



UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

Medizinische Fakultät

Praktikumsbuch Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin / Zentrallabor

in Zusammenarbeit mit

Klinik I für Innere Medizin

Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin

15. Auflage 2021

Nur zum internen Gebrauch

Änderung zur 14.Auflage

- 1) Aktualisierung der Zielwerte für LDL-Cholesterin - Tabelle: Empfohlene Zielwerte für LDL-Cholesterin in Abhängigkeit des Gesamtrisikos, Kapitel XII Lipidstoffwechsel

INHALTSVERZEICHNIS

I	Hämatologie.....	4
I.1	Einführung.....	4
I.2	Erythrozytäres System	4
I.3	Granulozytäres System	5
I.4	Monozyten-Makrophagen System	6
I.5	Lymphatisches System	6
I.6	Thrombozytäres System	7
I.7	Hämatopoietische Wachstumsfaktoren.....	7
I.8	Praktische Übungen.....	9
II	Hämatologie.....	12
II.1	Anämien.....	12
II.2	Praktische Übungen.....	16
III	Hämatologie.....	17
III.1	Reaktive Veränderungen.....	17
III.2	Chronische neoplastische Veränderungen.....	17
III.3	Praktische Übungen.....	19
IV	Hämatologie.....	22
IV.1	Zytochemie	22
IV.2	Immunologie	22
IV.3	WHO-Klassifikation der AML.....	24
IV.4	FAB-Klassifikation der akuten nicht-lymphozytären Leukämien.....	25
IV.5	FAB Klassifikation der ALL	25
IV.6	Immunologie, Zyto- und Molekulargentik der ALL.....	26
IV.7	Praktische Übungen.....	26
V	Immunhämatologie	27
V.1	Begriffsdefinitionen und klinisch relevante Blutgruppen-Antigene.....	27
V.2	Bedeutung von Blutgruppen-Bestimmung und Antikörper-Suchtest	28
V.3	Bedeutung des AB0-Bedside Tests.....	29
V.4	Blutkomponenten aus Blutspenden	30
V.5	Praktische Übungen.....	30
VI	Hämostaseologie	32
VI.1	Primäre Hämostase	32
VI.2	Sekundäre Hämostase.....	35
VI.3	Präoperative Diagnostik zur Erfassung einer Blutungsneigung	36

VII	Labororganisation und Qualitätsmanagement	43
VII.1	Präanalytik	43
VII.2	Analyse + analytische Beurteilung.....	43
VII.3	Medizinische Validation	47
VII.4	Befundinterpretation.....	47
VII.5	Einflußfaktoren und Störfaktoren.....	47
VII.6	Praktikum.....	48
VIII	Tumormarker	49
VIII.1	Einteilung der Tumormarker.....	49
VIII.2	Zeitplan der Tumormarkerbestimmung	51
VIII.3	Validität eines Tumormarker	51
VIII.4	Besondere Rolle des PSA (Prostata-spezifisches Antigen).....	52
VIII.5	Praktikum.....	55
IX	Labordiagnostik der Herzerkrankungen	56
IX.1	Lernziele	56
IX.2	Koronare Herzkrankheiten (KHK).....	56
IX.3	Akuter Myokardinfarkt	58
IX.4	Herzinsuffizienz.....	66
IX.5	Klinische Chemische Analytik.....	68
IX.6	Fragen zur Lernevaluation	70
X	Labordiagnostik der Leber- und Pankreaserkrankungen	71
X.1	Lernziele	71
X.2	Leber.....	71
X.3	Pankreas.....	78
X.4	Fragen zur Lernevaluation	80
XI	Kohlenhydratstoffwechsel	81
XI.1	Lernziele	81
XI.2	Einleitung	82
XI.3	Klassifikation des Diabetes mellitus	82
XI.5	Labor-Diagnostik des Diabetes mellitus	84
XI.6	Bestimmungsmethoden der Glucose	86
XI.7	Fragen zur Lernevaluation	87
XII	Lipidstoffwechsel.....	88
XII.1	Lernziele	88
XII.2	Biochemie	88
XII.3	Einteilung von Fettstoffwechselstörungen	90

XII.4 Diagnostik von Fettstoffwechselstörungen	92
XII.5 Risikofaktoren der Atherosklerose	95
XII.6 Bewertung des Atheroskleroserisikos	95
XII.7 Praktikum	96
XII.8 Fragen zur Lernevaluation.....	96
XIII Liquordiagnostik.....	98
XIII.1 Lernziele	98
XIII.2 Liquor-Produktion.....	98
XIII.3 Diagnostik	98
XIII.4 Zellsyndrome, Zellreaktionen	100
XIII.5 Eiweißuntersuchung.....	100
XIII.6 Fragen zur Lernevaluation	104
XIV Endokrinologische Diagnostik	105
XIV.1 Lernziele	105
XIV.2 Schilddrüse	105
XIV.3 Nebenniere	110
XIV.4 Fragen zur Lernevaluation	114
XIV.5 Immunoassays.....	115
XV Urin-Diagnostik	120
XV.1 Lernziele	120
XV.2 Uringewinnung	120
XV.3 Beurteilung der GFR	120
XV.4 Urin Basis-Diagnostik.....	121
XV.5 Proteinurien.....	123
XV.6 Gezielte Urin-Diagnostik.....	125
XV.7 Praktische Übungen.....	125
XV.8 Fragen zur Lernevaluation	126
XVI Blutgase/Säuren-Basen-Status.....	127
XVII Wichtige World Wide Web (WWW)-Adressen	129

I Hämatologie

I.1 Einführung

Unter physiologischen Bedingungen ist das Knochenmark postnatal alleiniger Ort der Hämatopoese. Die Hämatopoese ist hierarchisch strukturiert. Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten werden aus einer gemeinsamen undeterminierten Stammzelle gebildet. Aus dieser pluripotenten Stammzelle entstehen determinierte Stammzellen, die sich zumeist nur in eine bestimmte Richtung differenzieren können. Im weiteren Verlauf entstehen Progenitorzellen einer determinierten Zellreihe. Morphologisch entsprechen Stammzellen unreifen blastären Zellen, die im Verlauf ihrer Differenzierung zu determinierten Stammzellen immunologisch (Expression von immunologisch nachweisbaren Molekülen intrazellulär und auch an der Zelloberfläche) und morphologisch Eigenschaften der Differenzierungsrichtung annehmen. Der Nachweis solcher Stammzeleigenschaften erfolgt in Tiertransplantationsmodellen sowie mikroskopisch, durchflusszytometrisch und *in vitro* mit Hilfe von Knochenmarkzellkulturen. Diese Kulturen erfolgen entweder als Stammzellkulturen auf Stromazellkulturen (cobble stone units) oder als Linien-spezifische Kulturen in „Soft-agar“ (colony-forming units, CFU).

Die Replikation der Stammzelle ist für die Erhaltung des Stammzellpools und damit des blutbildenden System verantwortlich. Dabei vollziehen die pluripotenten Stammzellen zumeist eine asymmetrische Zellteilung, d.h. aus einer Mutterzelle mit den Eigenschaften einer pluripotenten Stammzelle entstehen zwei unterschiedliche Tochterzellen, eine mit erhaltenem pluripotentem Potenzial, die andere mit den Eigenschaften einer determinierten Stammzelle. Dagegen führt die Proliferation und Differenzierung der determinierten Progenitorzellen zu funktionstüchtigen Elementen wie Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Die Regulation dieser Expansion erfolgt über ortsständige (Knochenmarkstroma) und humorale Faktoren. Eine Reihe wachstumsstimulierender Faktoren greifen direkt oder indirekt an Stammzellen oder deren Rezeptoren an. Diese Zytokine (CSF, Flt3-Ligand, Erythropoietin, Interleukine) und Chemokine (Stromal-derived growth factor-1/SDF-1) bilden eine komplexe Familie von Glykoproteinen, die in den letzten Jahren identifiziert und kloniert wurden. Dabei bedarf es zumeist einer Kombination verschiedener dieser Stimuli, um die Proliferation und Differenzierung in Gang zu bringen. So bedarf es für die hämatopoetischen Stammzellen einer Kombination von SCF (stem cell factor, c-kit-ligand), SDF-1, Flt3.-ligand, Interleukin-3 und Thrombopoietin. Hemmende Einflüsse auf die Proliferation werden u.a. durch Prostaglandin E, Interferone und Tumornekrosefaktor (TNF-alpha) erzielt.

I.2 Erythrozytäres System

Die normale Erythropoese findet sich im Knochenmark in einer festen topographischen Zuordnung zu den Marksinus, in Gruppen oder Nestern (Erythron). Die früheste morphologisch identifizierbare Zelle der Erythropoese ist der **Proerythroblast**. Der Kern ist rund, das Chromatin feinkörnig, das Zytoplasma dunkelbasophil mit perinukleärer Aufhellungszone. Die verschiedenen Entwicklungsstufen der **Normoblasten** unterscheiden sich in der Zellgröße, der Kernstruktur (schollig bis homogen) und dem Zytoplasma (basophil bis orthochromatisch). Durch Kernausstoßung geht der orthochromatische Normoblast in den kernlosen **Retikulozyten** über. Durch aktive Diapedese durch das Sinusendothel erfolgt der Übergang des Retikulozyten ins periphere Blut. Mit Vitalfarbstoffen wie Brillantkresylblau lassen sich die Reste ribosomaler RNA netzartig (Substantia reticulo-granulofilamentosa) in den Retikulozyten nachweisen. Diese RNA-Reste gehen bei der Entwicklung zum

Erythrozyten verloren. Normale reife Erythrozyten haben die Gestalt einer bikonkaven flachen Scheibe.

Funktionell kann das erythrozytäre System in vier Kompartimente unterteilt werden. Ausgangspunkt ist der **Progenitorpool** (BFU-E, CFU-E) mit hoher Teilungsaktivität. Eine morphologische Identifizierung ist in diesem Kompartiment nicht möglich. Im **Proliferationspool** beginnt die Hämoglobinsynthese die Differenzierung und die Amplifikation durch eine Reihe von Zellteilungen. Aufgrund von Zellgröße, Kernchromatinstruktur, und Zytoplasmabasophilie lassen sich verschiedene Zellen morphologisch unterscheiden (Proerythroblast bis polychromatischer Normoblast). Im **Reifungspool** erfolgen keine Zellteilungen mehr (orthochromatischer Normoblast, Retikulozyt). Vom Reifungspool erfolgt der Übertritt ins periphere Blut in den **Funktionsspeicher** (Erythrozyten). Die mittlere Lebensdauer der Erythrozyten im peripheren Blut wird mit 120 Tagen angegeben. Die gesamte Reifungszeit vom Proerythroblasten bis zum Retikulozyten im Knochenmark beträgt drei bis vier Tage.

1.3 Granulozytäres System

Im Knochenmark findet sich die Granulopoese entlang der Knochenbälkchen. Die unreifste Zelle, die morphologisch eindeutig der Granulopoese zugeordnet werden kann, ist der **Myeloblast**. Myeloblasten besitzen einen runden Kern mit unscharf begrenzten Nukleolen. Das Zytoplasma ist zartblau; eine diskrete Granulation ist ebenfalls vorhanden. Diese Myeloblasten exprimieren das Stammzell-assoziierten Oberflächenantigen CD34 sowie auch das Kennzeichen der granulozytären Zellreihe CD13. Intrazellulär ist bereits Myeloperoxidase nachweisbar. **Promyelozyten** sind größer als Myeloblasten, die Kern/Plasma Relation ist geringer und das Zytoplasma basophiler. Der Promyelozytenkern ist oval und liegt exzentrisch. Das Zytoplasma enthält primäre oder azurophile Granula, die bei der mikroskopischen Ansicht charakteristischerweise auch die Kernstruktur bedecken. Der **Myelozyt** ist kleiner als der Promyelozyt, der Kern ist oval und enthält keine Nukleoli mehr. Er kann in die neutrophile, eosinophile oder basophile Reihe durch das Vorkommen von spezifischen oder sekundären Granula mit den entsprechenden Färbecharakteristika eingeteilt werden. Der **Metamyelozyt** zeigt eine deutliche Kerneindellung, das Chromatin deutlich verklumpt. Die weitere Ausreifung erfolgt über den **Stabkernigen** zum **Segmentkernigen** mit neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granula.

Auch die Granulopoese lässt sich in verschiedene funktionelle Kompartimente unterteilen: den **Stammzellpool** (CFU-GM, CFU-G), den **mitotischen Pool** (Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten) und den **postmitotischen Pool** bzw. **Speicherpool** (Metamyelozyten, Stabkernige, Segmentkernige). Für die Dauer des Entwicklungsprozesses vom Myeloblasten zum reifen Granulozyten kann man etwa zehn Tage annehmen. Die bei Bedarf notwendige Expansion findet wahrscheinlich auf Myelozytenebene statt. Im peripheren Blut lassen sich zwei Kompartimente unterscheiden, der zirkulierende und der marginale Pool. Im marginalen Pool haften die Granulozyten am Gefäßendothel. Aus dem Marginalpool sind die Granulozyten leicht mobilisierbar. Nach etwa 6-10 Stunden Aufenthalt in der Blutbahn werden die neutrophilen Granulozyten vor allem in der Milz wieder abgebaut. Im Falle eines aktiven entzündlichen Prozesses vermitteln Botenstoffe eine Diapedese ins entzündete Gewebe. Daraus resultiert eine v.a. Aktivierung der Freisetzung von Sauerstoffradikalprodukten, bei der die neutrophilen Granulozyten selbst auch untergehen (z.B. Abszessbildung).

I.4 Monozyten-Makrophagen System

Die frühesten morphologisch erkennbaren Zellen der monozytären Reihe sind Blasten mittlerer Größe mit klarem, blauen Zytoplasma (**Monoblasten**). **Promonozyten**; die nächste Entwicklungsstufe, sind große Zellen mit heterogen geformten, gebuchteten oder gefalteten Kernen. Promonozyten konstituieren bis zu 3% der hämatopoietischen Knochenmarkszellen. Der **Monozyt** ist die größte Zelle im peripheren Blut. Er hat einen unregelmäßig geformten, häufig gelappten Kern mit feinnetziger Chromatinstruktur und ein grau-blaues Zytoplasma. Die äußere Zellkontur verläuft häufig unregelmäßig, das Zytoplasma ist manchmal vakuolisiert. Aus den Monozyten entwickeln sich einerseits die **Gewebsmakrophagen** (z.B. Kupffer-Zelle, Osteoklast, Mikroglia-Zelle, Alveolar-, Pleura-, Peritonealmakrophage). Die Funktion dieser Zellen besteht im Wesentlichen in der Phagozytose opsonisierter Partikel (Makrophagen), aber auch in anderen lokalen Funktionen (Osteoklast, Mikrogliazelle). Eine weitere Zellgruppe mit wichtiger Funktion im Zusammenhang mit dem spezifischen Immunsystem entspricht den dendritischen Zellen, die sich aus Monozyten bzw. monozytären Progenitorzellen entwickeln. Deren Funktion besteht in der Antigenpräsentation im Rahmen der Immunantwort, sowohl im Lymphfollikel (follikuläre dendritische Zelle), als auch in verschiedenen Organen (z.B. Langerhans Zelle der Haut).

Unter Normalbedingungen verlassen Monozyten das Knochenmark bereits 1-3 Tage nach Produktion und zirkulieren ebenfalls für 1-3 Tage im peripheren Blut, bevor sie als Makrophagen ins Gewebe wandern. Die Verweildauer dort beträgt je nach Gewebe Wochen bis Monate.

I.5 Lymphatisches System

Im normalen Blutausschlag sind Lymphozyten überwiegend kleinzellig. Sie besitzen nur wenig Zytoplasma. Der Kern ist rund oder nur leicht eingedellt und besteht aus grobem Chromatin. Große Lymphozyten zeigen reichlich Zytoplasma, und ihr Chromatin ist weniger kondensiert. In manchen größeren Lymphozyten findet sich eine azurophile Granulation (**LGL, Large granular Lymphocytes**). Phänotypisch lassen sich Lymphozyten aufgrund von spezifischen Oberflächen-Merkmalen, die mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden, in Subpopulationen unterteilen (z.B. CD19 monoklonale Antikörper für B- oder CD3 Antikörper für T Lymphozyten). **T-Lymphozyten** stellen mit etwa 80% die Hauptpopulation der Lymphozyten im Blut und in den lymphatischen Organen dar. Sie sind die Träger der zellulären Immunreaktionen. Dabei wandern die determinierten lymphatischen Stammzellen (zytoplasmatisch positiv für das T-Zell-Rezeptor-assoziierte CD3-Molekül) in den Thymus und erfahren dort in mehreren Schritten eine „Ausbildung“ zur Antigen-spezifischen T-Zelle. Aufgrund von Oberflächenmerkmalen lassen sich 2 Subpopulationen unterscheiden: **CD4⁺ T-Lymphozyten** erkennen Antigene im Kontext mit HLA Klasse II Molekülen und besitzen Helferfunktionen in der Immunantwort. T_{regs} sind **CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten**, die an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. **CD8⁺ T-Lymphozyten** erkennen Antigene, die im Kontext mit HLA Klasse I Molekülen präsentiert werden; sie besitzen vorwiegend zytotoxische Eigenschaften. **B-Lymphozyten** als Träger der humoralen Immunantwort differenzieren zu **Plasmazellen** und produzieren spezifische Immunglobuline. Plasmazellen besitzen einen exzentrischen Kern mit grob-verdichtetem Chromatin („Radspeichen“) und ein deutlich basophiles Zytoplasma. Sie zirkulieren nicht im peripheren Blut. Die determinierte Stammzelle (CD19 positiv) differenziert im Knochenmark zum reifen IgM-positiven B-Lymphozyten, der ins periphere Blut auswandert. Die Differenzierung zu Plasmazellen erfolgt im Lymphfollikel in den lymphatischen Organen (Lymphknoten) in Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen und dendritischen Zellen. Die Plasmazellen selbst finden sich dann hauptsächlich im Knochenmark, wo auch die Antikörperproduktion stattfindet.

I.6 Thrombozytäres System

Die Zellen der Megakaryozytopoese sind die größten Zellen des Knochenmarks. Drei Stadien der Entwicklung des Megakaryozyten lassen sich morphologisch zuordnen. Der **Megakaryoblast** mit runden bis nierenförmigen Kern und intensivblauem Zytoplasma, der **Promegakaryozyt** mit lobuliertem Kern und geringerer Zytoplasmabasophilie und der reife **Megakaryozyt** mit ausgeprägter Kernlobulierung und rötlichem, granuliertem Zytoplasma. Die Zellen sind polyploid; die Zahl der Chromosomen beträgt das 4- bis 32-fache des normalen diploiden Satzes. Der Megakaryoblast ist zur weiteren DNA-Synthese fähig, dagegen nicht mehr teilungsfähig. Mit zunehmender Reifung geht die Fähigkeit zur DNA-Synthese verloren, während sich das Zellvolumen durch gleichzeitige Zytoplasmareifung vergrößert. Der gesamte Reifungsvorgang der Megakaryopoese dauert etwa 10 Tage. Die **Thrombozyten** lösen sich vom Zytoplasma der Megakaryozyten durch Fragmentation. Dieser Vorgang wird vorbereitet durch eine Invagination der Plasmamembran in das eigene Zytoplasma. Thrombozyten sind kernlose, scheibenförmige Gebilde mit feiner azurophiler Granulation. Die Lebensdauer im peripheren Blut beträgt etwa 7-10 Tage. Bei der Verteilung im Organismus spielt die Milz eine wesentliche Rolle. Etwa 20-30% der Thrombozytenmasse sind in der Milz gespeichert.

