde eine neue Methode zur quantitativen Auswertung der ¹H-NMR-Spektren entwickelt, die Konzentrationsangaben zu verschiedenen Fettsäurebestandteilen erlaubt.

Nach der Untersuchung des Einflusses des Schilddrüsenkarzinoms auf die Lipidkonzentrationen im Blutplasma wurde getestet, ob die Veränderungen weiter differenziert werden können, beispielsweise durch Einbeziehung der Tumorgröße oder Anwesenheit von Metastasen. Ferner wurde untersucht, inwieweit die NMR-Spektroskopie in einer nuklearmedizinischen Nachsorgeuntersuchung des Schilddrüsenkarzinoms von diagnostischem Nutzen ist.

Fernziel der Arbeit an diesem Thema ist die Entwicklung einer diagnostischen Methode, mit der durch NMR-Spektroskopie an Blutplasma auf noch vorhandenes Schilddrüsenkarzinomgewebe im Organismus geschlossen werden kann. Dies wäre hilfreich, um in Fällen, in denen Routinemethoden keinen eindeutig positiven oder negativen Befund ergeben, auf teure Alternativmethoden (¹⁸F-PET) verzichten zu können.

II Praktischer Teil: NMR spektroskopische Untersuchungen von Blutplasma

3 ^{31}P -NMR-Spektroskopie der Phospholipide

3.1 Aufbau und physikalische Phasen der Phospholipide

Als Phospholipide bezeichnet man Moleküle, die mindestens eine lipophile Fettsäure enthalten und einen hydrophilen, phosphathaltigen Rest. Phospholipide mit zwei langkettigen Fettsäuren sind in Wasser nicht homogen löslich, sondern bilden andere Phasen, z.B. Doppelschichten (Double Layer), Mizellen, zylindrische Anordnungen oder an Phasengrenzen auch Einfachschichten (Monolayer).¹¹

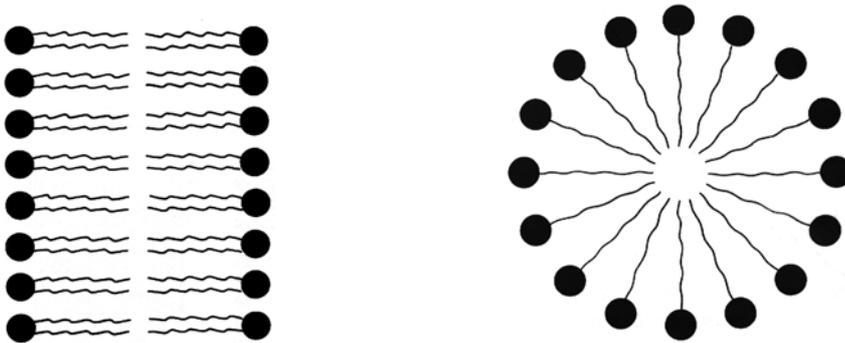


Abbildung 1: Phospholipide bilden in wässriger Umgebung z.B. nach außen hydrophile Doppelschichten oder Mizellen.

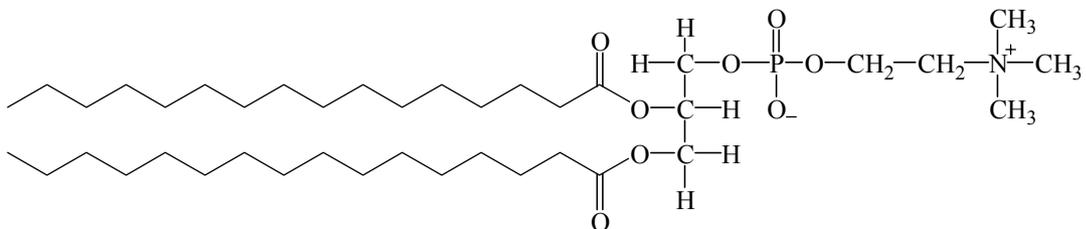


Abbildung 2: Phosphatidylcholin.

Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) sind Phospholipide, die formal vom Glycerin abgeleitet werden, das an den 1,2-Positionen mit zwei Fettsäuren und an der 3-Position mit einem phosphathaltigen Rest verestert ist (Abbildung 2 und Abbildung 3). Die Fettsäure an Position 1 ist in den meisten Fällen eine gesättigte Fettsäure, während an Position 2 eine ungesättigte Fettsäure gebunden ist. Im Blutplasma einer Ratte haben beispielsweise 78 % des Phosphatidylcholins diesen Aufbau.¹² Der Anteil ungesättigter Fettsäuren an den Phospholipiden der Zellmembran ist ein wichtiger Parameter für die Membranfluidität.

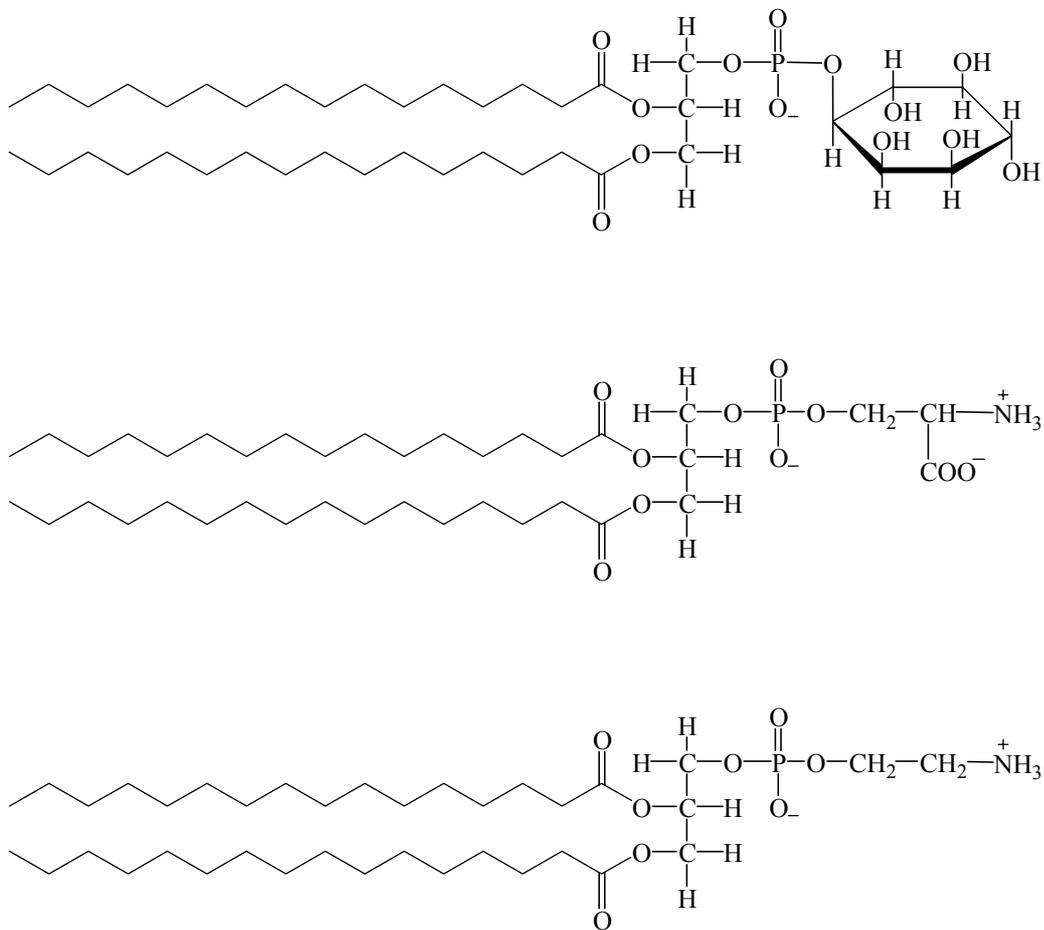


Abbildung 3: Phosphatidylinositol (oben), Phosphatidylserin (Mitte) und Phosphatidylethanolamin (unten).

Sphingomyelin (SM) leitet sich vom SphingosinGrundgerüst ab, ist aber auf den ersten Blick in seiner räumlichen Anordnung, seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften dem Phosphatidylcholin sehr ähnlich (Abbildung 4). Unterschiede ergeben sich aus der Asymmetrie der Kettenlänge und der unterschiedlichen Polarität der Schnittstelle zwischen hydrophober und hydrophiler Region, wodurch Lipiddoppelschichten stabilisiert werden.¹³ Ein weiterer Unterschied besteht in dem niedrigen Verhältnis der ungesättigten Fettsäuren zu gesättigten Fettsäuren (0,1 - 0,25) verglichen mit Phosphatidylcholin (1,1 - 1,5).¹⁴

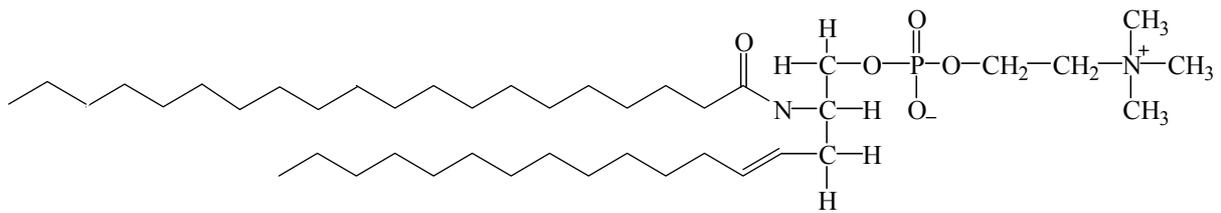


Abbildung 4: Sphingomyelin.

Durch enzymatische Spaltung der Phospholipide mit den Phospholipasen PLA_1 , PLA_2 , PLC und PLD erhält man sogenannte Lysophospholipide (1- oder 2-Acyl-sn-glycero-3-phosphocholin, bzw. 1- oder 2-Lysophosphatidylcholin, abgekürzt LPC1 oder LPC2), bzw. Diacylglycerin, bzw. Phosphatidat (Abbildung 5). Phospholipasen A_1 und A_2 findet man im Sekret der Bauchspeicheldrüse, im Cytosol der Leber, an Zellmembranen, Mitochondrien, aber auch in Schlangengift.

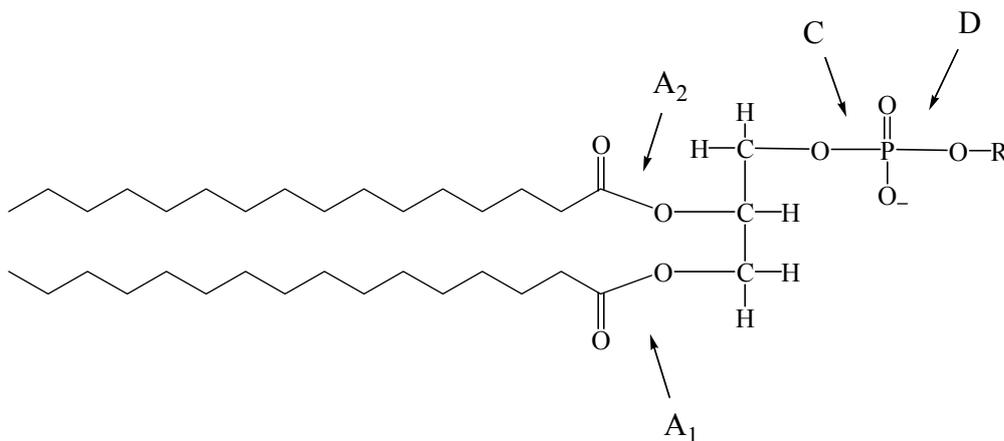


Abbildung 5: Vier verschiedene Klassen von Phospholipasen spalten die Phospholipide.

Aufgrund der geringen Konzentrationen und Aktivitäten von Phospholipasen C und D haben von den Abbauprodukten nur LPC1 und LPC2 (Abbildung 6) ausreichende Konzentrationen, um im ^{31}P -NMR-Spektrum von Blutplasma sichtbar zu werden:

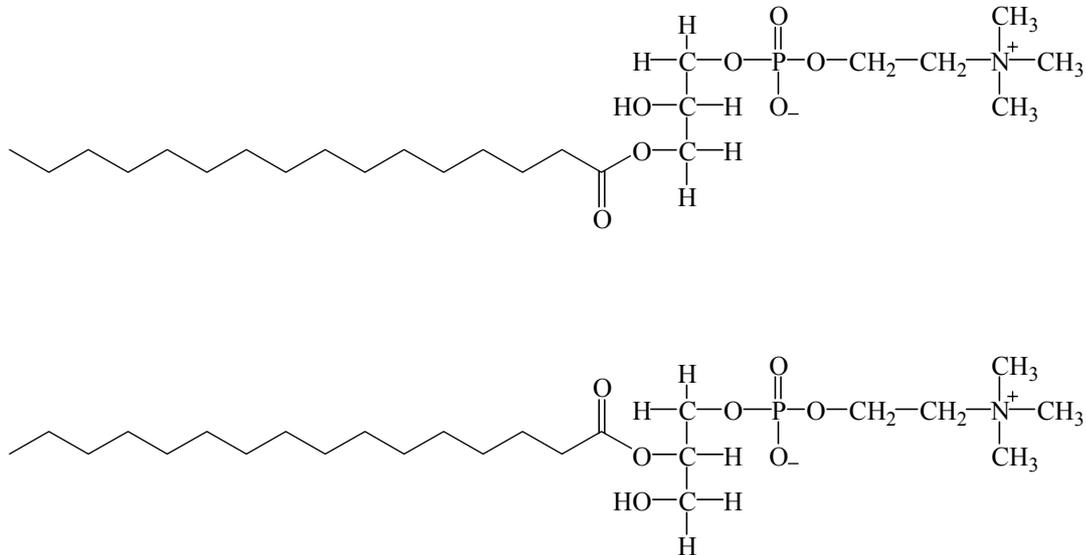


Abbildung 6: Lysophosphatidylcholin 1 (LPC1, oben) und Lysophosphatidylcholin 2 (LPC2, unten).

Ein besonders hoher Umsatz an Phospholipiden (Anabolismus und Katabolismus, also Biosynthese und Abbau) findet in der Leber statt. Mit Dotierungsexperimenten haben Kawamoto et al. zwei „Pools“ von Phospholipiden in der Leber nachgewiesen: Einen „statischen“, der verantwortlich für den Phospholipidtransport von der Leber ins Blutplasma ist, und einen „dynamischen“, der die Galle mit Phospholipiden versorgt.¹⁵

Die Biosynthese der Phospholipide geschieht am endoplasmatischen Retikulum.¹⁶ PC wird in der Leber nach 3 verschiedenen Mechanismen gebildet: Die Acylierung von LPC, die dreifache Methylierung von PE und die de novo Synthese über den Cytidinphosphatweg, in der Cholin aus der Nahrung umgesetzt wird (Abbildung 7):

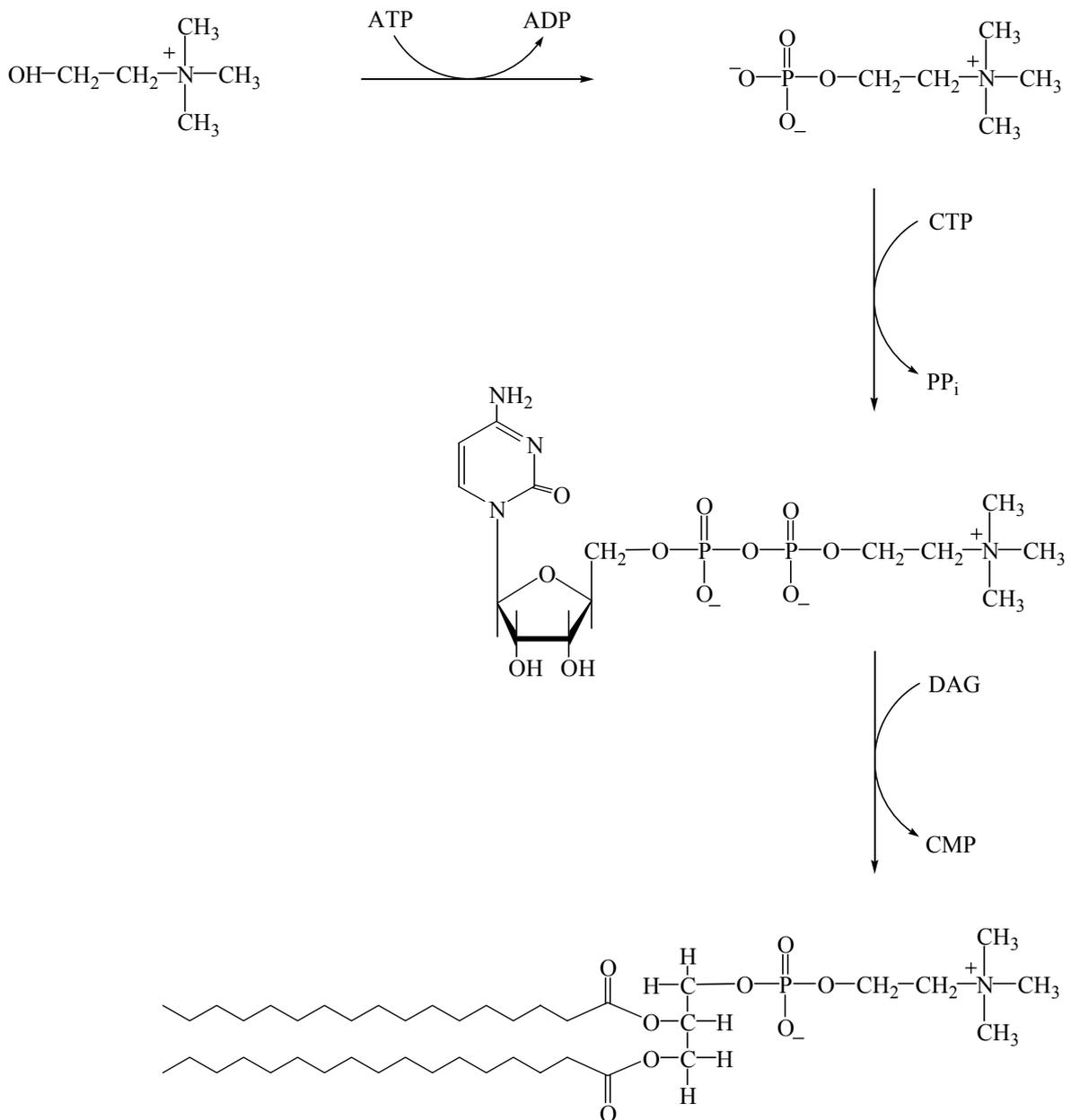


Abbildung 7: Cytidinweg der Phosphatidylcholinsynthese. Abkürzungen: CTP, Cytidin-triphosphat; PP_i, Diphosphat; DAG, Diacylglycerin; CMP, Cytidinmonophosphat.

Der Cytidinweg spielt auch eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von PE, PS und PI. Ferner gibt es noch Basenaustauschreaktionen, in denen Phospholipide zu anderen Phospholipiden umgesetzt werden, beispielsweise Phosphatidylserin und Ethanolamin zu Phosphatidylethanolamin und Serin. Erythrocyten sind im Gegensatz zu anderen Zellen nicht fähig zur de novo Synthese von Phospholipiden, wohl aber zur Modifizierung bereits vorhandener Phospholipide.

Aufgrund der unterschiedlichen molekularen Struktur verläuft die Biosynthese von Sphingomyelin natürlich anders als die der übrigen Phospholipide (Abbildung 8):¹⁷

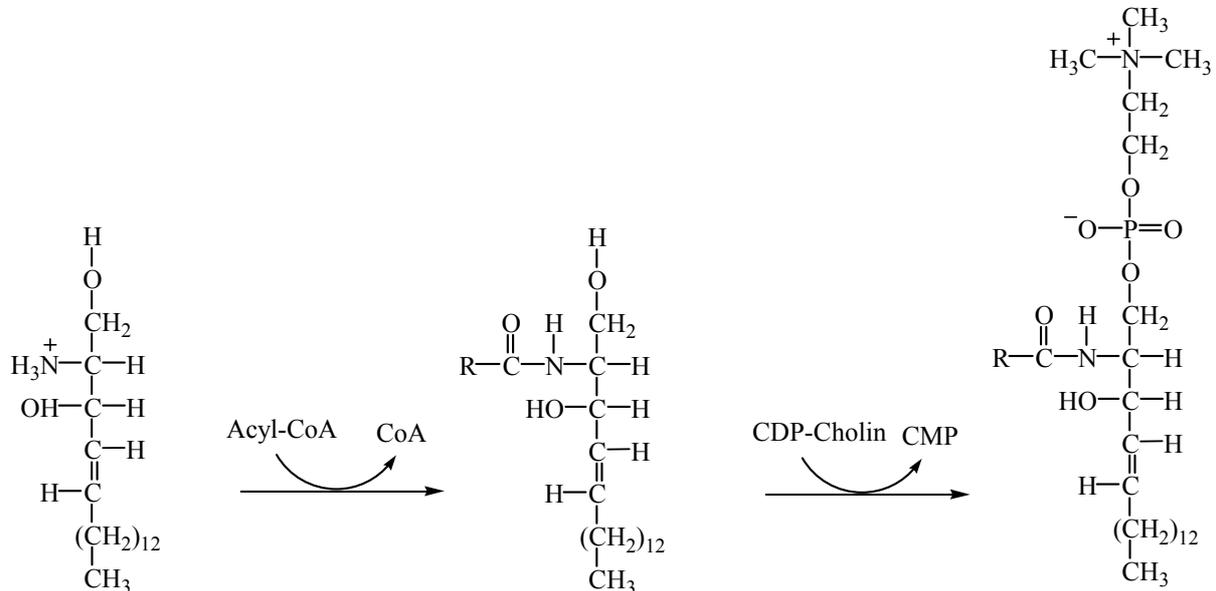


Abbildung 8: Sphingomyelinsynthese über Sphingosin (links) und Ceramid (Mitte).
Abkürzungen: CoA, Coenzym A; CDP-Cholin, Cytidindiphosphatcholin;
CMP, Cytidinmonophosphat.

Die Phospholipide im Blutplasma sind an die Lipoproteine gebunden. Lipoproteine enthalten u.a. große Proteinstrukturen (Apoproteine), die den äußeren Rahmen des Lipoproteins bestimmen (Abbildung 9). Die Lipide und Phospholipide sind durch nicht kovalente Wechselwirkungen an das Apolipoprotein assoziiert und stehen zu Austauschreaktionen mit Lipiden anderer Lipoproteine, der Erythrocytenmembran und anderer Membranen bereit.^{16,18,19} ^{14}C -Dotierungsexperimente zeigten, dass in der Leber synthetisierte Phospholipide vom Ort ihres Entstehens, dem endoplasmatischen Retikulum, zur Zellmembran in der Leber transportiert werden und in schnellem Austausch mit der äußeren Phospholipidschicht der Lipoproteine stehen. Die Lipoproteine wiederum werden von der Leber in das Blutplasma abgegeben.²⁰

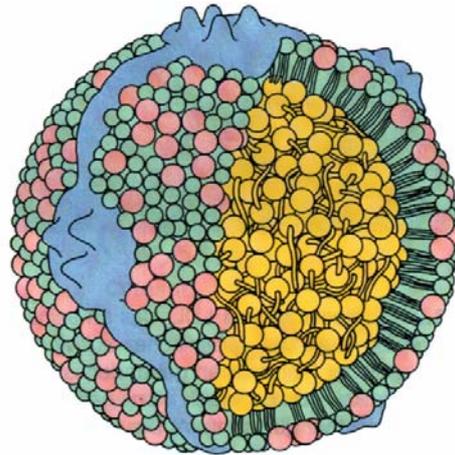


Abbildung 9: Ein LDL-Partikel (Low Density Lipoprotein) besteht aus Apoprotein B-100 (blau), unverestertem Cholesterin (rot), Phospholipiden (grün) und Cholesterinester (gelb).²¹

VLDL dient den Zellen im Organismus als Lieferant von Triglyceriden, LDL als Cholesterinlieferant, während HDL (High Density Lipoprotein) für den Cholesterintransport von den Zellen zur Leber verantwortlich ist. Im Zusammenhang mit den Phospholipiden spielt die Übertragungsreaktion von Cholesterin zum HDL eine wichtige Rolle, da Phosphatidylcholin (historischer Name: Lecithin) zu LPC1 verseift wird (Abbildung 10).

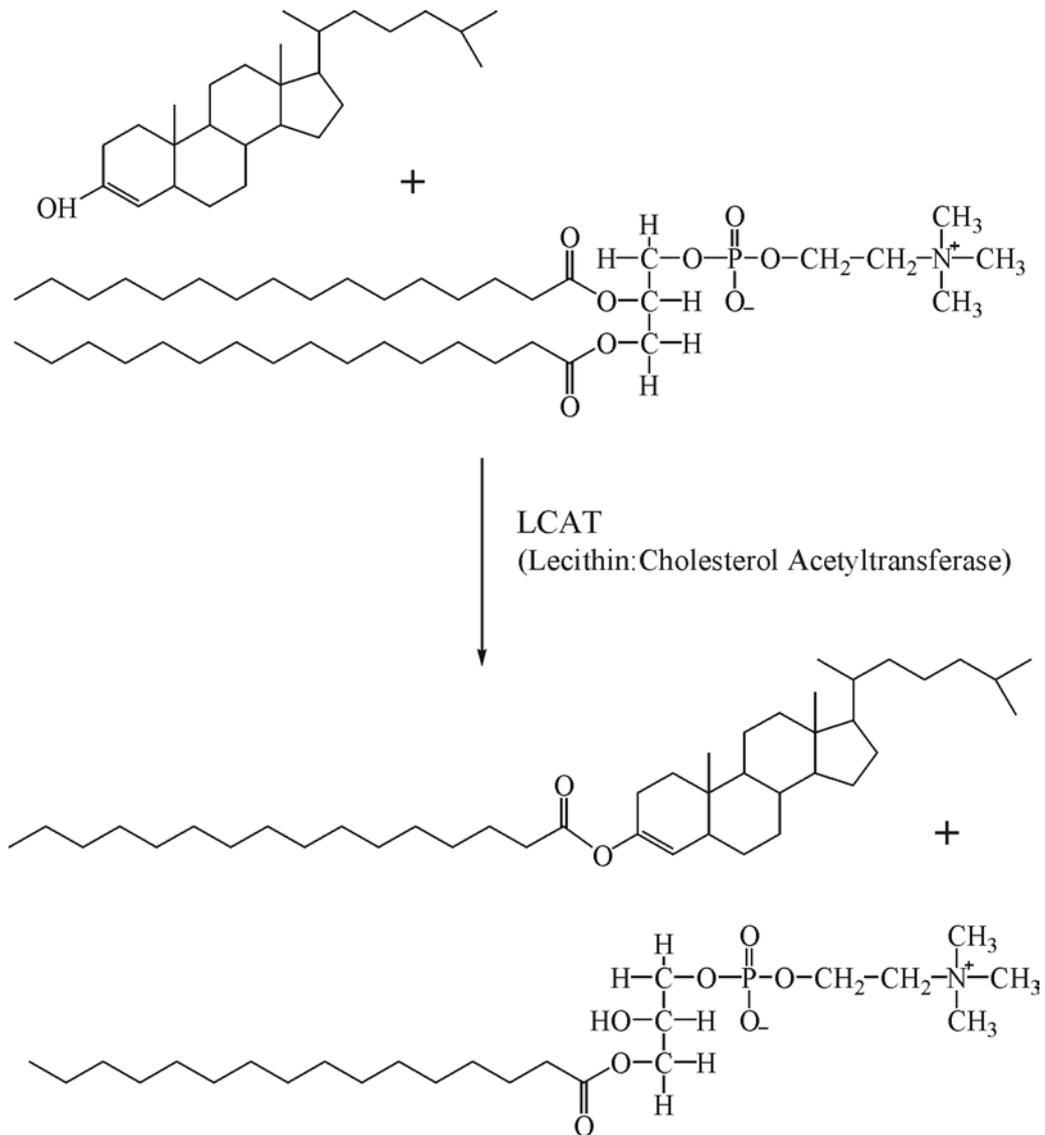


Abbildung 10: LCAT (Lecithin:Cholesterol Acetyltransferase) katalysiert den Cholesterintransfer von der Zellmembran zum HDL unter gleichzeitiger Übertragung einer Fettsäure.

3.2 Quantifizierung im Blutplasma

Phospholipidkonzentrationen können mit Hilfe von enzymatischen Assays, chromatographischen Methoden wie Dünnschichtchromatographie^{22,23} und HPLC^{24,25,26,27}, spektroskopischen Methoden wie IR²⁸ oder NMR oder auch durch die Kombination von Chromatographie und Spektroskopie²⁹ bestimmt werden. Voraussetzung für die quantitative Analyse mittels der NMR-Spektroskopie ist die Löslichkeit der Probe, bzw. die volle Beweglichkeit der Phospholipidmoleküle in der Lösung. Phospholipide der Zellmembran sind in ihrer Beweglichkeit so stark eingeschränkt, dass man im hochaufgelösten ^{31}P -NMR Spektrum unbehandelter Zellen kein Signal findet. Die Signalbreite ist so hoch, dass man das Signal nicht von der Basislinie unterscheiden kann. Die Phospholipide der Lipoproteine im Blutplasma haben eine höhere Beweglichkeit; sie reicht aber noch nicht aus, um ^{31}P -NMR Signale zu erhalten, die nach Phospholipidklassen aufgelöst, also unterscheidbar sind.

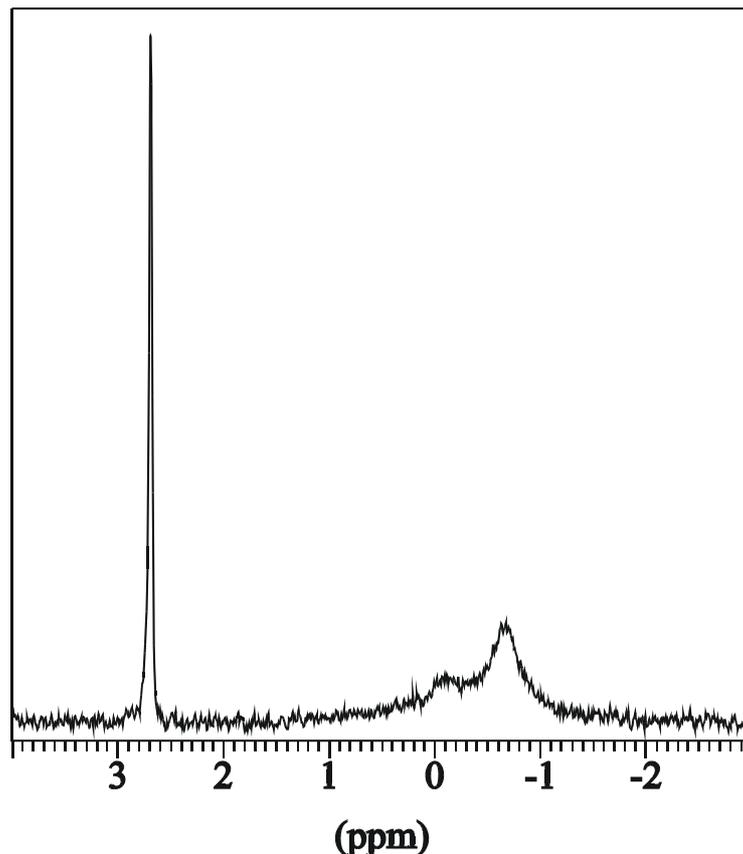


Abbildung 11: ^{31}P -NMR Spektrum von Blutplasma ohne Vorbehandlung. Bei ca. 3 ppm findet man anorganisches Phosphat, zwischen 0 und -1 ppm die Phospholipide der Lipoproteine.