I.7 Hämatopoietische Wachstumsfaktoren

SCF (Stem cell factor):

SCF ist ein N- und O-glykolisiertes Protein mit einer Länge von 248 Aminosäuren. Das für SCF kodierende Gen liegt auf Chromosom 12. SCF wirkt als Wachstumsfaktor für primitive lymphatische und myeloische hämatopoietische Progenitorzellen, die den Stem cell factor receptor (CD117) exprimieren.

Flt3-ligand

Flt3-ligand entspricht einem Homodimer mit einem Molekulargewicht von je 17,6 KD. Das für Flt3-ligand kodierende Gen liegt auf Chromosom 19. Zusammen mit SCF vermag Flt3-ligand ruhende hämatopoetische Stammzellen zu aktivieren.

SDF-1 (stroma-derived growth factor)

Als dritter stimulierender Faktor, der hämatopoetische Progenitorzellen zu stimulieren vermag, findet sich SDF-1, ein Chemokin mit einem sehr niedrigen Molekulargewicht von 8-12 KD. Es bindet an den CXCR4-Rezeptor der Zielzelle und hat pleiotrope Wirkungen im Immunsystem, kardiovaskulären System und Nervensystem). Aufgrund dieser Bindungseigenschaften wird SDF-1 (AMD3100) auch eine Funktion in der Fusionsinhibition zwischen HIV und der Zielzelle zugeschrieben. SDF-1 hat eine ausgesprochen starke mobilisierende Wirkung auf hämatopoetischen Stammzellen. Dies wird bereits zur Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen, insbesondere bei schlecht mobilisierenden Patienten, eingesetzt.

Erythropoietin:

Erythropoietin (EPO) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34 kD. Der Kohlehydratanteil beträgt etwa 40%. Hauptbildungsort im Erwachsenenalter sind die peritubulären Endothelzellen des Tubulus und/oder der Tubuluszellen der Nierenrinde. Ca. 15% werden extrarenal in den Hepatozyten und Kupffer-Zellen der Leber gebildet. Das EPO-Gen wurde auf dem langen Arm von Chromosom 7 lokalisiert. Die Synthese von EPO wird durch eine zelluläre Hypoxie ausgelöst. Vermutlich besitzen die EPO-bildenden Zellen selbst einen O₂ Sensor. EPO stimuliert die Proliferation und Differenzierung auf die Vorläuferzellen BFU-E und CFU-E, zusätzlich scheint EPO auch in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren megakaryozytäre Vorläuferzellen zu stimulieren.

GM-CSF:

Dieser Wachstumsfaktor ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 14-35 kD. Sowohl aktivierte T Lymphozyten als auch aktivierte Makrophagen produzieren GM-CSF. Das für GM-CSF kodierende Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 lokalisiert. Hochgereinigtes oder rekombinantes GM-CSF stimuliert das Wachstum von Granulozyten/Makrophagen- und Eosinophilen-Kolonien. Es hemmt die Neutrophilen-Migration, stimuliert die Chemotaxis und die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen. Die GM-CSF-Bindung an den spezifischen Rezeptor induziert die Ausprägung von zellulären Adhäsionsproteinen.

G-CSF:

G-CSF ist ein Wachstumsfaktor mit einem Molekulargewicht von 18-22 kD und wird durch ein Gen auf dem Chromosom 17 kodiert. Aktivierte Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen produzieren G-CSF. Die Proliferation und Differenzierung von granulozytären Vorläuferzellen wird durch G-CSF stimuliert. Ebenfalls werden funktionell die entsprechenden reifen Endzellen (Neutrophile Granulozyten) aktiviert. *In vitro* verbessert G-CSF die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von Granulozyten gegen Tumorzellen.

Thrombopoietin:

Thrombopoietin (ML = Mpl Ligand) hat ein Molekulargewicht von 70 kD. Das Gen für Thrombopoietin wurde auf den langen Arm des Chromosom 3 (3q26 oder q27) lokalisiert. Es findet sich in vielen Geweben (Leber, Niere, glatte Muskulatur, Milz und Knochenmark). Endothelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten exprimieren ML-spezifische mRNA. Thrombopoietin wirkt als Meg-CSF und beeinflusst zusätzlich die späte Phase der Megakaryozytenentwicklung.

Interleukin 3:

Interleukin 3 (IL-3) hat ein Molekulargewicht von 20-26 kD und wird von aktivierten T Lymphozyten sezerniert. Das IL-3 Gen ist auf dem Chromosom 5 zu finden, in enger Nachbarschaft zum GM-CSF Gen. Menschliches IL-3 stimuliert das Wachstum von multipotenten Vorläuferzellen CFU-GEMM. Zusätzlich wirkt es auf die frühe Erythropoese als burst-promoting Aktivität, in der frühen Myelopoese synergistisch mit GM-CSF und G-CSF und beeinflusst die Koloniebildung von megakaryozytären Vorläuferzellen (CFU Meg).

Interleukin 6:

Interleukin 6 (IL-6) hat ein Molekulargewicht von 26 kD und wird von stimulierten Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert. T und B Lymphozyten, Mastzellen, Gliazellen und Keratinozyten sind in der Lage, nach entsprechender Stimulation IL-6 zu exprimieren. Das kodierende Gen wurde auf den kurzen Arm des Chromosom 7 lokalisiert. Es zeigt ein weites Spektrum an biologischen Aktivitäten. IL-6 unterstützt zusammen mit IL-3 die Proliferation multipotenter hämatopoietischer Vorläuferzellen, wirkt als Thrombopoietin und als Differenzierungsfaktor für B Lymphozyten. Es induziert als physiologischer Hauptmediator die Akut-Phase-Reaktion u. a. CRP (C-reaktives Protein) und stimuliert die ACTH Synthese.

I.8 Praktische Übungen

I.8.1 Hämoglobinbestimmung im Vollblut

Die Bestimmung der Konzentration des Hämoglobins (Hb) im Vollblut nach Umwandlung in das stabile Cyanhämoglobin hat sich allgemein durchgesetzt. Ausschließlich dieses Verfahren wird von der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin empfohlen.

Prinzip:

Durch Kalium-Ferricyanid wird Hämoglobin zu Hämglobin oxidiert und dieses durch Kaliumcyanid in Cyanhämoglobin überführt. Cyanhämoglobin zeigt bei 540 nm eine für die Hämoglobinbestimmung geeignete Absorptionsbande.

Reagenz:

Transformationslösung

0.2 g $K_3Fe(CN)_6$

0.05 g KCN

0.14 g KH_2PO_4

0.5 ml Sterox

Aqua bidest. ad 1000 ml, pH 7

Transformationslösung wegen des Gehalts an KCN nur mit Sicherheitspipetten, Pipettierhilfen, Dispensern o.ä. abmessen!

Benötigt werden:

20 µl End-zu-End Kapillare, Vollblut, Reagenzgläser mit 5.0 ml Transformationslösung, Tupfer, Spektralphotometer, Filter Hg 546 nm, Küvetten von 1 cm Schichtdicke

Ausführung:

End-zu-End Kapillare füllen, nach Säubern mit einem Tupfer in das mit Transformationslösung gefüllte Reagenzglas werfen. Das Reagenzglas schütteln, bis die Kapillare ganz ausgespült ist. Mindestens 5 min. bei Zimmertemperatur stehen lassen.

Messung:

Photometer einschalten und mindestens 10 min. einbrennen lassen. Küvettenabgleich vornehmen. Messung gegen Aqua dest. und gegen Transformationslösung. Probenmessung.

Berechnung:

Extinktion (E) x 36.8 = g/dL Hämoglobin

Referenzbereiche:

Männer 13.8 - 16.9 g Hb/dL

Frauen 11.8 - 15.8 g Hb/dL

I.8.2 Hämatokrit - Bestimmung

Definition:

Prozentualer Volumenanteil der zellulären Bestandteile am Vollblut

Prinzip:

Die Zellelemente in der zuvor ungerinnbar gemachten Blutprobe werden durch Zentrifugalkraft zusammengepresst. Danach wird die Höhe der Zell-Säule in Beziehung

gebracht zur Höhe der Gesamtsäule: das Ergebnis wird in Volumen-Prozent angegeben.

Benötigt werden:

Mikro-Hämatokritverfahren unter Verwendung höhertouriger Spezialzentrifugen (Mikro-Hämatokritzentrifugen). Querschnittsgenormte Kapillaren mit angetrocknetem gerinnungshemmenden Mittel (75 mm mit 0.2 mg Heparin/ul Blut). Ablesegerät.

Ausführung:

Man läßt Blut durch Kapillarwirkung aufsteigen bis knapp unter die 65 mm Grenze bei 75 mm Kapillaren (bzw. bis 4/5 der Kapillarhöhe). Anschließend das andere nicht in Blut eingetauchte Röhrchenende durch Eindrücken in Spezialkitt verschließen. Röhrchen mit dem verschlossenen Ende der Peripherie zu in den Kapillareinsatz des Hämatokritrotors einlegen. Bei 5000 U/min zentrifugieren.

Auswertung:

Mit Hilfe eines Ablesegerätes. Das untere Ende (verschlossene Ende) der Blutsäule auf 0% das obere Ende der Plasmasäule auf 100%. Der Hämatokrit wird am oberen Ende der Erythrozytensäule in % abgelesen.

Referenzbereiche:

Männer 40 - 48%
Frauen 36 - 42%

I.8.3 Leukozytenbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Methode

Dieser Methode liegt das Verfahren der Leukozytenauszählung mit Verdünnungs- und Lysepuffer (Leukocount-Lösung) zugrunde.

Prinzip

Vollblut wird dem Verdünnungspuffer, der reife Erythrozyten hämolysiert, zugegeben. Das verdünnte Blut wird in die Neubauer-Zählkammer gegeben.

Reagenzien

1. Leuko-TIC (Leukozytenisotonischer Acetatpuffer, Gentianaviolett)
2. Kapillarpipette mit 20ul Kapazität
3. Füllkapillare

Benötigt werden:

Neubauer-Zählkammer, optisch plan geschliffene Deckgläser, Mikroskop (Standard-Hellfeld), objektiv 10:1, Okular

Ansatz:

1. Eine der 20 µl Volumenkapillaren (End to End) luftblasenfrei von Ende zu Ende mit Blut füllen. Außen anhaftendes Blut mit einem fusselfreien Einmaltuch abwischen ohne Untersuchungsgut aus der Kapillaren zu saugen.
2. Kapillare mit Inhalt in das Gefäß geben und kräftig schütteln bis alles Blut aus der Kapillare herausgespült ist.
3. Danach das Gefäß mindestens 5 min stehen lassen bis die Hämolysen abgeschlossen ist. Die Kapillare verbleibt im Gefäß.
4. Vorbereitung der Zählkammer: Der optisch plane Boden einer Zählkammer ist mit einem rechtwinkligen Zählnetz versehen, das aus Linien in definierten Abständen

besteht. Durch Aufbringen eines optisch planen Deckglases wird über der Bodenfläche ein Raum abgegrenzt. In diesem Raum werden die Partikel gezählt. Die zum Befestigen des Deckglases vorgesehenen plan geschliffenen Glasflächen der Kammer leicht anfeuchten. Das Deckglas so von der Seite her aufschieben, dass auf beiden Flächen Newtonsche Ringe sichtbar werden.

5. Das Gefäß wird vor der Beschickung der Zählkammer nochmals kräftig gemischt. Füllkapillare durch Kapillarwirkung halb voll füllen und am oberen Ende mit dem Finger verschließen. Die ersten drei Tropfen aus der Pipette verwerfen und dann die Pipette auf den Boden der Kammer aufsetzen und den Inhalt vorsichtig in die Kammer fließen lassen, bis die Überlaufrinne gefüllt ist.
6. Auszählung und Berechnung: Den Kondensator des Mikroskops nach unten drehen, Frontlinse aus dem Strahlengang klappen, abblenden. Objektiv 1:10 in den Strahlengang bringen und die Ebene der Zählkammer einstellen. Es werden nun die Leukozyten in 4 Eckquadraten ausgezählt. Summe der 4 Quadrate bilden und notieren.
7. Zur Berechnung der Leukozyten / μl Summe von 4 Eckquadraten mit dem Faktor 50 multiplizieren.

Berechnung:

Fläche	1 Eckquadrat	1 mm ²
Höhe	1 Eckquadrat	0,1 mm
Volumen	1 Eckquadrat	0,1 μl
Volumen	4 Eckquadrate	0,4 μl

n =	Leukozyten in 0,4 μl 1:20 verd. Blut
n x 1,0 / 0,4	Leukozyten in 1 μl 1:20 verd. Blut
n x 2,5 x 20	Leukozyten in 1 μl unverd. Blut
n x 50 =	Leukozyten/ μl Blut

Referenzbereiche:

Erwachsene	4 - 10/ 10 ⁹ /l
------------	----------------------------

II Hämatologie

II.1 Anämien

II.1.1 Definition

Anämie bedeutet eine Verminderung der Hämoglobinkonzentration und/oder der Erythrozytenzahl unter einen alters- und geschlechtsspezifischen Normbereich. Bei Erwachsenen (10-45 Jahre) liegt der untere Normbereich des Hämoglobins bei Männern bei 13.2g/dl und bei Frauen bei 11.7 g/dl. Dabei ist der Begriff Anämie nur als ein objektives Zeichen für eine Erkrankung zu werten. Die korrekte diagnostische Terminologie schließt die Pathogenese ein (z.B. Eisenmangel- Anämie, Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz etc.). Die Klassifikation der Anämien kann aufgrund der Pathogenese oder entsprechend den morphologischen Veränderungen erfolgen.

II.1.2 Diagnostik

Die Basisdiagnostik bildet die kombinierte Bestimmung von Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Erythrozyten-Indizes. Die Zählung und Größenbestimmung von Partikeln (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) erfolgt mit automatisierten Blutzellzählgeräten. Die Messungen erfolgen entweder über die Erfassung eines elektrischen Widerstandes (Impedanz) oder der Lichtstreuung (photoelektronisch). Die Hämoglobinbestimmungen erfolgen entweder nach der Cyanhäoglobin-Methode oder messen das Hämoglobin direkt oder als Oxyhämoglobin. Hämatokrit, MCV, MCHC und RDW werden elektronisch berechnet.

Erythrozyten-Indizes

Mittleres korpuskuläres Volumen (**MCV**)

$$\frac{\text{Hämatokrit (L/L)} \times 1000}{\text{Ery.-Zahl (} \times 10^{12}/\text{L)}} = 82 - 101 \text{ femtoliter (fl)}$$

Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (**MCH**)

$$\frac{\text{Hämoglobin (g/dL)}}{\text{Ery.-Zahl (} \times 10^{12}/\text{L)}} = 27 - 34 \text{ picogramm (pg)}$$

Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (**MCHC**)

$$\frac{\text{Hämoglobin (g/dL)}}{\text{Hämatokrit (L/L)}} = 31.5 - 36 \text{ g/dL}$$

Erythrozyten-Verteilungsbreite (Red cell distribution width, **RDW**)

$$\frac{\text{Standardabweichung des MCV} \times 100}{\text{MCV}} = 11.5 - 14.5 \%$$

Morphologische Veränderungen der Erythrozyten

Anisozytose	unterschiedliche Erythrozytengröße
Poikilozytose	unterschiedliche Gestalt der Erythrozyten
Polychromasie	unterschiedlich starke Anfärbbarkeit der Erythrozyten
Anulozyten	Ringformen bei ausgeprägtem Eisenmangel
Targetzellen (Codozyten)	Schießscheibenzellen bei Thalassämie, Eisenmangel
Sphärozyten	hereditäre Kugelzellen-Anämie
Elliptozyten	hereditäre Elliptozytose
Akanthozyten	Abetalipoproteinämie, Verbrennungen

Fragmentozyten	Schistozyten; bei mechanischer Schädigung, Vaskulitis, Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS), Moschkowitz-Syndrom,
Stomatozyten	Alkoholbedingte Lebererkrankungen
Dakryozyten (Tränentropfen)	Osteomyelofibrose
Drepanozyten (Sichelzellen)	Hämoglobinopathien, Sichelzell-Anämie
Rouleaux Bildung (Geldrollen)	Plasmozytom

Erythrozyten-Einschlüsse

Basophile Tüpfelung RNA)	Zeichen der Regeneration, Bleivergiftung (RNA-Reste)
Howell-Jolly Körperchen	Einschlusskörperchen aus Chromatinresten nach Splenektomie
Heinzkörper (instabiles Hb)	tox. hämolytische Anämien
Parasiten	Malaria

Ergänzungsuntersuchungen

Berliner Blau Reaktion	Nachweis von Speichereisen im Knochenmark, als Eisennachweis in Erythrozyten (Siderozyten), oder in roten Vorstufen (Sideroblasten, Ringsideroblasten)
------------------------	--

Klinisch-chemische Laboruntersuchungen

Ferritin	Funktion: Speicherprotein für Eisen Indikation: <u>erniedrigt</u> bei Eisenmangel. Serumferritinspiegel korreliert direkt mit Speichereisengehalt. Cave! Akut-Phase Protein (Entzündung etc.)
Transferrinsättigung	Funktion: prozentuale Sättigung des Transportproteins für Eisen, Indikation: Parameter für Eisenmangel
Haptoglobin	Funktion: Transportprotein für Hämoglobin Indikation: <u>erniedrigt</u> bei Hämolyse. Cave! Akut-Phase Protein
RET-He:	Retikulozyten-Hämoglobin-Äquivalent: Eisenmangel
sTfR	löslicher Transferrinrezeptor (erhöht bei Eisenmangel)
TfR-F-Index	TfR/log Ferritin: erhöht bei Eisenmangel (gegenüber alleiniger Bestimmung von sTfR wahrscheinlich nicht überlegen)