Aufgrund der sowohl lipo- als auch hydrophilen Eigenschaften der Phospholipide müssen geeignete Lösungsmittelsysteme genau eingestellt sein. Gute Signalaufösungen im ^{31}P -NMR Spektrum erhält man beispielsweise in einem Gemisch von CDCl_3 -MeOH- D_2O (10:4:1) mit Cs_4EDTA .^{30,31} Voraussetzung zur Nutzung dieses Lösungsmittelsystems ist eine vorherige Extraktion³² und Trocknung der Plasmaprobe. Eine einfachere Methode ist die Verwendung von Detergentien, da man dann im wäßrigen Medium arbeitet und das Wasser nicht entfernen muss. Die am besten aufgelösten ^{31}P -NMR Spektren in wäßrigem Medium erhält man mit Triton X-100³³ und mit Natriumcholat.^{34,35,36}

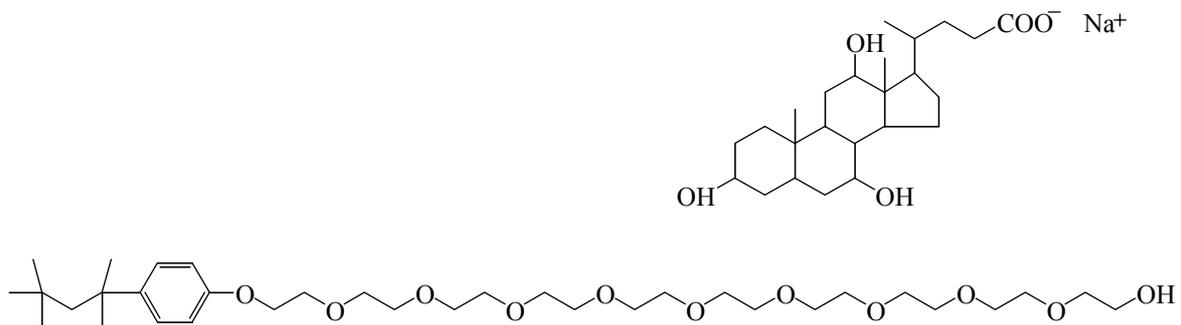


Abbildung 12: Natriumcholat (oben) hat das gleiche Grundgerüst wie Cholesterin (siehe Abbildung 10), Triton X-100 (unten) ist ein Polyether.

Natriumcholat und Triton X-100 bilden Mizellen (Abbildung 1), in denen die Phospholipide eingelagert werden. In diesen „gemischten Mizellen“ zeigt der hydrophile, phosphorhaltige Rest der Phospholipide nach außen und hat aufgrund der Geometrie der Mizelle eine höhere Beweglichkeit als in Lipoproteinen. Lipoproteine haben einen größeren Radius, daher ist der Winkel, den benachbarte Phospholipide zueinander einnehmen, kleiner. Die Zellmembranen haben annähernd parallel angeordnete Phospholipide, die in Doppelschichten angeordnet sind.

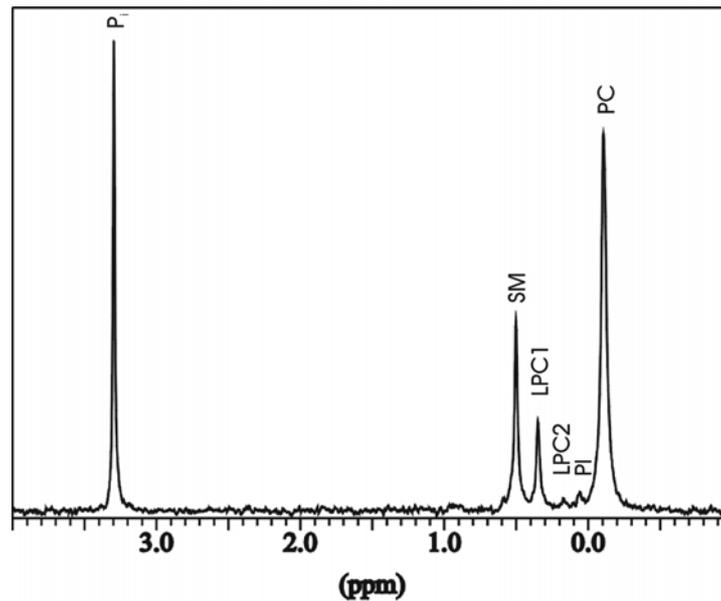


Abbildung 13: ³¹P-NMR Spektrum von Blutplasma mit Natriumcholat: Zwischen 1 und 0,5 ppm findet man verschiedene Signale der Phospholipide.

3.2.1 Standardisierung

Durch den Messimpuls wird das Besetzungsverhältnis der Energieniveaus eines Kerns aus dem Gleichgewicht gelenkt. Quantitative Messungen sind nur möglich, wenn ein genügend hoher Delay zwischen zwei Messdurchläufen geschaltet wird, damit das System vor dem neuen Impuls ausreichend relaxiert. Der Resonanzvorgang wird durch die „Blochschen Gleichungen“ beschrieben. Folgendes Zeitgesetz wird für die Relaxation der z - Komponente der Magnetisierung nach einem 90°_x - Puls postuliert:

$$M_z(t) = M_{gl} - M_{gl} e^{-\left(\frac{t}{T_1}\right)}$$

M_{gl} ist die Gleichgewichtsmagnetisierung, T_1 die T_1 - Zeit, die ein Maß für die Geschwindigkeit der Spin-Gitter Relaxation ist. Für einen 180°_x - Puls (Inversion-Recovery Experiment) erhält man:

$$M_z(t) = M_{gl} - 2M_{gl}e^{\left(-\frac{t}{T_1}\right)}$$

Nach einem Puls α_x mit $\alpha < 90^\circ$ verbleibt noch Magnetisierung auf der z - Achse. Diese Restmagnetisierung beträgt $M_z(\alpha) = \cos \alpha \cdot M_{gl}$.

Die Differenz zwischen z - Magnetisierung nach dem Puls und derjenigen im Gleichgewichtszustand beträgt beim α_x Puls $(1 - \cos \alpha) \cdot M_{gl}$. Die Relaxationsgleichung lautet dann:

$$M_z(t) = M_{gl} - (1 - \cos \alpha)M_{gl}e^{\left(-\frac{t}{T_1}\right)}$$

Als Faustregel gilt, dass für quantitative Messungen mit 90° - Impulsen die Repetitionszeit mindestens fünfmal die T_1 - Zeit betragen muss. Wählt man kleinere Pulswinkel, kann auch die Repetitionszeit t_R verkürzt werden.

Die T_1 -Zeit der ³¹P-NMR Signale wurden mit der Inversion-Recovery Methode bestimmt. Die Magnetisierung wird durch einen 180° - Puls auf die (-z)- Achse transferiert, dann läßt man der Magnetisierung während eines variablen Delays τ Zeit zur Relaxation, strahlt einen 90° - Messpuls ein und nimmt den FID auf. Ist das Signal noch in einem frühen Stadium der Relaxation, dann misst man ein negatives Signal. Ist es vollständig relaxiert, so ist das Signal positiv. Folglich gibt es einen Delay, an dem weder z-, noch (-z)- Magnetisierung existiert. Man spricht dann vom Nulldurchgang und kann über die Beziehung $t_0 = T_1 / \ln 2$ in erster Näherung die Konstante T_1 bestimmen. Verfügt man über genügend Messungen mit unterschiedlichen Delays τ , so trägt man besser $\ln \left[\frac{M_0 - M_z(\tau)}{2M_0} \right]$ gegen τ auf und bestimmt T_1 als negativen Kehrwert der Steigung.

Die Messungen wurden mit einem internen Standard durchgeführt. Wichtige Kriterien für die Wahl des Standards waren die Stabilität unter den Messbedingungen, die gute Einwägbarkeit, eine genügende Reinheit, eine niedrige T_1 -Zeit, um schnelle Messungen zu ermöglichen und nicht zuletzt die einfache Verfügbarkeit im Chemikalienhandel.

Tabelle 1: T₁ Relaxationszeiten der ³¹P- Signale im Blutplasma mit Standardlösung im Verhältnis 4 : 1 bei pH8 (37° C). Die Probe wurde nicht entgast.

Substanz	Phosphat	SM	LPC1	PI	PC
chemische Verschiebung (ppm)	3,30	0,52	0,35	0,09	-0,09
T ₁ (s)	11,7	1,7	2,0	1,3	1,7

Tabelle 2: T₁ Relaxationszeiten der ³¹P- Signale möglicher Standardsubstanzen in Standardlösung (+), bzw. Blutplasma mit Standardlösung im Verhältnis 4:1 (*) bei pH8 (37° C). Die Probe wurde nicht entgast.

Substanz	T ₁ (s)
Adenosinmonophosphat ⁺	7,2
Adenosintriphosphat (α- Signal) ⁺	3,4
Adenosintriphosphat (β- Signal) ⁺	4,6
Adenosintriphosphat (γ- Signal) ⁺	6,4
Aminosäurephosphate ⁺	> 7,2
n-Butylphosphonsäure*	3,6
tert-Butylphosphonsäure*	7,4
Cardiolipin ⁺	1,4
Glycerinphosphat*	8,3
Kreatinphosphat ⁺	7,2
Methylendiphosphonsäure*	7,3
Phosphatidsäure*	2,5
Phosphonomethylglycin, PMG*	3,3
Phosphorsäuremonobutylester ⁺	8,5
Phosphorsäuredibutylester ⁺	4,6
Tributylphosphan ⁺	< 1,4
Triphenylphosphanoxid ⁺	0,8

Ein interner Standard sollte eine T_1 -Zeit haben, die nicht wesentlich größer ist als die der Phospholipide. In Frage kommen zum Beispiel Cardiolipin und Phosphatidsäure. Beides sind Phospholipide, die im Blutplasma in nicht messbarer Konzentration enthalten sind. Käufliches Cardiolipin wird aus natürlichem Gewebe extrahiert. Daher haben die Fettsäuren keine definierte Kettenlänge, sondern eine Kettenlängenverteilung und damit keine feste Molekülmasse. Cardiolipin ist daher als Standard ungeeignet. Phosphatidsäure ist unter den Messbedingungen nicht stabil und zersetzt sich zum Teil innerhalb der Messzeit unter Fettsäureabspaltung.

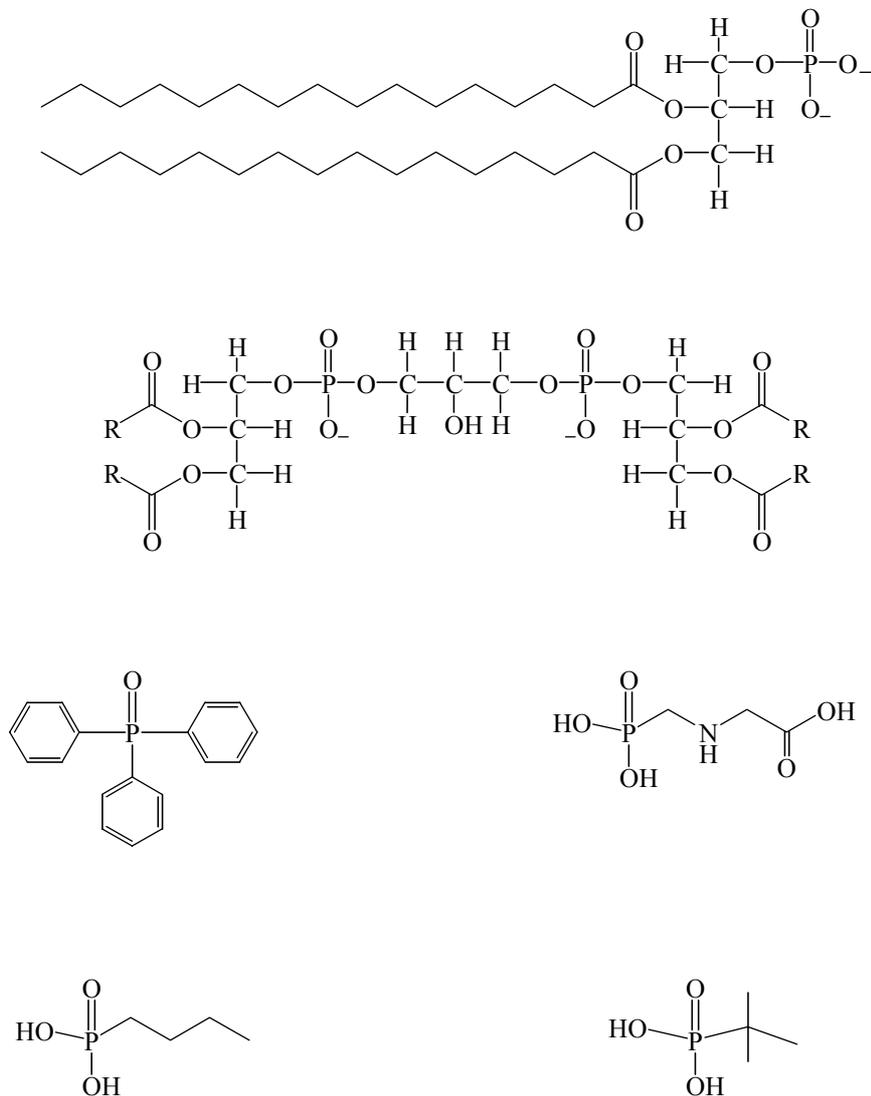


Abbildung 14: Phosphatidsäure (oben), Cardiolipin (2. von oben), Triphenylphosphinoxid (Mitte links), N-Phosphonomethylglycin (Mitte rechts), n-Butylphosphonsäure (unten links) und Tertiärbutylphosphonsäure.

Triphenylphosphanoxid ist preiswert, in wässriger natriumcholathaltiger Lösung stabil, hat mit 0,8 s eine sehr kleine T_1 -Zeit und ist leicht einwägbar. Jedoch verschwindet das ^{31}P -NMR-Signal nach Zugabe von Blutplasma. Möglicherweise geht das Triphenylphosphanoxid komplexe Verbindungen mit Proteinstrukturen des Blutplasmas ein, wodurch die Beweglichkeit des Phosphoratoms so stark eingeschränkt wird, dass sich das Signal so sehr verbreitert, dass es sich nicht von der Grundlinie und dem Rauschen abhebt. Phosphomethylglycin (PMG) und n-Butylphosphonsäure hingegen vereinen alle eben aufgeführten Eigenschaften, die von einem internen ^{31}P -NMR-Standard verlangt werden und sind für die Zwecke dieser Arbeit geeignet. Die Reinheit der bei Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) erworbenen Substanz betrug laut Etikett mehr als 97 %. Die max. vorhandenen 3 % Fremdsubstanzen wurden aufgrund der größeren Fehlergrenzen der Iteration bei der Integration vernachlässigt. Im NMR-Spektrum waren keine phosphorhaltigen Verunreinigungen zu erkennen. Auch nach einem Jahr Lagerung der Standardlösung (s.u. in diesem Kapitel) bei Raumtemperatur war weder eine Abnahme des Signals, noch irgendein Abbauprodukt NMR-spektroskopisch nachweisbar.

In Abschnitt 3.2.2. wird gezeigt, dass ^{31}P -NMR-Spektren von Proben, die in messbarer Konzentration Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) enthalten, wegen der besseren Signalauflösung unter basischen Bedingungen (pH 10) gemessen werden sollten. Für solche Spektren eignet sich PMG nicht als interner Standard, da das Signal bei hohen pH-Werten breit wird. Verständlich wird die Linienverbreiterung durch das Protonierungsgleichgewicht an der NH-Gruppe mit einem pK_s -Wert 10,14.³⁷

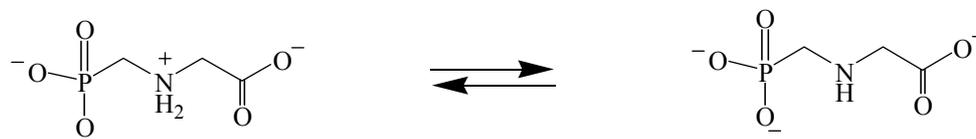


Abbildung 15: PMG hat zwitterionische Eigenschaften. Bei pH-Werten im Bereich von pH 10 besteht ein Protonierungsgleichgewicht am Stickstoffatom.

Die beiden Spektren in Abbildung 16 zeigen die Signale von n-Butylphosphonat und von PMG als internem Standard in Blutplasma. Das linke Spektrum zeigt die Probe unter dem physiologischen pH-Wert 7,4. Das rechte Spektrum wurde nach Zugabe von wenigen Tropfen NaOH - Lösung bei pH 10 gemessen.

Eine Integration (Tabelle 3) zeigt, dass PMG im Spektrum bei pH 10 gegenüber dem Spektrum bei pH 7,4 nicht an Intensität verloren hat, sondern lediglich eine höhere Linienbreite aufweist. Da sich der Messfehler durch die größere Linienbreite erhöht, eignet sich PMG nur als interner Standard bei pH - Werten unter 9. N-Butylphosphonsäure eignet sich sowohl bei pH-Werten im physiologischen Bereich, als auch bei pH-Werten zwischen 9 und 10.

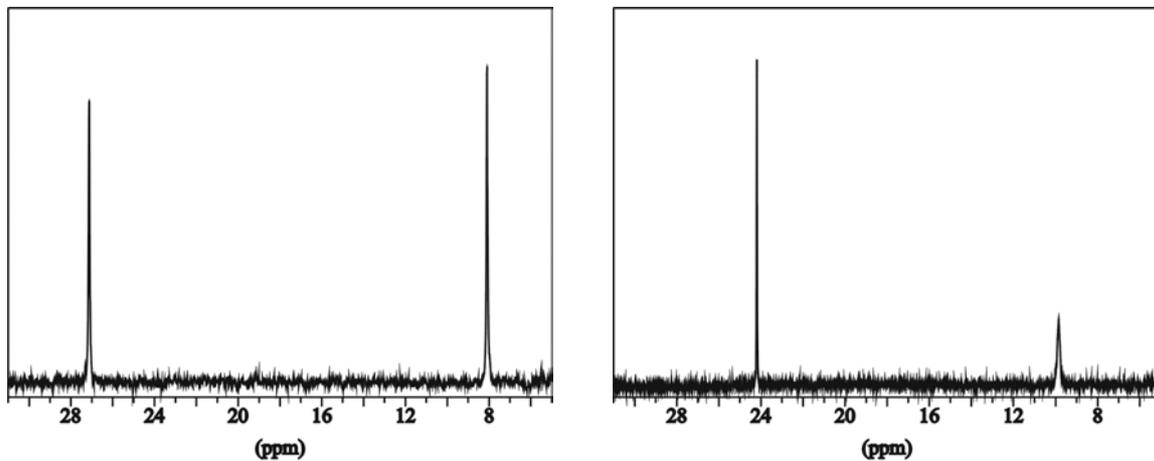


Abbildung 16: Ausschnitt des ³¹P-NMR Spektrums von n-Butylphosphonat (tiefes Feld) und PMG (hohes Feld) in Blutplasma beim pH - Wert 7,4 (links) und 10,0 (rechts), Spektrenausschnitte zwischen 31 ppm und 5 ppm.

Tabelle 3: Signalparameter der Spektren in Abbildung 16

pH	Linienbreite von PMG	$\frac{\text{Integral(PMG)}}{\text{Integral(BPA)}}$
7,4	5,2 Hz	1,01 ± 0,04
10,0	19,8 Hz	0,97 ± 0,04

Für die ³¹P-NMR Messungen von Blutplasma wurden als Standardlösung 82,52 mg PMG (0,5 mmol), 10 g Natriumcholat (23,3 mmol), 1 g Na₂EDTA (2,97 mmol) in einem Messkolben mit D₂O auf 100 ml aufgefüllt und so lange durchmischt, bis eine klare Lösung entstand. Die PMG Konzentration in der Standardlösung betrug 5 mmol/l.

Den Patienten und Probanden wurden jeweils morgens in nüchternem Zustand 10 ml Blut entnommen und in Na₂EDTA-haltige Röhrchen gefüllt, wodurch die Blutgerinnung verhindert wurde. Das Plasma wurde von den Zellen durch 10 min. Zentrifugation bei 3000 g getrennt. Plasma und Standardlösung wurden im Verhältnis 4:1 zusammengegeben. Die Probe wurde gut geschüttelt und bis kurz vor der Messung bei -20°C gelagert. Der pH-Wert der Probe betrug 8, 0±0, 2 .

3.2.2 Signallaufösung und Zuordnung

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Signallagen der Phospholipide und somit die Auflösung verschiedener Signale nebeneinander empfindlich vom Lösungsmittelsystem, vom Detergenz und bei wäßrigen Lösungen vom pH-Wert abhängen.³⁰⁻³⁵ Es war also wichtig, die Signallagen durch Zugabe bekannter Phospholipide zu überprüfen. Dazu wurde die Blutplasmprobe einer Testperson nach der routinemäßigen ³¹P-NMR Messung mit käuflich erworbenen Phospholipiden der Firma Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) versetzt. Um den Lösungsvorgang zu beschleunigen, wurde die Probe zusätzlich mit Ultraschall behandelt. Das Differenzspektrum zwischen der Probe vor und der Probe nach Zugabe eines bekannten Phospholipids lieferte die Signallage unter den Messbedingungen.

Tabelle 4: Signallagen (in ppm) der Phospholipide im ³¹P-NMR Spektrum von Blutplasma mit Natriumcholat.

	PC	PI	LPC2	LPC1	SM	PS	PE
pH 7.4	-0,03 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,41 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,56 ± 0,01
pH 10.0	-0,01 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,59 ± 0,03	0,78 ± 0,03	0,88 ± 0,03

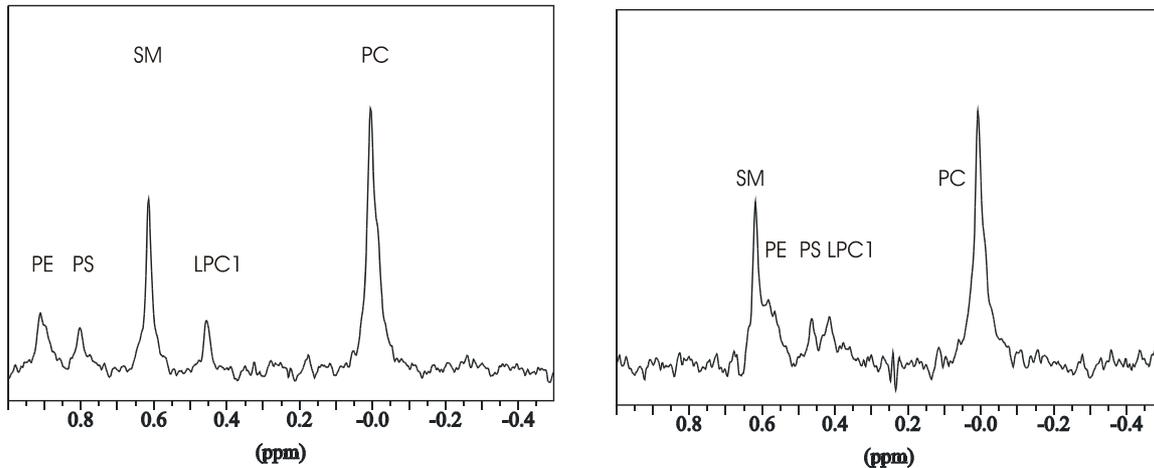


Abbildung 17: ^{31}P -NMR Spektrum von Phospholipiden in Knochenmarkzellen bei pH 10 (links) und pH 7,4 (rechts).

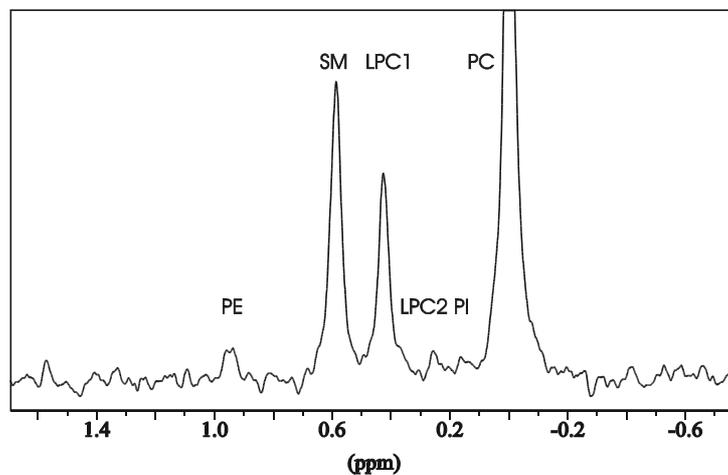


Abbildung 18: ^{31}P -NMR Spektrum von Phospholipiden im Blutplasma bei pH 10.

Beim physiologischen pH - Wert des Blutplasmas (pH 7,4) fallen die Signale von SM und PE sowie LPC1 und PS aufeinander. PS ist im Blutplasma nur in Spuren enthalten, PE trägt im Mittel nur 2 % zu den Phospholipiden im Blutplasma bei (eine ähnliche Größenordnung wie der Anteil von LPC2 und PI).³⁹ Da der Abbau von PC zu LPC1 durch hohe pH- Werte beschleunigt wird (basenkatalysierte Verseifung der Esterbindung), wurden die Messungen an Blutplasma

bei pH 8 durchgeführt, der sich in der 1:4 Mischung von Standard und Blutplasma ohne weiteren Abgleich einstellt. Der Stabilität von PC und LPC1 während der Messzeit wurde eine höhere Priorität eingeräumt, als der getrennten Integration von PE und SM.

Vorangegangene Versuche³⁸ haben gezeigt, dass das Signal von PI eine leichte Temperaturabhängigkeit aufweist und bei 37°C gegenüber dem PC Signal gut aufgelöst ist. Bei niedrigeren Temperaturen wird das Signal von PI durch PC überlagert. Die ^{31}P -NMR Spektren in dieser Arbeit sind daher ausnahmslos bei 37°C aufgenommen (Abbildung 19).

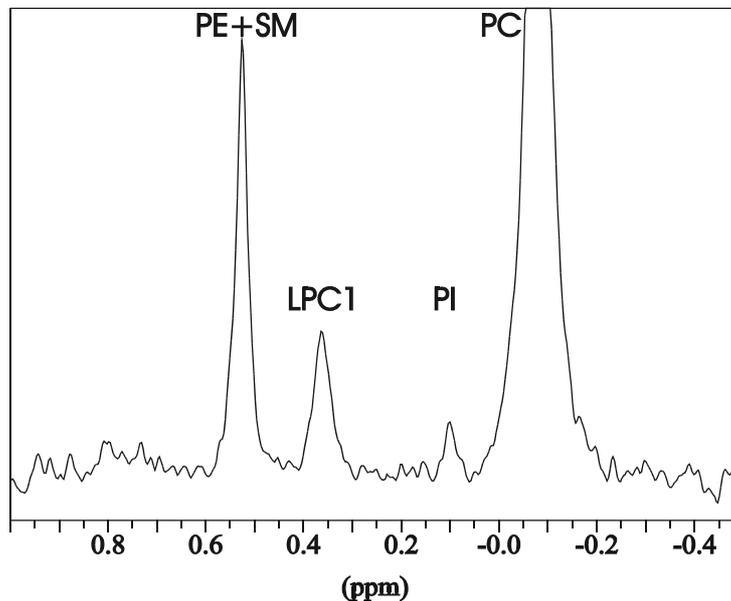


Abbildung 19: ^{31}P -NMR Spektrum von Blutplasma bei 37°C. PI ist neben PC gut sichtbar und integrierbar. (Dass LPC2 nicht sichtbar ist, liegt an der zu geringen Konzentration von LPC2 in dieser Plasmaprobe. PS ist generell im Plasma zu niedrig konzentriert, um detektiert werden zu können.)

3.2.3 Spektrenaufnahme und Signalintegration

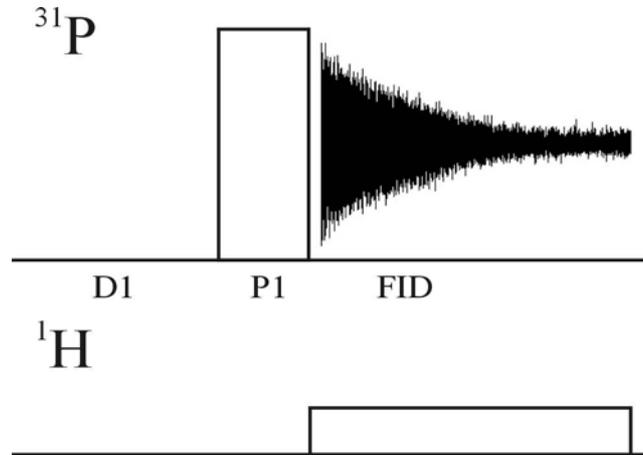


Abbildung 20: Pulsfolge der ^{31}P -NMR Messungen: Nach einem Delay D1 folgt ein 30° -Puls. Während der Aufnahme des FID ist die inverse gated Protonenentkopplung eingeschaltet.

Die ^{31}P -NMR-Spektren wurden mit einer einfachen eindimensionalen Pulsfolge mit inverse gated ^1H Entkopplung zur Vermeidung des Nuclear Overhauser Effekts (NOE) gemessen (Abbildung 20). D1 war 1,9 s, die Aquisitionszeit, in der der Free Induction Decay (FID) aufgenommen wurde, betrug 2,1 s. Die Pulslänge P1 entsprach mit $6\ \mu\text{s}$ einem 30° -Puls.

Um eine schnelle ^{31}P -NMR-Messung zu ermöglichen, wurde ein 30° - statt eines 90° - Pulses gewählt. Da beim 30° - Puls weniger Magnetisierung auf die x-y Ebene des rotierenden Koordinatensystems transferiert wird, erreicht die Magnetisierung früher ihren Gleichgewichtszustand und die Repititionszeit kann verkürzt werden. Ein mit einer Repititionszeit von 4 s bei einer Pulslänge von 30° aufgenommenes Spektrum wurde mit einem Spektrum der gleichen Probe verglichen, das mit einer Repititionszeit von 17,5 s ($5 \cdot T_1$ des Standardsignals) und einer Pulslänge von 90° gemessen wurde. Unter den zuletzt genannten Bedingungen kann man sicher sein, dass vor jedem Scan die Magnetisierungen sowohl des PMG-Signals als auch die der Phospholipidsignale nahezu vollständig relaxiert sind. Das Differenzspektrum entspricht in guter Näherung der Basislinie und zeigt, dass die relativen Signalintensitäten beider Spektren identisch sind (Abbildung 21). Zusätzlich wurden beide Spektren integriert.

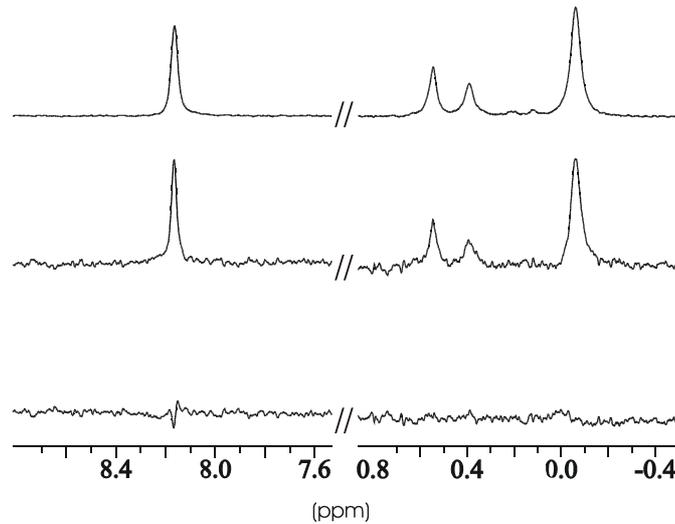


Abbildung 21: ³¹P-NMR-Spektren derselben Probe und das Differenzspektrum (unten). Aquisitionsparameter des oberen Spektrums: 30° Puls, AQ = 1,9 s, D1 = 2,1 s, NS = 6000. Aquisitionsparameter mittleres Spektrum: 30° Puls, AQ = 1,9 s, D1 = 17,6 s, NS = 450.

Die anhand der Integrale berechneten Phospholipidkonzentrationen wichen nur um 1 % voneinander ab. Somit kann man auch unter den standardisierten Messbedingungen mit kurzen Reptitionszeiten von einer quantitativen Messung sprechen.

Das Phospholipid im Blutplasma mit der geringsten noch meßbaren Konzentration war LPC2 (Abbildung 13 und Abbildung 18). Entscheidend für die Detektierbarkeit ist ein ausreichendes Signal/Rausch-Verhältnis. Um dies zu erreichen, wurden für Blutplasma 6000 Scans akkumuliert. Des Weiteren betrug die Spektrenweite 3906 Hz, die Time Domain 16k. Vor der Fourier Transformation wurde ein Zero-Filling zu 64k Datenpunkte durchgeführt und der FID mit der Exponentialfunktion $e^{-(1\text{Hz} \cdot t)}$ multipliziert (line broadening LB = 1 Hz). Die Basislinienkorrektur wurde manuell durchgeführt (Multiple-Points Methode).

Die Signale der ³¹P-NMR-Spektren wurden mit Hilfe des Programmpakets PERCH⁴⁰ integriert. Eine Linienformanalyse berechnete den Gaußanteil, den Lorentzanteil sowie die Halbwertsbreite eines ausgewählten Signals. Diese dienten als Startparameter für die Iteration, bei

der die Halbwertsbreite, Signalhöhe und Frequenz variiert wurden, während der Gauß- und Lorentzanteil konstant gehalten wurden. Aus den Parametern, die sich aus der Iteration ergeben, berechnet PERCH das Integral, also die Fläche zwischen Signal und Basislinie.

Auf diese Art und Weise kann man auch sich teilweise überlagernde Signale integrieren, zum Teil sogar Signale, die in größeren Signalen versteckt und nur als Schulter sichtbar sind. Diese Methode der Integration nennt man Dekonvolution.

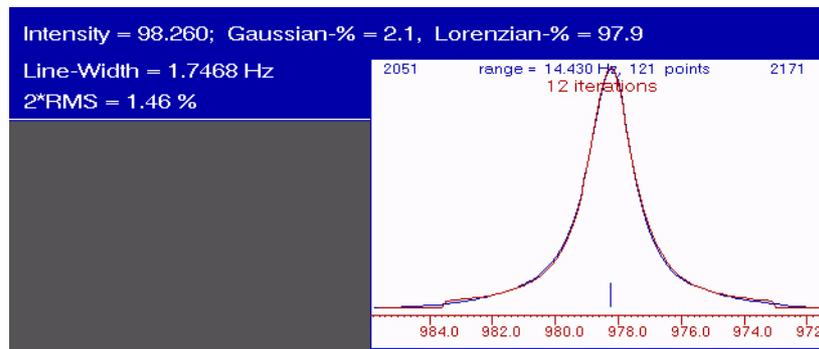


Abbildung 22: Linienformanalyse mit PERCH. Für dieses PMG Signal ergab sich ein Lorentzanteil von 97,9 %, einen Gaußanteil von 2,1 % und eine Linienbreite von ca. 1,7 Hz. Diese Parameter dienten als Startparameter für die anschließende Iteration (Abbildung 23).

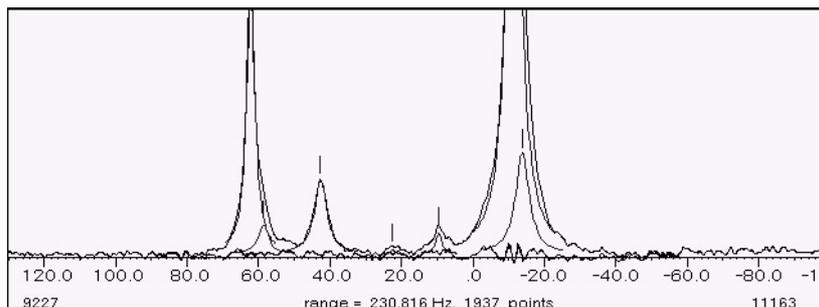


Abbildung 23: Integration und Dekonvolution mit PERCH. Frequenz, Signalhöhe und Linienbreite wurden mit PERCH bei konstantem Gaußanteil so iteriert, dass die Differenz zwischen Spektrum und berechneten Signalen möglichst genau der Basislinie entspricht. Um dies zu erreichen, mussten jeweils zwei Signale in SM und PC gelegt und iteriert werden.

3.2.4 Statistische Auswertung

Patienten und Probanden wurden für diese Arbeit in verschiedenen Kollektiven zusammengefasst, deren Zusammensetzung im jeweiligen Abschnitt aufgeführt ist. Das Blutplasma oder Gewebe wurde untersucht und die Lipidkonzentrationen unter der Fragestellung verglichen, ob sich die gemessenen Konzentrationen zwischen den verschiedenen Kollektiven signifikant unterscheiden.

Substanzkonzentrationen im Blutplasma oder Gewebe sind keine diskreten, sondern kontinuierliche Größen, die einer natürlichen Streuung unterliegen. Daher ist per se anzunehmen, dass sich jeder Mensch von einem anderen in den hier vermessenen Merkmalen unterscheidet. Es ist also anzunehmen, dass sich nicht nur gesunde Probanden von Patienten unterscheiden, sondern auch Patienten untereinander und Probanden untereinander.

Es müssen also statistische Methoden zur Klärung der Unterscheidbarkeit der Kollektive Anwendung finden. Es handelt sich um Standardmethoden, die als Werkzeug für die Auswertung dienen und hier kurz aufgeführt werden:⁴¹

Das arithmetische Mittel einer Stichprobe ist der allgemein bekannte „Mittelwert“, definiert als die Summe der gemessenen Eigenschaften dividiert durch die Anzahl der Objekte:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom sind nur eine kleine Stichprobe aller Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und man muss sich kritisch fragen, inwieweit der berechnete Mittelwert der Stichprobe mit dem Erwartungswert der Grundgesamtheit aller betroffenen Patienten übereinstimmt.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Streuung der Messwerte. Eine einfache Summation der Abweichungen aller Messwerte vom Mittelwert würde dazu führen, dass positive und negative Abweichungen sich gegenseitig aufheben. Man nutzt daher als Maß für die Abweichung die „mittlere quadratische Abweichung“ oder „Varianz“, die mit s^2 abgekürzt wird.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2$$

Die Quadratwurzel der Varianz nennt man Standardabweichung σ . Sie hat den Vorteil, dass sie die gleiche Dimension hat wie die Messgröße. Je größer der Umfang einer Stichprobe, desto dichter liegt das arithmetische Mittel am Erwartungswert der Grundgesamtheit. Der Standardfehler des Mittelwertes σ_x ist definiert als Standardabweichung dividiert durch die Wurzel des Umfangs der Stichprobe: $\sigma_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

σ_x sinkt also mit steigendem n . Gibt man Mittelwerte in der Form $\bar{x} \pm \sigma_x$ an, dann wird bei dem angegebenen Fehler berücksichtigt, dass die Abweichung des Mittelwerts der Stichprobe vom Erwartungswert der Grundgesamtheit mit steigendem Umfang der Stichprobe kleiner wird.

Unterteilt man die gemessenen Werte einer Messgröße in Intervalle konstanter Größe und trägt die Häufigkeit, einen Wert dieses Intervalles zu messen, gegen die Messwerte auf, so erhält man den Graphen der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, in vielen Fällen eine Glockenkurve um den Mittelwert der Grundgesamtheit.

$$(I) \quad y = a \cdot e^{(-bx^2)}$$

$$(II) \quad y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2\sigma^2}}$$

Gleichung (I) ist die einfachste Form einer Gauß'schen Verteilung um den Nullpunkt, Gleichung (II) beschreibt die Wahrscheinlichkeitsdichte einer Normalverteilung um den Erwartungswert \bar{x} . σ ist die eben beschriebene Standardabweichung. Die Integration der Wahrscheinlichkeitsdichte ergibt, dass im Bereich $\bar{x} \pm \sigma$ 68 % der Messwerte liegen, im Bereich $\bar{x} \pm 2\sigma$ liegen 96 % der Messwerte, im Bereich $\bar{x} \pm 3\sigma$ liegen 99,7 % der Messwerte.

Die Überprüfung, ob eine empirisch gefundene Verteilung als Normalverteilung angesehen werden kann, erfolgt mit dem sogenannten χ^2 - Test. Ein erster Anhaltspunkt kann aber auch sein, ob alle bzw. 99,7 % der Messwerte im „ 3σ “ - Bereich liegen. Voraussetzung für die Normalverteilung ist ausserdem die Symmetrie der Wahrscheinlichkeitsdichte.

In dieser Arbeit werden häufig Lipidkonzentrationen verschiedener Patientengruppen verglichen. Angenommen in Gruppe A findet man die Konzentration $\bar{x}_A \pm \sigma_A$, in Gruppe B $\bar{x}_B \pm \sigma_B$, dann dient der t-Test zur Untersuchung, ob die Mittelwerte der Gesamtheiten aller Patienten mit dem Merkmal A und dem Merkmal B sich unterscheiden oder nicht. Der t-Test vergleicht dabei die Differenzen der zufälligen Mittelwerte \bar{x}_A und \bar{x}_B mit den Standardabweichungen σ_A und σ_B . Über die Integration der sogenannten t-Verteilung erhält man den Wahrscheinlichkeitswert für die Hypothese $\bar{x}_A^{\text{gesamt}} = \bar{x}_B^{\text{gesamt}}$. Ein Wahrscheinlichkeitswert $p = 0,05$ für diese Hypothese bedeutet, dass nur mit 5 % Wahrscheinlichkeit die beiden Mittelwerte der Gesamtheiten der Gruppen A und B übereinstimmen, dass sie also mit 95 % Wahrscheinlichkeit unterschiedlich sind. Üblicherweise sagt man ab einem Wahrscheinlichkeitswert von 5 % oder weniger, dass die Mittelwerte „signifikant“ voneinander verschieden sind.

Mit dem t - Test kann man auch zwei Gruppen von Messwerten vergleichen, die aus derselben Stichprobe von Personen stammen (z.B. vor und nach einer Behandlung). Dann spricht man vom gepaarten t - Test. Hierbei werden nicht die einzelnen Messwerte miteinander verglichen, sondern die Differenz der Messwerte, beispielsweise vor und nach der Behandlung. So fällt jener Anteil an der Varianz der Messwerte nicht ins Gewicht, der auf individuelle Eigenschaften der Person zurückzuführen ist. Daher ist der gepaarte t - Test sensitiver und trennschärfer als der ungepaarte t - Test für voneinander unabhängige Stichproben.

Es gibt zwei Voraussetzungen für die Anwendung des t-Tests: Die Grundgesamtheit muss normalverteilt sein, was hier ohne Überprüfung angenommen wird, da die Zahl der Proben für den sogenannten χ^2 - Test zu gering ist. Ausserdem muss man wissen, ob die Standardabweichungen σ_A und σ_B der Grundgesamtheit gleich oder verschieden sind, was durch Anwendung des sogenannten F - Testes geschieht. In dieser Arbeit gibt es auch Messgrößen, die eindeutig nicht normalverteilt sind, beispielsweise die Schilddrüsenhormonkonzentrationen im

Blutplasma. Um in solchen Fällen die Signifikanz zu beurteilen, eignet sich der Test nach Wilcoxon, der darauf beruht, die Messwerte der Größe nach zu sortieren und die Rangsumme von Stichprobe A und Stichprobe B zu vergleichen.⁴¹

Der Umfang n der Stichprobe ist entscheidend, um abzuschätzen, wie genau der zufällige Stichprobenmittelwert \bar{x}_A mit dem Erwartungswert der Grundgesamtheit $\bar{x}_A^{\text{gesamt}}$ übereinstimmt. Man kann den benötigten Umfang mit folgender Formel berechnen:

$$n \geq \frac{\lambda_p^2 \cdot \sigma^2}{\delta^2}$$

λ_p ist die Grenze der Standardnormalverteilung für eine Wahrscheinlichkeit p . Diesen Wert kann man z.B. in Tabellen nachschlagen, er beträgt für 95 % Wahrscheinlichkeit 1,96. σ ist die Standardabweichung und δ die erlaubte Differenz zwischen gemessenem Mittelwert und Erwartungswert der Grundgesamtheit.

Häufig gibt es bei statistischen Untersuchungen eine gewisse Zahl von Messwerten, die sehr stark vom Mittelwert abweichen. Entweder ist die Grundgesamtheit dann nicht normalverteilt oder man kann davon ausgehen, dass dieser Messwert zu einer anderen Grundgesamtheit gehört. Bei den Lipidkonzentrationen im Blutplasma könnte beispielsweise eine unbekannte Erkrankung, ein genetischer Einfluss oder ein Messfehler die Ursache für einen „Ausreisser“ sein, der die Messergebnisse, z.B. Mittelwert, Standardabweichung und t- Test, verfälscht.

Für Stichproben im Umfang von bis zu 25 hat Dixon einen Test entwickelt, der es herauszufinden erlaubt, ob stark abweichende Messwerte als Ausreisser zu klassifizieren sind oder nicht.⁴² Voraussetzung für den Test ist die Normalverteilung der Grundgesamtheit. Die Messwerte werden der Reihenfolge nach sortiert, dann wird die Differenz zwischen dem höchsten und dem zweithöchsten, bzw. dritthöchsten Messwert mit der gesamten Spanne der Messwerte verglichen. Ob ein Ausreisser vorliegt oder nicht, ergibt sich durch Vergleich mit tabellierten Werten.⁴¹

Als letzter Punkt in diesem Kapitel soll hier die Korrelationsanalyse genannt werden. Sie untersucht, ob ein linearer Zusammenhang zwischen zwei Messgrößen besteht. Der Korrelationskoeffizient r einer Stichprobe von Messwertepaaren x und y ist eine dimensionslose Zahl zwischen -1 und 1 , die abschätzt, ob die Grundgesamtheit der Messwerte einen linearen Zusammenhang zwischen x und y aufweist.

$$r = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \cdot \sigma_y}$$

σ_x und σ_y sind die Standardabweichungen der Variablen x und y , σ_{xy} ist definiert als:

$$\sigma_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum ((x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}))$$

Sind die Messgrößen x und y normalverteilt, dann kann man aus Korrelationskoeffizient, Umfang der Stichprobe und t - Verteilung den Wahrscheinlichkeitswert für die Hypothese berechnen, dass x und y der Grundgesamtheit miteinander korrelieren.

3.3 Quantifizierung im Gewebe

Phospholipide im Gewebe befinden sich fast ausschließlich in den Membranen. Die Zellmembran trennt das Zytoplasma von der äußeren Umgebung der Zelle ab. Analog dazu gibt es innere Membrane, die innerhalb der Zelle verschiedene Organellen räumlich von anderen Strukturen abtrennen. Zellmembrane sind Doppelschichtstrukturen von Phospholipiden, in denen Cholesterin, Proteine und Glykolipide eingelagert sind. Während die Doppelschicht nahezu undurchlässig für wasserlösliche Moleküle und Ionen ist, regeln die Membranproteine vor allem den Ionen- und Molekültransport in die Zelle hinein und aus der Zelle heraus.

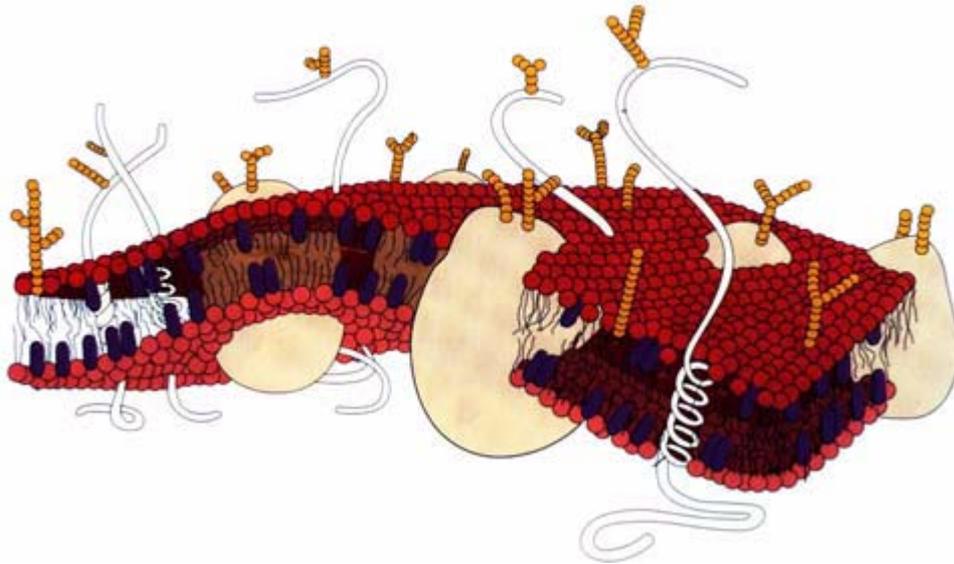


Abbildung 24: Modell einer Erythrocytenmembran.⁴³ In die Phospholipiddoppelschichten (rot) sind Cholesterinmoleküle eingelagert (dunkelblau) sowie Transportproteine (hellgelb), andere Proteinstrukturen (weiss) und Kohlenhydratsegmente (dunkelgelb).

Zur Vorbereitung einer Zellprobe für die ^{31}P -NMR-Spektroskopie wurde die gleiche Technik angewandt, wie zur Vorbereitung des Blutplasmas, jedoch wurde eine höhere Natriumcholatkonzentration (200 mmol / l in der fertigen Probe) verwendet. Zusätzlich wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt, um die Zerstörung der Doppelschichtstruktur der Zellmembran und die Bildung von gemischten Mizellen zu fördern. Cullis und Grathwohl fanden auf diese Weise NMR-spektroskopisch 98 % der vorhandenen Phospholipide,⁴⁹ so dass man von einer quantitativen Methode sprechen kann, die auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet wird.⁵⁰

4 $^1\text{H-NMR-Spektroskopie der Lipide}$

Bereits im Jahr 1957 hat eine schwedische Forschergruppe $^1\text{H-NMR-Spektren}$ einiger Körperflüssigkeiten wie menschlicher Muttermilch bei 21 MHz aufgenommen.⁴ Erst wesentlich später, im Jahr 1986, haben Fossel, Carr und McDonagh mit ihrer Veröffentlichung über unterschiedliche Linienbreiten der Lipoproteinsignale im Blutplasma von gesunden Probanden und von Krebspatienten in der medizinischen Welt für Aufregung gesorgt.⁴⁴ Die Ergebnisse konnten zwar in einigen Fällen reproduziert werden, litten aber an zu geringer Sensitivität, Spezifität, und Voraussagekraft.⁴⁵ Trotzdem war diese Arbeit der Startschuss für eine Vielzahl weiterer Untersuchungen mit dem Ziel, pathologische Veränderungen in Körperflüssigkeiten NMR-spektroskopisch nachzuweisen und die NMR-Spektroskopie für die klinische Diagnostik nutzbar zu machen.

Inzwischen wurden auch von vielen anderen Körperflüssigkeiten $^1\text{H-NMR-Spektren}$ gemessen, die intensiv auf ihren klinischen Nutzen geprüft wurden, z.B. von Urin, Gehirnflüssigkeit, Vollblut, Samenflüssigkeit, Gallenflüssigkeit, Fruchtwasser, Gelenkflüssigkeit, Speichel, Verdauungsflüssigkeiten und Flüssigkeiten in Zysten.^{46, 47, 48}

Im Gegensatz zur $^{31}\text{P-NMR-Spektroskopie}$ findet man im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von biologischen Proben eine Vielzahl von Signalen, in den meisten Fällen auch mehrere pro Verbindung. Häufig überlagern sich die Signale gegenseitig, so dass eine Zuordnung schwierig ist. Im Blutplasma kommt als Besonderheit hinzu, dass nicht alle Substanzen in wässriger Phase löslich sind. Wasserlösliche kleine Moleküle rufen Signale geringer Linienbreite hervor, Lipide in den Lipoproteinen dagegen Signale hoher Linienbreite. Wichtig für die Spektrenqualität ist eine gute Wasserunterdrückung, es sei denn, es handelt sich um Spektren von organischen Extrakten in deuterierten Lösungsmitteln.

4.1 Blutplasmaspektren

Die Signalzuordnung der $^1\text{H-NMR-Spektren}$ von Blutplasma wurde der Literatur entnommen.⁵² Sie ist für die wichtigsten Signale tabellarisch zusammengefasst. Da sich diese Arbeit mit Lipidkonzentrationen befasst, wurden nicht alle Resonanzen aufgeführt, zumal sich viele Signale kleiner Moleküle so stark überlagern, dass mittels eindimensionaler $^1\text{H-NMR-Spektren}$ die Signale nicht eindeutig zuzuordnen sind.

Besonders soll hier darauf hingewiesen werden, dass die Signalintegrale der $^1\text{H-NMR-Spektren}$ nur unter der Bedingung direkt proportional zur Stoffkonzentration sind, dass die Substanz homogen und vollständig löslich ist. Für Lipidmoleküle gilt dies nicht. Hier spielt die molekulare Beweglichkeit im Lipoprotein oder in der Zellmembran eine entscheidende Rolle. Ist die Beweglichkeit einer Teilstruktur der Fettsäurekette zu gering, so wird das Signal zu breit, um im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ sichtbar zu sein. Teilstrukturen von Lipiden mit einer höheren Beweglichkeit sind als Signal erkennbar, die Beweglichkeit ist aber immer noch gering, verglichen mit homogen gelösten hydrophilen Molekülen, daher haben Signale von Lipiden generell eine deutlich höhere Linienbreite im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von Blutplasma als beispielsweise Aminosäuren und Zucker.

Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen Ausschnitte eines typischen $^1\text{H-NMR-Spektrums}$ von Blutplasma. In Tabelle 5 sind die für die Arbeit bedeutsamen Signale den zugehörigen Substanzen zugeordnet.

Tabelle 5: Chemische Verschiebungen im ¹H-NMR-Spektrum von Blutplasma

Nummer	chemische Verschiebung	Substanz
1	0,00 ppm ⁵⁹	TMSP, Trimethylsilylpropionat (Standard)
2	0,66 - 0,70 ppm	Cholesterin (C18)
3	0,84 - 0,87 ppm	Triglycerid, CH ₃ - Gruppen
4	0,93 - 1,13 ppm	Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Valin), CH ₃ - Gruppen
5	1,25 ppm	Triglycerid, CH ₂ - Gruppen (LDL)
6	1,29 ppm	Triglycerid, CH ₂ - Gruppen (VLDL)
7	1,33 ppm	Lactat, CH ₃ - Gruppe
8	1,46 ppm	Alanin, CH ₃ - Gruppe
9	1,57 ppm	Triglycerid, β - Carbonylprotonen (VLDL)
10	2,00 ppm	Triglycerid, allylische Protonen
11	2,04 ppm	Glycoprotein, Acetylgruppen
12	2,23 ppm	Triglycerid, α - Carbonylprotonen
13	2,72 ppm	Triglycerid, doppelt allylische Protonen
14	2,9 - 3,1 ppm	Albumin, ε-CH ₂ - Gruppen
15	3,21 ppm	Cholin, Trimethylammoniumgruppe
16	3,27 ppm	β-D-Glucose (H2)
17	3,4 - 4,2 ppm	vor allem Kohlenhydrate und Aminosäuren
18	4,70 ppm	Wasser
19	5,23 ppm	α-D-Glucose (H1)
20	5,29 ppm	Triglycerid, olefinische Protonen

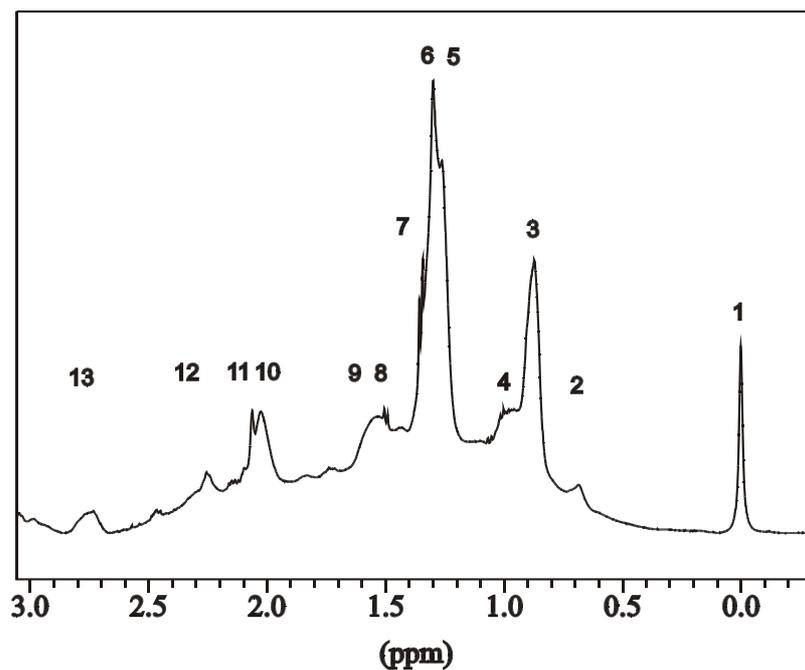


Abbildung 25: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Blutplasma mit Standardlösung, Resonanzbereich von -0,3 ppm bis bis 3,1 ppm. Signalzuordnung siehe Tabelle 5.

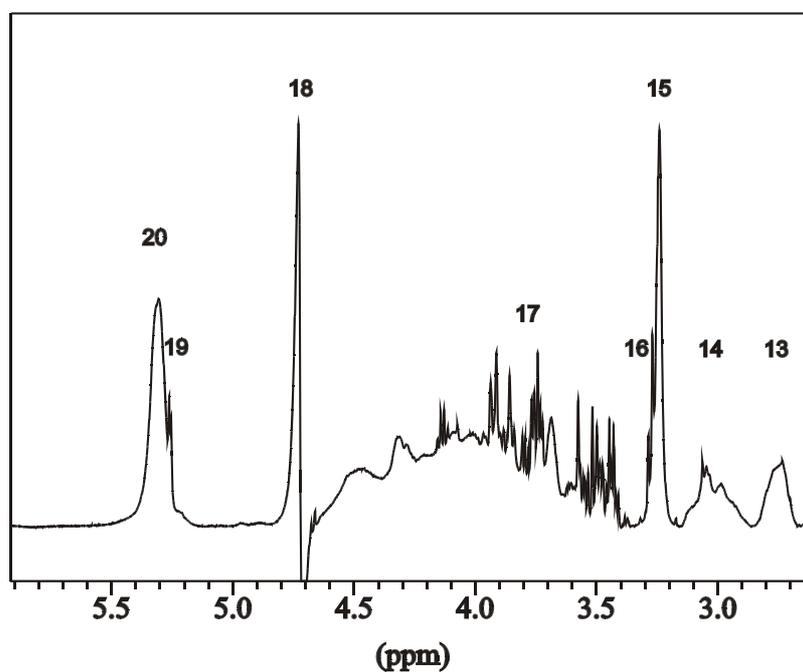


Abbildung 26: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Blutplasma mit Standardlösung, Resonanzbereich von 2,6 ppm bis 5,9 ppm. Signalzuordnung siehe Tabelle 5.

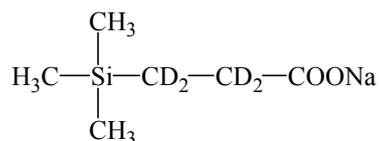
Das Methylensignal in Abbildung 25 ist aufgespalten (Signale 5 und 6). Dies ist ein Beispiel für die leicht unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Fettsäuren in unterschiedlicher chemischer Umgebung.

Bell und Mitarbeiter haben für die verschiedenen Lipoproteinfraktionen HDL, LDL und VLDL sowie für Chylomikronen und Plasmaalbumin Modellspektren aufgenommen, deren chemische Verschiebungen bestimmt und den Spektrenhabitus beschrieben.⁵³ Otvos und Mitarbeiter entwickelten auf dieser Grundlage ein Iterationsverfahren, das aus unterschiedlichen Modellspektren Plasmaspektren simuliert und mit einem gemessenen Spektrum vergleicht, woraus die Lipoproteinkonzentrationen berechnet werden können.^{54,55} Inzwischen kann man die Lipoproteinkonzentrationen auch mit Hilfe neuronaler Netze bestimmen: In der Trainingsphase wertet das neuronale Netz ^1H -Plasma-NMR-Spektren mit bekannten Lipoproteinkonzentrationen aus. Ist es einmal trainiert kann es nach Eingabe des ^1H -Plasma-NMR-Spektrums die Lipoproteinkonzentrationen quantifizieren.^{56,57,58}

4.1.1 Standardisierung

Die Blutplasmaproben wurden wie in Abschnitt 3.2.1. zur ^{31}P -NMR-Spektroskopie beschrieben gewonnen. Einzige Ausnahme: Die Blutgerinnung wurde durch Heparin gehemmt, und nicht durch EDTA, da die ^1H -NMR-Signale des EDTA das Signal der Methylgruppen des Cholins überlagern. Heparin hat ^1H -Resonanzsignale im Bereich zwischen 3,2 ppm bis 5,5 ppm. Die Heparinkonzentration ist jedoch so gering, dass die Signale nicht stören, außerdem spielt der Spektrenbereich zwischen 3,2 ppm und 5,0 ppm bei der Auswertung der Lipidkonzentrationen keine Rolle.

Als Standardsubstanz wurde 3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3- D_4]-natriumpropionat (TMSP) gewählt (Abbildung 27). Die Substanz ist luft- und wasserstabil, außerdem leicht einwiegar. Sie ist gut löslich und hat im ^1H -NMR-Spektrum ein Singulett mit einer chemischen Verschiebung von genau 0,00 ppm,⁵⁹ wo kein anderes scharfes Signal im ^1H -NMR-Spektrum von Blutplasma auftritt.

Abbildung 27: 3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3-D₄]-natriumpropionat (TMSP).

Für die Standardlösung wurden 430,53 mg TMSP eingewogen und mit D₂O auf 100 ml aufgefüllt. Das entsprach einer TMSP Konzentration von 25 mmol/l. Die Standardlösung war über den ganzen Zeitraum der Messungen hinweg stabil, es musste keine zweite Lösung angesetzt werden. Für die NMR-Messung wurde 1 ml einer Lösung aus 1,6 ml des aufgetauten Blutplasmas und 0,4 ml Standardlösung in ein 5 mm NMR Röhrchen gegeben und vermessen.

4.1.2 Das Pulsprogramm NOESYPR1D

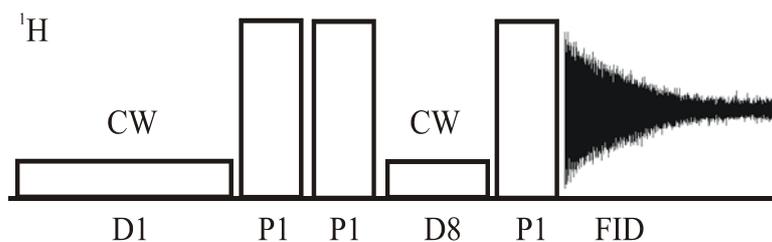


Abbildung 28: NOESYPR1D Pulssequenz.

Zur Wasserunterdrückung wurde das Pulsprogramm NOESYPR1D genutzt. Während des Relaxationsdelays D1 wird selektiv in der Frequenz des Wassersignals mit niedriger Leistung im CW-Modus eingestrahlt (Vorsättigung). Dadurch werden die Besetzungszahlen der Energieniveaus ausgeglichen, so dass die z-Magnetisierung von Wasser verschwindet. Die beiden hintereinandergeschalteten harten 90°-Impulse entsprechen zusammen einem 180°-Impuls, der

die Magnetisierung von der z-Achse auf die (-z)-Achse transferiert. Die Mischzeit D8 ist so niedrig gewählt, dass sich kein NOE aufbauen kann. Durch die CW-Einstrahlung während D1 und D8 wird das Wassersignal zum größten Teil unterdrückt. Ein letzter 90°- Messimpuls schließt die Pulsfolge ab. Die Phasenzyklen der drei 90°- Pulse und der Detektionsspulen sind so voreingestellt, dass das Wassersignal optimal unterdrückt wird und das Spektrum artefaktfrei ist (aufgrund der Phasenzyklen kann man die beiden 90°- Pulse nicht zu einem 180°- Puls zusammenfassen).