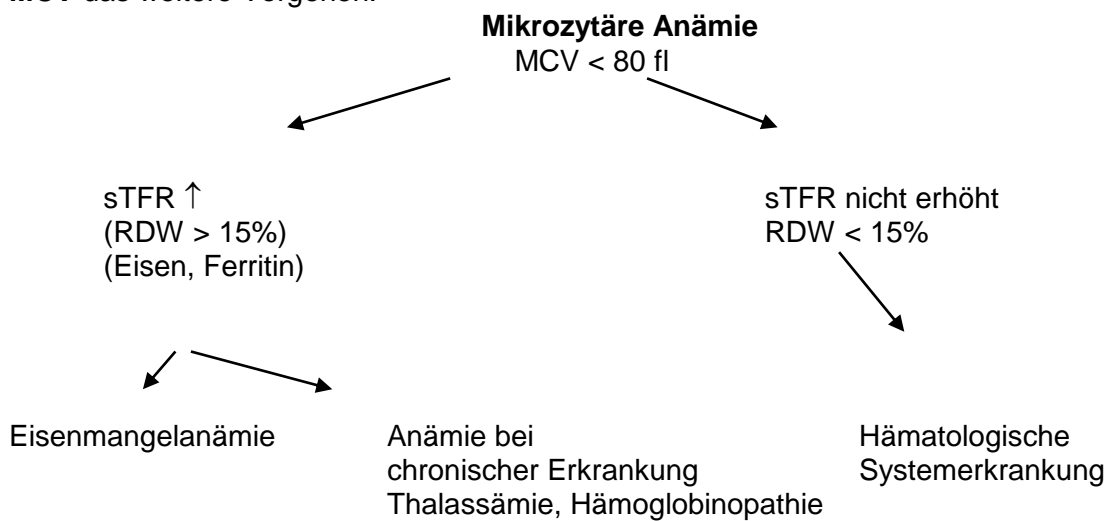
Spezielle Diagnostik

	<u> Methode </u>	<u> Indikation (Beispiele) </u>
Hämoglobin-analysen	Elektrophorese	Hämoglobinopathien
Erythrozyten-Enzyme	Enzymaktivität	Pyruvatkinase Mangel, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel
Osmotische Resistenz	Hypotone NaCl - Lsg	Hereditäre Sphärozytose

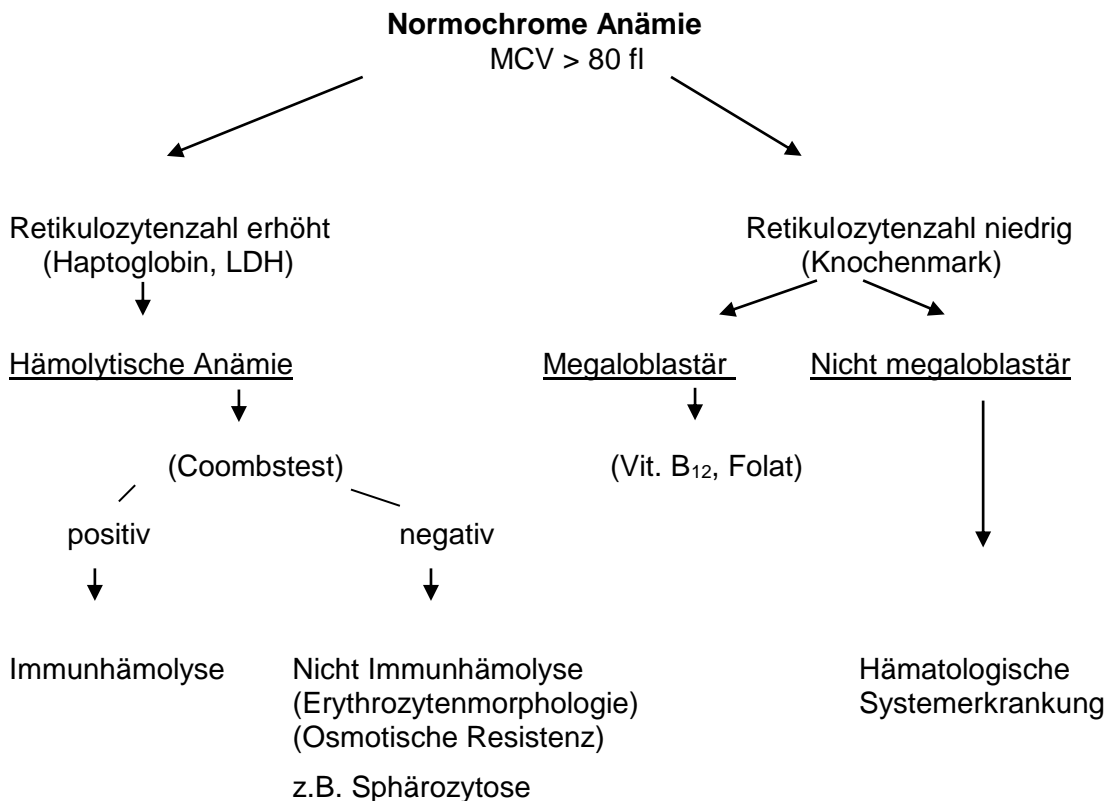
Antikörper – Nachweis auf Erys	Coombstest	Autoimmunhämolytische Anämie
Knochenmark	Zytologie mittels Aspiration Biopsie am Becken- kamm für histologische Auswertung	alle schwerwiegenden Störungen der Hämatopoese

II.1.2.1 Rationelle Anämie – Diagnostik

Bei einer Verminderung von Erythrozytenzahl, Hämoglobin oder Hämatokrit bestimmt das **MCV** das weitere Vorgehen.



Bei normalem MCV ist folgendes Vorgehen sinnvoll:



II.1.3 Wichtigste Störungen vor allem der roten Blutzellreihe

Hypochrome Anämien

Eisenmangel
Thalassämie

Normochrome Anämien

Viele hämolytische Anämien:

- a) Korpuskuläre Formen
 - Sphärozytose
 - Elliptozytose
 - Enzymopenische Anämien
 - Hämoglobinopathien
 - Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)

- b) Extrakorpuskuläre Anämien = serogen (meist erworben)
 - Mit Nachweis von Autoantikörpern (Coombs-Test)
 - Isoantikörper-Nachweis (Transfusionszwischenfall)
 - Toxisch: Medikamente, Schlangengifte etc.

Hyperchrome Anämien

Perniziosa und andere B12-/Folsäure-Mangelzustände
Myelodysplastische Syndrome

II.1.3.1 Eisenmangelanämie

Müdigkeit, Kopfschmerzen, rissige Haut, Blässe, Schleimhautatrophie. Häufigste Anämieform überhaupt, meist Frauen im gebärfähigen Alter (Menstruation), bei Gravidität. Ansonsten chron. intestinale Blutungen (ulcus, Hiatushernie, Hämorrhoiden etc.). Hypochrome Anämie, sTfR erhöht; weniger aussagekräftig: RDW (typischerweise erhöht), Transferrinsättigung (< 15%). Im Ausstrich Targetzellen bei leichtem, Anulozyten bei schwerem Eisenmangel, basophile Tüpfelung, Anisozytose.

II.1.3.2 Beta-Thalassämie (Minor-Thalassämie, heterozygot)

Dominant vererbte Defekte mit anomaler Synthese der alpha-, beta-, gamma- und delta-Ketten des Globinmoleküls. Im Fall der beta-Thalassämie ist nur die HbA1 (alpha2 beta2)-Bildung gestört und damit HbA2 über 3% und/oder HbF über 1% gesteigert. Homozygotie verläuft klinisch schwerer. Nicht selten sind Thalassämien mit anderen Hämoglobinopathien gekoppelt. Betroffen sind meist Personen mediterraner Abstammung, Manifestation schon in der Kindheit.

Hypochrome Anämie mit erniedrigtem MCV; Hb und Hkt sind jedoch typischerweise fast normal. Die Hb-Elektrophorese ist pathognomonisch. Meist kompensierte Hämolyse mit erhöhtem Bilirubin und Retikulozytose. Im Ausstrich Targetzellen, Anulozyten, basophile Punktierung und einzelne Erythroblasten.

II.1.3.3 Kugelzellanämie

Schon im Kindesalter krisenhaft gesteigerter Skleren- und Hautikterus, Splenomegalie. Familiäre Häufung, dominant vererbt. Normochrome Anämie mit Retikulozytose, ind. Bilirubin erhöht (kann zu Gallensteinen führen). Im Ausstrich Kugelzellen und basophile Tüpfelung.

II.1.3.4 Megaloblastäre Anämien (B12- oder Folsäuremangel)

Die perniziöse Anämie (Perniciosa) stellt die häufigste Form des B12-Mangels dar und ist autoimmun bedingt. Betroffen sind Patienten in höherem Lebensalter mit atrophischer Gastritis (=Fehlen des Intrinsic-Faktors). Strohgelbes Hautkolorit bei schleichendem Beginn. Neurologisch findet sich häufig eine funikuläre Spinalerkrankung mit Parästhesien der Beine. Ein Folsäuremangel kann durch Fehlernährung (Alkoholismus !) entstehen, ist vor allem aber in der Schwangerschaft anzutreffen. Bei beiden Formen liegt eine hyperchrome Anämie mit Leuko- und Thrombopenie und niedrigen Retikulozytenzahlen vor, B12 bzw. Folsäure sind im Blut erniedrigt. Das MCV kann 120 fl übersteigen, das MCHC verhält sich normal. Im Ausstrich Megalozytose und Übersegmentierung der Granulozyten.

II.2 Praktische Übungen

II.2.1 Retikulozytenfärbung

Beschreibung der manuellen Technik: Supravitalfärbung der Substantia retikulofilamentosa (präzipitierte ribosomale RNA) mit Brillant-Kresylblau
 Auszählung am Ausstrich: 5 - 15‰
 automatische Zählverfahren mit Fluorochromen

II.2.2 Beurteilung Ausstrich bei hämolytische Anämie

morphologische Veränderungen der Erythrozyten u.a. bei schwerem Blutzerfall

II.2.3 Beurteilung Ausstrich bei Malaria

Untersucht wird ein dünner Ausstrich (der „dicke Tropfen“ wird nicht mehr routinemäßig verwendet) in der Pappenheimfärbung. Die Untersuchungsdauer sollte wenigstens 15 min betragen, dies entspricht der Zeit, die man zur Auswertung von 100-200 Gesichtsfeldern bei hoher Vergrößerung benötigt.

Es lassen sich intraerythrozytär ein oder mehrere typische Ringformen nachweisen (Cave! Verwechslung mit auf den Erythrozyten lagernden Thrombozyten). Eventuell finden sich auch reifere Stadien (Morulaformen, Gametozyten).

Parasiten	Merkmale
Plasmodium vivax	Erythrozyten vergrößert, mit feiner, roter Tüpfelung (Schüffner-Tüpfelung); dicke Ringe, oft alle Stadien des Reproduktionszyklus
Plasmodium ovale	Erythrozyten oft oval oder birnenförmig; feine bis grobe rote Granula (Schüffner-Tüpfelung); kleine dicke kompakte Ringe
Plasmodium falciparum	Erythrozyten <u>ohne</u> Schüffner-Tüpfelung; feine Ringe; sichel- oder halbmondförmige Erythrozyten oft scheinbar ohne Hb, Mikrogametozyten bananenförmig.

III Hämatologie

Erkrankungen der Leukozyten

III.1 Reaktive Veränderungen

Die häufigste Reaktion auf eine bakterielle Infektion ist eine Leukozytose der Neutrophilen mit Linksverschiebung, toxischer Granulation und bei schweren Infektionen der Ausbildung von Zytoplasmavakuolen. Eine Monozytose erscheint erst nach Anstieg der Neutrophilen („Überwindungsphase“). Während der „Erholungsphase“ kommt es zu einer Zunahme der Eosinophilen. Infektionen wie Typhus, Bruzellose und Rickettsiose zeigen eine normale Leukozytenzahl, oft auch eine Neutropenie.

Eine Eosinophilie findet sich u.a. bei parasitären Erkrankungen, allergischen Erkrankungen und bei bestimmten Infektionskrankheiten (z.B. Scharlach). Eine Lymphozytose ist u.a. bei Virusinfektionen nachweisbar. Insbesondere bei der Infektiösen Mononukleose finden sich vielgestaltige atypische Lymphozyten im Ausstrich. Ein Teil dieser Zellen ist sehr groß mit basophilem Zytoplasma, häufig besitzen sie große Nukleoli und ähneln den Blasten einer akuten lymphatischen Leukämie.

III.2 Chronische neoplastische Veränderungen

III.2.1 Myeloproliferative Syndrome:

Unter den myeloproliferativen Syndromen faßt man eine Gruppe neoplastischer Knochenmarkerkrankungen zusammen mit einer autonomen Proliferation einer oder mehrerer Zelllinien der Hämatopoese. Dabei ist die Ausreifung erhalten. Hierzu werden die chronische myeloische Leukämie (**CML**), die Polyzythämia vera (**P. vera**), die essentielle Thrombozythämie (**ET**) und die Osteomyelofibrose (**OMF**) gerechnet. In den letzten Jahren gelang es, bei den myeloproliferativen Syndromen durch enzymatische, zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen den Nachweis einer monoklonalen Stammzellerkrankung zu führen.

Chronische myeloische Leukämie (chronische Phase)

Blutbild

Leukozytose; variable Anämie; Thrombozyten normal, oder erhöht, selten erniedrigt

pathologische Linksverschiebung bis zu Promyelozyten und Myeloblasten; Eosinophilie, Basophilie

Anisozytose, Poikilozytose, vereinzelt Normoblasten

Knochenmark

Hyperzellulär, granulopoetische Hyperplasie, Megakaryozyten reifungsgestört (Mikroformen); Eosinophilie; Basophilie; selten seeblaue Histozyten; Pseudo-Gaucher Zellen

Histologie:

zusätzlich zu den zytomorphologisch beobachteten Veränderungen häufig Faservermehrung (Knochenmarkfibrose)

Zusatzuntersuchungen

Alkalische Leukozytenphosphatase (Blut): Index erniedrigt (< 10)
 Chromosomenanalyse (Knochenmark)
 Nachweis Translokation t(9,22)(q34q11) (*Philadelphia-Chromosom*)

Molekularbiologie (Blut oder Knochenmark)
 bcr-abl-Fusionsgen; Genprodukt ist eine Tyrosinkinase

Blastenkrise

Blutbild

Blastenanteil (Myeloblasten) > 20%; zunehmende Anämie und Thrombopenie

Knochenmark

Blastenanteil (s.o.) > 50%; Reduktion der Erythropoese und Thrombopoese

Zusatzuntersuchung:

zusätzliche chromosomale Aberrationen,
 zytochemische und immunologische Untersuchung der Blasten
 (myeloische oder lymphatische Blastenkrise)

Polyzythämia vera

Blutbild

mäßige Leukozytose; Erythrozyten vermehrt; häufig Thrombozytose!
 Anisozytose, Poikilozytose, Normoblasten

Knochenmark

Hyperplasie aller Zellreihen, Reifungsstörung der Megakaryopoese
 Megakaryozyten in Nestern; Faserbildung

Zusatzuntersuchung

Alkalische Leukozytenphosphatase-Index häufig erhöht (> 100)

Jak-2-Mutation: in 60% der Fälle

Kommentar

Diagnose erfolgt über die Knochenmarkshistologie; alternativ werden die Kriterien der Polycythemia-Vera-Study-Group angewandt.

Essentielle Thrombozythämie

Blutbild

Thrombozytose; häufig mäßiggradige Leukozytose
 Dysthrombozytose (Riesenformen!)

Knochenmark

Granulozytopenie häufig gesteigert; Megakaryozyten stark vermehrt, oft in Haufen (große Formen mit ballonierten Kernen), Thrombozytenaggregate

Molekularbiologie: bis zu 50% mit jak-2-Mutation

Osteomyelofibrose

Blutbild

variable Leukozytose, oft normozytäre Anämie; häufig Thrombozytose, **leukoerythroblastäres Blutbild** (Blasten, Promyelozyten, Normoblasten); Dakrozyten (Tränentropfenzellen), Dysthrombozytose, in Spätstadien oft riesige Milz und Leber mit Panzytopenie

Knochenmark

zytologisch *Punctio sicca* infolge Faservermehrung

Histologie

im Frühstadium Hyperplasie aller Zellreihen; Megakaryozyten bizarr, in Nestern, häufig Mikroformen; variabel ausgeprägte Faserbildung (Retikulin, Kollagen); Reduktion der Markräume; Knochenneubildung

Molekularbiologie: jak-2-Mutationen bis 50%

III.2.2 Chronische lymphatische Leukämie (CLL, „Lymphadenose“)

Blutbild

Meist starke Vermehrung „reifer“ Lymphozyten ohne Auffälligkeiten, viele Gumprecht-Schatten (Ausstrich-Artefakte infolge der Fragilität der CLL-Zellen).

Immunologie

CD 19 pos. (B-Zellen), gleichzeitig Expression eines T-Zellmarkers (CD5), Leichtkettenrestriktion kappa oder lambda (als Ausdruck der Monoklonalität)

Knochenmark

Vermehrung lymphatischer Zellen bis hin zur Verdrängung der Blutbildung

Genetik

Mutierte V_H-Gene (prognostisch günstig)
Deletion 13: prognostisch ungünstig
Deletion 17: prognostisch ungünstig

III.3 Praktische Übungen

Hämatologische Differenzierung der Blutzellen

Die morphologische Prüfung der korpuskulären Blutelemente erfolgt anhand eines gefärbten Ausstrichs.

Benötigt werden:

Einwandfrei saubere Objektträger

Kapillaren

EDTA Vollblut

Technik Objektträgerausstrich:

Einen etwa linsengroßen Blutstropfen mit der Kapillare etwa 1 cm von der Schmalseite des Objektträgers entfernt auftragen. Anschließend sofort ausstreichen. Der Objektträger wird zwischen Daumen und Mittel- und Zeigefinger an den Schmalseiten gehalten. Von der Mitte

des Objekträgers her wird, ein 2. Objekträger schräg im Winkel von 30-45° gehalten, an den Blutstropfen herangeschoben, läßt ihn sich an der Objekträgerkante ausbreiten und zieht dann den 2. Objekträger in Schrägstellung gleichmäßig in Richtung gegenüberliegende Schmalseite.

Anschließend wird der Ausstrich luftgetrocknet und gefärbt.

Pappenheim Färbung:

Benötigt werden:

May-Grünwald-Lösung

Giemsa Lösung (60 ml Giemsa filtrieren und auf 500 ml Aqua bidest. auffüllen)

Aqua bidest.

Färbung:

5 min May-Grünwald

2x 5 min Aqua dest.

15 min Giemsa

2x 5 min Aqua dest.

Gefärbten Ausstrich lufttrocknen und differenzieren

Differenzierung:

Das Differentialblutbild dient der Zuordnung der Leukozyten zu bestimmten Untergruppen. Die Einteilung kann in Prozent oder bei bekannter Leukozytenzahl als absoluter Wert ausgedrückt werden. Zur Differenzierung geeigneten randfreien Bereich mit gut ausgebreiteten und gut gefärbten Zellen z.B. mäanderförmig absuchen.

Erythrozyten werden auf Form-, Größen und Anfärbbarkeitsveränderungen untersucht. Zur Beurteilung müssen die Erythrozyten deutlich isoliert voneinander liegen.