Gemessen wurde bei 500,13 MHz. Als Messfrequenz wurde die Resonanzfrequenz des Wassersignals gewählt. Die Spektrenweite betrug $SW = 12$ ppm, die Impulslänge von $12 \mu\text{s}$ entsprach einem Impulswinkel von 90°. Aus den Delays $D1 = 3$ s und $D8 = 0,15$ s sowie der Aquisitionszeit $AQ = 2,72$ s ergab sich eine Repetitionszeit von 5,87 s. 256 FIDs mit einer TD von 32 k Datenpunkten wurden akkumuliert, einem Zero Filling auf 128 k unterworfen und nach einer exponentiellen Multiplikation mit $e^{-(0,3\text{Hz} \cdot t)}$ fouriertransformiert.

Die Messungen wurden mit längeren Delays D1 wiederholt. Der Vergleich mit den Spektren, die mit den oben angegebenen Parametern aufgenommen wurden, zeigte, dass die Repetitionszeit unter diesen Bedingungen ausreichend ist.

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurde nur eine Phasenkorrektur nullter Ordnung durchgeführt (eine Phasenkorrektur erster Ordnung könnte nur reproduzierbar durchgeführt werden, wenn es im Spektrum neben dem Standardsignal ein zweites Signal gäbe, das sich zur Phasenkorrektur eignete). Die Basislinie wurde lediglich auf Grundlage eines Polynoms nullter Ordnung korrigiert.

Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 37°C aufgenommen, da die Lipidsignale, vor allem Methyl- und Methylengruppensignale, sowie das Signal von Cholesterin bei 0,70 ppm bei niedrigeren Temperaturen deutlich breiter sind und sich weniger von der Basislinie abheben (vergleiche Abbildung 29).⁵²

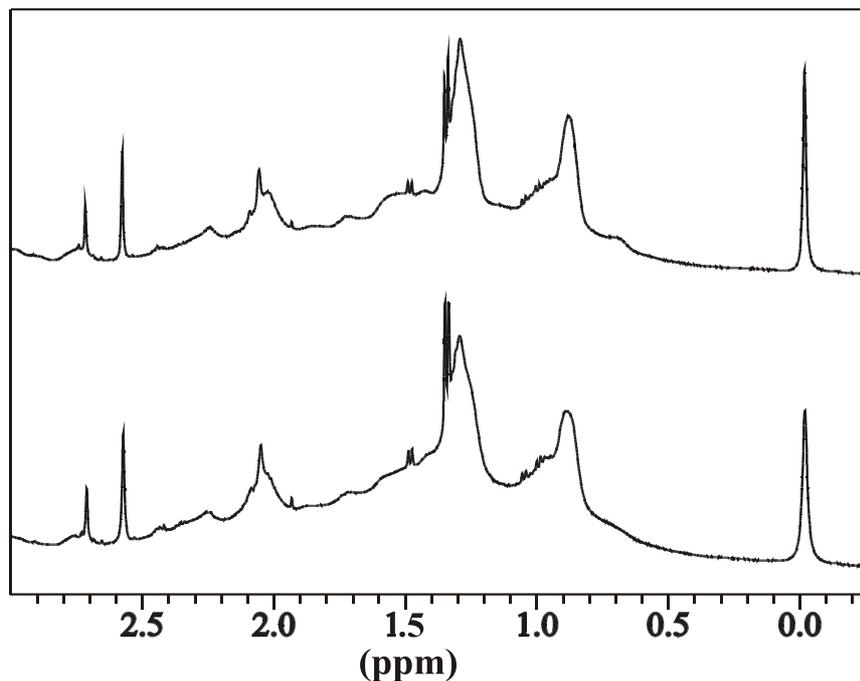


Abbildung 29: ^1H -NMR-Spektrum von Blutplasma mit Standard bei 37 °C (oben) und 20°C (unten), Spektrenbereich von 3,0 ppm bis -0,2 ppm.

4.1.3 Quantitative Auswertung mit AMIX

Aufgrund der sich überlagernden sehr unterschiedlichen Signale in den ^1H -NMR-Plasmaspektren ist eine Integration auch mit Dekonvolutionsmethoden (unter 3.2.3 beschrieben) unverhältnismäßig aufwendig und die Reproduzierbarkeit nur schwierig zu erreichen. Daher wurde hier eine andere Methode angewandt, die einfache Möglichkeiten der Automatisierung bietet: Das Spektrum wurde in ppm Bereiche gleicher Breite aufgeteilt und jeder dieser Bereiche scheinweise mit dem Programm Amix der Firma Bruker integriert. Beinhaltet ein Signal zum Beispiel 5 dieser ppm Bereiche, so ist die Summe der 5 Integrale über diese ppm Bereiche identisch mit dem Gesamtintegral und somit direkt proportional zur Stoffkonzentration. Nachteil dieser Methode ist, dass Stoffkonzentrationen nicht ohne spezielle Methoden bestimmbar sind, wenn sich Signale überlagern. Vorteil ist, dass man sehr leicht mit statistischen Verfahren signi-

fikante Unterschiede in Spektren aufdecken kann, da der Datensatz eines Spektrums von TD Datenpunkten auf $n \cdot \Delta\text{ppm}$ Datenpunkte reduziert wird, die leicht in Tabellenkalkulationsprogrammen ausgewertet werden können.

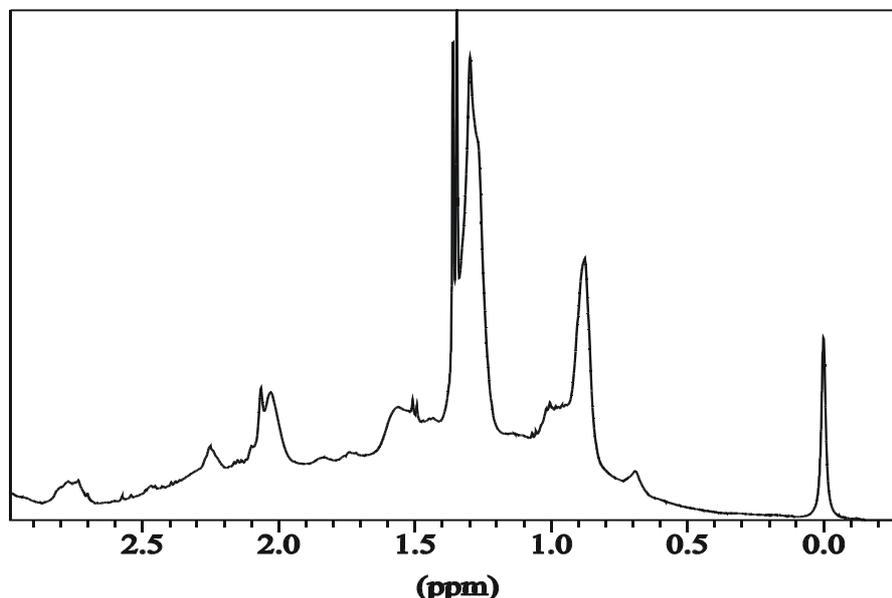


Abbildung 30: ¹H-NMR-Spektrum von Blutplasma mit Standard, Spektrenbereich von 3,0 ppm bis -0,3 ppm, zum Vergleich mit dem Diagramm der Scheibchenintegrale des gleichen Spektrums (Abbildung 31).

Die Integralbreite wurde auf 0,00293 ppm gesetzt (in Abbildung 31 ist sie der Anschaulichkeit wegen höher eingestellt), was einer Frequenz von 1,47 Hz entspricht. Das Standardsignal war ein Singulett mit zwei ²⁹Si-Satelliten niedriger Intensität bei 0,117 ppm und -0,120 ppm. Das Integral des Standardsignals wurde bestimmt, indem die Summe der Scheibchenintegrale von 0,137 ppm bis -0,153 ppm gebildet wurde und der darin enthaltene Anteil des breiten Proteinsignals davon abgezogen wurde. Die Signalform des Standardsignals kann durch eine Lorentzfunktion beschrieben werden, deren Intensitätsabfall in Abhängigkeit zur Resonanzfrequenz folgendermaßen beschrieben werden kann:

$$I(\nu) \propto \frac{M_0 T_2^*}{1 + (2\pi T_2^* \Delta\nu)^2}$$

$$\text{Halbwertsbreite} = \frac{1}{\pi \cdot T_2^*}$$

Aus $\Delta\nu = 68,4 \text{ Hz}$ und $T_2^* \geq 8,8 \text{ Hz}$ berechnet sich eine Signalintensität an den Integrationsgrenzen von 0,4 %. $\int I(\nu) d\nu$ lässt sich analytisch lösen. Daraus kann man berechnen, dass mit diesen Integrationsgrenzen 95,7 % des Standardsignals erfasst werden. Zur quantitativen Standardisierung des Spektrums wurden die Scheibchenintegrale über den ganzen Spektrenbereich auf das so berechnete Standardintegral normiert.

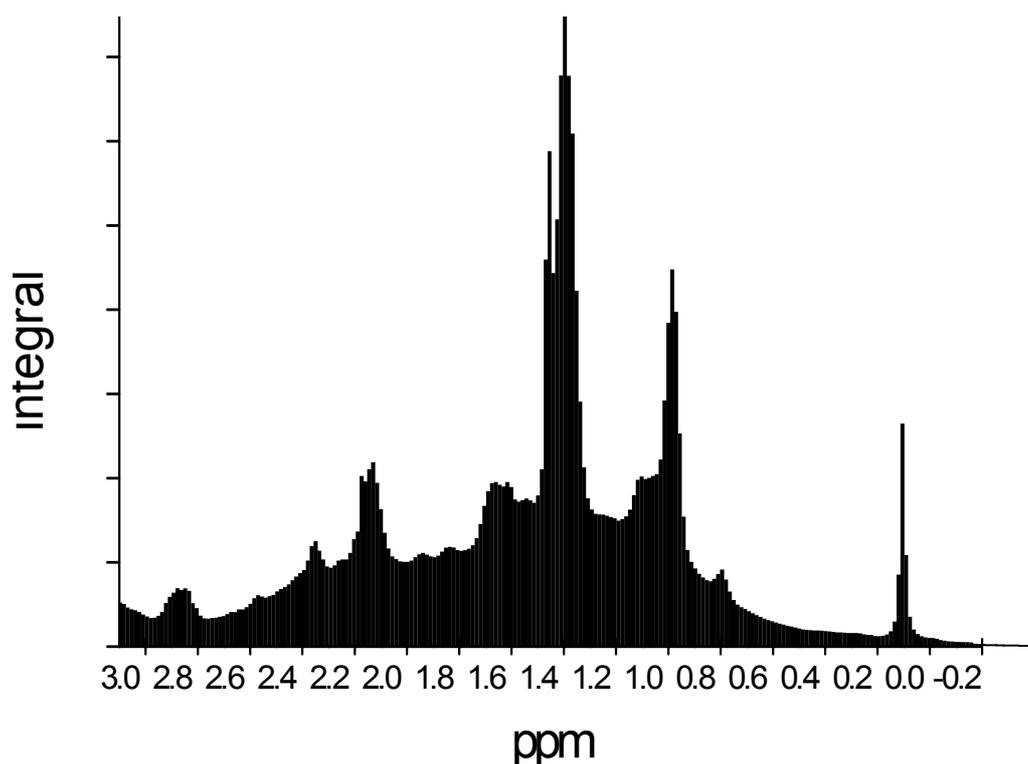


Abbildung 31: Diagramm der Scheibchenintegrale eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Blutplasma mit Standard nach Integration mit Amix, Bereich zwischen 3 ppm und -0,3 ppm. Die Breite der Scheibchen ($\Delta\text{ppm} = 0,0029$) ist zur besseren Veranschaulichung vergrößert dargestellt ($\Delta\text{ppm} = 0,0154$).

Bei genügend kleinen Δppm -Werten erreicht man, dass das Diagramm der Integrale einen ähnlichen Habitus hat wie ein herkömmliches Spektrum. Dadurch ist gewährleistet, dass die Werte der Integrale eine gute Näherung für die tatsächlichen Signalintensitäten darstellen, was für die Signalhöhe nicht gilt.

Für diese statistische Auswertung der in Scheibchenintegrale eingeteilten Spektren wurden die in 3.2.4. genannten Methoden eingesetzt. Man kann Mittelwertspektren berechnen, Standardabweichungen und t-Tests in Abhängigkeit der chemischen Verschiebung durchführen.

Die quantitative Auswertung erfolgte auch für einzelne Lipidsignale, beispielsweise Methylengruppen von Fettsäuren. Dazu wurde im Diagramm der Integralscheibchen eine obere und eine untere ppm-Grenze definiert, zwischen denen im Spektrum das Signal liegt (g1 und g2 in Abbildung 32). Der Integralwert bei g1 und g2 sei G1 und G2. Die normierten Integralscheibchen dieses Bereichs zwischen g1 und g2 wurden aufsummiert. Aufgrund von Überlagerungen mit sehr breiten ¹H-NMR-Signalen, beispielsweise von Albumin, liegt das Lipidsignal nicht auf der Basislinie, sondern auf einer mehr oder weniger angehobenen Grundlinie. Dadurch wird das Integral erhöht, ohne dass dies auf das Lipidsignal zurückzuführen wäre. Daher wurde von den vorher aufsummierten Integralen der Integralbeitrag unter der angehobenen Grundlinie zwischen g1 und g2 abgezogen. Dies erfolgte unter der Annahme, dass diese Grundlinie im Spektrenbereich des Lipidsignals einen linearen Verlauf hat [Gerade von Punkt (g1;G1) zu Punkt (g2;G2)], was natürlich nur näherungsweise zutrifft. Ferner wurde der Anteil des scharfen Signals von Lactat im Bereich zwischen 1,380 ppm (u1) und 1,338 ppm (u2) von der Summe der Integrale abgezogen. Der Integralwert bei u1 und u2 sei U1 und U2. Der Vorteil dieser Methode ist ihre leichte Reproduzierbarkeit und einfache Rechenvorschrift.

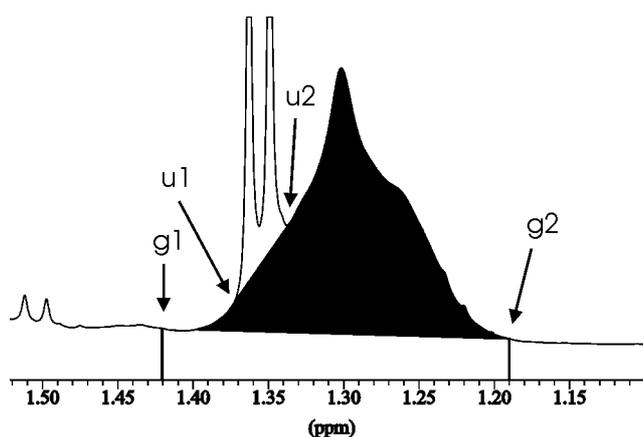


Abbildung 32: ¹H-NMR-Spektrum von Blutplasma: Diagramm der Integralscheibchen, Bereich der Methylenprotonen. Die Integration des Methylensignals erfolgte zwischen den Grenzen g1 und g2. Der Anteil des überlagernden Signals von Lactat zwischen u1 und u2 wurde abgezogen.

Die Teilintegrale zur Berechnung des Integrals des Methylensignals wurden folgendermaßen berechnet (g1, g2, u1 und u2 siehe Abbildung 32):

Gesamtintegral zwischen g1 und g2: Summe aller Scheibchen zwischen g1 und g2.

Untergrund zwischen g1 und g2: $0,5 * (G1 + G2) * \text{Scheibchenzahl zwischen g1 und g2}$.

Gesamtintegral zwischen u1 und u2: Summe aller Scheibchen zwischen u1 und u2.

Untergrund zwischen u1 und u2: $0,5 * (U1 + U2) * \text{Scheibchenzahl zwischen u1 und u2}$.

Das so berechnete Integral des Methylensignals ist proportional zur Konzentration des „sichtbaren“ Anteils der CH₂-Gruppen im Blutplasma. Um die Konzentration der „sichtbaren“ CH₂-Gruppen im Blutplasma in mmol/l angeben zu können, wurde die Zahl der Protonen mitberücksichtigt (2 Protonen für die Methylengruppen, also wurde das Integral der Methylenprotonen durch zwei geteilt, um die Zahl der Methylengruppen zu berechnen).

Die Lipidsignale, die mit dieser Methode integriert wurden, sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Spektrenbereiche für die quantitative Analyse der ¹H-NMR-Spektren.

Signal	Spektrenbereich g1 - g2 (in ppm)	Überlagerung u1 - u2 (in ppm)
olefinische Protonen unges. Fettsäuren	5,420 - 5,240	5,270 - 5,250 (α- Glucose)
Cholin	3,350 - 3,200	3,350 - 3,260 (β- Glucose)
Methylengruppen mit zwei benachbarten Doppelbindungen	2,870 - 2,680	keine
α- Carbonylprotonen von Fettsäuren	2,300 - 2,200	keine
Methylengruppen gesättigter Fettsäuren	1,420 - 1,190	1,380 - 1,338 (Lactat)
Methylgruppen von Fettsäuren	0,940 - 0,820	keine
Methylgruppen von Cholesterin	0,750 - 0,630	keine

Trotz reproduzierbarer Spektrenaquisition und Prozessierung muss man berücksichtigen, dass nicht die gesamte Stoffmenge an Lipiden im ¹H-NMR-Spektrum sichtbar ist, sondern nur der sogenannte „sichtbare“ Anteil, also der Anteil, dessen Protonen beweglich genug sind, um im hochaufgelösten NMR-Spektrum ein sichtbares Signal hervorzurufen.

Den Beweis liefern ¹H-NMR-Spektren von Blutplasma, die mit der MAS-Technik bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten aufgenommen wurden.

In Festkörpern werden aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Moleküle die dipolaren Kern-Kern-Wechselwirkungen und andere Anisotropieeffekte nicht mehr durch die Molekülbewegung ausgemittelt. Dies führt in der Regel zu sehr breiten Signalen, die mit den Methoden der NMR-Spektroskopie in Lösung nicht aufgelöst werden können. Quantenmechanische Berechnungen zeigen, dass diese Anisotropieeffekte reduziert werden können, wenn die Probe im sogenannten magischen Winkel von 54,7° zur Richtung des äußeren Magnetfelds mit hoher Geschwindigkeit rotiert wird. Dadurch gelingt es, die Linienbreite soweit zu vermindern, dass interpretierbare Spektren aufgenommen werden können.

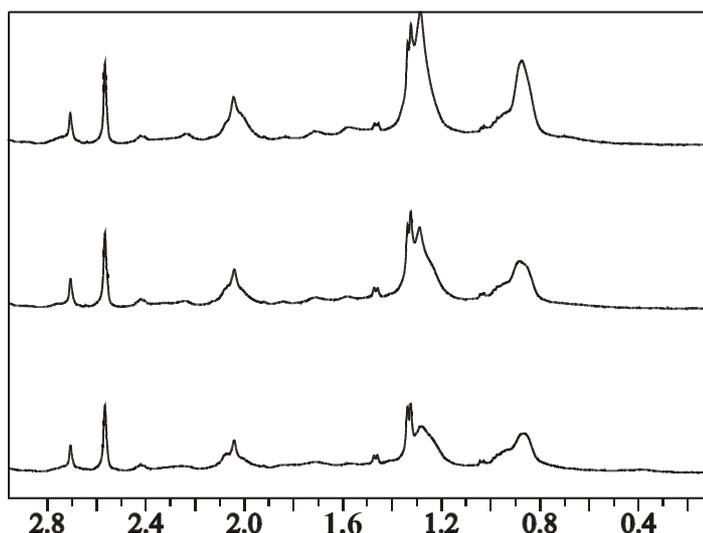


Abbildung 33: ¹H-NMR-Spektrum von Blutplasma, Spektrenbereich von 3,0 ppm bis 0,1 ppm. Rotationsfrequenz im magischen Winkel 12 kHz (oben), 5 kHz (Mitte) und 300 Hz (unten).

Tabelle 7: Signalerhöhung bei Rotation um den magischen Winkel, Vergleich mit dem bei 300 Hz aufgenommenen Spektrum, Referenz: Na₂EDTA-Signale bei 2,55 ppm und 2,70 ppm (Abbildung 33).

Rotationsfrequenz	CH ₂ -Signal	CH ₃ -Signal
5 kHz	+ 55 %	+ 8 %
12 kHz	+ 136 %	+ 76 %

Man findet einen deutlichen Intensitätsgewinn bis zu 55 % im Lipidbereich der ^1H -NMR-Spektren von Blutplasma, wenn während der Messung mit 5 kHz um den magischen Winkel rotiert wird. Das bei 300 Hz Rotation gemessene Spektrum gibt also offensichtlich nur Informationen über einen Teil der Lipide wieder, die in der Probe enthalten sind. Erhöht man die Rotationsfrequenz weiter auf 12 kHz, so findet man eine weitere deutliche Abnahme der Linienbreite. Da diese hohen Rotationsfrequenzen im Hause nicht routinemäßig realisiert werden konnten, wurde für die Spektroskopie an Blutplasma von Patientenkollektiven ganz auf den Einsatz der MAS-Technik verzichtet.

5 Anwendung der NMR-Spektroskopie auf die Diagnostik bei Schilddrüsenerkrankungen

Mit der in Kapitel 3 und 4 vorgestellten Methodik wurden gesunde Probanden untersucht sowie Patienten mit den in der Aufgabenstellung genannten Befunden. Im Folgenden wird für jeweils ein Krankheitsbild die Pathologie kurz beschrieben, danach werden jeweils die Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Eine zusammenfassende Diskussion wäre aufgrund der unterschiedlichen Krankheitsbilder unübersichtlich.

5.1 Schilddrüsenerkrankungen

5.1.1 Physiologie^{60, 61}

Die Schilddrüse ist eine stark durchblutete Drüse unterhalb des Kehlkopfes, deren wichtigste Aufgabe die Produktion des Schilddrüsenhormons Tetraiodothyronin (Thyroxin, T₄, Abbildung 35) ist. Iodidionen werden aktiv aus der Blutbahn in die Schilddrüse transportiert und dort enzymatisch zu elementarem Iod oxidiert. Die Drüsenzellen sind kleine Follikel (Schläuche), in deren Innerem das spezielle Schilddrüsenprotein Thyreoglobulin (TG) gespeichert ist. Die Tyrosinreste (Abbildung 34) des Thyreoglobulins können in mehreren Schritten enzymatisch iodiert werden und aneinander koppeln. T₄ wird bei Bedarf vom Protein abgespalten und gelangt in die Blutbahn. In der Peripherie kann T₄ zu T₃ (Abbildung 35), dem in den Zielzellen wirksamen Hormon, deiodiert werden. Wichtige Parameter der Schilddrüsenfunktion sind die freien Konzentrationen von T₃ und T₄ im Blutplasma (fT₃ und fT₄).

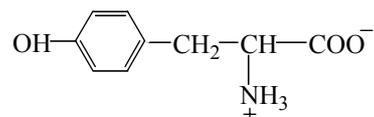


Abbildung 34: Tyrosin, eine aromatische Aminosäure, aus der die Schilddrüsenhormone gebildet werden.

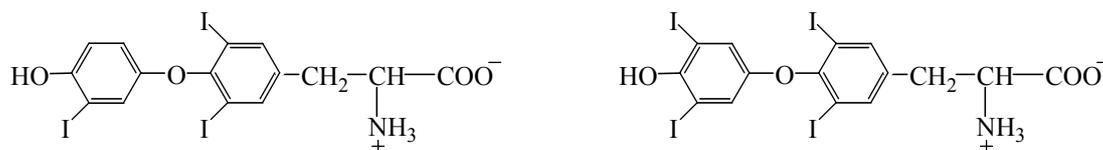


Abbildung 35: Die freien Schilddrüsenhormone Triiodothyronin (fT3) und Tetraiodothyronin (Thyroxin, fT4).

Die Ausschüttung der Schilddrüsenhormone wird durch zwei andere Hormone gesteuert, die im Gehirn produziert werden und von dort aus in die Blutbahn gelangen, dem TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) und TSH (Thyroid Stimulating Hormone, Trivialname Thyrotropin).⁶² Zwischen diesen 4 Hormonen besteht eine enge Kopplung (Abbildung 36): TRH stimuliert die TSH Bildung, dieses wiederum die T3 und T4 Synthese. Hohe T3 und T4 Konzentrationen hemmen dagegen die TSH und die TRH Bildung. Produziert die Schilddrüse kein oder nur wenig T3 und T4 (Schilddrüsenunterfunktion), so misst man im Blutplasma hohe TSH Konzentrationen. Neigt die Schilddrüse zu einer Überproduktion an T3 und T4 (Schilddrüsenüberfunktion), so findet man niedrige TSH Konzentrationen. Eine Schilddrüsenunterfunktion nennt man Hypothyreose, eine Schilddrüsenüberfunktion Hyperthyreose. Analog spricht man von hypothyreotem oder hyperthyreotem Zustand. Gesunde Probanden haben dagegen normale Schilddrüsenhormonwerte, diesen Zustand nennt man euthyreot.

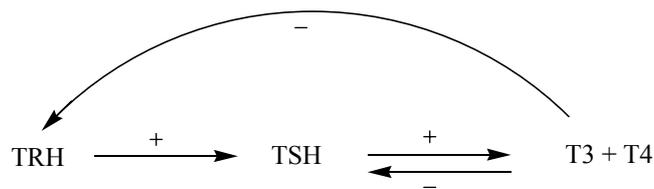


Abbildung 36: Regelkreis der Schilddrüsenhormone T3 und T4 durch TRH (Thyroid Releasing Hormone) und TSH (Thyroid Stimulation Hormone). Eine positive Rückkopplung (+) bedeutet, dass die Substanz stimulierend auf die Neubildung desjenigen Stoffes wirkt, auf den der Pfeil zeigt, eine negative Rückkopplung (-) hemmt dagegen die Neubildung.

Bei Hyperthyreosen ist der Regelkreis in Abbildung 36 gestört. Von einer latenten Hyperthyreose spricht man, wenn die fT3 und fT4 Konzentrationen noch im oberen normalen Bereich sind, die TSH Konzentration als Regulationsinstrument aber schon bei 0 angelangt ist. Wenn die Schilddrüse aus diversen Gründen weiter die Hormonproduktion steigern sollte, hat der Organismus kein Instrument mehr, um die Hormonproduktion zu vermindern. Das Ergebnis ist dann eine manifeste Hyperthyreose. Bei ihr sind fT3 und fT4 gegenüber gesunden Probanden erhöht bei gleichzeitiger niedriger TSH Konzentration.

T3 und T4 haben ausgesprochen vielfältige Wirkungen im Körper. Die Rezeptoren in den Zielzellen sitzen vor allem am Zellkern. Der Hormonrezeptorkomplex bindet sich an die DNA und löst dadurch eine Aktivierung der Proteinsynthese aus.⁶³ Ferner stimuliert T3 die für den Energiestoffwechsel wichtige Na⁺-K⁺-ATPase.⁶⁴ Es kommt unter anderem zu einer katabolischen Wirkung, zu einem erhöhten Energiestoffwechsel⁷⁰ und Grundumsatz, das Wachstum wird gefördert und die Lipidkonzentration im Blut gesenkt.

Der Einfluss der Schilddrüsenhormone auf die Phospholipidkonzentration im Blutplasma war in dieser Arbeit wichtig in Bezug auf das im nächsten Kapitel beschriebene Schilddrüsenkarzinom.

5.1.2 Ergebnisse

Von 17 Patienten mit Schilddrüsenunterfunktion wurde wie in Abschnitt 3.2.1. beschrieben Blutplasma entnommen. Die Patienten hatten eine Vorgeschichte als Karzinompatienten, befanden sich aber zum Zeitpunkt der Untersuchung mindestens 6 Monate im Zustand der Remission, also ohne Krebsgewebe im Organismus, was durch regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen überprüft wurde.

Als Folge der Therapie des Schilddrüsenkarzinoms hatten die Patienten kein Schilddrüsengewebe mehr, der Organismus verfügte also nicht mehr über körpereigene Schilddrüsenhormone. Stattdessen wurden künstlich hergestellte Schilddrüsenhormone eingenommen (Substitutionstherapie). Der Hormonhaushalt ist bei diesen Patienten üblicherweise auf einen euthyreoten bis grenzwertig hyperthyreoten Zustand eingestellt, der nur bei speziellen Nachsorgeuntersuchungen (Ganzkörperszintigraphie) aus diagnostischen Gründen (siehe Kapitel 5.2.1.) aufgegeben und in einen hypothyreoten Zustand überführt werden muss. Von den hypothyreot vermessenen Patienten wurde im euthyreoten bis latent hyperthyreoten Zustand eine zweite Plasmaprobe genommen und mit der hypothyreoten verglichen.

Zur Kontrolle des hypothyreoten Zustands diente die TSH Konzentration im Blutplasma, die bei gesunden Probanden 1.1 ± 1.0 mU/l beträgt. Die Einheit U ist in der medizinischen Literatur für jedes Enzym spezifisch definiert. Ein U (unit) ist die Menge des Enzyms, die einen bestimmten Stoffumsatz pro Minute unter definierten Standardbedingungen bewirkt.

Mit Hilfe der oben vorgestellten Methodik wurden die Konzentrationen von PE+SM, LPC1, LPC2, PI und PC NMR-spektroskopisch gemessen. In der Klinik für Nuklearmedizin wurde zusätzlich routinemäßig der Parameter TSH für die Patienten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8, Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgeführt:

Vergleicht man die Mittelwerte der Phospholipidkonzentrationen (Tabelle 8 und Tabelle 9), so stellt man fest, dass alle Mittelwerte des hypothyreoten Kollektivs höher liegen als die des euthyreoten Kollektivs, und zwar zwischen 61 % (PI) und 20 % (LPC1). Alle Veränderungen liegen im Signifikanzbereich von $p \leq 0,05$ außer der LPC1 Konzentration. LPC1 besitzt allerdings den einzigen Ausreißer dieser beiden Kollektive, nämlich die euthyreote Probe der lau-

fenden Nummer 11. Läßt man diese Probe unter der Annahme unberücksichtigt, dass sie aus unbekannter Ursache nicht in das Probenkollektiv passt, so ist auch die Veränderung von LPC1 signifikant ($p = 0.007$).

Tabelle 8: Plasmakonzentrationen von 14 Patienten in hypothyreotem und euthyreotem Zustand. TSH ist in mU/l, PE+SM und LPC1 in mmol/l angegeben.

lfd. Nr.	TSH	PE+SM hypothyreot	PE+SM euthyreot	LPC1 hypothyreot	LPC1 euthyreot
1	35,4	0,600	0,393	0,383	0,283
2	249	0,619	0,518	0,325	0,264
3	112	0,598	0,478	0,425	0,255
4	87,5	0,519	0,442	0,263	0,275
5	48,7	0,523	0,670	0,247	0,314
6	66	0,589	0,641	0,332	0,218
7	64,8	0,718	0,513	0,234	0,205
8	68,4	0,491	0,507	0,214	0,221
9	242	0,646	0,302	0,392	0,138
10	94,6	0,643	0,303	0,311	0,208
11	12,2	0,672	0,494	0,337	0,591
12	31,8	0,618	0,371	0,204	0,220
13	74,8	0,498	0,518	0,293	0,264
14	84	0,556	0,560	0,346	0,186
\bar{x}	91	0,589	0,473	0,307	0,256
σ_x	15	0,02	0,03	0,02	0,03
σ_x (%)	16	3	6	6	11
p (t-Test)		0,005		0,1	

Die TSH Konzentration ist lediglich ein Anhaltspunkt, dass die erste der beiden entnommenen Proben des jeweiligen Patienten wirklich in hypothyreotem Zustand entnommen wurde, sie korrelierte nicht mit den Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma.

Tabelle 9: Plasmakonzentrationen von 14 Patienten in hypothyreotem und euthyreotem Zustand. LPC2, PI und PC sind in mmol/l angegeben.

Ifd. Nr.	LPC2		PI		PC	
	hypothyreot	euthyreot	hypothyreot	euthyreot	hypothyreot	euthyreot
1	0,077	0,025	0,078	0,018	2,066	1,225
2	0,056	0,046	0,073	0,029	1,965	1,671
3	0,062	0,029	0,070	0,052	1,854	2,060
4	0,028	0,025	0,057	0,065	1,475	2,219
5	0,017	0,052	0,106	0,051	3,101	1,649
6	0,036	0,036	0,073	0,039	2,206	1,538
7	0,025	0,015	0,071	0,050	2,669	1,949
8	0,038	0,019	0,038	0,070	1,412	1,791
9	0,070	0,015	0,124	0,028	2,191	1,229
10	0,038	0,028	0,072	0,058	2,085	1,087
11	0,065	0,076	0,081	0,050	1,949	1,071
12	0,043	0,027	0,061	0,043	1,817	1,611
13	0,047	0,046	0,039	0,029	1,453	1,671
14	0,059	0,022	0,085	0,069	1,849	1,780
\bar{x}	0,048	0,033	0,074	0,046	1,981	1,581
σ_x	0,005	0,005	0,006	0,004	0,123	0,094
σ_x (%)	10	14	8	10	6	6
p (t-Test)	0,02		0,003		0,02	

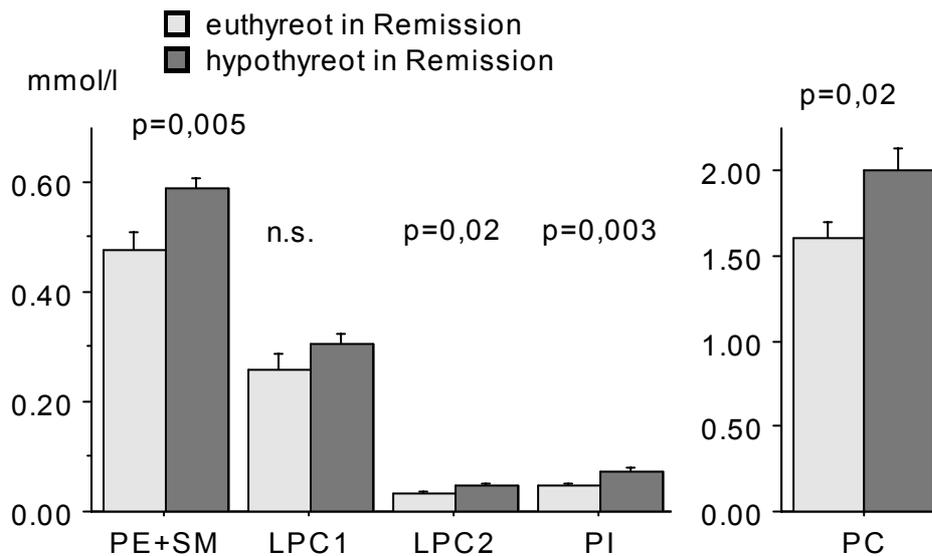


Abbildung 37: Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma von hypothyreoten Patienten in Remission und den gleichen Patienten in euthyreotem Zustand, Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte. Die p-Werte beziehen sich auf den gepaarten t-Test.

Die Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma der euthyreoten Patienten in Remission wurden mit denen von gesunden Probanden und von hyperthyreoten Patienten verglichen, um zu überprüfen, ob neben dem Einfluss der Schilddrüsenhormonkonzentrationen noch andere Effekte sichtbar werden. Dazu stand Blutplasma von 23 gesunden Probanden sowie von 9 Patienten mit latenter Hyperthyreose und 6 Patienten mit manifester Hyperthyreose zur Verfügung.

Tabelle 10: Konzentrationen der Schilddrüsenhormone fT3, fT4 und von TSH bei gesunden Probanden, euthyreoten Patienten in Remission und hyperthyreoten Patienten.

Befund	Probenzahl	fT3 [pg/ml]	fT4 [ng/100ml]	TSH [mU/l]
euthyreot in Remission	14	3,9 ± 0,7	2,4 ± 0,5	0,1 ± 0,1
gesund	23	3,2 ± 0,3	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2
latent hyperthyreot	9	4,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2	0,11 ± 0,05
manifest hyperthyreot	6	21 ± 11	5,4 ± 0,9	0,06 ± 0,03

Tabelle 11: Konzentrationen der Phospholipide im Blutplasma bei gesunden Probanden, euthyreoten Patienten in Remission und hyperthyreoten Patienten in mmol/l.

Befund	PE+SM	LPC1	LPC2	PI	PC
euthyreot in Remission	0,473±0,030	0,256±0,030	0,033±0,005	0,046±0,004	1,581±0,094
gesund	0,467±0,013	0,227±0,010	0,032±0,002	0,052±0,004	1,819± 0,077
latent hyperthyreot	0,425±0,023	0,195± 0,017	0,027±0,004	0,048±0,006	1,442±0,114
manifest hyperthyreot	0,372±0,035	0,196±0,019	0,030±0,008	0,038±0,005	1,237±0,147

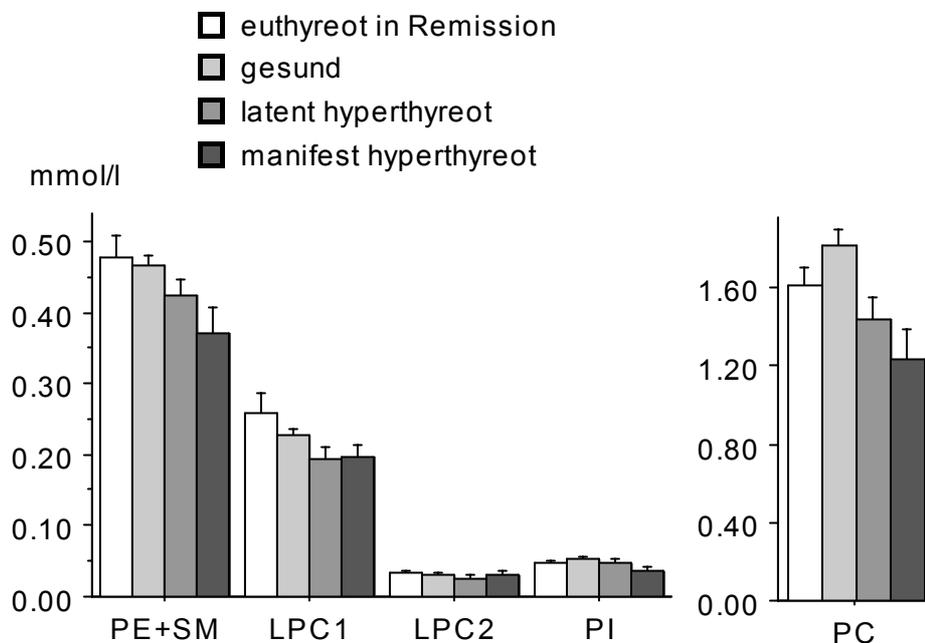


Abbildung 38: Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma von gesunden Probanden, euthyreoten Patienten in Remission und hyperthyreoten Patienten, Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte.

Man erkennt in Tabelle 10, Tabelle 11 und Abbildung 38, dass sich euthyreote Patienten in Remission weder von gesunden Probanden noch von Patienten in latenter Hyperfunktion signifikant unterscheiden. Das gilt sowohl für die Schilddrüsenhormonkonzentrationen fT3 und fT4, als auch für die Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma. Man erkennt zwar einen Trend zu niedrigeren Phospholipidkonzentrationen bei steigenden fT3- und fT4-Werten und einen Trend zu hohen Phospholipidkonzentrationen bei steigenden TSH-Werten. Aber die Korrelationskoeffizienten sind zu gering, um die euthyreoten Patienten in Remission von gesunden Probanden anhand der Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma eindeutig unterscheiden zu können. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Phospholipidkonzentrationen und fT3, fT4 sowie TSH sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten zwischen den Phospholipidkonzentrationen und Hormonkonzentrationen im Blutplasma von fT3, fT4 und TSH. Die Berechnung erfolgte mit den Daten von 42 Patienten und Probanden.

	PE+SM	LPC1	LPC2	PI	PC
fT3	- 0,41	- 0,33	- 0,27	- 0,25	- 0,27
fT4	- 0,43	- 0,44	- 0,34	- 0,32	- 0,20
TSH	+ 0,31	+ 0,56	+ 0,57	+ 0,56	+ 0,15

fT4 ist die Speicherform von fT3, die eigentlich wirksame Spezies in den Zielzellen des Organismus ist fT3. Die Korrelationskoeffizienten zwischen Phospholipidkonzentrationen und Schilddrüsenhormonen unterscheiden sich allerdings nur unwesentlich zwischen fT3 und fT4, was aufgrund der hohen Korrelation zwischen fT3 und fT4 ($r = 0,82$) nicht verwunderlich ist. Die PC Konzentration ist relativ unabhängig vom Schilddrüsenstatus (jeweils niedrige Korrelationskoeffizienten), PE+SM reagiert besonders stark auf fT3 und fT4, die Lysophosphatidylcholine LPC1 und LPC2 sowie PI korrelieren besonders gut mit TSH.

Dass sich die Wirkung von TSH auf die Phospholipidkonzentrationen nicht nur im Vorzeichen, sondern auch im absoluten Betrag von der Wirkung von fT3 und fT4 unterscheidet (Abbildung 12), ist mit dem Regelkreis von Abbildung 36 alleine nicht zu erklären. TSH hat anscheinend nicht nur über die Steuerung der fT3 und fT4 Synthese eine systemische Wirkung auf das Blut-

plasma. Da Schilddrüsenzellen die alleinigen Zielzellen von TSH sind, muss die besonders hohe Korrelation zwischen TSH und LPC1/2 sowie die besonders niedrige zwischen TSH und PE+SM sowie PC auf Veränderungen der Schilddrüsenzellen zurückzuführen sein.

Vergleicht man jedoch die Phospholipidkonzentrationen zwischen gesunden Probanden und Patienten mit manifester Hyperthyreose, so sind die Veränderungen bei PE+SM ($p = 0,005$) und bei PC ($p = 0,002$) signifikant, die Veränderungen der Lysophosphatidylcholine sind nicht signifikant. Im Vergleich zu gesunden Probanden findet man bei Patienten mit manifester Hyperthyreose 20 % weniger PE+SM, 14 % weniger LPC1, 8 % weniger LPC2, 28 % weniger PI und 32 % weniger PC.

5.1.3 Diskussion

In Vorbereitung auf die Untersuchungen an Patienten mit Schilddrüsenkarzinom wurde in diesem Kapitel der deutliche Zusammenhang zwischen Schilddrüsenhormonen und Phospholipidkonzentration im Blutplasma gezeigt. Bisherige Untersuchungen^{65,66,67,68} zeigten vor allem die Veränderungen der Lipoproteinfraktionen oder der Gesamtkonzentration aller Phospholipide im Blutplasma. In dieser Arbeit werden dagegen die einzelnen Phospholipidklassen separat betrachtet.

Dem Vergleich zwischen hypothyreoten und euthyreoten Patienten in Remission liegt ein longitudinaler Datensatz zu Grunde, d.h. von den gleichen Patienten wurde in hypothyreotem und euthyreotem Zustand eine Plasmaprobe gewonnen. Dadurch wurden individuelle Unterschiede wie Alter, Geschlecht, genetische Faktoren, Lebensgewohnheiten, Begleiterkrankungen, etc. ausgeschaltet. Ausserdem wurde ein gepaarter t-Test möglich, der nur Proben des gleichen Patienten miteinander vergleicht.

Trotzdem gelten die hier gefundenen Veränderungen nicht streng für jeden Patienten, sondern nur im Mittel. Während die Mehrzahl der Plasmaproben in hypothyreotem Zustand eine höhere Phospholipidkonzentration aufweisen als in euthyreotem Zustand, gibt es für PE+SM und

LPC1 fünf Ausnahmen, für PC vier, für LPC2 drei und für PI zwei. Diese Abweichungen von den im großen Kollektiv gefundenen Trends treten allerdings häufig in biologischen Proben auf und sind daher nicht verwunderlich.

Die besonders hohe Signifikanz der Veränderung der PI-Konzentration zeigt die Zweckmäßigkeit, bei erhöhter Temperatur (37°C) zu messen: Unter dieser Bedingung ist das kleine PI-Signal neben dem großen PC Signal integrierbar. Dies gelingt durch die erhöhte Messtemperatur (37°C) wie in Abschnitt 3.2.2. beschrieben.

In der Literatur wird ausführlich beschrieben, dass HDL und vor allem LDL Konzentrationen im Blutplasma bei hypothyreoten Patienten sinken, die mit Thyroxin behandelt werden und so in einen euthyreoten Zustand geführt werden.^{66,67,68} Da Phospholipide ein wesentlicher Bestandteil der Außenhülle von HDL und LDL sind, müssen sich Veränderungen in den Lipoproteinen zwangsläufig auch im Phospholipidgehalt des Blutplasmas widerspiegeln.

Die hier angewandte Natriumcholatomethode bewirkt, dass die Phospholipide aus dem Lipoprotein heraustreten und in die Mizellen des Natriumcholats eingegliedert werden. Dadurch wird das ursprüngliche Lipoprotein zerstört. Im ³¹P-NMR-Spektrum sind PE+SM, LPC1, LPC2, PI und PC nur als Gesamtkonzentration im Plasma berechenbar, es kann nicht unterschieden werden, ob eine der Phospholipidklassen aus HDL, LDL oder VLDL stammt.

Schilddrüsenhormone sind im Plasma vor allem an Transportproteinen wie Albumin oder TBG gebunden, werden aber auch in Lipoproteinen mitgetragen. Z.B. ist 6 % des T3 im Plasma an HDL gebunden.⁶⁹ Mit Isotopenexperimenten wurde nachgewiesen, dass der Anteil des an HDL gebundenen T3 an der Gesamtmenge des T3 im Blutplasma bei hypothyreoten Patienten um einen Faktor 4 höher liegt als bei euthyreoten Personen. Möglicherweise handelt es sich um einen Ausgleichsmechanismus: Über Lipoproteinrezeptoren an den Zellmembranen können Schilddrüsenhormone, die an Lipoproteine gebunden sind, in die Zelle gelangen. Durch die höhere Lipoproteinkonzentration bei hypothyreoten Patienten und die bessere Fähigkeit, Schilddrüsenhormone zu transportieren, werden den Zielzellen mehr Schilddrüsenhormone angeboten als es der Unterfunktion entspricht.

Dass die Phospholipidkonzentrationen der euthyreoten Patienten in Remission denen anderer Patienten oder Probanden mit ähnlichen Schilddrüsenhormonwerten entsprechen, zeigte der Vergleich mit den Phospholipidkonzentrationen gesunder Probanden und Patienten mit latenter Hyperthyreose. Die Thyreodektomie, die erfolgreiche Therapie des Schilddrüsenkarzinoms und die langfristig angelegte Substitutionstherapie mit externen Schilddrüsenhormonen hatte also keinen signifikanten Einfluss auf die Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma.

Vom hormonellen Status ähneln die euthyreoten Patienten in Remission eher den latent hyperthyreoten Patienten als den gesunden Probanden. Die Unterschiede in den Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma bei diesen drei Kollektiven sind allerdings alle gering (daher nicht signifikant) und evtl. nur auf die geringe Zahl der Proben zurückzuführen. Man kann also sagen, dass sich aus den ^{31}P -NMR-Plasmaspektren der euthyreoten Patienten in Remission innerhalb der Fehlergrenzen die gleichen Phospholipidkonzentrationen ergeben wie aus den Spektren von gesunden Probanden. Eine leichte (latente) Hyperthyreose ändert die Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma ebensowenig gegenüber gesunden Probanden, eine manifeste Hyperthyreose bewirkt jedoch eine signifikante Erniedrigung von PE+SM ($p = 0,005$) und PC ($p = 0,002$). Untersuchungen an Muskelzellen zeigen, dass die Aktivität der Phospholipase A im hyperthyreoten Zustand gegenüber der Euthyreose steigt.⁷¹ Dies deckt sich mit dem Befund, dass die Konzentrationen von LPC1 und LPC2 nur um 14 %, bzw. 8 % niedriger sind als im euthyroten Zustand (und damit nicht signifikant), die Konzentration von PC aber besonders erniedrigt ist (um 32 %). Die hier beschriebenen Zusammenhänge zwischen Schilddrüsenfunktion und Phospholipidkonzentrationen kommen auch in den Korrelationskoeffizienten von fT3 zu den Phospholipidkonzentrationen zum Ausdruck (Tabelle 12).

5.2 Das Schilddrüsenkarzinom

5.2.1 Physiologie⁶¹

Schätzungen zufolge leiden 10 % der Bevölkerung an Schilddrüsenknoten, von denen aber 95 - 98 % gutartig sind. In den meisten Fällen entsteht ein bösartiges Schilddrüsenkarzinom aus einer solchen gutartigen knotenartigen Verdichtung des Schilddrüsengewebes. Das Schilddrüsenkarzinom ist die häufigste Form der Schilddrüsentumoren. Je nach Zelltyp unterscheidet man ein papilläres, follikuläres, gemischtes oder undifferenziertes Karzinom. Die Diagnose

eines Knotens erfolgt durch Ultraschall, gefolgt von der Schilddrüsenszintigraphie mit ^{99m}Tc -Pertechnetat, um „kalte“ Knoten mit geringer ^{99m}Tc -Anreicherung von „heissen“ Knoten mit hoher ^{99m}Tc -Anreicherung zu unterscheiden. Schilddrüsenkarzinome sind in mehr als 95 % der Fälle echoarm (Ultraschall) und kalt (Szintigraphie). Für solche Knoten wird eine Feinnadelpunktion mit anschliessender zytologischer Untersuchung vorgenommen. Besteht ein hinreichender Verdacht auf Schilddrüsenkarzinom, erfolgt ein chirurgischer Eingriff, in dessen Verlauf das Gewebe histologisch untersucht wird und bei positivem Befund die Schilddrüse entfernt wird.

Da die Schilddrüse zum Teil mit ihrer Umgebung verwachsen ist, bleibt Restgewebe zurück, das durch eine erste Radioiodtherapie zerstört wird. Dazu wird dem Patienten im hypothyreoten Zustand ^{131}I -dotiertes Natriumiodid verabreicht, das sich im Restgewebe und zum geringeren Teil auch in evtl. noch vorhandenem Karzinomgewebe anreichert und die Zellen zerstört. Zur Radioiodtherapie werden höhere Dosen ^{131}I -Natriumiodid verabreicht als zur Ganzkörperszintigraphie.

Zur Detektion evtl. vorhandener Metastasen in den regelmäßigen Nachsorgeuntersuchungen stehen 3 bildgebende Verfahren zur Verfügung:

1.) Die ^{131}I -Ganzkörperszintigraphie stellt nach Verabreichung radioaktiv markierten Iods in Form von Natriumiodid mit Hilfe von Gamma-Detektoren Bereiche von iod-speicherndem Gewebe im Organismus dar. Hilfreich ist das Verfahren jedoch nur zur Aufdeckung von iod-speichernden Fernmetastasen und Lymphknotenmetastasen.

2.) Die Kernspintomographie (^1H -MRI, bzw. ^1H -Magnetic Resonance Imaging) ist ein magnetisches Resonanzverfahren wie die NMR-Spektroskopie. Durch Impulsgradienten werden im Permanentmagneten lokal unterschiedliche und genau definierte magnetische Flussdichten erreicht. Die Wahl einer geeigneten Pulsfolge und Berücksichtigung der Phasenlage des Resonanzsignals ermöglicht eine separate Signalanalyse für jedes Volumenelement im Messbereich. Das berechnete dreidimensionale Bild basiert auf der Wasser- oder Lipidkonzentration im

Organismus. Da schnellwachsende Karzinome üblicherweise besser durchblutet sind als angrenzendes gesundes Gewebe, kann man so das Karzinomgewebe vom gesunden Gewebe unterscheiden.

3.) Die Bildgebung durch PET (Positronenemissionstomographie) ist ebenfalls eine nuklearmedizinische Methode, die darauf beruht, dass sich Radiopharmaka im Gewebe nicht gleichmäßig verteilen. Vielfach wird dem Patienten eine Dosis ^{18}F -markierter fluorierter Glucose verabreicht, das mit einer Halbwertszeit von 109,7 min. als Positronenstrahler zerfällt. Aufgrund des schnellen Tumorstwachstums und des daraus resultierenden hohen Energiebedarfs nimmt eine Tumorzelle mehr Glucose, also auch mehr radioaktiv markierte Glucose auf als das angrenzende gesunde Gewebe. Entdifferenzierte und besonders schnell wachsende Metastasen, die mit der ^{131}I -Ganzkörperszintigraphie nicht erfasst werden, da sie kein ^{131}I speichern, können durch PET Untersuchungen sichtbar gemacht werden, da die ^{18}F -PET Untersuchung den Energieverbrauch in Glucoseeinheiten detektiert, der mit der Geschwindigkeit des Zellwachstums korreliert.

Während zahlreiche Untersuchungen den Einfluss von Tumorgewebe auf den Fettstoffwechsel der Zelle und die Lipidkonzentration im Blutplasma beschreiben (siehe Diskussion), ist bisher nur eine einzige Arbeit zu Veränderungen des Blutplasmas bei Schilddrüsenkarzinomen bekannt,⁷³ die zudem zum Schluß kommt, dass das Schilddrüsenkarzinom keine signifikanten Veränderungen in den Phospholipidkonzentrationen des Blutplasmas bewirkt.

Von Seiten der nuklearmedizinischen Diagnostik besteht ein Interesse, neue Methoden zur Nachsorge zu entwickeln, die bei der Detektion von möglichen Krebsneubildungen oder Metastasen behilflich sind. Ausgangspunkt der Untersuchungen in diesem Kapitel war also nicht die Erforschung biochemischer Wirkungen des Tumorgewebes auf das Blutplasma, sondern die diagnostische Unterscheidbarkeit von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und Patienten in Remission mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden.

5.2.2 Ergebnisse

Für die Messreihen wurden morgens Blutplasma-Proben von nüchternen Patienten genommen, die sich aufgrund der bevorstehenden routinemäßigen und regelmäßigen Ganzkörperszintigraphie im hypothyreoten Zustand befanden. Zur Kontrolle der Hypothyreose wurden die Schilddrüsenhormone und TSH im Labor der Klinik für Nuklearmedizin bestimmt, ferner auch Thyreoglobulin (TG), das spezifische Protein der Schilddrüse, das für die Bildung von Schilddrüsenhormonen verantwortlich ist. Eine TG-Konzentration, die über 1 ng/ml im Blutplasma liegt, gilt als Hinweis auf Schilddrüsenrestgewebe, sagt aber nichts darüber aus, ob das TG von gesundem Schilddrüsenrestgewebe oder Schilddrüsenkarzinomgewebe stammt.

5.2.2.1 ^{31}P -NMR-spektroskopische Untersuchungen

Aufgrund des starken Einflusses von T3 und T4 auf die Phospholipidkonzentration im Blutplasma, der im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, musste das Patientenkollektiv mit Schilddrüsenkarzinom und das Kollektiv in Remission sehr sorgfältig aufeinander abgestimmt werden, damit der Einfluss von T3 und T4 auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden konnte. Ferner wurde darauf geachtet, dass sich das Alter der Patienten nicht signifikant unterscheidet, denn der Einfluss des Alters auf die Lipidkonzentrationen im Blutplasma ist vielfach beschrieben worden.⁷⁴ Zudem haben beide Kollektive einen annähernd gleichen Anteil beider Geschlechter.

Tabelle 13: Veränderungen der Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma beim Schilddrüsenkarzinom. Angaben über die Patientenkollektive.

Befund	Zahl der Proben	Alter	fT3 in [pg/ml]	fT4 in [ng/100ml]	TSH in [mU/l]	TG in [ng/ml]
hypothyreot in Remission	7 w 10 m	46 ± 5	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,1	101 ± 25	1,7 ± 1,1
hypothyreot mit Karzinom	7 w 9 m	41 ± 5	0,8 ± 0,2	0,3 ± 0,1	101 ± 23	59 ± 18

Normalerweise liegt die TG-Konzentration von hypothyreoten Patienten in Remission zwischen 0 und 1 ng/ml. Die für Patienten in Remission sehr hohe mittlere TG-Konzentration in Tabelle 13 (obere Zeile) kommt durch zwei Ausreisser zustande, bei denen man zwar TG-Konzentrationen von 8,3 und 11,9 ng/ml gemessen hatte, aber kein Karzinomgewebe oder Metastasen gefunden hatte. Allerdings traten bei einem dieser beiden Patienten ein Jahr nach der Probenahme Metastasen auf. Nimmt man die beiden Werte heraus, kommt man auf eine TG-Konzentration von $0,5 \pm 0,4$ ng/ml.

Abbildung 39 zeigt, dass innerhalb der beiden Kollektive von hypothyreoten Patienten in Remission und mit Schilddrüsenkarzinom kein signifikanter Unterschied zwischen den Phospholipidkonzentrationen von männlichen und weiblichen Patienten besteht. Das ist keineswegs selbstverständlich, da in anderen Kollektiven signifikante Unterschiede aufgetreten sind. Da das Geschlecht in dieser Studie offensichtlich keinen signifikanten Einfluss ausübt, wurde es bei der Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

Der Ausreissertest nach Dixon fällt sowohl für hypothyreote Patienten in Remission als auch für hypothyreote Patienten mit Schilddrüsenkarzinom negativ aus, es werden also alle Proben zur Auswertung herangezogen. Hypothyreote Patienten mit Karzinom haben generell kleinere Mittelwerte der Phospholipidkonzentrationen verglichen mit hypothyreoten Patienten in Remission. Die Erniedrigung liegt bei 17,9 % (PE+SM, $p = 0,0001$), 12,4 % (LPC1, nicht signifikant), 11,1 % (LPC2, nicht signifikant), 16,2 % (PI, nicht signifikant) und 21,5 % (PC, $p = 0,006$).

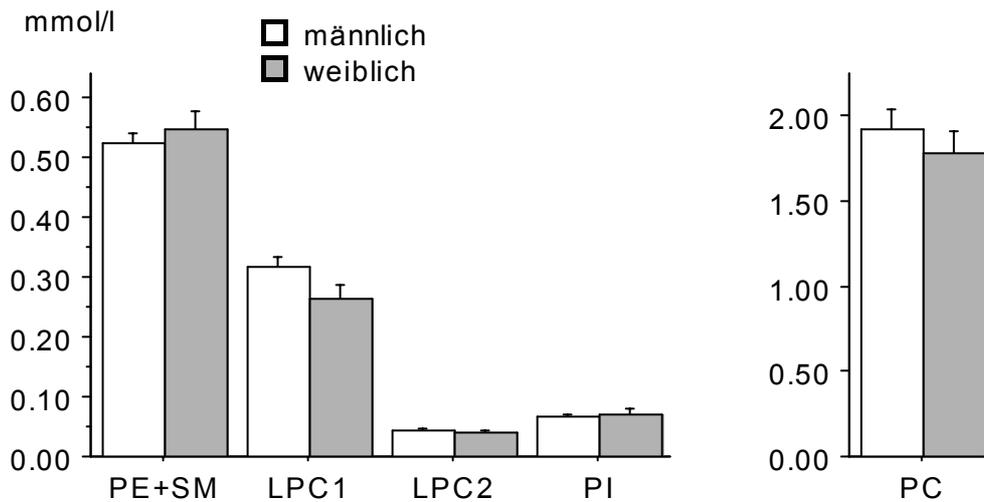


Abbildung 39: Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma von männlichen und weiblichen hypothyreoten Patienten in Remission und mit Schilddrüsenkarzinom, Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

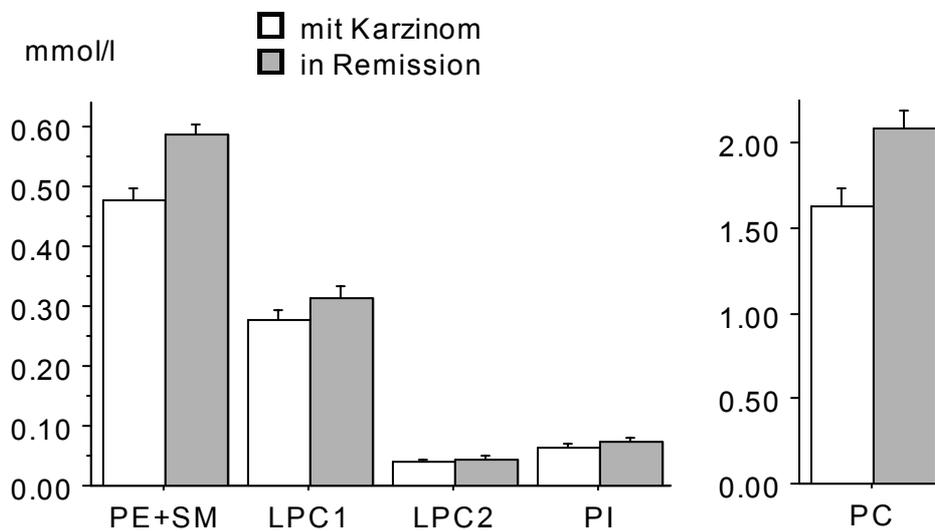


Abbildung 40: Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma von hypothyreoten Patienten in Remission und mit Schilddrüsenkarzinom, Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte.

Tabelle 14: Plasmakonzentrationen von 17 hypothyreoten Patienten in Remission. Alle Phospholipidkonzentrationen sind in mmol/l angegeben.

lfd. Nr.	Geschlecht	PE+SM	LPC1	LPC2	PI	PC
1	m	0,556	0,346	0,059	0,085	1,849
2	m	0,600	0,383	0,077	0,078	2,066
3	m	0,551	0,494	0,046	0,074	2,436
4	m	0,619	0,325	0,056	0,073	1,965
5	m	0,598	0,425	0,062	0,070	1,854
6	m	0,546	0,293	0,035	0,083	2,226
7	m	0,498	0,293	0,047	0,039	1,453
8	m	0,606	0,250	0,018	0,073	2,643
9	m	0,519	0,263	0,028	0,057	1,475
10	m	0,523	0,247	0,017	0,106	3,101
11	w	0,589	0,332	0,036	0,073	2,206
12	w	0,718	0,234	0,025	0,071	2,669
13	w	0,491	0,214	0,038	0,038	1,412
14	w	0,646	0,392	0,070	0,124	2,191
15	w	0,643	0,311	0,038	0,072	2,085
16	w	0,672	0,337	0,065	0,081	1,949
17	w	0,618	0,204	0,043	0,061	1,817
\bar{x}		0,588	0,314	0,045	0,074	2,082
σ_x		0,015	0,019	0,004	0,005	0,110
σ_x (%)		3	6	10	7	5

Tabelle 15: Plasmakonzentrationen von 16 hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom. Alle Phospholipidkonzentrationen sind in mmol/l angegeben.

lfd. Nr.	Geschlecht	PE+SM	LPC1	LPC2	PI	PC
18	w	0,601	0,197	0,023	0,065	1,904
19	w	0,398	0,239	0,025	0,035	0,896
20	w	0,551	0,277	0,032	0,091	1,645
21	w	0,525	0,405	0,080	0,150	1,986
22	w	0,346	0,236	0,036	0,021	1,231
23	w	0,416	0,180	0,028	0,030	1,294
24	w	0,439	0,153	0,018	0,059	1,699
25	m	0,617	0,331	0,068	0,090	2,036
26	m	0,527	0,344	0,043	0,062	2,120
27	m	0,388	0,218	0,045	0,059	1,140
28	m	0,391	0,342	0,031	0,047	1,581
29	m	0,542	0,252	0,027	0,087	2,413
30	m	0,499	0,386	0,061	0,059	1,757
31	m	0,493	0,317	0,057	0,040	1,563
32	m	0,391	0,324	0,027	0,050	1,493
33	m	0,478	0,202	0,037	0,045	1,392
\bar{x}		0,475	0,275	0,040	0,062	1,634
σ_x		0,021	0,019	0,004	0,008	0,099
σ_x (%)		4	7	11	13	6

Es gelingt leider nicht, Konzentrationsbereiche anzugeben, mit denen man jede bisher unbekannte Plasmaproben der einen oder der anderen Gruppe eindeutig zuordnen könnte. Man kann den Bereich $\bar{x} \pm 2\sigma$ für die hypothyreoten Patienten in Remission angeben. 96 % aller Messwerte liegen darin, unter der Annahme, dass die Phospholipidkonzentrationen normalverteilt sind. 2 % der Messwerte weichen nach oben ab, 2 % nach unten. Ist die gemessene Phospholi-

phospholipidkonzentration eines hypothyreoten Patienten ohne andere Begleiterkrankung niedriger als $\bar{x}_{\text{Remission}} - 2\sigma$, so ist die Wahrscheinlichkeit 98 %, dass die Probe zu einem hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom gehört. Von den 16 hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom könnte man auf diese Weise anhand der PE + SM Konzentration 7 Patienten mit hoher Sicherheit der Karzinomgruppe zuordnen, anhand der PC Konzentration gelingt das bei zwei Patienten. Im umgekehrten Fall kann man prüfen, welche Plasmaproben Phospholipidkonzentrationen haben, die über $\bar{x}_{\text{Karzinom}} + 2\sigma$ hinausgehen und sie mit 98 % Wahrscheinlichkeit einem hypothyreoten Patienten in Remission zuordnen. Dies gelingt bei vier Patienten anhand der PE+SM Konzentration und bei vier Patienten anhand der PC Konzentration. Insgesamt kann man mit dieser Methode 14 Proben der richtigen Gruppe zuordnen, 19 Proben ergeben keinen eindeutigen Befund, es gibt keinen falsch positiven.