Relative Normalbereiche:

Leukozyten	Prozent
Stabkernige	0 - 5
Segmentkernige	30 - 80
Eosinophile	0 - 6
Basophile	0 - 2
Monozyten	0 - 12
Lymphozyten	15 - 50

Zählfehler der prozentualen Anteile von kernhaltigen Zellen im Blutausstrich:

Ermittelter Prozentsatz der Zellen einer Klasse	Zählfehler bzw. Ver- bereich (95%-Grenzen)
0	0 - 3
1	0 - 5
2	0 - 6
3	1 - 8
4	1 - 9
5	2 - 10
10	4 - 16
15	8 - 23
20	12 - 28
25	16 - 34

30	21 - 39
35	26 - 44
40	30 - 50
45	35 - 55
50	40 - 60
60	50 - 70
70	61 - 79
80	72 - 88
90	84 - 96

Die Quantifizierung von Zellen im Blutausstrich mit der 100-Zellzählung ist nur unbefriedigend möglich. Der wesentliche Fehler beruht auf den hohen Konfidenzintervalle bei nur 100 gezählten Zellen sowie der ungleichen Zellverteilung im Ausstrich. Die Präzision lässt sich nur durch Zählung von mehr Zellen verbessern. In der Praxis hat sich jedoch besonders aus zeitlichen Gründen die 100-Zellzählung durchgesetzt.

Ausstrich Chronische myeloische Leukämie

Ausstrich Chronische lymphatische Leukämie

IV Hämatologie

Akute Leukämien

Akute Leukämien entstehen durch die maligne Transformation und klonale Proliferation hämatopoietischer Vorläuferzellen. Dabei ist ein Reifungsabbruch nach diesen „Blasten“ typisch, der morphologisch vor allem bei den akuten myeloischen Leukämien auffällt. Zur Pathogenese wird eine somatische Mutation einer einzelnen Zelle innerhalb der frühen Progenitorzellen im Knochenmark oder Thymus diskutiert. Definitionsgemäß muß der Anteil dieser Blasten an allen kernhaltigen Zellen im Knochenmark über 20% liegen. Akute Leukämien werden unterteilt in akute myeloische Leukämien (AML) und akute lymphatische Leukämien (ALL).

Fast immer lassen sich nachweisen:

Leukozytose mit Blasten (ca. 25% „aleukämische Leukämie“);
Anämie und Thrombozytopenie (!)

Diagnostische Verfahren:

Morphologische Beurteilung der Blasten
Zuordnung der Blasten nach dem zytochemischen Färbeverhalten
Immunologische Zuordnung der Blasten
Zytogenetische Untersuchung
Molekularbiologische Untersuchung (besondere Fragestellung)

IV.1 Zytochemie

Färberischer Nachweis von Enzymen in Zellen der Hämatopoese

Peroxidase (**POX**)

Peroxidasen katalysieren die Oxidation von Substraten durch Wasserstoff-peroxid

Positiver Nachweis:

Neutophile, Eosinophile, Basophile u. ihre entsprechenden Vorstufen

alpha-Naphthylazetat-Esterase (**ANAE**)

Esterasen hydrolysieren aromatische und aliphatische kurzkettige Ester

Positiver Nachweis:

Diffuser Nachweis in Monozyten

Perjodsäure Schiff Reaktion (**PAS**)

Reaktion mit R-CHO Gruppen in Geweben (insbesondere Glykogen)

Positiver Nachweis:

Granulär in Lymphoblasten; variabel in Normoblasten bei Erythroleukämie oder Myelodysplastischen Syndromen

IV.2 Immunologie

Die Entwicklung monoklonaler Antikörper hat die Identifizierung verschiedener Differenzierungsantigene ermöglicht, die für die immunphänotypische Charakterisierung akuter Leukämien unverzichtbar sind. Bei den akuten lymphatischen Leukämien (ALL) hat die immunzytologische Klassifikation die FAB Klassifikation abgelöst.

Durchflusszytometrie („FACS“)

Inkubation einer Zellsuspension mit einem oder mehreren monoklonalen Antikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Mit Hilfe eines Lasersystems gleichzeitige Darstellung von bis zu 6 Antigenstrukturen auf Einzelzellebene bei sehr hoher Durchflußrate. Gleichzeitige Darstellung in zwei- oder drei-dimensionalem Bereich von Zellgröße und Granularität. Beliebige Analyse bestimmter Subpopulationen durch elektronisches „gating“.

APAP-(alkalische Phosphatase-Anti-alkalische Phosphatase) Technik:

Inkubation von Ausstrichen oder Zytozentrifugenpräparaten mit einem monoklonalen Antikörper. Zweite Inkubation mit einem Kaninchen-Anti-Maus-Ig. Dritte Inkubation mit dem APAAP-Komplex. Zytochemische Färbereaktion mit einem Substrat für alkalische Phosphatase. Die Antikörper-positive Zellen färben sich im entsprechenden Präparat.

CD-Einteilung:

Festlegung sogenannter CD-Orte (*Cluster of Differentiation*). Darin werden jeweils die verschiedenen Antikörper zusammengefaßt, die mit dem gleichen Antigenmolekül reagieren, wobei jedoch die einzelnen Epitope entsprechend der Spezifität der verwendeten Antikörper etwas unterschiedlich sein können.

Differenzierungsantigene in der Diagnostik akuter Leukämien

Antigen	Expression
myeloisch	CD 13 CD 33 MPO Glykophorin
B-lymphatisch	CD 19 CD 10 CD 20 CD 23 slgM
T-lymphatisch	CD 3 CD 4 CD 8
nicht linien-spezifisch	CD 34 TdT HLA-DR

IV.3 WHO-Klassifikation der AML

Akute myeloische Leukämie

AML mit spezifischen zytogenetischen Translokationen

AML mit Translokationen t(8;21)(q22; q22), *CBFA2T1/RUNX*

Akute Promyelozytenleukämie (AML mit t(15; 17)(q22; q11-12), *PML/RAR-α* u.Varianten)

AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark (*inv(16)(p13q22)* oder *t(16;16)(p13;q22)*, *CBF-β/MYH 11X*)

AML mit 11q23(MLL)-Abnormitäten

AML mit multilineärer Dysplasie

mit vorangegangenem myelodysplastischen Syndrom

ohne vorangegangenes myelodysplastisches Syndrom

AML und myelodysplastische Syndrome, therapie-assoziiert

assoziiert mit alkylierenden Substanzen

assoziiert mit Epipodophyllotoxin

andere

AML, nicht anderweitig klassifiziert

M0 AML mit minimaler Differenzierung: lichtmikroskopisch peroxidase-negativ, aber elektronenmikroskopisch und immunologisch mit myeloischen Markern

M1 AML ohne Ausreifung

M2 AML mit Ausreifung

M4 Akute myelomonozytäre Leukämie

M5 Akute monozytäre Leukämie

M6 Akute Erythroleukämie

M7 Akute megakaryozytäre Leukämie

Akute Basophilenleukämie

Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Myeloisches Sarkom

Akute biphänotypische Leukämien

IV.4 FAB-Klassifikation der akuten nicht-lymphozytären Leukämien

Definition		Morphologie	Zytochemie
M0	Minimal differenzierte myeloblastische Leukämie	wie M1	< 3% POX immunologisch definiert (CD 13)
M1	Myeloblastäre Leukämie, ohne Reifung	mittelgroße Blasten und allenfalls geringer azurophiler Granulation	≥ 3% POX pos.
M2	Myeloblastäre Leukämie mit Reifung	deutliche Reifungsmerkmale zu Promyelozyten	POX positiv
M3	Hypergranuläre Promyelozyten-Leukämie	atyp. Promyelozyten mit dichter azurophiler Granulation, Auerstäbchen	POX positiv
	Mikrogranuläre Promyelozyten-Leukämie	atyp. Promyelozyten mit staubförmiger azurophiler Granulation	
M4	Myelomonozytäre Leukämie	wie M2, jedoch > 20% Monozyten	POX positiv ANAE positiv
M5	Monozytäre Leukämie, un-differenziert oder differenziert	große Blasten mit auffälligen Nukleolen und breitem Zytoplasma, monozytär	ANAE positiv
M6	Erythroleukämie	Erythroblasten > 50%; Blasten > 30% der nicht Erythrozytären Zellen	POX positiv
M7	Megakaryoblastäre Leukämie	polymorphe, unterschiedlich große Blasten mit rundem Kern, Zytoplasma-Abschnürungen	PAS positiv immunologisch definiert

IV.5 FAB Klassifikation der ALL

FAB	Morphologie
L1	vorwiegend kleine Blasten mit homogenem Chromatin und schmalen Zytoplasma
L2	Größere, heterogene Blasten mit irregulärer Kernform, gut abgrenzbaren Nukleolen und breitem Zytoplasma
L3	Große Blasten mit ovalem Kern, prominenten Nukleolen und breitem, stark basophilem Zytoplasma; auffallende Vakuolisierung

IV.6 Immunologie, Zyto- und Molekulargenetik der ALL

Subgruppe	Immunphänotypisierung		Zyto/Molekulargenetik	
	Charakt. Marker	Inzidenz	Häufige Aberrationen	Molekulare Marker
B-Linien ALL	HLA-DR+, TdT+, CD19+ u./o. CD 79a+ u./o. CD22+	76%		
B-Vorläufer ALL Pro-B	CD10-	11%	t(4;11)	ALL1-AF4
c- (common)	CD10+	49%	t(9;22)	BCR-ABL
Prä-B	CyIgM+	12%	t(1;19) t(9;22)	E2A-PBX1 BCR-ABL
Reife B	SlgM+	4%	t(8;14)	cMYC
T-Linien ALL	TdT+, cyCD3+, CD7+	24%		
"Early" T	CD2-, sCD3-, CD1a-	6%		
Thymische	sCD3±, CD1a+	12%		
"Mature" T	sCD3+, CD1a-	6%		

IV.7 Praktische Übungen

Ausstrich ALL

Ausstrich AML FAB M2 oder M4

Ausstrich Promyelozytenleukämie

V Immunhämatologie

V.1 Begriffsdefinitionen und klinisch relevante Blutgruppen-Antigene

Blutgruppenantigene sind lösliche oder korpuskulär gebundene Substanzen, die im Organismus eine Immunantwort auslösen können. Sie lassen sich serologisch durch spezifische Antikörper mit Hilfe von Agglutinationstechniken nachweisen. Bei Blutgruppen-Antigenen im engeren Sinn handelt es sich um konstitutionelle oder adsorbierte Stoffe der Erythrozytenoberfläche, die durch Kohlenhydrate (z.B. AB0-, Lewis-System) oder Proteine (z.B. Rhesus, Kell oder Duffy) determiniert werden. Der Kohlenhydratanteil ist in Form von Oligosacchariden kovalent an Proteine, aber auch an Membranlipide gebunden. Es gibt zahlreiche Blutgruppensysteme, von denen das AB0- und Rhesussystem klinisch besonders bedeutsam sind

AB0-Blutgruppensystem

Die Kohlenhydrat-Grundsubstanz des AB0-Systems der Erythrozyten besteht aus z.T. verzweigt-kettigen Oligosacchariden, die eine terminale beta-Galactose aufweisen. Durch Verbindung mit einer Fucose entsteht die H-Substanz (Blutgruppe 0). Durch zusätzliche Anknüpfung von N-Acetyl-Galactosamin wird die Blutgruppe A oder von Galactose die Blutgruppe B gebildet. Der Phänotyp der AB0-Gruppen ist durch die genetische Determinierung von verschiedenen Glycosyltransferasen bedingt, die die kovalente Anbindung des jeweils endständigen Zuckerrests herbeiführen. Beim sehr seltenen, sogenannten Bombay-Typ fehlt die H-Substanz, so dass die Blutgruppen-Antigene A und B nicht ausgebildet werden können.

Rhesus-Blutgruppensystem

Das Rhesussystem umfaßt im Wesentlichen die Antigene D sowie C, c, E und e. Wer das Antigen D exprimiert ist Rhesus-positiv (D-positiv), wer kein D-Merkmal auf den Erythrozyten trägt ist Rhesus-negativ (D-negativ). Daneben gibt es eine Fülle weiterer Antigene, die klinisch jedoch weit weniger bedeutsam sind. Das Zeichen ‚d‘ kennzeichnet kein eigenes Antigen sondern die Abwesenheit des Antigens D. Ein Genlocus determiniert das Rhesus D-Protein, der andere die Rhesusmerkmale C/c und E/e („Rhesus-Haplotypen“). Aus dem Genotyp cde/cDE entsteht so z.B. der Phänotyp ccD.Ee. Die Genotypbezeichnung „d“ steht dabei nicht für ein eigenes Allel, sondern für ein nicht vorhandenes D-Allel.

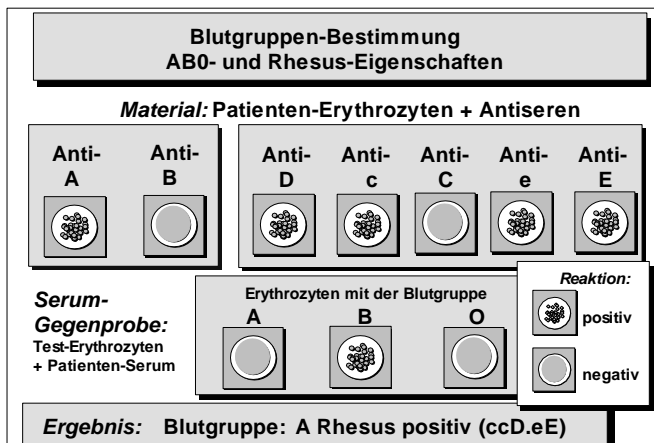
Blutgruppen-Bestimmung

Die Bestimmung der Blutgruppen erfolgt methodisch durch **Agglutination** der Erythrozyten nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierbei reagiert ein spezifischer Antikörper mit seinem Zielantigen (Blutgruppen-Antigen, Blutgruppen-Merkmal) auf der Erythrozytenoberfläche und führt zu einer Quervernetzung der Erythrozyten, die in einem zusammenhängenden Verband makroskopisch sichtbare Agglutinate („Verklumpung“) bilden. Technisch wird hierfür eine zu untersuchende Erythrozytensuspension mit Testserum, das den spezifischen Antikörper enthält, versetzt und auf Agglutination geprüft. Am gebräuchlichsten ist inzwischen der Testansatz in Mikroküvetten auf Kunststoffkarten (z.B. sog. Gelzentrifugation). Diese und andere Techniken wie die Mikrotiterplatten-Technik eignen sich auch für die automatisierte Blutgruppenbestimmung.

Zur Vorbereitung einer Transfusion wird die Blutgruppe des Empfängers im **AB0-System** bestimmt und der Empfänger zusätzlich auf das **Rhesus-Antigen D** sowie ggf. auf weitere

Rhesus-Antigene untersucht. Die AB0-Antigene und das Rhesus D-Antigen auf den Erythrozyten werden mit Hilfe der monoklonalen Testseren Anti-A, Anti-B und Anti-D ermittelt. Da bzgl. des AB0-Systems im Serum die komplementären Antikörper gegen das nicht vorhandene Blutgruppen-Antigen A oder B enthalten sind, werden bei einer vollständigen Blutgruppen-Bestimmung mit Hilfe von Testerythrozyten der Blutgruppe A, B und 0 auch diese sog. Isoantikörper in der sog. Serumgegenprobe ermittelt. Die nachfolgende Abbildung zeigt ein Beispiel für eine komplette Blutgruppen-Bestimmung im AB0- und Rhesussystem.

Beispiel für ein Reaktionsgeschehen im Rahmen einer vollständigen AB0-Blutgruppen-Bestimmung inkl. Serumgegenprobe (ohne Antikörper-Suchtest)



Antikörper-Suchtest

Der Antikörper-Suchtest dient zur Analyse des Vorhandenseins von Blutgruppen-Antikörpern, die regulär nicht im Patientenblut vorkommen (sog. irreguläre Antikörper). Diese irregulären Blutgruppen-Antikörper, z.B. Anti-D oder Anti-Kell, sind zumeist durch eine Immunisierung im Rahmen von Vortransfusionen oder Schwangerschaften entstanden und müssen in aller Regel bei Bluttransfusionen berücksichtigt werden. Damit kommt dem Ergebnis dieses Tests neben der Blutgruppen-Bestimmung eine zentrale Bedeutung im Rahmen einer sicheren Bluttransfusion zu.

V.2 Bedeutung von Blutgruppen-Bestimmung und Antikörper-Suchtest

Die vollständig durchgeführte Blutgruppen-Bestimmung inkl. Antikörper-Suchtest ist die Voraussetzung für eine **kompatible und damit sichere Transfusion**. Da im AB0-System komplementäre Antikörper (Anti-A und Anti-B) bereits präformiert gegen die nicht vorhandenen Blutgruppe vorliegen und zeitlebens persistieren, wird im Regelfall die AB0-Blutgruppen-identische Transfusion durchgeführt. In Notfällen oder bei fehlender Verfügbarkeit von AB0-identischen Erythrozytenkonzentraten können dem Empfänger entsprechend der unten genannten Transfusionsregel auch AB0-ungleiche, aber kompatible Erythrozytenkonzentrate

transfundiert werden. Darüber hinaus werden grundsätzlich auch im Rhesus-System, insbesondere für das Rhesus-Merkmal D, kompatible Transfusionen angestrebt, um der Gefahr der Bildung eines irregulären Antikörpers entgegen zu wirken.

Zusammenhang zwischen AB0-Blutgruppe eines Patienten (Empfängers) und verträglicher AB0-Blutgruppe von Erythrozytenkonzentraten und gefrorenem Frischplasma.

AB0-Blutgruppe Patient	AB0-Blutgruppe verträglicher (kompatibler) Erythrozytenkonzentrate	AB0-Blutgruppe verträglicher (kompatibler) gefrorener Frischplasmen (GFP)
0	0	0, A, B, AB
A	A, 0	A, AB
B	B, 0	B, AB
AB	AB, A, B, 0	AB

V.3 Bedeutung des AB0-Bedside Tests

Der sogenannte **AB0-Bedside Test** ist ein äußerst wichtiger Test, der vor jeder Transfusion eines Erythrozyten-haltigen Blutpräparates vom transfundierenden Arzt durchgeführt werden muss. Hierbei müssen die AB0-Eigenschaften der Patienten-Erythrozyten unmittelbar vor einer Bluttransfusion am Patientenbett überprüft werden. Die Erythrozyten des Blutpräparates können parallel getestet werden. Dieser Test ist der letzte Arbeitsschritt unmittelbar vor Einleitung der Transfusion, um eine Verwechslung zwischen Patient und Blutpräparat und damit eine lebensbedrohliche, AB0-inkompatible Erythrozyten-Transfusion zu verhindern. Im Gegensatz zur vollständigen Blutgruppen-Bestimmung im AB0-System (s. oben) werden beim AB0-Bedside-Test nur die AB0-Erythrozyten-Eigenschaften (Antigene) der Patienten-Blutprobe untersucht; die Serum-Eigenschaften (AB0-Antikörper) sowie das Rh-Merkmal D bleiben dagegen unberücksichtigt. Der AB0-Bedside-Test ist damit keine vollständige Blutgruppen-Bestimmung. Der AB0-Bedside-Test ist auch keine Kreuzprobe, die ausschließlich im Labor durchgeführt wird.