PE+SM und PC als die beiden Signale, die signifikante Unterschiede zwischen hypothyreoten Patienten in Remission und hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom aufweisen, korrelieren stark miteinander ($r = 0,955$). Trotzdem findet man bei einer zweidimensionalen Auftragung der beiden Konzentrationen in einem Diagramm verschiedene Bereiche (Punktwolken), in denen die Messwerte des jeweiligen Kollektivs liegen. Diese Bereiche überlappen sich zum Teil. Aufgrund der Punktwolken können 7 Proben der hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom eindeutig klassifiziert werden und 6 hypothyreote Patienten in Remission.

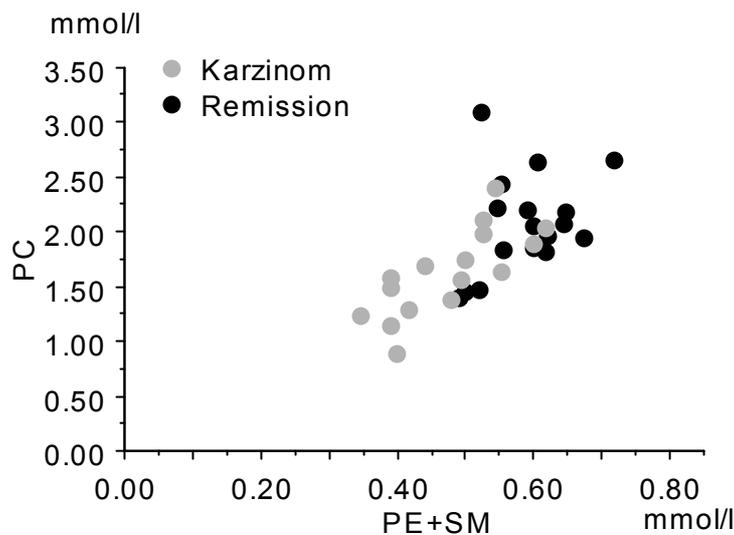


Abbildung 41: Konzentrationen von PE+SM und PC im Blutplasma von hypothyreoten Patienten in Remission und hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom, dargestellt in einem zweidimensionalen Punktwolken Diagramm.

Die restlichen Messwerte befinden sich im Diagramm in einem Bereich, in dem sich beide Punktwolken überschneiden. Diese Klassifizierung ist allerdings rein empirisch und statistisch nicht gesichert. Um genauere Aussagen treffen zu können, bräuchte man ein größeres Probenkollektiv.

5.2.2.2 ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen

Nachdem die ^{31}P -NMR-Spektren von Blutplasma deutliche Unterschiede zwischen hypothyreoten Patienten in Remission und hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom gezeigt haben, sollte in einem weiteren Schritt getestet werden, ob ein ähnliches Verhalten in den ^1H -NMR-Spektren zu beobachten ist. Ein Vorteil der ^1H -NMR-Spektroskopie ist, dass die Messung wesentlich kürzer ist und mit Hilfe automatischer Probenwechsler oder Durchflusssköpfen ein Probendurchsatz von bis zu 70 Proben pro Tag zu erreichen ist, was mit der ^{31}P -NMR-Spektroskopie nicht möglich ist.

Der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren brachte keine signifikanten Unterschiede der beiden in 5.2.2.1. untersuchten Kollektive. Daher wurde in einem zweiten Anlauf ein longitudinales Kollektiv zusammengestellt: Von neuen Patienten wurde Blut abgenommen, einmal in hypothyreotem Zustand mit Schilddrüsenkarzinom und ein weiteres mal 3-6 Monate später bei einer routinemäßigen Nachsorgeuntersuchung, die zeigte, dass sich die Patienten in hypothyreotem Zustand in Remission befanden. Die Konzentration der Schilddrüsenhormone im Blut waren also in beiden Fällen vergleichbar niedrig. Die Patienten unterschieden sich zum Zeitpunkt der beiden Probennahmen nur dadurch, dass die erste Probe im Zustand mit Schilddrüsenkarzinom genommen wurde, die zweite nach erfolgreicher Behandlung.

Die Integration wurde wie in Abschnitt 4.1.3. beschrieben durchgeführt. Das Integrationsintervall wurde mit 0,0029 ppm so klein gewählt, dass keine Unterschiede zwischen einem normalen Spektrum und dem Diagramm des scheinbar integrierten Spektrums sichtbar sind. Die Integrale sind daher nicht als Balkendiagramm dargestellt, sondern wie ein normales Spektrum, in dem die (x,y)-Wertepaare miteinander verbunden sind. Jedes einzelne „Spektrum“ abzubilden, wäre zu unübersichtlich, daher sind in der folgenden Darstellung die Mittelwerte der

Spektren bei vorhandenem Schilddrüsenkarzinom und bei Remission abgebildet und die Standardabweichungen der Mittelwerte. Ferner sind Spektrenbereiche mit signifikanten Unterschieden blau markiert.

Tabelle 16: ^1H -NMR-Spektroskopie von Blutplasma bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinom. Angaben zum Patientenkollektiv. Abkürzungen siehe Text.

Nr.	Diagnose	Stadium	fT3 in [pg/ml]	fT4 in [ng/100ml]	TSH in [mU/l]	TG in [ng/ml]
1	pap. multifokal	pT1NxMx	1,1	0,3	35,8	7,2
	Remission		0,1	0,1	55,8	0,1
2	pap.	pT2N0M0	2,4	0,6	15,5	31,5
	Remission		0,5	0,0	67,0	0,1
3	pap. foll.	pT1N0M0	1,0	0,2	51,9	0,1
	Remission		0,3	0,0	112,9	0,1
4	foll.	pT4NxMx	0,5	0,0	34	0,0
	Remission		0,5	0,1	38,5	0,3
5	foll.	pT4N0M0	1,5	0,7	32	0,3
	Remission		1,3	0,3	60	0,4
6	pap. foll.	pT1N0M0	1,3	0,2	63,9	1,1
	Remission		0,5	0,0	78,6	0,1
7	pap.	pT2NxM0	1,0	0,1	50,8	6,0
	Remission		0,5	0,1	66,1	0,1
8	foll.	pT2N0M0	2,0	0,39	15,7	2,7
	Remission		0,1	0,1	26,0	0,1
9	pap.	pT4N0M0	1,6	0,2	76	7
	Remission		0,9	0,7	115	0,4
10	pap. multifokal	pT1NxMx-G2	1,0	0,2	45,7	1,6
	Remission		0,5	0,1	56,8	0,1
11	pap.	pT1N0M0	2,2	0,6	18,3	12,8
	Remission		0,4	0,1	50	0,4
12	pap. (Lindsay)	pT2N1M0	0,4	0,1	40,4	14,4
	Remission		1,4	0,1	90,5	0,0
13	pap. (Lindsay)	pT2N0M0-G2	1,8	0,2	38,2	3,2
	Remission		0,1	0,1	57,1	0,2

Tabelle 16: ^1H -NMR-Spektroskopie von Blutplasma bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinom. Angaben zum Patientenkollektiv. Abkürzungen siehe Text.

Nr.	Diagnose	Stadium	fT3 in [pg/ml]	fT4 in [ng/100ml]	TSH in [mU/l]	TG in [ng/ml]
14	foll. onkozytär Remission	pT2NxMx	2,4	0,8	10,7	34
			0,3	0,1	87,1	0,7
15	pap. Remission	pT2N0M0	1,7	0,2	69	11,2
			1,5	0,0	157,8	0,2
16	pap. Remission	pT2N1M0-G1	1,4	0,25	34,8	1,0
			0,0	0,1	54,5	0,0
17	pap. Remission	pT3N0M0	1,4	0,3	47	4,5
			0,5	0,1	65,2	0,6
18	pap. multifokal Remission	pT2N0M0	2,0	0,4	35,3	5,4
			0,1	0,2	53,5	0,6
19	pap. Remission	pT4N1M0	1,4	0,1	59,7	0,2
			0,4	0,1	73,3	0,0
20	pap. foll. (Lindsay) Remission	pT2N1M0	0,9	0,2	42,6	0,4
			0,1	0,4	42,6	0,0
21	foll. Remission	pT1N0M0-G2	0,5	0,2	84,9	0,0
			0,1	0,4	69,4	0,0

Die Abkürzungen pap. (papillär) und foll. (follikulär) bezeichnen den Zelltyp des Karzinoms. Das Tumorstadium ist in der TNM-Klassifikation angegeben: pT1 bezeichnet einen kleinen Primärtumor, pT4 einen ausgedehnten. N1 steht für das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, N0 für deren Fehlen und Nx für einen nicht eindeutigen Befund. Analog werden Fernmetastasen mit M1, Mx oder M0 bezeichnet. G steht für den Differenzierungsgrad („Grading“), wobei höhere G-Werte auf weniger differenzierte Zellen hinweisen. Fünf der in Tabelle 16 aufgeführten Patienten hatten bei der Nachuntersuchung minimales, nicht therapiebedürftiges Schilddrüsenrestgewebe (min. SD-Rest). Diese Patienten gelten ebenfalls wie die ohne Befund als Patienten in Remission.

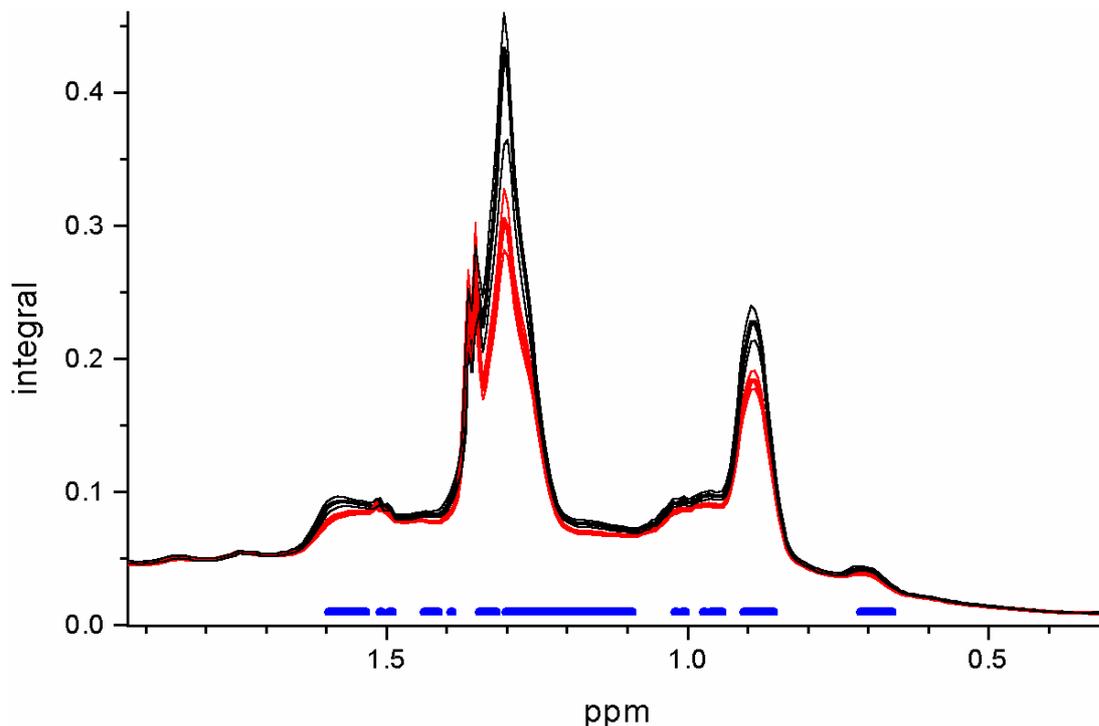


Abbildung 42: ^1H -NMR-Spektren von Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom (rot) und hypothyreoter Patienten in Remission (schwarz). Spektrenbereich von 0,3 ppm bis 1,9 ppm. Mittelwerte aus den scheinbarweise integrierten Spektren (dicke Linie) und Standardabweichungen der Mittelwerte nach oben und nach unten (dünne Linien). Bereiche mit signifikanten Änderungen sind blau markiert.

Man findet in den Lipidbereichen der ^1H -NMR-Spektren ein ähnliches Ergebnis wie in den ^{31}P -NMR-Spektren von Blutplasma bei den Phospholipiden: Hypothyreote Patienten mit Schilddrüsenkarzinom haben signifikant niedrigere Lipidkonzentrationen im Blutplasma als hypothyreote Patienten in Remission. Dies ist ein erstaunliches Ergebnis, da die Integrale der ^1H -NMR-Spektren eine noch größere Streuung haben als die Integrale der Phospholipidsignale im Blutplasma. Um dies anschaulich darzustellen, ist in Abbildung 44 der Spektrenausschnitt der olefinischen Protonen für alle hypothyreoten Patienten in Remission dargestellt. Für alle anderen Lipidsignale findet man ebenfalls eine große Streuung der Signalintensitäten, auf deren Darstellung hier verzichtet werden kann, da sich ein ähnliches Bild ergibt.

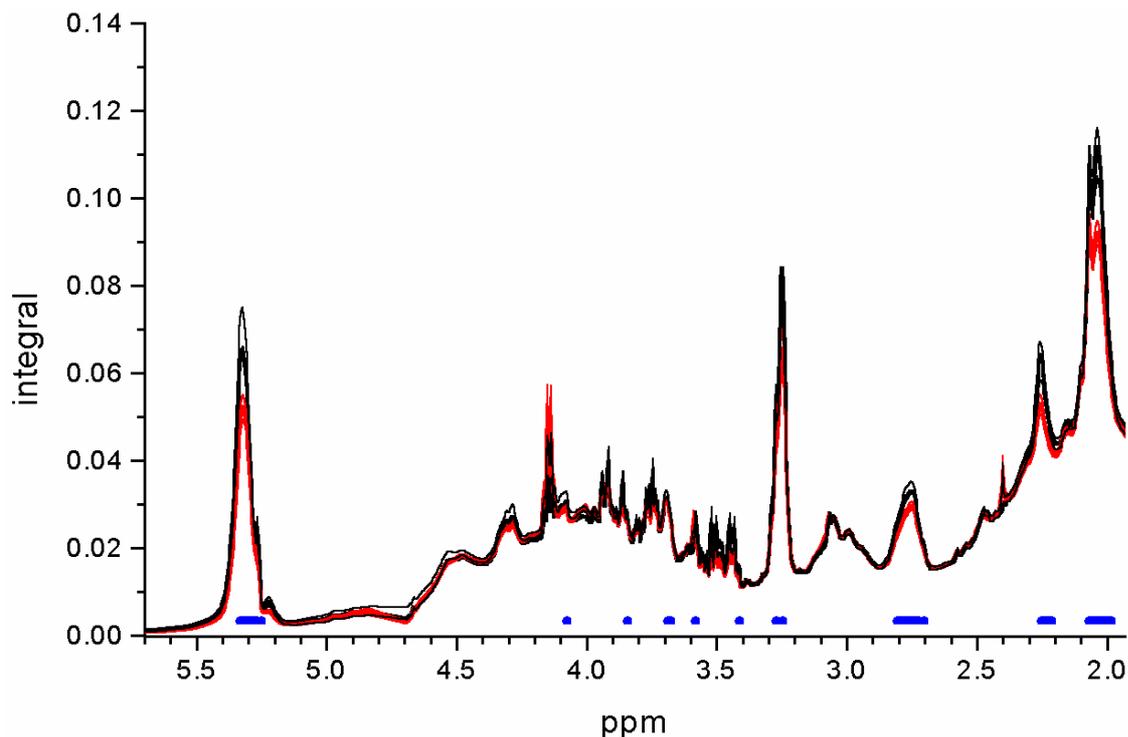


Abbildung 43: ^1H -NMR-Spektren von Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom (rot) und hypothyreoten Patienten in Remission (schwarz). Spektrenbereich von 1,9 ppm bis 5,7 ppm. Mittelwerte aus den scheinbarweise integrierten Spektren (dicke Linie) und Standardabweichungen der Mittelwerte nach oben und nach unten (dünne Linien). Bereiche mit signifikanten Änderungen sind blau markiert.

Nicht nur die Gesamtintegrale des Signals der olefinischen Protonen unterscheiden sich in Abbildung 44 stark voneinander, auch die chemische Verschiebung des Signalmaximums. Dies ist auf die unterschiedlichen Konzentrationen von HDL, LDL und VLDL zurückzuführen, da sich das Signal mit geringerer Dichte des Lipoproteins in Richtung zu hoher Feldstärke (zu höheren ppm-Werten) verschiebt.^{53,54,55} Zwischen 5,25 ppm und 5,28 ppm wird das Lipidsignal vom α -Glucosesignal (1H) überlagert, das wie im Methodenteil am Beispiel des Lactatsignals beschrieben in der Integration unberücksichtigt blieb (Abschnitt 4.1.3.).

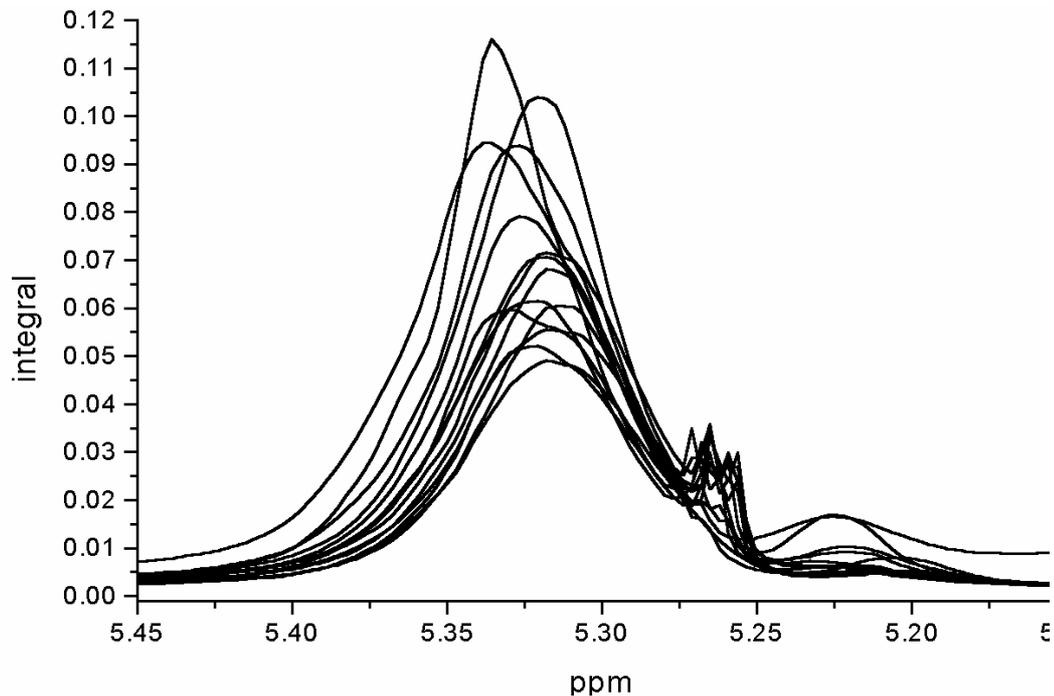


Abbildung 44: ^1H -NMR-Spektren von hypothyreoten Patienten in Remission, Spektrenausschnitt der olefinischen Protonen ungesättigter Fettsäuren.

Neben den eindeutig Lipiden zuzuordnenden Signalen findet man auch im Spektrenbereich zwischen 4,5 ppm und 3,4 ppm Signale, die sich zwischen den beiden Kollektiven signifikant unterscheiden. Vermutlich sind diese Unterschiede den Signalen von α -Glucose (3,84 ppm, 3,83 ppm, 3,70 ppm, 3,58 ppm, 3,42 ppm) und Glycerol (3,87 ppm, 3,64 ppm, 3,56 ppm) zuzuschreiben. Da sich in diesem Bereich viele Signale überlagern, kann man dies allerdings nicht mit Sicherheit feststellen. Bei 4,08 ppm liegen die Signale von Glycerylprotonen von Lipiden. Sie haben ebenfalls wie andere Lipidprotonen eine signifikant niedrige Intensität bei hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom.

Die Differenzspektren, in denen nicht die Integrale bei vorhandenem Schilddrüsenkarzinom und in Remission aufgetragen sind, sondern die Differenz der beiden Integrale, sehen auf den ersten Blick ähnlich verwirrend aus (Abbildung 45). Man findet allerdings, dass von den 16 hier betrachteten Patienten 13 Patienten den oben beschriebenen Befund haben, nur 1 Patient weicht stark, zwei weitere weichen schwach davon ab. 13 von 16 hypothyreoten Patienten haben also bei vorhandenem Schilddrüsenkarzinom niedrigere Konzentrationen an ungesättigten Lipiden im Blutplasma als in Remission.

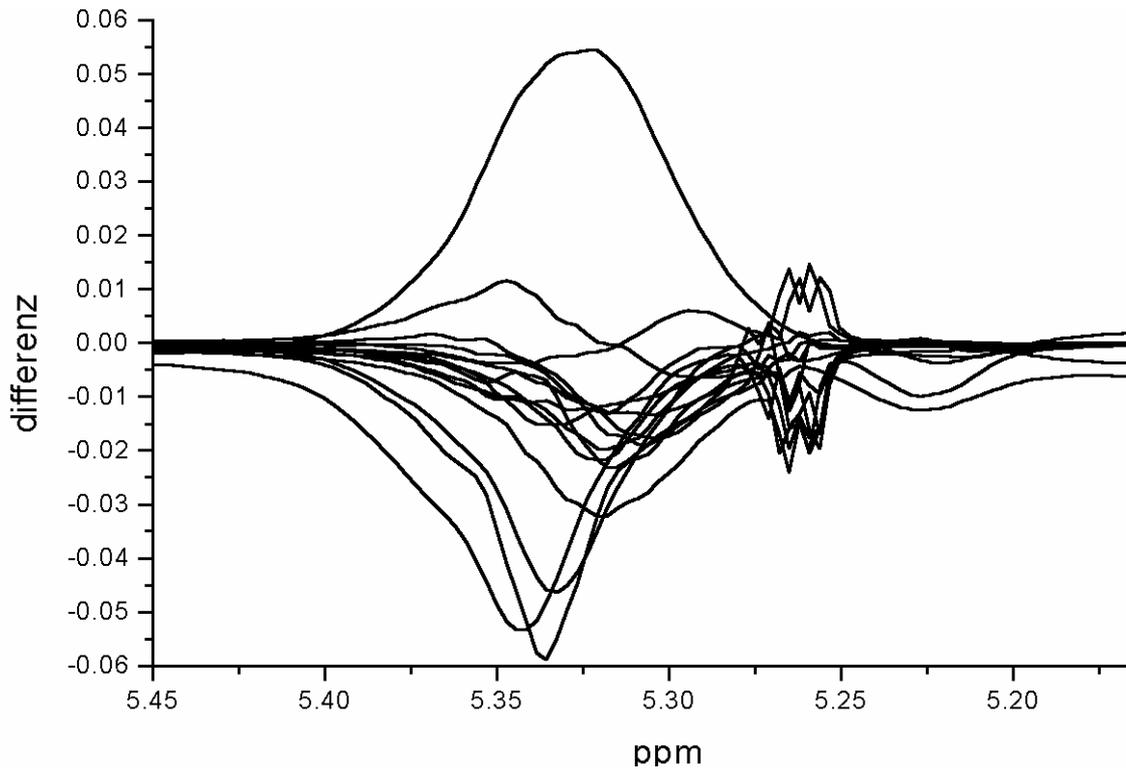


Abbildung 45: Differenzen der integrierten ^1H -NMR-Spektren, Bereich der olefinischen Protonen. Vom ersten Spektrum des hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom wurde das zweite Spektrum in hypothyreotem Zustand in Remission abgezogen (Zwischen beiden Probennahmen lagen 3-6 Monate).

Die Veränderungen des ^1H -NMR-Spektrums konnten auch quantifiziert werden, allerdings immer mit der Einschränkung, dass die Auswertung nicht alle Lipide im Blutplasma erfasst, sondern nur die im Spektrum als Signal sichtbaren Lipide.

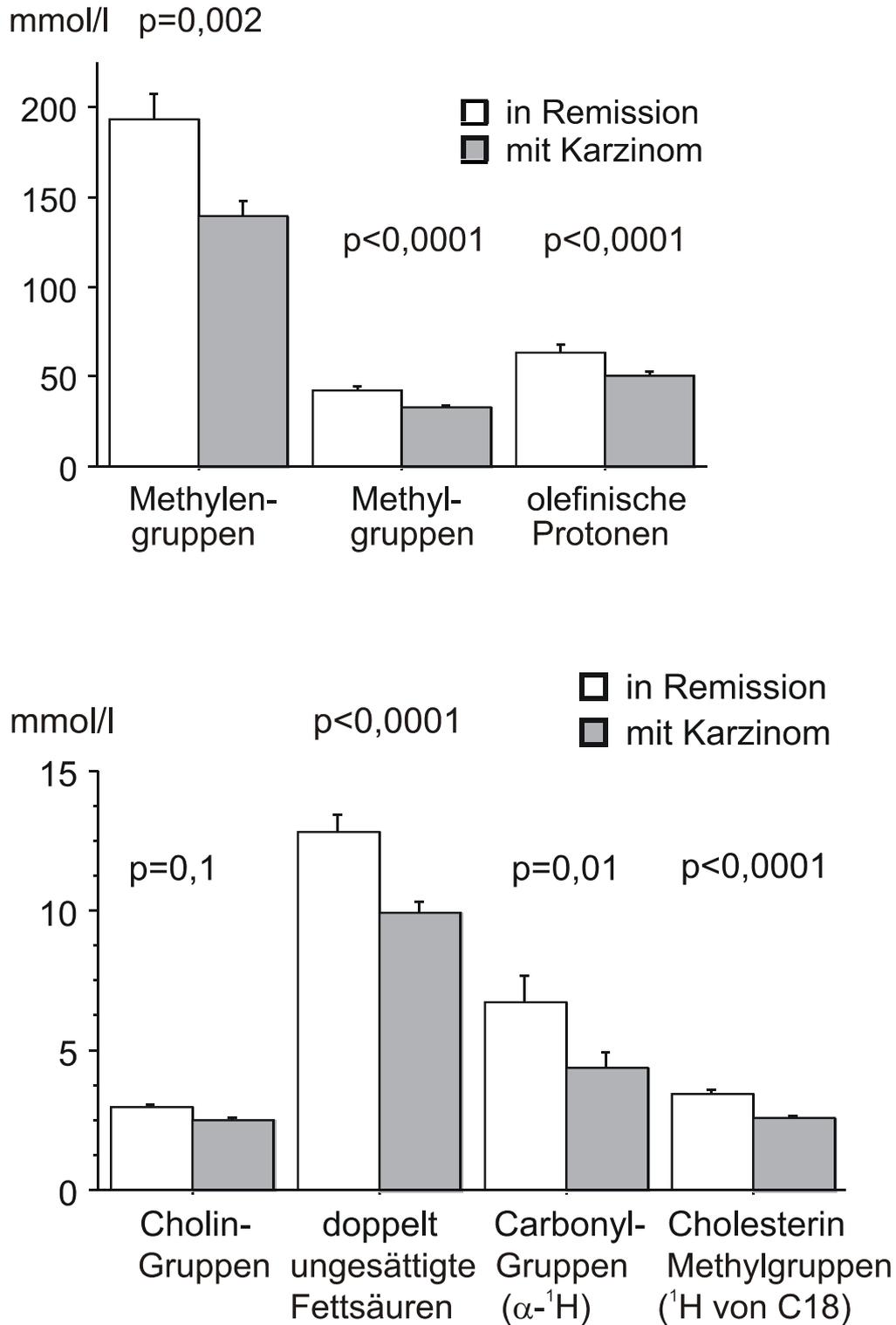


Abbildung 46: Konzentrationen der im ^1H -NMR-Spektrum sichtbaren Lipide im Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und in Remission (Patientenkollektiv Tabelle 16). Mittelwerte und Standardabweichung des Mittelwerts sowie p-Werte des ungepaarten t-Tests.

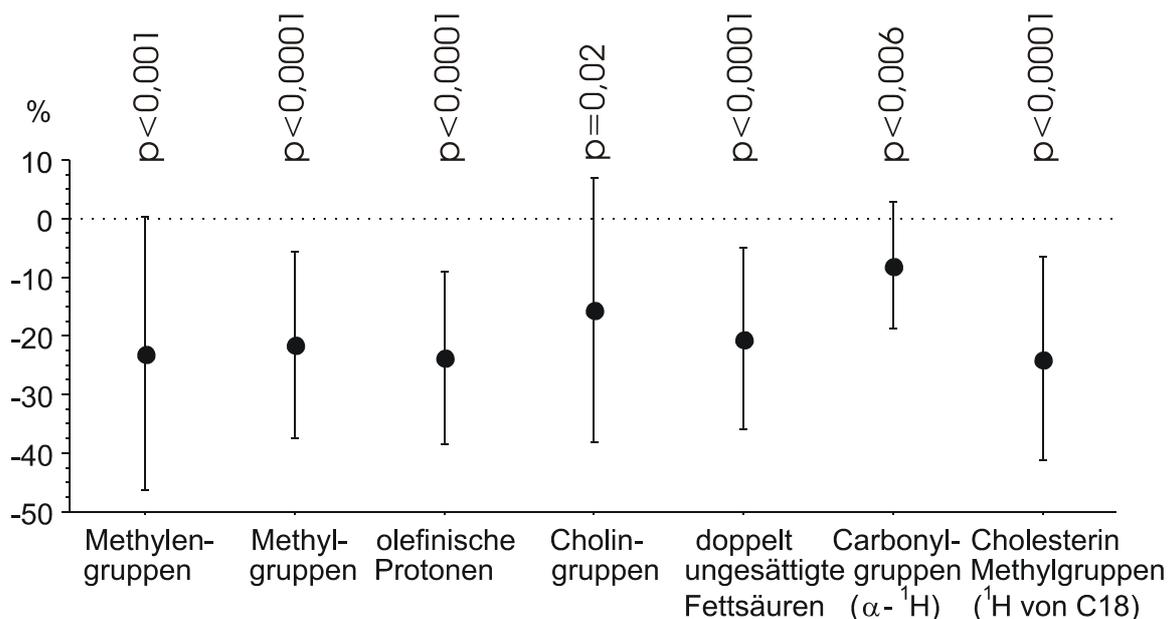


Abbildung 47: Prozentuale Veränderungen der im ^1H -NMR-Spektrum sichtbaren Lipidkonzentrationen im Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und in hypothyreoter Patienten in Remission (Patientenkollektiv Tabelle 16). Mittelwerte und Standardabweichungen sowie p-Werte des gepaarten t-Tests.