Prätransfusionelle Untersuchungen

Zur Vorbereitung einer Transfusion von Erythrozyten-haltigen Blutpräparaten sind gemäß den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ die nachfolgend genannten Untersuchungen vorgeschrieben:

Im Labor / in der Blutbank:

- Bestimmung der vollständigen Patienten-Blutgruppe (**AB0-System** und **Rhesus-Merkmal D**) inkl. **Antikörpersuchtest**.
- **Verträglichkeitsprüfung** (sog. **Kreuzprobe**) zwischen Patienten-Serum und Erythrozyten des Blutpräparates im indirekten Coombs-Test.

Am Patientenbett vom transfundierenden Arzt:

- Durchführung des **AB0-Bedside Tests**.

Die genannten Untersuchungen dienen der Sicherung von Identität und Kompatibilität bei der Anwendung von Blutprodukten.

V.4 Blutkomponenten aus Blutspenden

Die o.g. blutgruppenserologischen Regeln und labordiagnostischen Maßnahmen gelten speziell für **Erythrozytenkonzentrate (EKs)**. Wie alle zellulären Blutpräparate werden EKs nur leukozytendepletiert von der Blutbank ausgeliefert. Diese Präparate müssen bei $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden. EKs sind entsprechend der Leitlinien der Bundesärztekammer zur Behandlung von Anämien, akuten und chronischen Blutverlusten, zur perioperativen Substitution oder bei Austauschtransfusion indiziert.

Gefrorenenes Frischplasma (GFP) wird hauptsächlich zum Ausgleich bei globalem Gerinnungsfaktorendefizit eingesetzt, z. B. im Rahmen von Massivtransfusionen. Darüber hinaus dient es zur Substitution bei schwerem Mangel der Gerinnungsfaktoren V und XI. Da GFP entsprechend der jeweiligen Spender-Blutgruppe die Isoagglutinine Anti-A und/oder Anti-B enthält, müssen auch diese Präparate AB0-identisch bzw. AB0-kompatibel transfundiert werden. GFP wird bei unter -30 Grad Celsius gelagert und muss für Transfusionszwecke aufgetaut werden.

Thrombozytenkonzentrate (TKs) werden aus Vollblut-Spenden oder mittels automatisierter Blutspende (sog. Zytapherese) hergestellt. Sie werden bei $+22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ unter ständiger Agitation bis zu 5 Tagen nach Herstellung gelagert und sind zur Behandlung und Abwehr von Blutungskomplikationen bei schweren Thrombozytopenien indiziert. TKs sollen AB0- und Rhesus(D)-identisch, im Ausnahmefall auch AB0-kompatibel transfundiert werden. Bei therapierefraktären Thrombozytopenien und nachgewiesener Immunisierung gegen Antigene im HLA (Human Leukocyte Antigen)-System ist die Gabe von HLA-kompatiblen TKs indiziert.

V.5 Praktische Übungen

Durchführung und Interpretation des AB0-Bedside Tests

Am Tisch finden Sie 2 AB0-Bedside-Testkarten vor. Auf jeder Karte befinden sich eingetrocknete Testseren der Spezifität Anti-A (blau) und Anti-B (gelb).

Darüber hinaus befinden sich am Tisch 2 Röhrchen mit Vollblut-Proben von 2 Probanden unbekannter AB0-Blutgruppe sowie 1 Röhrchen mit isotoner NaCl-Lösung. Das Blut der Probanden wurde bei der Entnahme antikoaguliert und simuliert das Vollblut eines Transfusionsempfängers, wie es unmittelbar vor der Transfusion am Patientenbett entnommen wird:

- Röhrchen 1) Vollblut Proband 1
- Röhrchen 2) Vollblut Proband 2
- Röhrchen 3) 0,9%ige NaCl-Lösung

Bestimmen Sie für jedes Probanden-Vollblut die AB0-Eigenschaften der Erythrozyten wie folgt:

- Entnehmen Sie mit einer Einweg-Pipette etwas NaCl-Lösung und geben Sie **1-2 Tropfen** auf die eingetrockneten Testseren auf der Bedside-Testkarte.
- Lösen Sie die Testseren in der NaCl-Lösung mittels Pipette/Holzstäbchen.
- Entnehmen Sie mit einer Einweg-Pipette etwas Probanden-Vollblut und geben Sie **je 1 Tropfen** in die Testfelder mit den gelösten Anti-A- und Anti-B-Testserum. Bitte kein Testserum verschleppen! Verwerfen Sie die Pipette.
- Mischen Sie den Inhalt der Testfelder, indem Sie die Bedside-Testkarte in die Hand nehmen und **vorsichtig schwenken**.

- Bewerten Sie die Reaktionen in den Testfeldern bzgl. des Auftretens einer sichtbaren Agglutinationsreaktion (Bewertung: **+** : Agglutination; **-** : keine Agglutination).
- **Bitte fertigen Sie von den Befunden des AB0-Bedside-Tests Zeichnungen mit den Reaktionen im Praktikumsbuch an und bewerten Sie die erhobenen Befunde.**

VI Hämostaseologie

Die **Hämostaseologie** ist die interdisziplinäre Lehre von der Blutgerinnung. Als Spezialgebiet der Medizin befasst sie sich mit all jenen Faktoren, die zur Diagnostik und Therapie von Störungen der Hämostase mit verstärkter Blutungs- oder Thromboseneigung notwendig sind. Mit dem Begriff Hämostase wird ein komplexes Zusammenspiel von Prozessen, Geweben, Zellen und löslichen Substanzen verstanden, durch das zum einen die Fließfähigkeit des Blutes und zum anderen gleichzeitig seine Gerinnbarkeit nach Verletzung an jedem Ort des Körpers und zu jeder Zeit gewährleistet wird. Wesentliche Aspekte der Hämostaseologie sind:

- eine intakte Blutgerinnung unter Einbeziehung des Zusammenspiels sämtlicher Gerinnungsfaktoren
- die ungestörte Funktion der Thrombozyten sowie des Endothels als innerer Auskleidung der Gefäßwand
- die der Blutgerinnung entgegenwirkenden Faktoren (Inhibitoren), wie z. B. das Antithrombin und das Fibrinolyse-System mit seiner Aktivierung und Wirkung von Plasmin.

Hauptaufgabe des Hämostasesystems ist die Ermöglichung eines suffizienten Wundverschlusses und Initiierung der Wundheilung. Einen ersten Schritt auf dem Weg zur **Wundheilung** stellt die **Blutstillung** dar. Die Blutstillung wird daher auch als das Hauptziel der Hämostase angesehen.

VI.1 Primäre Hämostase

Das unmittelbare Abdichten eines Gefäßes nach Verletzung gelingt durch einen schnell ablaufenden Mechanismus, der als primäre Hämostase bezeichnet wird. Von wesentlicher Bedeutung ist dafür die Interaktion aus Vasokonstriktion, Endothelreaktion sowie Plättchenadhäsion und -aggregation. Zugleich wird die plasmatische Gerinnung als sekundäre Hämostase aktiviert, die entscheidend die Verfestigung eines Thrombus durch Fibrin bestimmt. Im Zusammenspiel einer Vielzahl von Gerinnungsfaktoren mit der Hämodynamik der Blutströmung und dem Gefäßsystem kommt es zur Ausbildung eines zunächst primären und später sekundären Blutpfropfs zum Gefäßverschluss.

VI.1.1 Thrombozyten

Die Blutplättchen werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet. Die physiologische Thrombozytenzahl im peripheren Blut beträgt 150-400/nl. Blutplättchen haben einen Durchmesser von 2-5 µm. Im Gegensatz zu Leukozyten weisen Blutplättchen keinen Zellkern auf und sind dadurch nicht oder nur sehr eingeschränkt zur Proteinsynthese befähigt. Die physiologische Überlebenszeit der Blutplättchen im peripheren Blut beträgt etwa 7-10 Tage. Der Abbau der Plättchen erfolgt im Monozyten/Phagozyten-System der Leber und Milz. Etwa ein Drittel der Plättchen ist in der Milz gespeichert und steht im Austausch mit dem zirkulierenden Anteil.

Das Zytoplasma der Plättchen enthält drei verschiedene Formen von Speichergranula: dichte Granula ("dense bodies"), α -Granula und Lysosomen. Die Inhaltsstoffe der Granula werden in der Tab. 1 wiedergegeben.

Tab. 1 Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula

Dichte Granula (dense bodies)	α -Granula	Lysosomen
ATP ADP Ca ²⁺ Serotonin	Adhäsionsproteine: Fibrinogen Fibronectin von-Willebrand-Faktor Thrombospondin Glykoprotein IIb-IIIa Gerinnungsfaktoren: Plasminogen Faktor V und XI Protein S Wachstumsfaktoren Enzyme Zytokinähnliche Proteine	Kathepsin Kollagenase β -Galaktosidase u.a.

VI.1.2 Thrombozytenaktivierung und primäre Hämostase

Bei einer Gefäßverletzung werden subendotheliale Strukturen (Kollagen, Laminin, Fibronectin etc.) freigelegt. Hierdurch kommt es zu einer raschen Plättchenadhäsion und Aggregation. Es bildet sich in kurzer Zeit ein Plättchenthrombus, der die Wunde verschließt.

Die Adhäsion noch ruhender Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase. Sie wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert. Für die Adhäsion der Thrombozyten an freigelegte subendotheliale Strukturen ist das Plasmaprotein 'von Willebrand-Faktor' erforderlich. Der von Willebrand-Faktor bindet an Kollagenfasern und an den thrombozytären Rezeptor für den von Willebrand-Faktor (Glykoprotein Ib/V/IX) und verankert den Thrombozyten auf diese Weise am Subendothel.

Neben der Adhäsion kommt es bei der primären Hämostase auch zu einer Aggregation der Thrombozyten. Hierbei spielt das Glykoprotein IIb/IIIa als Fibrinogenrezeptor auf der Thrombozytenoberfläche eine wichtige Rolle. Fibrinogen bindet an den aktivierten Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor. Durch die Ausbildung von Fibrinogenbrücken zwischen aktivierten Thrombozyten entstehen Plättchenaggregate.

Im nichtaktiviertem Zustand weisen Thrombozyten eine diskoide Form auf. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Formveränderung (Kugelform) mit Bildung von Pseudopodien, die Ausstülpungen der Plasmamembran darstellen. Dabei vergrößert sich die Oberfläche des Thrombozyten erheblich. Bei der Thrombozytenaktivierung werden die Inhaltsstoffe der Thrombozytengranula freigesetzt. ADP und Thromboxan führen zu einer direkten Aktivierung von weiteren Thrombozyten. Serotonin wirkt vasokonstriktorisch. Außerdem wird durch die Gefäßläsion sog. Tissue Factor freigesetzt und hierdurch das plasmatische Gerinnungssystem aktiviert. Das bei der plasmatischen Gerinnung entstehende Thrombin aktiviert wiederum Thrombozyten. Thrombin setzt Fibrin-Monomere aus Fibrinogen frei. Die Fibrinmonomere polymerisieren sehr schnell zu Fibrinfäden. Die Fibrinbildung stabilisiert den primären Plättchenpropf. Durch die Retraktion der Fibrinfäden werden die Wundränder schließlich zusammengezogen. Am Ende wird das gebildete Fibrin durch die Wirkung des F XIII quervernetzt und damit stabilisiert.

VI.1.3 Blutungszeit

Mit der Blutungszeit wird die primäre Hämostase geprüft. Indikationen zur Bestimmung der Blutungszeit sind:

- jedes unbekanntes Blutungsleiden
- Beurteilung der Blutungsgefährdung z. B. präoperativ bei V.a. einer hämorrhagischen Diathese
- Verlaufskontrolle bei Patienten mit von Willebrand-Syndrom oder anderen Störungen der primären Hämostase

Die Blutungszeit kann mit den folgenden Verfahren am Patienten bestimmt werden:

Blutungszeit nach Duke:

Die Methode kann am Ohrläppchen oder an der Fingerbeere durchgeführt werden. Nach gründlichem Abreiben mit einem Hautdesinfektionsmittel wird ca. 3 - 4 mm tief mit einer sterilen Einmal-Lanzette eingestochen und die Stoppuhr in Gang gesetzt. Dann saugt man alle 10-15 sek. das ausgetretene Blut vorsichtig mit einem Filterpapier ab, ohne die Wundränder zu berühren. Registriert wird die Zeit bis zum Stillstand der Blutung. Bei einer normalen primären Hämostase sistiert die Blutung nach spätestens ca. 4 min. (Norm < 4 min.)

Blutungszeit nach Mielke:

Bei der Bestimmungsmethode nach Mielke werden zum besseren Standardisieren des Messprinzips ein Schnäppersystem von ca. 70x40x1 mm mit einem zentralen Schlitz von 1 cm Länge und ein Skalpell mit einstellbarer Schnitt-Tiefe (1 mm) verwendet (z. B. Surgicutt® Bleeding Time Device). Die Manschette eines Blutdruck-Meßgerätes wird um den Oberarm gelegt und auf 40 mmHg aufgeblasen. Die Innenseite des gestauten Unterarms wird mit Hautdesinfektionsmittel gereinigt und desinfiziert. Das Schnäppersystem wird aufgelegt und 1 Schnitt von je 1 mm Tiefe und 1 cm Länge vorgenommen. Alle 10-20 sek. wird das austretende Blut mit Filterpapier ohne Berühren der Wundränder aufgesaugt und die Zeit bis zum Stillstand der Blutung gestoppt. Als Referenzbereich wird eine Blutungszeit < 10 min. angegeben.

VI.1.4 Ursachen einer verlängerten Blutungszeit

Ursachen einer verlängerten Blutungszeit können Thrombozytopenien, Thrombozytenfunktionsstörungen sowie seltener Hypofibrinogenämien oder Vasopathien sein. Thrombozytenfunktionsstörungen sind häufig durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure bedingt. Aufgrund der irreversiblen Hemmung der thrombozytären Cyclooxygenase-1 durch Acetylsalicylsäure ist die Bildung des Thrombozytenaktivators Thromboxan inhibiert. Bei den folgenden Medikamenten kommt es ebenfalls zu Thrombozytenfunktionsstörungen: Ticlopidin, Clopidogrel, Abciximab (Fab-Fragment eines chimären gegen den thrombozytären GP IIb/IIIa-Rezeptor gerichteten Antiköpers), Valproinsäure, Penicilline, Dextrane. Erworbene Thrombozytenfunktionsstörungen treten auch bei Leberzirrhose und Urämie auf.

Die häufigste angeborene Thrombozytenfunktionsstörung stellt das von Willebrand-Syndrom dar. Der von Willebrand-Faktor ist ein oligomeres Protein, das zwei wichtige Aufgaben erfüllt: Thrombozytenadhäsion (hochmolekularer von-Willebrandfaktor) und Bindung von Faktor VIII (Schutz der Gerinnungsfaktors VIII vor zu raschem Abbau). Das von Willebrand-Syndrom kann sich daher sowohl auf die primäre Hämostase als auch auf die plasmatische Gerinnung auswirken.

Zu erwähnen sind ferner seltene angeborene Thrombozytenfunktionsstörungen. Beim Bernard-Soulier-Syndrom handelt es sich um einen Defekt des GP-Ib/V/IX-Rezeptors mit Auftreten von Riesenthrombozyten. Bei der Thrombasthenie Glanzmann ist der GP IIb/IIIa Rezeptor betroffen. Unter der Bezeichnung Storage Pool Diseases werden verschiedene erbliche Thrombozytenfunktionsstörungen zusammengefaßt, bei denen bestimmte Funktionen der Speichergranula gestört sind.

VI.1.5 In vitro Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Anstelle der Bestimmung der Blutungszeit am Patienten kann auch eine in-vitro Thrombozytenfunktionsdiagnostik aus einer Blutprobe erfolgen. Hierfür stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Die Patiententhrombozyten werden durch verschiedene Aktivatoren (z. B. Kollagen, ADP, Adrenalin etc.) stimuliert. Bei der Aggregometrie wird die Thrombozytenaggregation mit Hilfe der zunehmenden Lichtdurchlässigkeit einer Thrombozytensuspension nach Zugabe von Aktivatoren beurteilt. Mit einem anderen für die Routinediagnostik geeigneten Verfahren werden die Verhältnisse in einem verletzten Gefäß in einem Gerät (z. B. Platelet Function Analyzer-100®) simuliert, wobei die Thrombozytenfunktion mit Hilfe einer Verschlusszeit beurteilt wird.

Bei der Differentialdiagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen spielt auch die Durchflußzytometrie eine Rolle. Die in-vitro-Funktionsdiagnostik kann jedoch nicht vakuläre Störungen, die beim Ehlers-Danlos-Syndrom und Skorbut auftreten können, erfassen. Somit würde bei alleiniger Thrombozytenfunktionsdiagnostik eine Vasopathie der Diagnosestellung entgehen.

VI.2 Sekundäre Hämostase

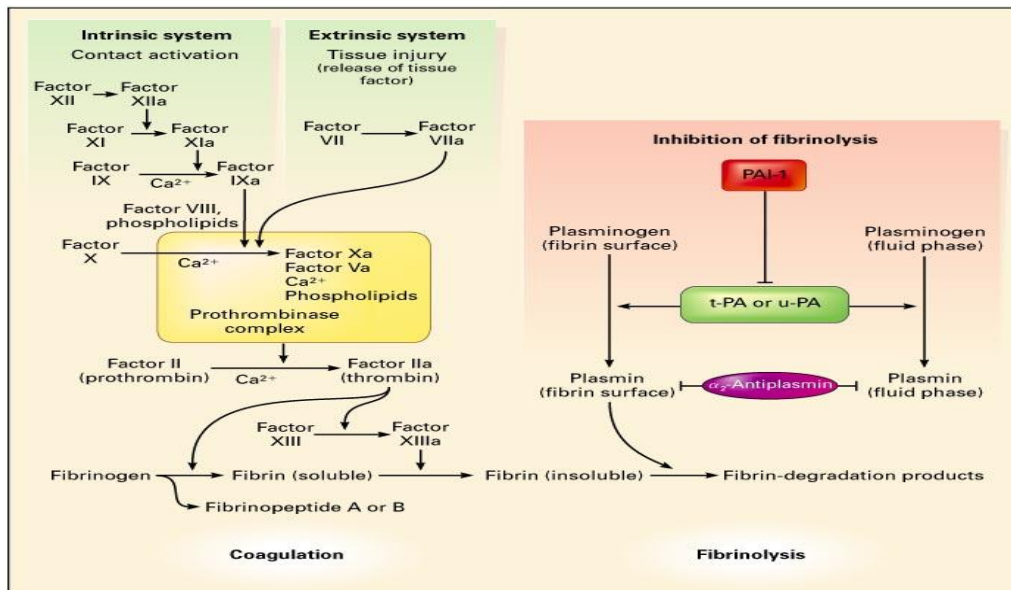
VI.2.1 Plasmatische Gerinnung

Die plasmatische Gerinnung führt als Ergebnis zu einem Maschenwerk aus mechanisch stabilem Fibrin, in das neben Thrombozyten auch Erythrozyten eingefangen werden. Ein so entstehender Thrombus wird daher auch als „roter Thrombus“ bezeichnet. Die sekundäre Blutstillung, die Blutgerinnung, wird nach dem zurzeit gültigen Modell in folgende drei Hauptphasen unterteilt: **Initiationsphase, Amplifikationsphase und Propagationsphase**. Hierbei spielen sich im Wesentlichen die folgenden Hauptreaktionen ab:

- Start der Gerinnung über Gerinnungsfaktor FVIIa / Tissue Factor am Ort der Gefäßwandverletzung
- Aktivierung von Plättchen am Verletzungsort
- Zeitgleiche Aktivierung der Gerinnungsfaktoren und deren Bindung auf der Plättchenoberfläche
- Beschleunigung der Gerinnung über lokal gebildetes Thrombin (sog. Thrombinburst)
- Bildung eines stabilen Fibrin-Thrombus

In der folgenden Abbildung wird das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten der sekundären Hämostase schematisch dargestellt.

Kaskadenmodell der plasmatischen Blutgerinnung



VI.3 Präoperative Diagnostik zur Erfassung einer Blutungsneigung

Die häufigste Fragestellung der hämostaseologischen Diagnostik betrifft den Ausschluss einer erhöhten Blutungsneigung vor Operationen und anderen invasiven Eingriffen. Selbst milde hämorrhagische Diathesen können perioperative Blutungen und Wundheilungsstörungen verursachen, im schlimmsten Fall das Leben des Patienten bedrohen, den Op-Erfolg gefährden oder die Behandlung erheblich verlängern und verteuern. Die Patienten werden Nachblutungen und Wundheilungsstörungen als schlechte Behandlungsqualität empfinden. Das Blutungsrisiko wird am häufigsten bei Eingriffen im Hals-Nasen-Ohren- oder Zahn-Mund-Kieferbereich unterschätzt, wie z.B. bei Tonsillektomien, Adenotomien oder Zahnextraktionen.

Der so genannte routinemäßige präoperative Ausschluss einer Blutungsneigung besteht aus **drei** sich ergänzenden, unverzichtbaren Maßnahmen: der Erhebung der **Blutungsanamnese**, der Suche nach **klinischen Zeichen einer erhöhten Blutungsneigung** und einem **Laborscreening**. Die Gründe für diese diagnostische Strategie liegen in der relativen Unzuverlässigkeit der Blutungsanamnese und dem Fehlen von hämostaseologischen Screeningtests, die mit hinreichender Sensitivität und Spezifität alle relevanten Ursachen einer hämorrhagischen Diathese erfassen können.

VI.3.1 Blutungsanamnese und Blutungssymptome

Die Blutungsanamnese sollte im optimalen Fall mit einem vorgefertigten Fragebogen unter Anleitung eines Arztes erhoben werden (s. Beispiel). Die positiven Antworten auf die einzelnen Fragen sind mit einem Score zu versehen. Überschreitet der Score einen Schwellenwert, ist von einer anamnestisch erhöhten Blutungsneigung auszugehen.

Tab. 2 Beispiel für einen Fragebogen zur Erfassung einer Blutungsneigung

Bitte beantworten Sie folgende Fragen durch Ankreuzen:

Welche Medikamente nehmen Sie ein?

Haben oder hatten Sie

Starkes Nachbluten nach Operationen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Bluttransfusionen während oder nach Operationen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Verzögerte, schlechte Wundheilung	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Große blaue Flecke nach leichten Verletzungen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Langes Nachbluten nach Schnittverletzungen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Auffällig langes Nachbluten nach Zähneziehen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Wiederholtes Einblutungen in Gelenke	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Blutungsneigung bei Eltern, Geschwistern, Großeltern, sonst. Verwandten, z.B. Nachbluten nach Operationen, Verletzungen oder Zähneziehen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Häufiges Nasenbluten	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Aspirin, Aspirin-haltige Schmerzmittel, Plavix oder Iscover in den letzten 14 Tagen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Grippemittel oder Rheumamittel in den letzten 14 Tagen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Nur für Frauen: haben oder hatten Sie		
Starke und/oder verlängerte Monatsblutungen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Nachbluten nach Geburten oder Fehlgeburten	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Fehlgeburten	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein

Unsichere und deutliche Zeichen einer erhöhten Blutungsneigung können unterschieden werden. Rezidivierende Gelenkblutungen, Schleimhautblutungen mit mehreren Lokalisationen oder großflächige Hämatome, auffallendes sofortiges oder zeitlich verzögertes Nachbluten nach Operationen, Traumata oder Geburten, eine schlechte Wundheilung, sowie Menorrhagien und Hypermenorrhoe sind mit wesentlich größerer Wahrscheinlichkeit mit einer hämorrhagischen Diathese assoziiert als Nasenbluten oder Zahnfleischbluten als jeweils einziges Symptom oder vorwiegend kleine Hämatome oder passagere Petechien, die ausschließlich an den Extremitäten auftreten. Bei etwa 20% der Frauen mit Menorrhagien oder Hypermenorrhoe findet man eine Hämostasestörung als Ursache oder Mitursache der Beschwerden, zumeist ein von Willebrand-Syndrom.

Der Arzt muss nach Schwere, Häufigkeit und Dauer von Blutungen fragen, ob diese spontan oder nach Operationen oder Verletzungen aufgetreten sind, sowie nach Grunderkrankungen, die häufig mit Hämostasestörungen einhergehen: Hepatopathien, Infekte, Urämie, maligne und myeloproliferative Erkrankungen. Besonders sorgfältig muss die Medikamentenanamnese erhoben werden, da zahlreiche Pharmaka vornehmlich Thrombozytopenien und Thrombozytopathien verursachen können.

Art, Lokalisation und zeitliches Auftreten von Blutungen in Abhängigkeit von Operationen oder Traumata lassen bedingt Rückschlüsse auf die Art der zugrunde liegenden Gerinnungsstörung zu. Störungen der plasmatischen Gerinnung (Koagulopathien)

verursachen eher großflächige Hämatome und Sugillationen sowie zeitlich verzögertes Nachbluten, während Thrombozytopenien und Thrombozytopathien bevorzugt Petechien und sofortige postoperative oder posttraumatische Schleimhautblutungen hervorrufen. Koagulopathien beeinträchtigen die Wundheilung schwerer als andere Hämostasestörungen. Die **häufigste angeborene hämorrhagische Diathese, das von Willebrand-Syndrom** mit einer laboranalytischen Prävalenz von zirka 1%, zeigt zumeist die bei Koagulopathien typischen Blutungszeichen, wenn Eingriffe oder Verletzungen im Schleimhautbereich stattfinden. Blutungen aus Stichkanälen sind nicht selten auch mit einer Hyperfibrinolyse assoziiert.

Trotz ihrer Unverzichtbarkeit ist die Prädiktivität der Blutungsanamnese für perioperative Blutungen nicht sehr hoch, da sowohl falsch negative als auch falsch positive Befunde häufig vorkommen müssen.

Ursachen einer falsch negativen und einer falsch positiven Blutungsanamnese

Falsch negativ

- Bislang kein „Blutungsstress“, wie Trauma, Op, Menstruation, bei Kindern und Jugendlichen
- Familienanamnese nicht erhebbar
- Mittlerweile erworbene Hämostasestörung nach früheren Op oder Traumata ohne abnorme Blutungen
- Mildes von Willebrand-Syndrom: keine Blutungen bei Op außerhalb der Schleimhäute, schwere Blutungen bei künftigen Op im Schleimhautbereich
- Schwere Blutung wird als normal empfunden, z.B. Menorrhagien bei von Willebrand-Syndrom, wenn keine Vergleichsmöglichkeiten bestehen
- Eine milde Hämostasestörung verursacht möglicherweise, aber nicht sicher eine postoperative Blutung
- Unzuverlässige Angaben

Falsch positiv

- Chirurgische Blutung
- Aggravation bei Hämatombildung oder Nachblutungen
- Neigung zu kleinen Hämatomen vorwiegend an den Extremitäten, bei Purpura simplex, Purpura senilis, psychogener Purpura, Vasopathien
- Falsche Fragen

Besonders wichtig ist die Vermeidung falscher Fragen. Dies unterstreicht die Bedeutung eines auf Basis umfassender klinischer Erfahrung zusammengestellten, möglichst einfachen vorgefertigten Fragebogens zur Erhebung der Blutungsanamnese, der unter Anleitung eines Arztes ausgefüllt wird.

Präoperatives Laborscreening

Der Umfang der hämostaseologischen Labordiagnostik zum präoperativen Ausschluss einer erhöhten Blutungsneigung wird von der diagnostischen Wertigkeit und Praktikabilität der verfügbaren Methoden sowie von deren Wirtschaftlichkeit bestimmt. Die Analytik muss jederzeit und kurzfristig mit geringer Personalbindung verfügbar sein. Parameter, die eine komplizierte Präanalytik erfordern, indem sich z.B. Blutentnahmen aus bestehenden arteriellen oder venösen Zugängen verbieten würden, sind ungeeignet. Die Ergebnisse müssen unter Routinebedingungen analytisch zuverlässig erbracht werden können. Aufwändige Analysen zur Erfassung von Hämostasestörungen mit niedriger Prävalenz oder Assays, die eine Hämostasestörung unzureichend sensitiv und spezifisch erfassen, können nicht in das Laborscreening einbezogen werden.

Das **laboranalytische Minimalprogramm zum präoperativen Ausschluss einer hämorrhagischen Diathese** besteht aus

- Thrombozytenzahl im peripheren Blut (EDTA-Blut, ggf. Citratblut zum Ausschluss einer Pseudothrombozytopenie)
- Aktivierter partieller Thromboplastinzeit (aPTT)
- Thromboplastinzeit nach Quickwert in % der Norm
- Fibrinogen-Konzentration
- Ggf. Thrombinzeit

Mindestens 50% aller klinisch relevanten Hämostasestörungen, die durch das präoperative Screening erfasst werden, entfallen auf Thrombozytopenien. Die Ursachen einer abnormen aPTT oder eines verminderten Quickwertes sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3 Ursachen einer abnormalen aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT) oder Thromboplastinzeit (Quickwert)

Abnormale aPTT	Verminderter Quickwert, in % der Norm
<p>Verlängert, assoziiert mit Blutung</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mangel an Fibrinogen, Prothrombin, FV, FX, FVIII, FIX oder FXI • Vitamin K-Mangel oder -Antagonismus durch orale Antikoagulanzen oder Beta-Lactam-Antibiotika • Spezifische Inhibitoren gegen Gerinnungsfaktoren, z.B. FVIII • Unfraktioniertes Heparin und Niedermolekulare Heparine • Thrombininhibitoren, z.B. Hirudine, Argatroban <p>Verlängert, keine Assoziation mit Blutung oder Thrombose</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unspezifisch, Ursache unklar • Mangel an Prekallikrein oder Hochmolekulargewicht-Kininogen, schwerer FXII-Mangel • Transiente Phospholipid-Antikörper, vorwiegend bei Kindern mit Infektionen • Erhöhter Hämatokrit • Heparinverunreinigung der Probe • Partiiell aktivierte Probe <p>Assoziiert mit Thrombose</p> <p>Verlängert</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lupusantikoagulans • Moderater FXII-Mangel? <p>Verkürzt</p> <ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Spiegel: Fibrinogen, FVIII, FIX; aktivierte Hämostase 	<p>Assoziiert mit Blutung</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mangel an Fibrinogen, Prothrombin, FV, FX oder FVII • Spezifische Inhibitoren gegen Gerinnungsfaktoren, z.B. FV • Vitamin K-Mangel oder -Antagonismus durch orale Antikoagulanzen oder Beta-Lactam-Antibiotika • Hohe Dosen an unfraktioniertem Heparin • Thrombininhibitoren, z.B. Hirudine, Argatroban • Hemmung der Fibrinpolymerisation: Fibrin(ogen)spaltprodukte, Monoklonale Gammopathien, Dysfibrinogenämie <p>Keine Assoziation mit Blutung</p> <ul style="list-style-type: none"> • Erhöhter Hämatokrit • Hemmung der Fibrinpolymerisation: Dysfibrinogenämie <p>Assoziiert mit Thrombose</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lupusantikoagulans • Hemmung der Fibrinpolymerisation: Dysfibrinogenämie

Die Mitbestimmung des Fibrinogens ist sinnvoll, da aPTT und Quicktest klinisch relevante Hypo- und Dysfibrinogenämien mit Plasmaspiegeln zwischen 0,6 und 1,0 g/l nicht immer erfassen. Darüber hinaus markieren erhöhte Fibrinogenspiegel eine chronische Akutphasenreaktion und ein erhöhtes arterielles und venöses Thromboserisiko.

Der Arzt, der die Gerinnungsanalysen interpretiert, muss die folgenden **fünf** wichtigsten Fakten kennen, um keine möglicherweise folgenschweren Fehlentscheidungen zu treffen:

1. **Nicht jede Verlängerung der aPTT oder Verminderung des Quickwertes** ist mit einem Mangel an Gerinnungsfaktoren und damit einer Blutungsneigung assoziiert .

Beispiele:

- aPTT 60 s (Normalwert des Labors bis 39 s), Ursache Lupusinhibitor bei Antiphospholipid-Antikörpersyndrom mit erheblichem Risiko für arterielle und venöse Thromboembolien.
- aPTT 50 s (Normalwert des Labors bis 39 s), Ursache harmlose parainfektöse Antiphospholipid-Antikörper im Rahmen bakterieller Infekte bei Kindern, ohne Blutungsneigung und ohne Thromboseneigung
- aPTT 120 s (Normalwert des Labors bis 39 s), Ursache schwerer angeborener FXII-Mangel ohne Blutungsneigung aber erhöhtes Thrombose-Risiko
- Quickwert 55% (Normalwert >70%), Ursache Polyglobulie mit Hämatokrit von 55%.
- aPTT >140 s (Normalwert des Labors bis 39 s) und Quickwert 50% (Normalwert >70%), Ursache Heparinkontamination der Probe, keine Blutungsneigung

2. Das **Ausmaß einer aPTT-Verlängerung oder einer Quickwert-Verminderung** sagt nicht zwangsläufig etwas über das Blutungsrisiko aus. Der Trugschluss „... aPTT nur 1 sek. über Grenzwert, da kann ja nichts passieren“, ist unter Umständen lebensgefährlich!

Beispiele:

- aPTT 40 s (Normalwert des Labors bis 39 s), Ursache leichte Hämophilie A oder mildes von Willebrand-Syndrom, schwere Blutungsneigung bei Op im Schleimhautbereich
- Quickwert 68% (Normalwert >70%), Ursache FVII-Mangel mit FVII-Restaktivität von 20%, Blutungsneigung im Rahmen von Op und schweren Verletzungen

3. Die **Sensitivität der verfügbaren Reagenzien** zur Bestimmung der aPTT und des Quickwertes im Hinblick auf die Erfassung von Mangelzuständen an Gerinnungsfaktoren ist sehr unterschiedlich. Einige am Markt befindliche Reagenzien sind ungeeignet, milde, aber klinisch relevante Koagulopathien zu erfassen. Treten trotz unauffälliger präoperativer Gerinnungsanalytik unerwartete intra- oder postoperative Blutungen auf, muss eine Laborkontrolle erfolgen. Nach einem „Blutungsstress“ können milde Hämostasestörungen mit aPTT und Quickwert häufig sicherer erfasst werden als präoperativ. Beispiele:

- aPTT 32 s (Normalwert des Labors bis 35 s), leichte Hämophilie A mit FVIII-Restaktivität von 22%
 - Quickwert 78% (Normalwert >70%), FVII-Mangel mit FVII-Restaktivität von 23%
4. **Milde Koagulopathien** bleiben klinisch stumm, solange keine Operationen oder Traumata stattfinden und bei Mädchen keine Menstruationsblutung auftreten. Die in zahlreichen Lehrbüchern angegebenen hämostatisch wirksamen Mindestspiegel für die verschiedenen Gerinnungsfaktoren (z.B. 10-20% für FXIII) gelten nur für die Verhütung von Spontanblutungen. Angeborene Hypo- und Dysfibrinogenämien und heterozygote Mangelzustände an den Faktoren II, V, VII, X, XI und XIII dürften in einer Prävalenz von mindestens 1:500 auftreten, wobei nahezu die Hälfte dieser Patienten eine erhöhte Blutungsneigung aufweisen.
5. Die häufigen **Thrombozytopathien** und seltene hämorrhagische Diathesen wie der **FXIII-Mangel** und der **Plasmininhibitor-Mangel** entgehen dem präoperativen Routine-Laborscreening ebenso wie die meisten Patienten mit mildem **von Willebrand-Syndrom**, bei denen der FVIII-Spiegel nicht vermindert ist. Die Blutungszeit oder andere Thrombozytenfunktionsteste wie der *Platelet Function Analyzer-100®* (PFA-100) können zwar prinzipiell Thrombozytopathien und ein von Willebrand-Syndrom erfassen, sind aber wegen relativ unzureichender Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit und im Falle des PFA-100 insbesondere auch wegen zu hoher Kosten ungeeignet, um in das routinemäßige präoperative Laborscreening einbezogen werden zu können.

Unterschiedliche Strategien zum präoperativen Ausschluss einer hämorrhagischen Diathese

Basierend auf der zweifellos niedrigen Prädiktivität präoperativer hämostaseologischer Screeningtests für das Auftreten intra- und postoperativer Blutungen raten einige Arbeitsgruppen nur dann Laboruntersuchungen durchzuführen, wenn ein klinischer Verdacht auf eine hämorrhagische Diathese besteht.