Tabelle 17: Konzentrationen der im ^1H -NMR-Spektrum sichtbaren Lipide im Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und in Remission (Patientenkollektiv Tabelle 16). Konzentrationsangaben in mmol/l.

Signal	Patienten mit Schilddrüsenkarzinom	Patienten in Remission
olefinische Protonen unges. Fettsäuren	50 ± 2	67 ± 4
Cholin	$3,1 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,3$
Methylengruppen mit zwei benachbarten Doppelbindungen	$10,0 \pm 0,4$	$13,0 \pm 0,5$
α -Carbonylprotonen von Fettsäuren	$4,6 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,9$
Methylengruppen gesättigter Fettsäuren	139 ± 8	193 ± 14
Methylgruppen von Fettsäuren	32 ± 1	43 ± 2
Methylgruppen von Cholesterin	$2,6 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,2$

Alle in den ^1H -NMR-Spektren untersuchten Konzentrationsänderungen der Lipide im Blutplasma sind hochsignifikant zwischen hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und hypothyreoten Patienten in Remission. Im Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom findet man im Schnitt 23 % weniger olefinische Fettsäuren, 16 % weniger Cholin, 23 % weniger Protonen mehrfach ungesättigter Fettsäuren, 9 % weniger α -Carbonylgruppen von Fettsäuren, 23 % weniger Methylengruppen, 22 % weniger Methylgruppen und 25 % weniger Methylgruppen des C18-Kohlenstoffatoms von Cholesterol.

Vergleichbar sind die Ergebnisse der im ^1H -NMR-Spektrum und im ^{31}P -NMR-Spektrum gefundenen Konzentrationen von Cholin. Im ^1H -NMR-Spektrum ist Cholin als einzelnes Signal zu erkennen, das durch Anteile des β -Glucosesignal bei 3,27 ppm überlagert wird, während im ^{31}P -NMR-Spektrum die vier cholinhaltigen Phospholipide als vier getrennte Signale integriert werden können: SM, LPC1, LPC2 und PC. Die Konzentrationen, die sich aus der Berechnung der ^1H -NMR-Spektren ergeben sind höher als die aus den ^{31}P -NMR-Spektren berechneten. Die Veränderungen zwischen hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und hypothyreoten Patienten in Remission liegen aber in beiden Fällen bei 0,6 bis 0,7 mmol/l. Dass das Cholinintegral bei den ^1H -NMR-Spektren größer ist und auch die größere Standardabweichung des Mittelwerts hat, liegt vermutlich an der Überlagerung mit dem Signal von β -Glucose.

Tabelle 18: Konzentrationen von Cholingruppen im Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und in Remission, bestimmt aus ^{31}P -NMR-Spektren und ^1H -NMR-Spektren. Konzentrationsangaben in mmol/l.

Signal	Patienten mit Schilddrüsenkarzinom	Patienten in Remission
^{31}P -NMR-Spektrum	$3,1 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$
^1H -NMR-Spektrum	$3,8 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,3$

Sortiert man das Patientenkollektiv in 3 Gruppen nach der Größe des Primärtumors, so erhält man ein überraschendes Ergebnis: 6 Personen mit pT1-Tumoren weisen im Vergleich zu 10 Personen mit pT2-Tumoren die größeren Lipidveränderungen im Vergleich zum Zustand in Remission auf (Tabelle 19 und Tabelle 20). Die 5 Patienten mit pT3- und pT4-Tumoren verhalten sich ähnlich wie die Patienten mit pT2-Tumor.

Tabelle 19: Konzentrationen der im ^1H -NMR-Spektrum sichtbaren Lipide im Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und in Remission, separiert nach Tumorgröße (Patientenkollektiv Tabelle 16). Konzentrationsangaben in mmol/l.

Signal	Patienten mit Schilddrüsenkarzinom			Patienten in Remission		
	pT1	pT2	pT3/4	pT1	pT2	pT3/4
olefinische Protonen	49 ± 3	51 ± 4	49 ± 3	77 ± 5	63 ± 5	62 ± 1
Cholin	2,5 ± 0,3	3,4 ± 0,6	3,2 ± 0,6	3,6 ± 0,3	3,8 ± 0,5	3,9 ± 0,3
Methylengruppen mit zwei Doppelbindungen	9,6 ± 0,5	10,2±0,7	10,1±0,7	14,5±0,9	12,4±0,8	12,3±0,4
α -Carbonylprotonen von Fettsäuren	5,0 ± 1,4	4,6 ± 0,6	4,1 ± 0,5	12,1±2,0	5,5 ± 0,5	5,3 ± 0,4
Methylengruppen gesättigter Fettsäuren	141 ± 20	141 ± 11	133 ± 12	263 ± 30	165 ± 12	165 ± 5
Methylgruppen von Fettsäuren	34 ± 3	32 ± 2	31 ± 2	51 ± 4	39 ± 2	40 ± 1
Methylgruppen von Cholesterin	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,4 ± 0,2

Tabelle 20: Konzentrationsveränderungen vom hypothyreoten Zustand mit Schilddrüsenkarzinom zum hypothyreoten Zustand in Remission, sortiert nach Tumorgröße.

Signal	pT1		pT2		pT3/4	
	Veränderung	Signifikanz	Veränderung	Signifikanz	Veränderung	Signifikanz
olefinische Protonen	- 36 %	p=0,0006	- 17 %	p = 0,02	- 19 %	p = 0,03
Cholin	- 32 %	p=0,0004	- 6 %	n.s.	- 15 %	n.s.
Methylengruppen mit zwei Doppelbindungen	- 34 %	p=0,0003	- 18 %	p = 0,004	- 17 %	n.s.
α - Carbonylprotonen von Fettsäuren	- 54 %	p = 0,03	- 16 %	p = 0,05	- 19 %	n.s.
Methylengruppen gesättigter Fettsäuren	- 44 %	p = 0,01	- 12 %	p = 0,05	- 19 %	n.s.
Methylgruppen von Fettsäuren	- 33 %	p = 0,003	- 15 %	p = 0,01	- 22 %	p = 0,03
Methylgruppen von Cholesterin	- 34 %	p=0,0007	- 18 %	p = 0,009	- 24 %	n.s.

Ebenfalls überraschend ist, dass die größten Unterschiede nicht etwa bei den hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom auftraten, sondern in der Nachuntersuchung, als sie hypothyreot in Remission waren. Bei der geringen Zahl der Proben von Patienten mit pT1-Tumor sowie mit pT3/4-Tumor ist allerdings fraglich, ob die hier beschriebenen Unterschiede repräsentativ sind und in einem größeren Kollektiv bestätigt werden können.

Die Existenz von Metastasen scheint für die ^1H -NMR-Spektren von Blutplasma keine Rolle zu spielen. Man findet keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen und Patienten ohne solche. Ein Vergleich zwischen den 5 Patienten mit rein follikulären Tumoren und den 16 Patienten mit papillären Tumoren und gemischten Tumortypen ergab keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 21).

Tabelle 21: Konzentrationsveränderungen vom hypothyreoten Zustand mit Schilddrüsenkarzinom zum hypothyreoten Zustand in Remission, sortiert nach Tumortyp. (n.s. = nicht signifikant)

Signal	papillär	follikulär	Signifikanz
olefinische Protonen	- 23 %	- 27 %	n.s.
Cholin	-18 %	- 9 %	n.s.
Methylengruppen mit zwei Doppelbindungen	- 24 %	- 17 %	n.s.
α - Carbonylprotonen von Fettsäuren	- 28 %	- 26 %	n.s.
Methylengruppen gesättigter Fettsäuren	- 23 %	- 22 %	n.s.
Methylgruppen von Fettsäuren	- 23 %	- 17 %	n.s.
Methylgruppen von Cholesterin	- 26 %	- 18 %	n.s.

Zum Schluss soll noch untersucht werden, ob man anhand der ^1H -NMR-Spektren unterscheiden kann, auf welche der Lipoproteinfraktionen im Blutplasma die bisher beschriebenen Veränderungen zurückzuführen sind: Auf VLDL, LDL, HDL oder auf mehrere Fraktionen zusammen.

Die Unterscheidung erfolgte mittels der Tabelle der chemischen Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum (Tabelle 5) und den in der Literatur angegebenen Vergleichsspektren für unterschiedliche Lipoproteinfraktionen.^{53,54} Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 48 zwei ^1H -NMR-Spektren von Blutplasma mit sehr unterschiedlich konzentrierten Lipoproteinfraktionen zu sehen. Das eine wird von VLDL Signalen dominiert, das andere von LDL Signalen.

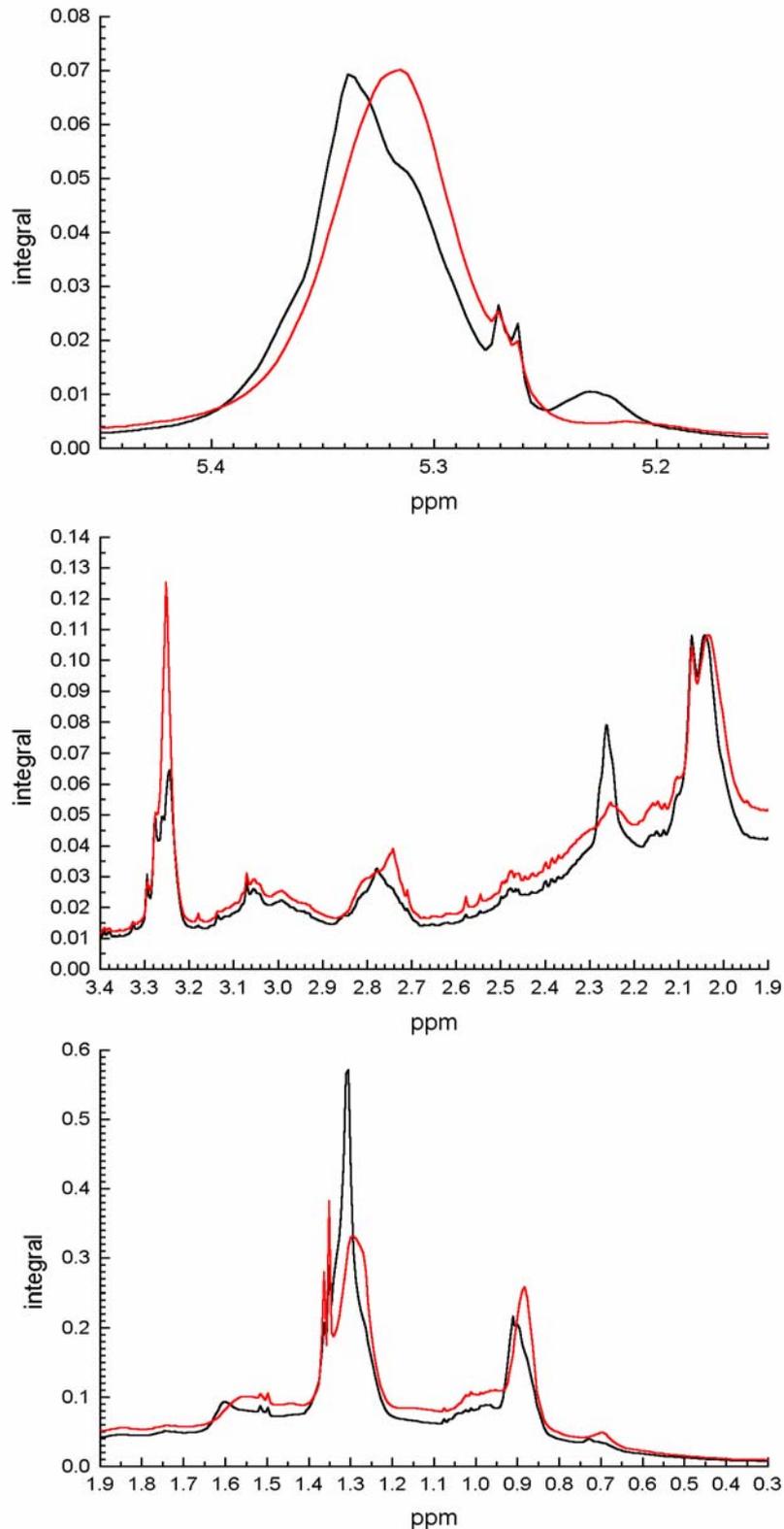


Abbildung 48: Normierte Scheibchenintegrale von ^1H -NMR-Spektren von Blutplasma unterschiedlicher Patienten. Die Lipidsignale des einen Spektrums werden von VLDL dominiert (schwarze Linie), die des anderen von LDL (rote Linie).

Diese nach Lipoproteinfraktionen differenzierte Auswertung der Veränderungen bei hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom im Vergleich zu hypothyreoten Patienten in Remission konnte für das in Tabelle 16 angegebene Patientenkollektiv leider nur qualitativ vorgenommen werden. Dazu wurde jedes Spektrenpaar auf Veränderungen der folgenden Signale untersucht:

- N⁺(CH₃)₃ von Cholin bei 3,24 ppm (HDL und LDL)
- CH₂-CO von Triglyceriden bei 2,25 ppm (VLDL)
- NH-CO-CH₃ von Glycoprotein bei 2,07 ppm
- CH₂- von Lipiden bei 1,31 ppm (VLDL) bei 1,29 ppm (LDL) und bei 1,27 ppm (HDL)
- CH₃ von Cholesterol bei 0,69 ppm (HDL und VLDL).

In Tabelle 22 ist notiert, ob das Signal beim hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom kleiner (-) oder größer (+) ist als beim gleichen Patienten in hypothyreotem Zustand in Remission oder unverändert (o).

Quantitative Veränderungen der Lipoproteinfraktionen könnten in einer weiteren Studie durch computergestützte Auswertelgorithmen erfasst werden. Sie würden allerdings ein größeres Patientenkollektiv erfordern, da die Algorithmen erst durch Vergleichsspektren mit bekannten Lipoproteinkonzentrationen trainiert werden müssten.

Die in Tabelle 22 rein qualitativ angegebenen Veränderungen zeigen, dass der Trend zu niedrigen Lipidkonzentrationen bei hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom verglichen mit hypothyreoten Patienten in Remission für jede der untersuchten Lipoproteinfraktionen gilt. Tabelle 22 zeigt aber auch, dass es für jede der hier untersuchten Lipoproteinfraktionen mindestens eine Ausnahme gibt, außer bei HDL.

Tabelle 22: Qualitative Unterschiede im Blutplasma von hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom gegenüber hypothyreoten Patienten in Remission.

Patient	Cholin	Glycoprotein	VLDL	LDL	HDL
1	-	0	-	0	-
2	0	-	-	0	0
3	0	0	0	0	0
4	-	+	0	-	0
5	-	+	-	0	-
6	-	-	-	0	0
7	-	-	-	-	-
8	0	0	+	-	-
9	-	0	0	-	-
10	+	-	0	+	0
11	+	-	-	-	0
12	-	-	-	-	0
13	-	-	-	0	-
14	-	-	-	-	-
15	+	-	0	-	0
16	-	+	-	-	-
17	-	+	-	-	-
18	-	+	-	-	-
19	-	+	-	-	-
20	-	-	-	0	-
21	-	-	0	-	0

Eine Konzentrationssteigerung ist mit „+“ gekennzeichnet, eine Abnahme der Konzentration mit „-“, keine Veränderung mit „0“.

5.2.3 Diskussion

Die ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen an hypothyreoten Patienten zeigten, dass Patienten mit Schilddrüsenkarzinom signifikant niedrigere Konzentrationen von PE+SM und PC im Blutplasma haben als Patienten in Remission. Bei der Auswahl der Patienten für die beiden Kollektive wurde sehr genau darauf geachtet, dass sie nach Geschlecht, Alter und Schilddrüsenhormonkonzentration im Blutplasma vergleichbar waren. Der einzige bekannte signifikante Unterschied zwischen den Kollektiven war also die Existenz von Schilddrüsenkarzinomgewebe im Organismus, so dass angenommen werden kann, dass für die erniedrigten PE + SM und PC Konzentrationen der systemische Einfluss des Schilddrüsenkarzinomgewebes verantwortlich ist.

Diese Beobachtungen sind konsistent mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen: Hämatologische Krebserkrankungen wie akute Leukämien,⁷⁵ maligne Lymphome⁷⁶ und multiple Myelome⁷⁷ zeigten analoge Befunde. Beim Nierenzellkarzinom hingegen fand man keine signifikante Veränderung in den Konzentrationen von PE+SM und PC, wohl aber von LPC1.⁷⁸

Erhöhte Konzentrationen von Phosphomonoestern^{79,80} und Phosphodiestern^{81,80} in Karzinomgewebe deuten darauf hin, dass Krebszellen einen höheren Phospholipidmetabolismus haben als gesunde Zellen. In Experimenten mit Zellkulturen zeigten Daly et al., wie die Konzentrationen von Phosphorylcholin und Phosphorylethanolamin in Brustkrebszellen steigen, wenn die Zellen zum Wachstum angeregt werden.⁸² Umgekehrt sanken die Konzentrationen von Phosphomonoestern und Phosphodiestern im Tumorgewebe von Mäusen nach Behandlung mit Tumornekrosefaktor alpha.⁸³ Ting et al. konnten die Konzentrationen dieser beiden Phosphomonoester direkt mit der Bösartigkeit der Zellen korrelieren.⁸⁴

Aufgrund der hohen Replikationsrate der Krebszelle kann man von einem erhöhten Phospholipidbedarf gegenüber gesunden Zellen ausgehen. Die meisten Zellen decken ihren Bedarf an Phospholipiden zum einen Teil durch die eigene Biosynthese innerhalb der Zelle und zum anderen Teil durch molekulare Austauschreaktionen mit HDL und LDL, den phospholipidreichen Fraktionen der Lipoproteine.^{16,18,19} Insofern besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Phospholipidbedarf der Zelle und den Lipoproteinkonzentrationen von HDL und LDL.

Als weitere Ursache für ein erhöhtes Zellwachstum bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinom muss man die TSH-Konzentration nennen, die das Wachstum von gesundem Schilddrüsengewebe und Schilddrüsenkarzinomgewebe stimuliert.^{85,86} Die Patienten der hier untersuchten Kollektive waren alle im hypothyreoten Zustand, hatten also alle eine hohe TSH-Konzentration im Blutplasma. Bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinom konnte TSH das Wachstum von Schilddrüsenzellen beschleunigen, bei Patienten in Remission fehlten jedoch die Zielzellen für TSH, das Hormon konnte bei diesen Patienten also keine wachstumsbeschleunigende Wirkung auf Zellen im Organismus ausüben.

TSH verstärkt nach dieser Argumentation also die systemische Wirkung von Schilddrüsenkarzinomgewebe auf das Blutplasma. Dies kann eine mögliche Ursache dafür sein, dass Das und Isichei⁷³ im euthyreoten Zustand keine Unterschiede zwischen Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und Patienten in Remission gefunden haben. Ein weiterer Befund dieser indischen Arbeitsgruppe ist, dass der Anteil von Sphingomyelin an der Zellmembran von Schilddrüsenkarzinomen höher ist als in gesundem Schilddrüsengewebe.⁷³ Möglicherweise ist dies eine Ursache dafür, dass speziell die Sphingomyelinkonzentration im Blutplasma der untersuchten hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom sehr signifikant niedriger ist als im Blutplasma der hypothyreoten Patienten in Remission, deutlicher, als die anderen detektierten Phospholipidklassen.

Kobayashi et al. fanden, dass die Aktivität von Phospholipase C der Zellmembranen von Schilddrüsenkarzinomzellen signifikant erhöht ist gegenüber der von gesunden Zellen.⁸⁷ Möglicherweise ist die niedrige Konzentration von PC im Blutplasma hypothyreoter Patienten mit Schilddrüsenkarzinom auf diese hohe Phospholipase C Aktivität zurückzuführen. Die Abbauprodukte dieser enzymatischen Lipolyse sind Diacylglycerol, das nur in sehr geringer Konzentration in lebenden Zellen vorkommt und sofort in den Lipidstoffwechsel einbezogen wird, sowie Phosphorylcholin, das in vielen Karzinomzellen akkumuliert wird,⁸⁸ was möglicherweise auf diese hohe Phospholipase C Aktivität zurückzuführen ist.

Viele der bisher angegebenen Literaturstellen stützen die These, dass die niedrigen Phospholipidkonzentrationen bei hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom verglichen mit hypothyreoten Patienten in Remission mit dem beschleunigten Zellwachstum bei Karzinompatienten zusammenhängen. Da dieser Zusammenhang aber noch nicht konkret nachgewiesen

wurde, befasste sich eine inzwischen abgeschlossene Folgestudie mit der Frage, ob die hier gefundenen Ergebnisse mit der Wachstumsgeschwindigkeit des Karzinomgewebes korreliert werden können.

^{18}F FDG-PET (^{18}F -Fluorodesoxyglucose-Positronenemissionstomographie) wurde eingesetzt, um die Patientenkollektive in Tabelle 14 und Tabelle 15 genauer zu klassifizieren. Es konnte differenziert werden, ob es sich bei evtl. vorhandenem minimalem Schilddrüsenrestgewebe um gesundes oder Karzinomgewebe handelt. Da ^{18}F FDG-PET den Glucosemetabolismus detektiert, konnte nachgewiesen werden, welche Patienten besonders schnellwachsende und aggressive Tumore oder Metastasen hatten.⁸⁹

Es zeigte sich, dass die niedrigen Phospholipidkonzentrationen bei vorhandenem Schilddrüsenrestgewebe sowohl bei Patienten mit Karzinomgewebe als auch bei Patienten mit minimalem gesundem Restgewebe auftraten. Die Erniedrigung der Konzentrationen von PE+SM und PC gegenüber hypothyreoten Patienten in Remission war jedoch bei Patienten mit minimalem gesundem Restgewebe deutlich geringer als bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und/oder Metastasen.

Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie von Blutplasma eignet sich also nicht nur zum Nachweis auf Schilddrüsenengewebe, das durch TSH zum Wachstum angeregt wird (gesunde Zellen oder Krebsgewebe). Vielmehr kann die Methode direkt einen Hinweis geben, ob Schilddrüsenkrebsgewebe im Organismus vorhanden ist. Drei Patienten mit besonders aggressivem Tumor und ausgeprägter Metastatisierung hatten die niedrigsten Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma.⁸⁹

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Unterschiede der ^{31}P -NMR-Spektren von hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und in Remission sind also diagnostisch nutzbar. Sie können den erfolgreichen Verlauf der bisherigen Tumorthherapie aufzeigen bzw. auf notwendige weitere Maßnahmen zur Bekämpfung des Schilddrüsenkarzinoms hinweisen.

Phospholipide werden im Blutplasma als Außenhülle der Lipoproteine transportiert, die daher eine wichtige Phospholipidquelle sowohl für die gesunde als auch für die Tumorzelle darstellt. Insofern ist es nicht überraschend, dass die Befunde der bisher diskutierten ^{31}P -NMR-Spektroskopie an Blutplasma mit denen der ^1H -NMR-Spektroskopie in Einklang stehen.

Seit langem ist bekannt, dass die Lipoproteinkonzentrationen im Blutplasma von Krebspatienten und gesunden Probanden sehr signifikante Unterschiede aufweisen, zum Beispiel stark erhöhte VLDL Konzentrationen und erniedrigte HDL Konzentrationen bei Frauen mit Brustkrebs verglichen mit gesunden Frauen.⁹⁰ Hohe Cholesterinanteile in HDL⁹¹ werden als Risikofaktor für Brustkrebs diskutiert, da Frauen mit hohen Cholesterinanteilen in HDL durchschnittlich häufiger daran erkranken als die Gesamtheit der weiblichen Bevölkerung. Ebenfalls wird vermutet, dass die verstärkte Peroxidation ungesättigter Fettsäuren⁹² ein Brustkrebsrisiko darstellt. Bei den meisten anderen Krebsarten fand man dagegen niedrige Konzentrationen von Gesamtcholesterin, verestertem Cholesterin und LDL Cholesterin.⁹³ Diese Charakteristika scheinen reversibel zu sein, denn für Patienten mit erfolgreicher Chemotherapie gibt es Verlaufskontrollen, die steigende Konzentrationen für Gesamtcholesterin und LDL Cholesterin ergaben.⁹⁴ Konzentrationen von Triglyceriden und VLDL in Blutplasma von Krebspatienten sind zwar im Schnitt erhöht gegenüber gesunden Probanden, aufgrund der hohen Streuung aber nicht signifikant.

Untersuchungen an Zellen und Gewebe zeigen dagegen, dass besonders die hohen Triglyceridkonzentrationen ein signifikantes Merkmal für Tumorzellen sind.⁹⁵ Kuesel et al. zeigten, dass die Konzentration von „mobilen“ Triglyceriden, die im ^1H -NMR-Spektrum sichtbar sind, vor allem in nekrotischen Zellen erhöht ist.⁹⁶ Triglyceride in den Zellen sind im Gegensatz zu den anderen Lipidbausteinen (Cholesterin und Phospholipide) nicht am Aufbau der Zellmembran beteiligt, sondern dienen als Energiespeicher.⁹⁷ Mountford et al. fanden einen Zusammenhang zwischen hohen Konzentrationen sowohl von Phosphomonoestern als auch von Triglyceriden der Zelle mit dem Differenzierungsgrad und der Fähigkeit zur Metastasierung.⁹⁸ Dies deutet zum einen auf einen hohen Energiestoffwechsel der Tumorzelle, zum anderen auf einen hohen Phospholipidstoffwechsel hin, was mit der oben beschriebenen Beobachtung übereinstimmt, dass anhand der ^{18}F FDG-PET Untersuchung (die den Energiestoffwechsel detektiert) Vorausagen möglich sind, welche Patienten besonders niedrige Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma haben.

Die in dieser Arbeit untersuchten Unterschiede im Blutplasma zwischen hypothyreoten Schilddrüsenkarzinompatienten und hypothyreoten Patienten in Remission waren in der ^1H -NMR-Spektroskopie zwar noch signifikanter als in der ^{31}P -NMR-Spektroskopie, man muss allerdings berücksichtigen, dass zwei unterschiedliche Patientenkollektive ^{31}P -NMR-spektroskopisch untersucht wurden, während nur ein einziges Patientenkollektiv mit der ^1H -NMR-Spektroskopie vermessen wurde, einmal bei noch vorhandenem Schilddrüsenkarzinomgewebe und einmal in Remission. Dadurch fallen individuelle Unterschiede im Lipidstoffwechsel weit weniger ins Gewicht. In einer weiteren Arbeit könnte sich ergeben, dass unter diesen idealen Bedingungen auch die Ergebnisse der ^{31}P -NMR-Spektroskopie ihre Signifikanz noch weiter steigern.

Für diese These gibt es aber auch ein Gegenargument: Die Unterschiede der Cholinkonzentrationen sind in den ^1H -NMR-Spektren weit weniger signifikant als bei anderen Lipidbestandteilen. Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie an Blutplasma würde also vermutlich ebenfalls weniger signifikante Ergebnisse für die cholinhaltigen Phospholipide liefern als die ^1H -NMR-Spektroskopie für Lipidbestandteile wie Cholesterin, ungesättigte Fettsäuren, etc.

Die nach Lipoproteinen differenzierte Auswertung in Tabelle 22 war hier leider nur rein qualitativ möglich. Tabelle 22 zeigt aber, dass die davor angewandte Methode der Integration nach chemischen Gruppen, beispielsweise von den CH_2 -Gruppen oder von Cholesterin (Protonen des C18-Kohlenstoffatoms), möglicherweise erfolgreicher ist als eine differenzierte Auswertung nach Lipoproteinen. Hypothyreote Patienten in Remission hatten zwar allgemein höhere Lipidkonzentrationen als hypothyreote Patienten mit Schilddrüsenkarzinom. Während bei den einen Patienten diese Unterschiede allerdings auf Unterschiede der VLDL Fraktion zurückzuführen war, war es bei anderen Patienten eher die LDL Fraktion, die HDL Fraktion oder mehrere Fraktionen zusammen. Um hier ein klareres Bild zu erhalten, sind Untersuchungen an einem größeren Kollektiv und die Möglichkeit der quantitativen Lipoproteinanalyse notwendig.

Warum die Veränderungen bei den pT1-Tumoren größer waren als bei den pT2-Tumoren, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Möglicherweise braucht der Organismus als „Host“ der Tumorzellen Zeit, um seinen Lipidmetabolismus auf den wachsenden Tumor einzustellen. Der Lipidmetabolismus wird aus seinem Gleichgewicht gebracht und pendelt sich nach einer Zeit

des Tumorwachstums wieder auf einen stationären Zustand ein. Natürlich ist dies nur Spekulation, es zeigt aber, mit welchen Fragestellungen sich Folgeuntersuchungen befassen können. Dazu gehört auch die Korrelation der Ergebnisse des Kollektivs der ^1H -NMR-Spektroskopie mit den Ergebnissen der ^{18}F FDG-PET Diagnose, die sich für die ^{31}P -NMR-Spektroskopie als so erfolgreich erwiesen hatte.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich sowohl mit der ^{31}P -, also auch mit der ^1H -NMR-Spektroskopie an menschlichem Blutplasma. Mit den ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen gelang es, eine reproduzierbare und einfach anwendbare Methode zu entwickeln, um fünf verschiedene Phospholipidklassen im Blutplasma absolut zu quantifizieren: Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin (PE + SM), Lysophosphatidylcholin1 (LPC1), Lysophosphatidylcholin2 (LPC2), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylcholin (PC). Bisher waren aufwendige Extraktionsverfahren notwendig, um eine solche Phospholipidbestimmung ^{31}P -NMR-spektroskopisch vorzunehmen.

Um eine solche absolute Quantifizierung zu erreichen, wurde dem Blutplasma eine Standardlösung zugegeben, die neben Deuteriumoxid als Locksubstanz und Natriumcholat als Detergens eine Standardsubstanz enthielt. Mit N-Phosphonomethylglycin (PMG) und n-Butylphosphonsäure wurden zwei zur internen Referenzierung geeignete Substanzen gefunden. Es wurden pH-abhängige Messungen durchgeführt, die zeigten, dass Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) chemische Verschiebungen haben, die stark mit dem pH-Wert variieren. Dies ist für eine gute Signalauflösung bei der Aufnahme von Spektren an Zellen zu beachten, die eine andere Phospholipidzusammensetzung haben als Blutplasma. Die Messtemperatur wurde mit 37°C physiologischen Bedingungen angepasst. Dies hat außerdem den Vorteil, dass die Signale von Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylcholin (PC) im Spektrum getrennt erscheinen und separat integriert werden können. Um auch LPC2, das nur in geringer Konzentration im Blutplasma enthalten ist, quantifizieren zu können, wurden 6000 Messdurchläufe akkumuliert.

Die hier entwickelte Methode zur Bestimmung der Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma hat gegenüber enzymatischen oder chromatographischen Methoden den Vorteil, dass das NMR-Spektrum bei bekannter Konzentration der Standardsubstanz in einem einzigen Spektrum zeigt, welche Phospholipide enthalten sind (qualitative Analyse) und in welcher Konzentration sie enthalten sind (quantitative Analyse).

Mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie wurden die sogenannten „neutralen Lipide“ (Triglyceride und Cholesterin) im Blutplasma quantifiziert. Auch hier wurde ein interner Standard gewählt (3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3- D_4]-natriumpropionat), mit dessen Hilfe man durch den Vergleich der Integrale im Spektrum die Lipidkonzentrationen direkt berechnen kann. Aufgrund des Lösungsverhaltens der Lipide im Blutplasma erhält man jedoch nicht die Konzentration aller Lipide, sondern nur den Anteil der Lipide, der im Medium der Messung eine genügende molekulare Beweglichkeit hat. Da diese Beweglichkeit stark temperaturabhängig ist, wurden die Messungen bei 37°C durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass auch das C18-Methylsignal von Cholesterin sichtbar wurde. Es wurde nachgewiesen, dass der Anteil der Lipide, der im ^1H -NMR-Spektrum sichtbar ist, durch Anwendung der MAS-Technik (Rotation um den Magischen Winkel) deutlich erhöht werden kann. Für Reihenuntersuchungen an Patientenkollektiven wurde jedoch wegen des hohen Aufwands bisher auf diese Technik verzichtet.

Die Signalüberlagerungen im ^1H -NMR-Spektrum von Blutplasma stellen erhebliche Schwierigkeiten bei der spektroskopischen Quantifizierung der Lipide dar. In dieser Arbeit wurde eine völlig neuartige Methode entwickelt, wie eine solche Lipidbestimmung reproduzierbar und automatisierbar durchgeführt werden kann. Dazu wurde das ^1H -NMR-Spektrum in kleine Scheibchen unterteilt. Für jedes dieser Scheibchen wurde die Fläche berechnet. Aus dem Spektrenhabitus wurden für das Standardsignal und jedes der charakteristischen Lipidsignale im Blutplasma Integrationsgrenzen festgelegt, zwischen denen das Summenintegral durch Addition der Scheibchenflächen gebildet wurde. Der Anteil breiter Signale, die zu einer Anhebung der Grundlinie führten, wurde von diesem Gesamtintegral abgezogen. Gut aufgelöste, scharfe Signale wurden separat integriert und ebenfalls abgezogen.

Mit dieser Methoden wurden folgende Lipidgruppen im Blutplasma quantifiziert: Olefinische Protonen, Cholin, doppelt allylische Protonen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, α -Carbonylprotonen, Methylengruppen, Methylgruppen und C18-Methylgruppen von Cholesterin.

Alle Spektren wurden auf das Integral der Standardsubstanz normiert. Die Breite der einzelnen Integralscheibchen wurde so klein gewählt, dass die Diagramme der Integrale näherungsweise das normale $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum abbilden.

Nach der Entfernung der Schilddrüse befinden sich die Patienten während der Radioiodtherapie und während der Kontrolluntersuchung (^{131}I -Ganzkörperszintigraphie) in einem hypothyreoten Zustand (Schilddrüsenunterfunktion). Es konnte in einem ersten Schritt gezeigt werden, dass die Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma mit steigender Schilddrüsenfunktion abnehmen. Dies gilt nicht nur für den Vergleich zwischen hypothyreoten und euthyreoten Patienten, sondern in gleichem Maße auch für hyperthyreote Patienten. Niedrige Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma bei hoher Schilddrüsenfunktion wurden für alle Phospholipidklassen gefunden. Diese Unterschiede waren bis auf die von Lysophosphatidylcholin signifikant. Sie zeigen sich sowohl in voneinander unabhängigen Personenkollektiven (hypothyreote Patienten in Remission, gesunde Probanden, Patienten mit latenter und manifester Hyperthyreose) als auch in Kollektiven der gleichen Personen mit unterschiedlichem Schilddrüsenstatus (Patienten in Remission einmal im hypothyreoten Zustand und 3-6 Monate später im euthyreoten Zustand).

Beim Vergleich zwischen hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und hypothyreoten Patienten in Remission wurde daher besonderer Wert darauf gelegt, dass diese Patientenkollektive gleiche fT_3 -, fT_4 - und TSH-Konzentrationen hatten. Keine der Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma unterschied sich signifikant zwischen weiblichen und männlichen Patienten, daher brauchte keine Rücksicht auf das Geschlecht genommen zu werden. Hypothyreote Patienten mit Schilddrüsenkarzinom hatten gegenüber hypothyreoten Patienten in Remission 17,9 % weniger PE + SM im Blutplasma ($p = 0,0001$), 12,4 % weniger LPC1 (nicht signifikant), 11,1 % weniger LPC2 (nicht signifikant), 16,2 % weniger PI (nicht signifikant) und 21,5 % weniger PC ($p = 0,006$). Berücksichtigt man, dass bei normalverteilten Zufallsgrößen 96 % der Messwerte im Bereich $\bar{x} \pm 2\sigma$ liegen (\bar{x} = Mittelwert, σ = Standardabweichung), so konnten 14 der 33 untersuchten Blutplasmaproben eindeutig der richtigen Gruppe zuordnen

werden, es gibt keine falsch positive Probe. Die 19 restlichen Proben hatten mittlere Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma, die sowohl in hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom, also auch in hypothyreoten Patienten in Remission gefunden werden. Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie vermag also bei 42 % der Nachsorgepatienten eine eindeutige Diagnose zu stellen bei einem äußerst geringen Risiko einer falschen Diagnose. Veranschaulichen kann man dieses Ergebnis auch durch eine zweidimensionale Auftragung der PE + SM- und der PC-Konzentration. Die Messwerte von hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und hypothyreoten Patienten in Remission werden im Diagramm in Punktwolken zusammengefasst, die sich überschneiden. 13 der Patienten sind in diesem Diagramm eindeutig zu klassifizieren.

Mithilfe von ^{18}F -PET Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass besonders Patienten mit schnellwachsenden und aggressiven Tumoren sehr niedrige Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma haben.⁸⁹ Da gerade diese schnellwachsende und aggressive Schilddrüsenkarzinome wenig differenziert sind und zum Teil kein Iod speichern, können sie durch die ^{131}I -Szintigraphie nicht sichtbar gemacht werden. Gerade in diesem Fall ist dagegen die diagnostische Unterscheidung durch die ^{31}P -NMR-Spektroskopie besonders erfolgreich.

Versuche, signifikante Einflüsse des Schilddrüsenkarzinoms auf das Blutplasma auch mittels der ^1H -NMR-Spektroskopie zu finden, schlugen zuerst fehl. Führt man ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen an Blutplasma jedoch nicht in zwei voneinander unabhängigen Kollektiven durch, sondern vermisst das Blutplasma des Patientenkollektivs zweimal, nämlich einmal in hypothyreotem Zustand mit Schilddrüsenrestgewebe / Metastasen und einmal im hypothyreoten Zustand in Remission, so findet man hochsignifikante Veränderungen, die den Befunden der ^{31}P -NMR-Spektroskopie gleichen. Um die hohen individuellen Unterschiede der Lipoproteinkonzentrationen der Patienten zu berücksichtigen, wurden für jeden Patient einzeln die prozentuale Erniedrigungen der Lipidkonzentrationen in hypothyreotem Zustand mit Schilddrüsenkarzinom gegenüber dem hypothyreoten Zustand in Remission bestimmt. Die Patienten hatten in hypothyreotem Zustand mit Schilddrüsenkarzinom gegenüber dem hypothyreoten Zustand in Remission im Schnitt 23 % ($p < 0,0001$) weniger olefinische Gruppen von Fettsäuren, 16 % ($p = 0,02$) weniger Cholingruppen, 23 % ($p < 0,0001$) weniger Methylengruppen mehrfach ungesättigter Fettsäuren, 9 % ($p < 0,006$) weniger Methylengruppen in α -Stellung zur Carbonylgruppe von veresterten Fettsäuren, 23 % ($p < 0,001$) weniger Methylengruppen, 22 %

($p < 0,001$) weniger Methylgruppen von Fettsäureketten und 25 % ($p < 0,0001$) weniger C18-Methylgruppen von Cholesterin im Blutplasma. Das Ausmaß dieser Veränderungen hängt weder vom Tumortyp ab (papillär, follikulär oder Mischformen), noch von evtl. vorhandenen Metastasen, wohl aber vom Tumorstadium. Überraschenderweise bewirken Mikrokarzinome der Größe pT1 eine wesentlich stärkere Erniedrigung der untersuchten Lipidkonzentrationen im Blutplasma als Schilddrüsenkarzinome der Größen pT2, pT3 und pT4. Gründe für diesen Befund sind bisher nicht bekannt und könnten Anlass zu weiteren Untersuchungen sein.

Die qualitative Analyse der Differenzspektren nach Veränderungen in den Lipoproteinkonzentrationen zeigt, dass der Trend zu niedrigen Lipidkonzentrationen bei hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom gegenüber hypothyreoten Patienten in Remission sowohl für HDL als auch für LDL und VLDL gilt. HDL ist jedoch die einzige der Lipoproteinfraktionen ohne Ausreisser. Da HDL gleichzeitig die phospholipidreichste der Lipoproteinfraktionen ist, steht dies in guter Übereinstimmung damit, dass die ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen besonders erfolgreich verlaufen sind.

Die vorliegende Arbeit lieferte vielversprechende Ergebnisse, die in der Nachsorgediagnostik von Schilddrüsenkrebspatienten nutzbar gemacht werden können. Bevor die ^{31}P - und ^1H -NMR-Spektroskopie an Blutplasma jedoch routinemäßig eingesetzt werden kann, müssen die hier beschriebenen Befunde an größeren Patientenkollektiven bestätigt und statistisch abgesichert werden.

III Anhang

7 Technische Details

7.1 Geräte

NMR-Spektrometer

AMX 300 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Karlsruhe.

Meßfrequenz: ^1H : 300,13 MHz

^{31}P : 121,50 MHz

DRX 500 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Karlsruhe.

Meßfrequenz: ^1H : 500,13 MHz

Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan als Standard für die ^1H -NMR-Spektren und auf 85 % Phosphorsäure als Standard für die ^{31}P -NMR-Spektren.

Ultraschallgerät

Sonopuls HD 70 Hochleistungs-Ultraschall-Desintegrator (mit Mikrospritze MS 73) der Firma BANDELIN electronic, Berlin.

7.2 Auswertungssoftware

WIN-NMR 5.1 und X-WIN-NMR 2.0 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik in Karlsruhe zur Prozessierung der Spektren.

PERCH, Version 091093, Universität Kuopio, Finnland zur Dekonvolution der ^{31}P -NMR-Spektren.

AMIX aus dem Programmpaket AURELIA 2.1.3 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik in Karlsruhe zur Berechnung der Scheibchenintegrale der ^1H -NMR-Spektren.

7.3 Chemikalien

Folgende Substanzen wurden käuflich erworben:

Adenosinmonophosphat	Sigma-Aldrich	
Adenosintriphosphat	”	
Aminosäurephosphate	”	
Cardiolipin	”	
Glycerinphosphat	”	
Kreatinphosphat	”	
Lysophosphatidylcholin	”	
Methyldiphosphonsäure	”	
Natriumcholat	”	
Phosphatidsäure	”	
Phosphatidylcholin	”	
Phosphatidylethanolamin	”	
Phosphatidylinositol	”	
Phosphonomethylglycin	”	
Sphingomyelin	”	
n-Butylphosphonsäure		Avocado
tert-Butylphosphonsäure		”
Deuteriumoxid		Deutero
Na ₂ EDTA-Dihydrat		Fluka
Phosphorsäuremonobutylester		Merck
Phosphorsäuredibutylester		Fluka
Tributylphosphan		”
3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3-D ₄]-natriumpropionat		”
Triphenylphosphanoxid		”

IV Literaturverzeichnis

- ¹ Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M., *Phys. Rev.* 69, 127 (1946).
- ² Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V., *Phys. Rev.* 69, 37 (1946).
- ³ Odeblad, E., Bhar, B.N., Lindström, G., *Arch. Biochem. Biophys.* 63, 221-225 (1956).
- ⁴ Odeblad, E., Westin, B., *Acta Radiol.* 49, 390-392 (1958).
- ⁵ Ernst, R.R., Anderson, W.A., *Rev. Sci. Instrum.* 37, 93-102 (1966)
- ⁶ Kumar, A., Welti, D., Ernst, R.R., *J. Magn. Reson.* 18, 69-83 (1975).
- ⁷ Damadian, R., *Science* 171, 1151-1153 (1971).
- ⁸ Griffiths, J.R., Iles, R.A., *Biosci. Rep.* 2, 719-725 (1982).
- ⁹ Moka, D., Theissen, P., Linden, A., Waters, W., Schicha, H., *Nucl. Med.* 30, 77 (1991).
- ¹⁰ Koppelman, S., Doktorarbeit, Köln (1995).
- ¹¹ Cullis, P.R., Hope, J., *Biochim. Biophys. Acta* 559, 399-420 (1979).
- ¹² Hawthorne, J.N., Ansell, G.B. (eds.), *Phospholipids*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford (1982).
- ¹³ Cullis, P.R., Hope, M.J., *Biochim. Biophys. Acta* 597, 533-42 (1980).
- ¹⁴ Rouser, G., Kitchevsky, G., Yamamoto, A., *Adv. Lipid Res.* 10, 261-360 (1972).
- ¹⁵ Kawamoto, T., Okano, G., Akino, T., *Biochim. Biophys. Acta*, 619, 20-34 (1980).
- ¹⁶ Dawson, R.M.C., *Sub-Cell. Biochem.* 2, 69-89 (1973).
- ¹⁷ Stoffel, W., Melzner, I., *Z. Physiol. Chem.* 361, 755-771, (1980).
- ¹⁸ Nichols, A.V., *Proc. Natl. Sci. U.S.* 64, 1128-1137 (1969).
- ¹⁹ Illingworth, D.R., Portman, O.W., Robertson, A.L.jr., Magyar, W.A., *Biochim. Biophys. Acta* 306, 422-436 (1973)
- ²⁰ Jackson, R.L., Westerman, J., Wirtz, K.W.A., *FEBS Lett.* 94, 38-42 (1978).
- ²¹ Stryer, L., *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1994).
- ²² Touchstone, J.C., *Quantitative Thin Layer Chromatography*, Wiley, New York (1973).
- ²³ Rustenbeck, I., Lenzen, S., *J. Chromatogr. B* 525, 85-91 (1990).
- ²⁴ Nelson, G. (ed.), *Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism*, Wiley-Interscience, New York, London, Sydney and Toronto (1972).
- ²⁵ Christie, W.W., *J. Lipid Res.* 26, 507-512 (1985).
- ²⁶ Tadey, T., Purdy, W.C., *J. Chromatography B*, 671, 237-253 (1995).
- ²⁷ McHowat, J., Jones, J.H., Creer, M.H., *J. Lipid Res.* 37, 2450-2460 (1996).
- ²⁸ Gomez-Fernandez, J.C., Villalain, J., *Chem. Phys. Lipids*, 96, 41-52 (1998).
- ²⁹ Choi, G.T.Y., Casu, M., Gibbons, W.A., *Biochem. J.* 290, 717-721 (1993).
- ³⁰ Glonek, T., Merchant, T.E., *³¹P-NMR profiling of phospholipids in:* Christie, W.W. (ed.), *Advances in Lipid Methodology*, vol. 3, The Oily Press, West Ferry, Dundee, Scotland (1995).
- ³¹ Pearce, J.M., Shifman, M.A., Pappas, A.A., Komoroski, R.A., *Magn. Reson. Med.* 21, 107 (1991).
- ³² Henke, J., Willker, W., Engelmann, J., Leibfritz, D. *Anticancer Res.* 16, 1417-1428 (1996).
- ³³ Marinier, D.S., Letoublon, R., Delmau, J., *J. Lipid Res.* 29, 1237-1243 (1988).
- ³⁴ Pearce, J.M., Komoroski, R.A., *Magn. Reson. Med.* 29, 724-731 (1993).
- ³⁵ London, E., Feigenson, G.W., *J. Lipid Res.* 20, 408-412 (1979).
- ³⁶ Pearce, J.M., Komoroski, R.A., *Magn. Reson. Med.* 44, 215-223 (2000).
- ³⁷ Motekaitis, R.J., Martell, A.E., *J. Coord. Chem.* 14, 139-149 (1985).
- ³⁸ Raffelt, K., Diplomarbeit, Köln (1996).

- 39 Boon, J., Broekhuys, R.M., Van Munster, P, Schretlen, E, Clin. Chem. Acta, 23, 453-456 (1969)
- 40 Laatikainen, R, Niemitz, M, Malaisse, W.J., Biesemans, M, Willem, R, Magn. Reson. Med. 36, 359-365 (1996).
- 41 Precht, M., Bio- Statistik, R. Oldenbourg Verlag, München, Deutschland (1987).
- 42 Dixon, W.J., Biometrics 9, 74-89 (1953).
- 43 Strengers, P.F.W., van Aken, W.G., Blut - Von der Magie zur Wissenschaft, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1996).
- 44 Fossel, E.T., Carr, J.M., McDonagh, J., New Engl. J. Med. 315, 1369-1376 (1986).
- 45 Leray, G., de Ceratines, J.D., Anticancer Res. 14, 1839-1852 (1994).
- 46 Nicholson, J.K., Wilson, I.D., Progr. NMR Spectr. 21, 449-501 (1989).
- 47 Reglinski, J., Watson, I.D., Ann. Clin. Biochem., 33, 290-307 (1996).
- 48 Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Everett, J.R., Ann. Rep. NMR Spekt., 38, 1-79 (1999).
- 49 Cullis, P.R., Grathwohl, C., Biochim. Biophys. Acta, 471, 213-226 (1977).
- 50 Nouri-Sorkhabi, M.H., Agar, N.S., Sullivan, D.R., Gallagher, C., Kuchel, P.W., Exp. Biochem. Physiol. 113B, 221-227 (1996).
- 51 Kruatachue, M., Evert, R.F., Amer. J. Bot. 64, 310-325 (1977).
- 52 Nicholson, J.K., Foxall, P.J.D., Spraul, M., Farrant, R.D., Lindon, J.C., Anal. Chem., 67, 793-811 (1995).
- 53 Bell, J.D., Sadler, P.J., Macleod, A.F., Turner, P.R., La Ville, A., FEBS Letters, 219, 239-243 (1987).
- 54 Otvos, J.D., Jeyarajah, E.J., Benett, D.W., Clin. Chem. 37, 377-386 (1991).
- 55 Otvos, J.D., Jeyarajah, E.J., Bennett, D.W., Krauss, R.M., Clin. Chem. 38, 1632-1638 (1992).
- 56 Hiltunen, Y., Heiniemi, E., Ala-Korpela, M., J. Magn. Reson. B, 106, 191-194 (1995).
- 57 Ala-Korpela, M., Hiltunen, Y., Bell, J.D., NMR Biomed. 8, 235-244 (1995).
- 58 Ala-Korpela, M., Hiltunen, Y., Bell, J.D. Anticancer Res. 16, 1473-1478 (1996).
- 59 Pohl, L., Eckle, M., Angew. Chem. 81, 395 (1969).
- 60 Pschyrembel, W., Klinisches Wörterbuch, 257. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, New York (1994).
- 61 Pfannenstiel, P., Hotze, L.-A., Saller, B., Schilddrüsenkrankheiten Diagnose und Therapie, 3. Aufl., Berliner Medizinische Verlagsanstalt 1997.
- 62 Braverman, L.E., Utiger, R.D., The Thyroid, J.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown (1991).
- 63 Burger, A.G., Triangel, 22, 175-179 (1982).
- 64 Sterling, K., New Engl. J. Med., 300, 117-123 (1979).
- 65 Engler, H., Riesen, W.F., Clin. Chem. 39, 2466-2469 (1993).
- 66 Hylander, B, Rosenqvist, U., Acta Med. Scand. 211, 287-291 (1982)
- 67 Franklyn, J.A., Daykin, J., Betteridge J., Hughes E.A., Holder, R., Jones, S.R., Sheppard, M.C. Clin. Endocrinol. 38, 453-459 (1993).
- 68 Pazos, F., Alvarez, J.J., Rubies-Prat, J., Varela, C., Lasuncion, M.A., J. Clin. Endocrinol. Metab. 80, 562-566 (1995).
- 69 Benvenga, S., Robbins, J., Thyroid, 6, 595-600 (1996).
- 70 Moka, D., Theissen, P., Linden, A., Waters, W., Schicha, H., Nuklearmed. 30(3), 77-83 (1991).
- 71 Szmanska, G., Pikula, S., Zborowski, J., Biochim. Biophys. Acta, 1083, 265-270 (1991).
- 72 Li Volsi, V.A., Surgical Pathology of the Thyroid, Saunders, Philadelphia S.173 (1990).
- 73 Das, S.C., Isichei, U.P., Ind. J. Exp. Biol., 27, 538-544 (1989).
- 74 Boettiger, L.E., Acta Med. Scand., 193, 49-52 (1973).
- 75 Kuliszkiwicz-Janus, M., Baczynski, S., Biochim. Biophys. Acta, 1360, 71-83 (1997).

-
- ⁷⁶ Kuliszkiwicz-Janus, M., Baczynski, S., *Magn. Reson. Med.* 35, 449-456 (1996).
- ⁷⁷ Kuliszkiwicz-Janus, M., Baczynski, S., *NMR Biomed.* 8, 127-132 (1995).
- ⁷⁸ Süllentrop, F., *Doktorarbeit, Köln* (2001).
- ⁷⁹ Ruiz-Cabello, J., Cohen, J.S., *NMR Biomed.* 5, 226-233 (1992).
- ⁸⁰ Leach, M.O., Verrill, M., Glaholm, J., Smith, T.A.D., Collins, D.J., Payne, G.S., Sharp, J.C., Ronen, S.M., McCready, V.R., Powles, T.J., Smith, I.E., *NMR Biomed* 11, 314-340 (1998).
- ⁸¹ Carpinelli, G., Canese, R., Giannini, M., Belardelli, F., Podo, F., *Acta Med. Rom.* 30, 295-299 (1992).
- ⁸² Daly, P.F., Lyon, R.C., Faustino, P.J., Cohen, J.S., *J. Biol. Chem.*, 262, 14875-14878 (1987).
- ⁸³ Carpinelli, G., Canese, R., Giannini, M., Proietti, E., Belardelli, F., Podo, F., *Acta med. rom.* 30, 295-299 (1992).
- ⁸⁴ Ting, Y.-L.T., Sherr, D., Degani, H., *Anticancer Res.* 16, 1381-1388 (1996).
- ⁸⁵ Valente, W.A., Vitti, P., Kohn, L.D., Brandi, M.L., Rotella, C.M., Toccafondi, R., Tramontano, D., Aloï, S.M., Amtesì-Impìombato, F.S., *Endocrinology* 112, 71-79 (1983).
- ⁸⁶ Field, J.B., Bloom, G., Chou, M.C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47, 1052-1058 (1978).
- ⁸⁷ Kobayashi, K., Shaver, J.K., Liang, W., Siperstein, A.E., Duh, Q.Y., Clark, O.H., *Thyroid*, 3, 25-29 (1993).
- ⁸⁸ Galons, J.-P., Fantini, J., Vion-Dury, J., Cozzone, P.J., Canioni, P., *Biochimie*, 71, 949-961 (1989).
- ⁸⁹ Moka, D., Raffelt, K., Dietlein, M., Süllentrop, F., Hahn, J., Schicha, H., *J. Nucl. Med.* 41, 92 (2000).
- ⁹⁰ Barclay, M., Skipski, V.P., Terebus-Kekish, O., Greene, E.M., Kaufman, R.J., Stock, C.C., *Cancer Res.* 30, 2420-2430 (1970).
- ⁹¹ Boyd, N.F., McGuire, V., *J. Nat. Cancer Inst.* 82, 460-467 (1990).
- ⁹² Boyd, N.F., McGuire, V., *Free Radic. Biol. Med.* 10, 185-190 (1991).
- ⁹³ Alexopoulos, C.G., Blatsios, B., Avgerinos, A., *Cancer* 60, 3065-3070 (1987).
- ⁹⁴ Alexopoulos, C.G., Pournaras, S., Vaslematzis, M., Avgerinos, A., Raptis, S., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30, 412-416 (1992).
- ⁹⁵ Rosi, A., Luciani, A.M., Matarrese, P., Arancia, G., Viti, V., Guidoni, L. *Magn. Reson. Med.* 42, 248-257 (1999).
- ⁹⁶ Kuesel, A.C., Briere, K.M., Halliday, W.C., Sutherland, G.R., Donnelly, S.M., Smith, I.C.P. *Anticancer Res.* 16, 1485-1490 (1996).
- ⁹⁷ Nichols, A.V., *Proc. N. A. S.* 64, 1128-1137 (1969).
- ⁹⁸ Mackinnon, W.B., Huschtscha, L., Dent, K., Hancock, R., Paraskeva, C., Mountford, C.E., *Int. J. Cancer* 59, 248-261 (1994).
- ⁹⁹ Russel, P., Lean, C.L., Delbridge, L., May, G.L., Dowd, S., Mountford, C.E., *Am. J. Med.* 96, 383-388 (1994).

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Speziell danken möchte ich:

Herrn Dr. D. Moka für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung von Proben.

Frau Dr. F. Sülentrop und Herrn Dipl. Chem. H. Scherer für ihren Einsatz am DRX500.

Herrn Dipl. Chem. U. Berg und Herrn Dipl. Chem. U. Zettl für die Hilfestellung bei Hardwareproblemen.

Allen Patienten und Probanden, die diese Arbeit ermöglichten.

Meinen Laborkollegen, die schon oben genannt sind, für gute Zusammenarbeit.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises und des Lehrstuhls II, die diese Arbeit nach sprachlichen und inhaltlichen Kriterien durchgesehen haben.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls II, die mir jahrelang gute Gesprächspartner waren, allen voran Herrn Dr. K. Glinka.

Ein besonderes Dankeschön an Anne, Alex, Arash, Azadeh, David, Dirk, Hendrik, Holger, Ilona, Irena, **Kaja**, Melanie, Mo, Phillip, Said, Sebastian und Sven.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Professor Dr. Josef Hahn betreut worden.

Teilpublikation:

K. Raffelt, D. Moka, F. Sülentrop, M. Dietlein, J. Hahn, H. Schicha

„Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an in-vitro ³¹P high-resolution NMR study“

NMR Biomed. 13, 8-13 (2000).

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Klaus Raffelt
geboren am	26. September 1969 in Köln
Eltern	Hubert Raffelt und Elisabeth Raffelt, geb. Bongartz
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1976-1978 Gemeinschaftsgrundschule Weimarer Str. in Köln - Höhenberg

1978-1980 Katholische Grundschule in Bergisch Gladbach - Heidkamp

1980-1989 Dietrich Bonhoeffer - Gymnasium in Bergisch Gladbach

Studium:

4 / 1990 Beginn des Chemiestudiums an der Universität zu Köln

5 / 1993 Diplom-Chemiker-Vorprüfung

10 / 1995 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung (mündlicher Teil)

11 / 1995 - 8 / 1996 Diplomarbeit unter Leitung von Herrn Professor Dr. Josef Hahn

9 / 1996 - 7 / 2001 Dissertation unter Leitung von Herrn Professor Dr. Josef Hahn

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich sowohl mit der ^{31}P -, also auch mit der ^1H -NMR-Spektroskopie an menschlichem Blutplasma. Mit den ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen gelang es, eine reproduzierbare und einfach anwendbare Methode zu entwickeln, um fünf verschiedene Phospholipidklassen im Blutplasma absolut zu quantifizieren: Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin (PE + SM), Lysophosphatidylcholin 1 und 2 (LPC1 und LPC2), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylcholin (PC).

Mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie wurden die im NMR-Spektrum sichtbaren Anteile der Lipoproteine im Blutplasma quantifiziert. Die Integration der Spektren erfolgte über eine neu entwickelte, leicht automatisierbare und reproduzierbare Methode, die auch zur Normierung der Spektren genutzt wurde.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde das Blutplasma von Schilddrüsenkarzinompatienten unter nuklearmedizinischen Aspekten der Nachsorgediagnostik untersucht. Hypothyreote Patienten mit Schilddrüsenkarzinom hatten gegenüber hypothyreoten Patienten in Remission 17,9 % weniger PE + SM im Blutplasma ($p=0,0001$), 12,4 % weniger LPC1, 11,1 % weniger LPC2, 16,2 % weniger PI und 21,5 % weniger PC ($p=0,006$). Man kann 14 der 33 untersuchten Blutplasmaproben eindeutig der richtigen Gruppe zuordnen, 19 Proben ergeben keinen eindeutigen Befund, es gibt keine falsch positive Probe. Die signifikante Erniedrigung der Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma bei hypothyreoten Patienten mit Schilddrüsenkarzinom wurde in einer differentialdiagnostischen Folgeuntersuchung an den Patientenkollektiven dieser Arbeit bestätigt: Besonders schnellwachsende und aggressive Tumore, die mit der ^{131}I -Szintigraphie nur selten erfassbar sind, waren mit der ^{31}P -NMR-Spektroskopie am besten unterscheidbar.

^1H -NMR-spektroskopisch findet man ebenfalls hochsignifikante Veränderungen. Die Patienten hatten in hypothyreotem Zustand mit Schilddrüsenkarzinom gegenüber dem hypothyreoten Zustand in Remission im Schnitt 23 % weniger olefinische Gruppen von Fettsäuren, 16 % weniger Cholingruppen, 23 % weniger Methylengruppen mehrfach ungesättigter Fettsäuren, 9 % weniger Methylengruppen in α -Stellung zur Carbonylgruppe von veresterten Fettsäuren, 23 % weniger Methylengruppen, 22 % weniger Methylgruppen von Fettsäureketten und 25 % weniger C18-Methylgruppen von Cholesterin im Blutplasma. Überraschenderweise bewirken Mikrokarzinome der Größe pT1 eine wesentlich stärkere Erniedrigung der untersuchten Lipidkonzentrationen im Blutplasma als Schilddrüsenkarzinome der Größen pT2, pT3 und pT4.

Abstract

This study deals with in-vitro ^3P and ^1H high-resolution NMR spectroscopy of human blood plasma. ^3P NMR spectroscopy was optimized to obtain absolute concentrations of the major phospholipids: phosphatidylethanolamine and sphingomyelin (PE + SM), lysophosphatidylcholine 1 and 2 (LPC1 und LPC2), phosphatidylinositol (PI) und phosphatidylcholine (PC).

The „NMR-visible“ parts of lipoproteins in blood plasma were quantified by means of ^1H NMR spectroscopy. For that purpose a new method was developed for carrying out integration automatically and reproducibly and for standardizing the spectra.

In the second part of this work blood plasma of patients with thyroid carcinoma was examined trying to find new ways to diagnose metastases or residual tumor tissue in the nuclear medical aftercare. Hypothyroid patients with thyroid carcinoma showed a decrease of 17,9 % PE + SM ($p=0,0001$), 12,4 % LPC1, 11,1 % LPC2, 16,2 % PI and 21,5 % PC ($p=0,006$) in blood plasma comparing to hypothyroid patients in remission. Trying a ^3P NMR based assignment, 14 of the 33 patients could be diagnosed clearly to be in remission or to have residual tumor tissue / metastases, there were no false positives, but 19 patients with ambiguous results. The significant decrease of phospholipids in blood plasma of hypothyroid patients with thyroid carcinoma was additionally confirmed by differential diagnosis by ^{18}F -PET: especially the most aggressively proliferating tumors showed the strongest changes in plasma phospholipids. Simultaneously these tumors are often little differentiated and not detectable by routine ^{131}I scintigraphy. There were similar differences in the ^1H NMR spectra of blood plasma, highly significant, too. Comparing with hypothyroid patients in remission, hypothyroid patients with thyroid carcinoma showed a decrease of 23 % olefinic signals of unsaturated fatty acids, 16 % choline signals, 23 % methylene signals of polyunsaturated fatty acids, 9 % α -carbonyl methylene signals of esterified fatty acids, 23 % methylene signals with saturated neighboring-groups, 22 % methyl signals of fatty acids and 25 % C18-methyl signals of cholesterol. Surprisingly, pT1 microcarcinoma caused a substantially stronger decrease of the examined lipid concentrations than larger pT2, pT3 and pT4 thyroid carcinoma.