Die Strategie, hämostaseologische Laboruntersuchungen nur bei einem anamnestischen oder klinischen Verdacht auf eine hämorrhagische Diathese durchzuführen, muss jedoch zwangsläufig im Einzelfall äußerst gefährliche Situationen provozieren, wie folgendes Fallbeispiel aus der Praxis zeigt:

7-jähriger Knabe vor Tonsillektomie, anamnestisch keine Blutungsneigung, bisher keine Operationen, Familienanamnese negativ, kein präoperatives Screening der Hämostase vor Op, schwere postoperative, chirurgisch nicht beherrschbare Nachblutung am 2. postoperativen Tag, zu diesem Zeitpunkt aPTT 42 s (Normal des Labors bis 39 s), FVIII 20%, von Willebrand-Faktor 100%, Diagnose leichte Hämophilie A, Substitution mit FVIII-Konzentrat bis zum Abschluss der primären Wundheilung, Entwicklung eines hochtitrigen Inhibitors gegen FVIII, Hemmkörperelimination und Immuntoleranzinduktion mit zweimal täglich 100 E/kgKG FVIII-Konzentrat und 50 E/kgKG Prothrombinkomplex-Konzentrat über 3 Monate, Therapiekosten zirka 600.000 €. In diesem Fall wäre u.U. die präoperative Gabe des Desmopressin-Analogons Minirin® ausreichend blutstillend gewesen, wenn die Hämophilie A bereits präoperativ diagnostiziert worden wäre. Die Gabe von FVIII-Konzentrat und die Entwicklung eines Inhibitors als schwere Komplikation der FVIII-Substitution hätten möglicherweise verhindert werden können.

Der Verzicht auf ein präoperatives hämostaseologisches Laborscreening erscheint gerade auch bei Kindern besonders riskant, da die Blutungsanamnese trotz klinisch relevanter Hämostasestörungen oftmals eher unauffällig ist, wenn bislang keine Operationen oder Verletzungen stattfanden und bei Mädchen noch keine Menarche auftrat.

Bei jedem Verdacht auf eine erhöhte Blutungsneigung, der sich aus Anamnese, klinischer Symptomatik oder aus dem präoperativen Laborscreening ergibt, sollte daher eine Abklärung in einer hämostaseologischen Ambulanz / Spezialeinrichtung angestrebt werden.

VII Labororganisation und Qualitätsmanagement

Ein Laborbefund entsteht in einem komplexen Untersuchungsgang, der in 4 Teilschritte zu gliedern ist (Punkte I.1 bis I.4).

VII.1 Präanalytik

Die präanalytische Phase umfaßt alle Einflüsse, die vor dem Messvorgang einwirken. Es sind dabei folgende Teilschritte zu beachten:

Festlegung des Untersuchungsprogramms	behandelnder Arzt
Patientenvorbereitung (z.B.: spezielle Vorbereitung bei Belastungstests, Tagesrhythmik)	behandelnder Arzt
Probenarten (z.B. Serum, Plasma, Vollblut)	behandelnder Arzt
Entnahme des Probenmaterials	behandelnder Arzt
Transport	Transportdienst
Aufbereitung	Labor
Lagerung	Labor
Kenntnis und Beachtung von Einflußgrößen und Störfaktoren	behandelnder Arzt und Labor

VII.2 Analyse + analytische Beurteilung




Die eingesetzten Messmethoden werden durch folgende Zuverlässigkeitskriterien beschrieben:

analytische Spezifität:	beschreibt die Fähigkeit einer Analysenmethode, nur denjenigen Bestandteil quantitativ zu erfassen, den sie vorgibt zu messen.
analytische Empfindlichkeit:	kennzeichnet die kleinste unterscheidbare Messwertdifferenz.
untere Messbereichsgrenze:	ist als sicher erkennbares, vom Hintergrund unterscheidbares Meßergebnis definiert.
obere Messbereichsgrenze:	entspricht der Linearitätsgrenze bei linearer Beziehung zwischen Meßsignal und Konzentration des Analyten
Präzision:	siehe I.2.1
Richtigkeit:	siehe I.2.1

VII.2.1 Qualitätskontrolle: Präzision, Richtigkeit und Fehlerarten

Allgemeine Grundlagen:

Präzision und Richtigkeit gelten als wichtigstes Qualitätskriterium einer analytischen Methode. Die Präzision erfasst den **zufälligen Fehler** und die Richtigkeit den **systematischen Fehler**. In der ab 2010 verbindlich vorgeschriebenen neuen Richtlinie der Bundesärztekammer (RiLi-BÄK) wird nicht mehr die Präzision und Richtigkeit in den Vordergrund gestellt, sondern der quadratische Mittelwert der Messabweichung. Aus pädagogischen Gründen wird jedoch zum besser Verständnis die Präzision und Richtigkeit im nachfolgenden Schießscheibenmodell dargestellt.

Richtigkeit	Präzision	Schießscheibe	Fehlerart
optimal	Optimal		kein Fehler
gut	Schlecht		zufälliger Fehler
schlecht	Gut		systematischer Fehler

Zusätzlich gibt es noch den **groben Fehler**. Dieser bezieht sich nicht auf die Analytik, sondern die Ursache kann in der Patientenverwechslung, falschem Reagenz, Fehler in der Ergebnismitteilung usw. liegen.

Richtlinie der Bundesärztekammer:

Das Vorgehen zur Qualitätskontrolle ist detailliert in der **Richtlinie der Bundesärztekammer vom 15. Februar 2008** geregelt (Lit.: Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, Dt. Ärzteblatt 2008; 105 A341-A355). Die Richtlinie ist nach einer Übergangszeit verbindlich ab dem 1.04.2010 vorgeschrieben. In der RiLi-BÄK wird ein Allgemeiner Teil A und ein Spezieller Teil B1 für quantitative labormedizinische Untersuchungen unterschieden.

Allgemeiner Teil A

Der allgemeine Teil A enthält:

- a) umfangreiche Begriffbestimmungen
- b) umfangreiche Anforderungen an Struktur und Ressourcen des Laboratoriums, Vorgaben zur Pränanalytik und Postanalytik
- c) Hinweise zum Aufbau eines Qualitätsmanagementsystems in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 15189

Spezieller Teil B1

Alle von medizinischen Laboratorien durchgeführten quantitativen Untersuchungen unterliegen der *internen Qualitätskontrolle*. In der Tabelle B1 sind verbindliche maximale Abweichungen von Kontrollprobeneinzelmessungen vorgeschrieben für 67 Analyte in Plasma, Serum und Vollblut, 10 Analyte im Urin und 7 Analyte im Liquor. Darüber hinaus werden Berechnungen für maximal mögliche Abweichungen von Parametern aufgeführt, die

nicht in der Tabelle B1 aufgelistet sind. In Tabelle B1 ist die Spalte 3 von herausragender Bedeutung. Hier wird festgelegt wie die maximale Abweichung von Kontrollprobeneinzelmessungen vom Zielwert sein darf. Wird z.B. ein Kontrollmaterial für Glukose gekauft, kann die Abweichung des Kontrollprobeneinzelwertes vom Zielwert nach oben und unten maximal 11 % betragen. Das Messergebnis des Kontrollprobeneinzelwertes muss also zwischen 89 mg/dl und 111 mg/dl liegen. Werden Ergebnisse außerhalb dieser vorgegebenen Grenze erzielt, dürfen die gleichzeitig gemessenen Patientenergebnisse nicht als richtig bewertet werden. In der Tabelle B1 sind exemplarisch die geforderten Vorgaben für Hämoglobin, Glukose und PSA aufgeführt. Am Ende eines Kontrollzyklus wird zusätzlich der quadratische Mittelwert der Messabweichung (QUAMM) berechnet. Auch hier gelten die in Spalte 3 aufgeführten maximalen Abweichungen. Ein Kontrollzyklus setzt sich mindestens aus 15 Kontrollprobeneinzelmessungen zusammen. Die Berechnung des QUAMM ähnelt der Berechnung der Standardabweichung, aber mit dem entscheidenden Unterschied, dass vom Messergebnis der Zielwert und nicht wie bei der Standardabweichung der Mittelwert abgezogen wird. Ergänzend zur internen Qualitätskontrolle ist die externe Qualitätssicherung (Ringversuche) für jede in Tabelle B1 genannte Messgröße Pflicht.

Berechnung des quadratischen Mittelwertes der Messabweichung:

$$\Delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_0)^2}{n}}$$

x_i : Kontrollprobeneinzelwert; x_0 : Zielwert

Kontrollproben:

Es sind Kontrollproben mit bekannten Zielwerten zu verwenden. Die Kontrollproben sollen in den für die ärztliche Entscheidung relevanten Messbereichen liegen. Es sind Kontrollproben mit Zielwerten in mindestens zwei unterschiedlichen Konzentrationsbereichen im Wechsel einzusetzen.

Häufigkeit der Kontrollprobeneinzelmessungen:

Die Kontrollprobeneinzelmessung erfolgt Zeit- und Ereignisgesteuert.

- a) Zeitgesteuert: An jedem Tag, an dem Patientenproben gemessen werden, müssen innerhalb von 24 Stunden zwei Kontrollproben gemessen werden. Dabei dürfen nicht mehr als 16 Stunden ohne Kontrollproben-Messung vergehen.
- b) Ereignisgesteuert: Beim Start des Messverfahrens und nach jedem Eingriff in das Messsystem (Kalibration, Reparatur, Wartung, Chargenwechsel von Reagenzien) ist eine Kontrollprobeneinzelmessung durchzuführen.

Nicht in Tabelle B1 aufgeführte Analyte:

Die laboratoriumsinternen Fehlergrenzen werden basierend von mindestens 15 Kontrollprobeneinzelmessungen (Kontrollzyklus) anhand der dargestellten Formel berechnet.

$$\Delta_{\max} = \sqrt{(3 \cdot s_{ep})^2 + \delta_{ep}^2}$$

s_{ep} , empirische Standardabweichung; δ_{ep} , empirische Richtigkeit; 3, Erweiterungsfaktor

POCT:

Der Begriff POCT (Point of care Testing) hat sich heute etabliert und steht für die patientennahe Sofortdiagnostik. In der POC Diagnostik werden Unit-use-Reagenzien von den üblichen Reagenzien im Labor unterschieden. Unit-use-Reagenzien sind solche Reagenzien, die für Einzelbestimmungen portioniert und mit einer Untersuchung verbraucht sind. Ein typischer Vertreter für Unit-use-Reagenzien ist der Glukose Teststreifen. Die Blutgasbestimmung zählt demgegenüber nicht zu den Unit-use-Messungen. Die Abgrenzung von Unit-use-Reagenzien von den üblichen Messsystemen ist bedeutsam hinsichtlich der Häufigkeit von Kontrollprobeneinzelmessungen. Werden Unit-use-Reagenzien eingesetzt, reicht eine Kontrollprobeneinzelmessung pro Woche aus. Für die übrigen Messsysteme gilt die Regelung von zwei Kontrollprobeneinzelmessungen pro 24 Stunden.

Dokumentation:

Die Unterlagen zur Qualitätskontrolle müssen 5 Jahre aufbewahrt werden und werden regelmäßig durch die **Eichämter der Länder** kontrolliert.

1 Lfd. Nr.	2 Analyt	3 Zulässige relative Abweichung des Einzelwertes bzw. des relativen quadratischen Mittelwertes	4 Gültigkeitsbereich der Spalten 3 und 5	5 Zulässige relative Abweichung beim Ringversuch	6 Zielwertart beim Ringversuch
27	Hämoglobin	4 %	2 – 20 g/dl	6 %	RMW
25	Glukose	11 %	40 – 400 mg/dl	15 %	RMW
51	PSA	15,5 %	0,2 -50 µg/l	25 %	SW

RMW, Referenzmethodenwert: Mit einem Referenzmessverfahren ermittelter Wert. Ein Referenzmessverfahren ist ein sorgfältig untersuchtes Messverfahren, bei dem nachgewiesen ist, dass Werte mit einer Messsicherheit erzeugt werden, die für ihre vorgesehene Verwendung angemessen ist, besonders bei der Bewertung der Richtigkeit anderer Messverfahren für die gleiche Größe und bei der Merkmalsfeststellung von Referenzmaterialien (EN 12286: 1998, 3.7; ISO/FDIS15193:2009).

SW, Sollwert: Der verfahrensabhängige Sollwert wird immer mit einem speziellen Analyseverfahren ermittelt. Der Anwender muss daher auf den vom Hersteller ermittelten Sollwert Bezug nehmen, der sein angewendetes Verfahren und gegebenenfalls das verwendete Gerät repräsentiert.

Externe Qualitätssicherung:

Zusätzlich zur internen Qualitätssicherung muss das Labor für die durchgeführten Analyte vierteljährlich an **externen Qualitätskontrollen** teilnehmen. Die Proben werden ohne bekanntes Ergebnis zugesandt und unter Routine-Bedingungen analysiert. Für die externe Qualitätssicherung wird in Tabelle B1, Spalte 5, eine höhere maximal zulässige Messabweichung festgelegt als für die interne Qualitätskontrolle. Bei bestandener externer Qualitätskontrolle wird ein Zertifikat erteilt, das 6 Monate gültig ist. Liegt kein gültiges Zertifikat vor, darf die Analyse nicht mehr im Labor durchgeführt werden. In der Rili-BÄK ist festgelegt, dass auch die POCT-Messsysteme zu einer externen Qualitätssicherung verpflichtet sind. In Krankenhäusern trifft diese Regelung nicht zu, wenn das Zentrallabor die

Verantwortung für die Durchführung der internen Qualitätssicherung trägt und die Messgröße auch selbst bestimmt.

VII.3 Medizinische Validation

Bevor ein Analysenergebnis zur Grundlage einer ärztlichen Handlung werden kann, muß der Befund im Rahmen der medizinischen Validation unter Berücksichtigung von Patientendaten beurteilt werden. Wesentliche Inhalte der medizinischen Validation sind dabei:

- **Transversalbeurteilung:** Beurteilung der Ergebnisse unter Bezug auf Referenzwerte. Dabei differieren die Referenzbereiche in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der untersuchten Kollektive (z.B. Alter, Geschlecht, Rasse).
- **Longitudinalbeurteilung:** Die Ergebnisse werden unter Berücksichtigung von Vorergebnissen beurteilt.
- **Befundkonstellationen:** Resultate sind nicht isoliert voneinander zu betrachten, sondern haben Bezug zueinander (z.B. die Plausibilität einer erhöhten K⁺ Konzentration wird durch eine gleichzeitig erhöhte Kreatinin-Konzentration gestützt)
- **Extremwerte:** Ungewöhnlich niedrige oder hohe Konzentrationen sind primär verdächtig auf einen (zufälligen) Messfehler. Ist ein Messfehler ausgeschlossen, muss nach Einfluss- und Störfaktoren als Ursache des Extremwertes geforscht werden (z.B. lebensgefährliche Glucose-Erniedrigung in der Probe durch langen Probentransport ohne vorherige Zentrifugation).

VII.4 Befundinterpretation

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine bestimmte Krankheit bei positivem Testergebnis vorliegt, wird durch die Sensitivität, Spezifität und den prädiktiven Wert maßgeblich beeinflusst. Deshalb ist die Kenntnis dieser Größen zwingend für die Interpretation von Messergebnissen erforderlich.

Sensitivität: Die Sensitivität eines Tests gibt an, wie viel Prozent der Kranken ein pathologisches Ergebnis haben (richtig positiv). Die Anzahl aller Erkrankten entspricht der Summe aus 'richtig positiv' und 'falsch negativ'.

Spezifität: Die Spezifität eines Tests gibt an, wie viel Prozent der Gesunden ein normales Ergebnis haben (richtig negativ). Die Anzahl aller Gesunden entspricht der Summe aus 'richtig negativ' und 'falsch positiv'.

Prädiktiver Wert: Der prädiktive Wert bezeichnet den diagnostischen Aussagewert eines Tests. Man unterscheidet einen positiven und negativen prädiktiven Wert. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Erkrankung vorliegt, wird durch den positiven prädiktiven Wert ausgedrückt, der den Anteil der richtig positiven Testergebnisse an allen positiven Testergebnissen (Summe von richtig positiven und falsch positiven) angibt. Die Vorhersagewahrscheinlichkeit hängt außer von der Sensitivität, Spezifität des Testsystems auch von der **Prävalenz** der Krankheit ab.

VII.5 Einflußfaktoren und Störfaktoren

VII.5.1 Einflußgrößen

Kenntnis von Einflußgrößen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Beurteilung von Laborbefunden. Einflußfaktoren beeinflussen in vivo das Messergebnis. Es sind dabei **unveränderliche Einflussfaktoren** (Altersklasse, Geschlecht, Rasse usw.) von

veränderlichen Einflussfaktoren (Ernährung, Körperlage, körperliche Aktivität, Biorhythmen, Schwangerschaft, Medikamenteneinnahme) zu unterscheiden.

VII.5.2 Störfaktoren

Störfaktoren führen in vitro, also nach Abnahme des Materials zu einem Meßergebnis, das nicht der in vivo-Konzentration des Analyten entspricht. Es sind dabei **körpereigene Störfaktoren** (Hämolyse (Freisetzung erythrozytärer Bestandteile), Beeinflussung der photometrischen Messung (durch Lipämie, ikterische und hämolytische Seren) von **körperfremde Störfaktoren** (Kontamination des Urins mit Bakterien, Proben transport, Abnahme aus der Infusion) zu unterscheiden.

VII.6 Praktikum

VII.6.1 Demonstration

Automation in der Labordiagnostik:
Stand alone Systeme - Work cells - Lab cells

VII.6.2 Praktische Übungen

Simulation der gesetzlichen Vorgaben der Qualitätskontrolle.

VII.6.3 Lernziele

1. Vier Teilschritte eines Laborbefundes
2. Qualitätskontrolle entsprechend den Richtlinien der Bundesärztekammer
3. Die Bedeutung von Einfluß- und Störfaktoren
4. Automationskonzepte der Labormedizin

VIII Tumormarker

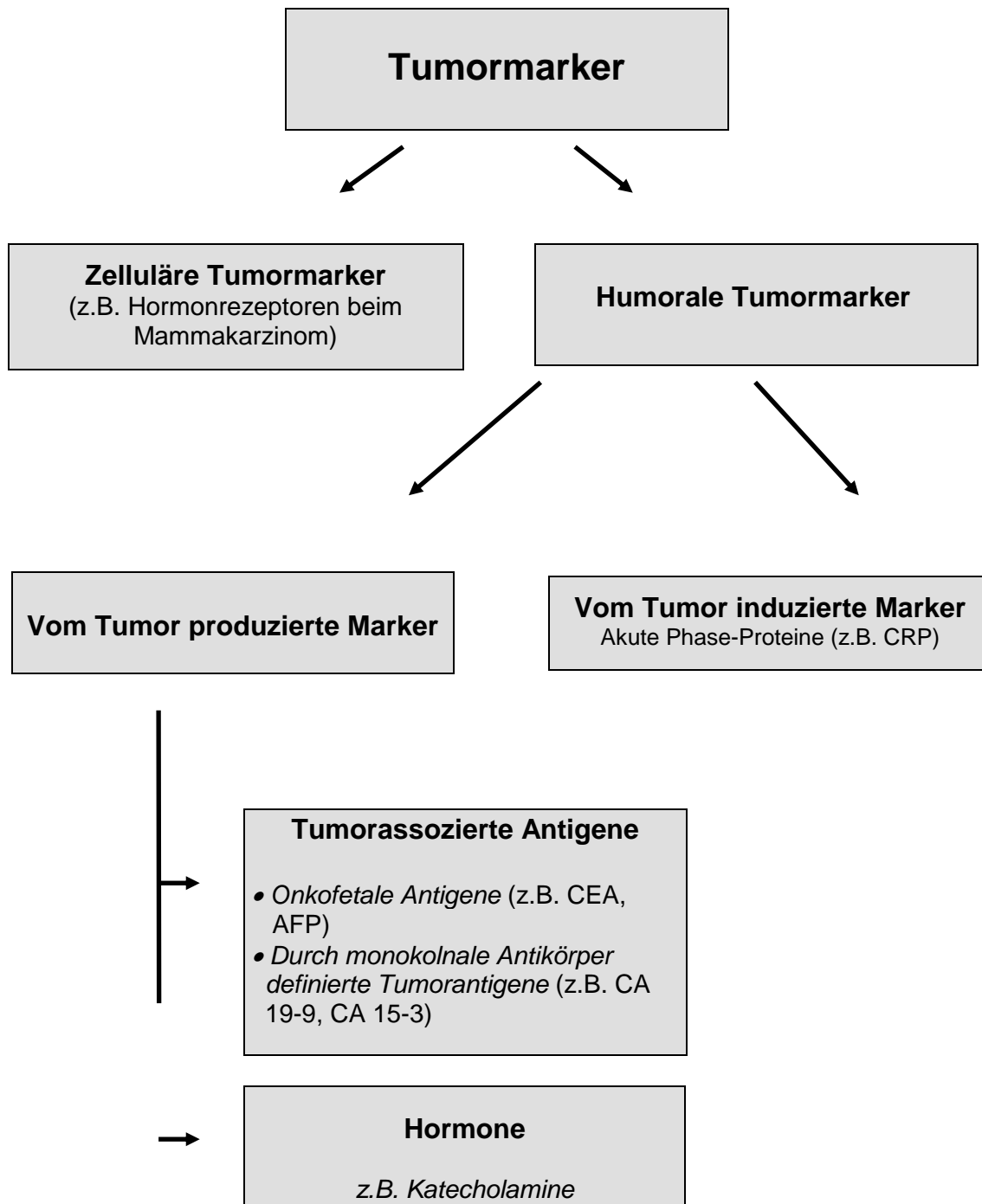
Tumorerkrankungen nehmen hinter Herz-Kreislauferkrankungen den 2. Platz in den Todesursachen ein. Es wurde daher frühzeitig versucht geeignete Marker zu finden, die auf ein Krebsgeschehen hinweisen. Im wesentlichen haben sich heute drei Indikationen für den Einsatz von Tumormarkern herausgebildet:

- 1) Verlaufskontrolle: Dies ist die eigentliche Domäne der Bestimmung von Tumormarkern
- 2) Risikopatienten für einen bestimmten Tumor
- 3) Klinischer Verdacht auf eine bestimmte Tumorerkrankung

Tumormarker haben bisher enttäuscht hinsichtlich eines Screeningtests auf Tumorerkrankungen. Eine Ausnahme bildet hier das PSA (Prostata-spezifische Antigen). Ebenfalls von Nachteil ist die fehlende Organspezifität vieler Tumormarker. Die Ergebnisse einer Tumormarkerbestimmung sind kritisch unter den Gesichtspunkten Sensitivität, Spezifität und positiver prädiktiver Wert zu beurteilen.

VIII.1 Einteilung der Tumormarker

Tumormarker treten häufig aufgrund des veränderten Stoffwechsels der transformierten Zelle auf. Sie können entweder histologisch am Tumorgewebe (zelluläre Tumormarker) oder wesentlich einfacher in einer Körperflüssigkeit (humorale Tumormarker) nachgewiesen werden. In der klinischen Diagnostik haben vor allem die Tumor-assoziierten Antigene einen hohen Stellenwert erlangt. Dabei handelt es sich häufig um im Blut vorkommende zirkulierende Makromoleküle - zumeist Proteine mit einem Kohlenhydrat - oder Lipidanteil.



VIII.2 Zeitplan der Tumormarkerbestimmung

Die Verlaufskontrolle ist die eigentliche Domäne der Tumormarkerbestimmung. Da nicht jeder Tumor ein und desselben Organs die gleichen Tumormarker exprämiert, ist es ratsam, ein Panel von Tumormarkern präoperativ zu testen und denjenigen Marker für die Verlaufskontrolle heranzuziehen, der beim Patienten am besten mit der Erkrankung korrelierte. In der Verlaufskontrolle ist unbedingt auf die Regelmäßigkeit zu achten, um rechtzeitig Hinweise auf ein Rezidiv ableiten zu können. In der Frühdiagnose des Rezidivs ist die Tumormarkerbestimmung den bildgebenden Verfahren häufig überlegen.

Vor der ersten Therapie

(Operation, Chemo-, Hormon- oder Radiotherapie)

Postoperativ bzw. nach Therapiebeginn

2 bis 14 Tage nach Therapie

alle 3 Monate während der ersten 2 Jahre

alle 6 Monate im 3., 4., und 5 Jahr nach der ersten Therapie

Vor jedem Therapiewechsel

Bei Verdacht auf Rezidivierung oder Metastasierung

Bei erneutem Staging

2 bis 4 Wochen nach dem Auftreten eines Konzentrationsanstiegs des entsprechenden Tumormarkers

VIII.3 Validität eines Tumormarker

Die Validität eines Tumormarkers hängt von verschiedenen Faktoren ab. Insbesondere bestimmen die Sensitivität, Spezifität und der positive prädiktive Wert die Validität eines Tumormarkers.

Sensitivität: Die Sensitivität bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der bei **vorhandenem Tumor** das Testergebnis positiv ausfällt.

Spezifität: Die Spezifität gibt an, bei wie viel Prozent der **Gesunden** das Testergebnis negativ ausfällt. In der Regel ist von einer Spezifität von 95 % in einem diagnostischem Test für Tumormarker auszugehen. Ausgehend von der 95%-Spezifität wird die Sensitivität eines Tumormarkers festgelegt.

Positiver prädiktiver Wert: Der positive prädiktive Wert gibt den Anteil richtig positiver Werte in Bezug auf alle positiv getesteten Ergebnisse (richtig positiv und falsch positiv) an. Als wichtige Größe geht beim positiven prädiktiven Wert die **Prävalenz** der Erkrankung mit ein.

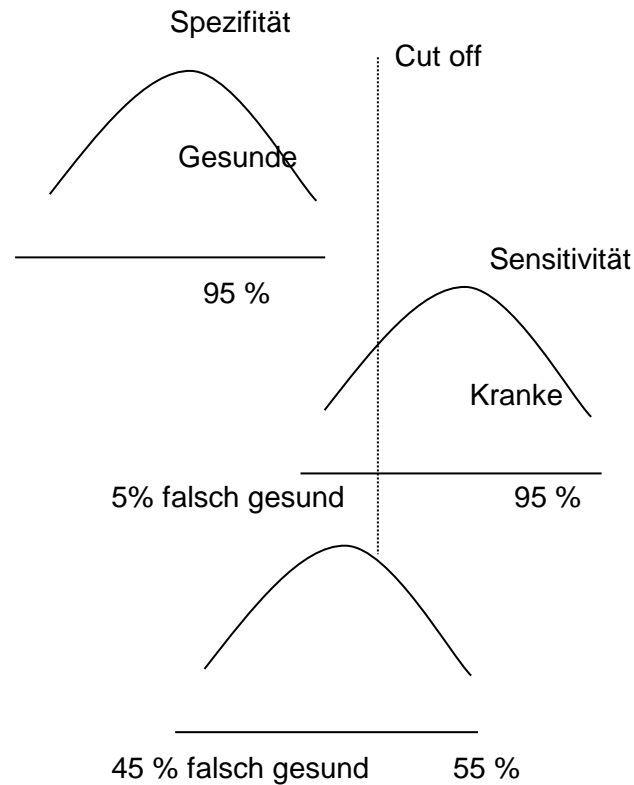
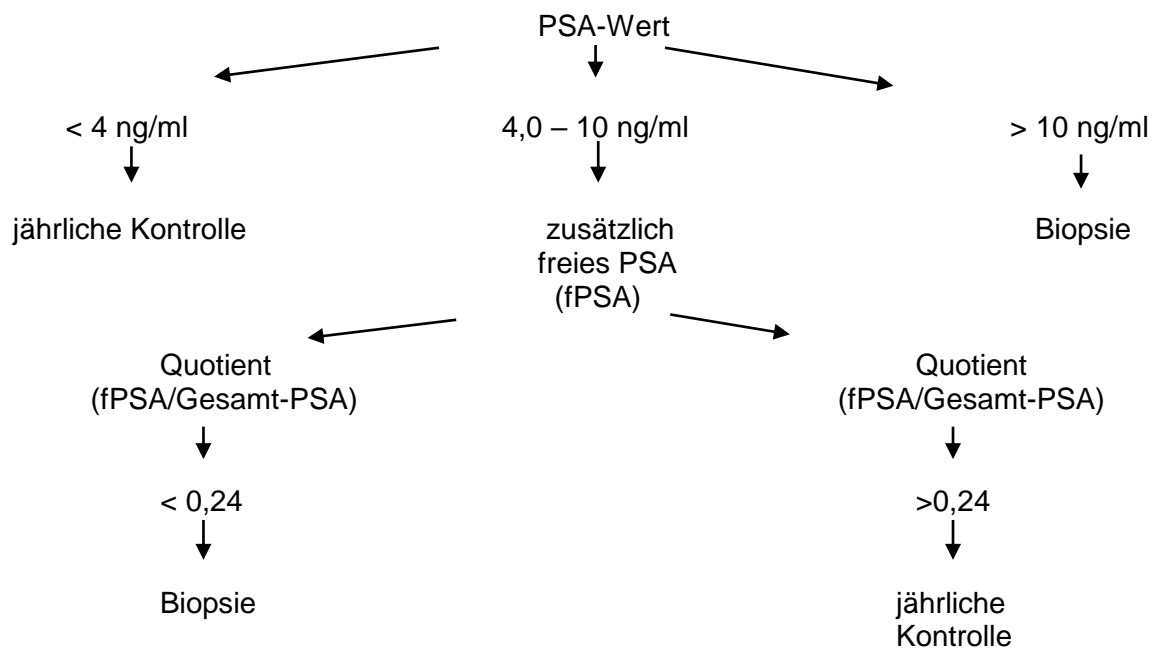


Abb. Definition des cut off in Abhängigkeit von der Spezifität und Sensitivität eines Tumormarkers

VIII.4 Besondere Rolle des PSA (Prostata-spezifisches Antigen)

In zweierlei Hinsicht besitzt das PSA eine Sonderrolle. PSA gehört zu den wenigen Tumormarkern die eine strenge Organspezifität besitzen. PSA hat sich als einziger Tumormarker hinsichtlich eines Screenings auf Tumorerkrankungen bewährt. Liegt der PSA-Wert im niedrigen Bereich ($<4,0$ ng/ml) ist das Vorliegen eines Tumors unwahrscheinlich. Bei Werten über 10 ng/ml muss potenziell mit einem Tumor gerechnet werden. Eine weitere Abklärung erfolgt in der Regel durch eine Prostatabiopsie. Kritisch bleibt der Bereich zwischen 4 und 10 ng/ml. Hier kann einerseits eine benigne Prostatahyperplasie vorliegen, andererseits ist die Möglichkeit für ein Karzinom gegeben. Um hier den Umfang der Prostatabiopsien einzuschränken wurde intensiv nach nicht invasiven Möglichkeiten der Abklärung gesucht.

Das PSA kommt im Plasma in einer freien und in einer Proteingebundenen-Form vor. Bei Vorliegen eines Karzinoms verschieben sich die beiden Fraktionen hinsichtlich eines reduzierten Anteils des freien PSAs. Der freie Anteil kann neben dem Gesamt-PSA immunologisch bestimmt werden. Diagnostisch hilfreich ist die Bildung eines Quotienten aus freiem PSA und Gesamt-PSA. Liegt der Quotient unter 0,24 ist die Wahrscheinlichkeit für ein Karzinom erhöht und eine invasive Abklärung durch Biopsie sinnvoll. Liegt der Wert über 0,24 ist die benigne Prostatahyperplasie wahrscheinlich. Die Konsequenz ist eine jährliche Überprüfung des Quotienten freies PSA zu Gesamt-PSA.



PARAMETER	KÜRZE.	MATERIA.	BEMERK.	REFERENZ	EINH.	INDIKATION
Alpha-Fetoprotein	AFP	Serum		< 10	µg/l	Prim. Leberzell-CA Hodentumoren außer Seminom, Keimzelltumoren des Ovars
Beta-HCG	β-HCG	Serum		< 0,65	ng/ml	Schwangerschaft, Chorion-CA, Hodentumoren, Keimzelltumoren des Ovars
Beta2-Mikroglobulin	β2-MG	Serum	< 60 J > 60 J	1,2 - 2,5 < 3,5	mg/l	Hodgkin- und Non- Hodgkin-Lymphome (insb. Plasmacytom, CLL)
Calcitonin	CALC	Serum		< 15	pg/ml	Medulläres Schilddrüsen-CA
Carbohydrate Antigen 12-5	CA 12-5	Serum		< 35	U/ml	Ovarial-CA, Pankreas-CA, evtl. Mamma-CA
Carbohydrate Antigen 15-3	CA 15-3	Serum		< 25	U/ml	Mamma-CA, Ovarial-CA, Uterus- CA
Carbohydrate Antigen 19-9	CA 19-9	Serum		< 30	U/ml	Pankreas-CA, Magen-CA, Colon- CA
Carbohydrate Antigen 72-4	CA 72-4	Serum		< 3,2	U/ml	Magen-CA, Mucinöses Ovarial- CA
Carcinoembryonales- Antigen	CEA	Serum	Raucher	< 5 5-10	ng/ml	Kolorektale CA, Mamma-CA, Bronchial-CA, Magen-CA, Pankreas-CA
Cytokeratinfragment 21-1	CYFR	Serum		< 3,3	ng/ml	Nicht-kleinzelliges Bronchial-CA
Erythropoetin	EPO	Serum		8-21	U/l	Hypernephrom
Neuronenspezifische- Enolase	NSE	Serum	0-15 J > 16 J	5-25 < 12,5	ng/ml	Kleinzelliges Bronchial-CA, Neuroblastom, Carcinoid, Seminom, malignes Melanom (Blut nicht länger stehen lassen, falsche hoher Wete)
Prostata-Spezifisches- Antigen (Gesamt-PSA) (Frei-PSA)	PSA	Serum	50-60 J 60-70 J > 70 J	< 3 < 4 < 4,5	ng/ml	Prostata-CA
Squamous Cell Carcinoma Antigen	SCC	Serum		< 1,5	ng/ml	Plattenepithel-CA: Cervix, Lunge, Ösoph., HNO-Berei.

Thymidinkinase	TK	Serum		< 5	U/l	Lymphome
Thyreoglobulin	TG	Serum	SD-Gesunde	2-70	ng/ml	Schilddrüse-CA
			n. Strumektomie	< 2		Wenn TSH < 0,1
			n. Strumektomie	< 4		Wenn TSH normal
Tissue Polypeptide Specific Antigen	TPS	Serum		< 80	U/l	Blasen-CA, Mamma-CA, Gastrointestinale-CA

VIII.5 Praktikum

VIII.5.1 Demonstrationen

Einteilung der Tumormarker

Sensitivität und Spezifität

prädiktiver Wert

Indikationen der Bestimmung von Tumormarkern

Gesamt-PSA und freies PSA

VIII.5.2 Praktische Übungen

Befundinterpretation unter Berücksichtigung von Sensitivität, Spezifität und positiven prädiktiven Wert.

IX Labordiagnostik der Herzerkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in Deutschland trotz rückläufiger Tendenz immer noch die häufigsten Todesursachen. Laut Statistischem Bundesamt waren 2014 von 863.356 Todesfällen 38,9% auf eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems zurückzuführen. Die ersten drei Plätze der Todesursachenstatistik nahmen dabei die **chronische ischämische Herzkrankheit** (= koronare Herzkrankheit) ein mit 69.890 (8,0%), der **akute Myokardinfarkt** mit 48.181 (5,5%) und die **Herzinsuffizienz** mit 44.551 (5,1%) der Todesfälle. Zusammen ergibt dies 18,7% der Todesfälle in 2014.

IX.1 Lernziele

Herz:

- Risikofaktoren KHK
- Kinetik (Freisetzungzeiten und Halbwertszeiten) der Marker sind unterschiedlich.
- Kardiale Troponine
- CK-MB: >6%-Regel (bei CK >200 U/l) und <25%-Regel
- Makro-CK und verschiedene Typen
- BNP und NT-proBNP als Herzinsuffizienzmarker

IX.2 Koronare Herzkrankheiten (KHK)

Die häufigste Ursache für eine Schädigung des Myokards ist ein Sauerstoffmangel (Myokardischämie). Hauptursache der Myokardischämie ist die koronare Herzkrankheit (KHK; Synonym: ischämische Herzerkrankung). Die KHK ist definiert durch die klinische Manifestation der Atherosklerose der Herzkranzgefäße. Dies führt zu einer Abnahme der koronararteriellen Perfusion des Herzens, was zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf des Herzmuskels führt. Es ergeben sich zwei unterschiedliche Formen bzw. Stadien der KHK: Manifestation einer Koronarsklerose ohne Ischämienachweis („nicht-stenosierende KHK“) und die Koronarsklerose mit Ischämienachweis („stenosierende KHK“). Die nicht-stenosierende KHK ist definitionsgemäß asymptomatisch.

Verlaufsformen der KHK sind:

- Stabile Angina pectoris
- Akutes Koronarsyndrom (ACS)
 - Instabile Angina pectoris (UA)
 - Akuter Myokardinfarkt (AMI)
 - Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI, *Non-ST-elevation myocardial infarction*), nicht transmural
 - ST-Hebungsinfarkt (STEMI, *ST-elevation myocardial infarction*), transmural
 - Plötzlicher Herztod
- Herzinsuffizienz
- Herzrhythmusstörungen
- Asymptomatische KHK, stumme Myokardischämie

Ausgangspunkt für atherosklerotische Läsionen ist eine lokale Funktionsstörung des Endothels (endotheliale Dysfunktion) der innersten Schicht der Arterienwand. Dies führt zu frühesten atherosklerotischen Läsionen (weißliche Fettablagerungen = fatty streaks) und schreitet fort zu einer komplizierten Plaque, die zunehmend zur Stenosierung des Gefäßes führt. Abgedichtet wird diese durch eine fibröse Kappe, es bildet sich eine stabile Plaque. Vulnerable Plaques (Hochrisiko-Plaques) haben eine besondere Morphologie: lipidreicher Kern, Infiltration von Entzündungszellen, dünne fibröse Kappe. Eine vulnerable Plaque kann bereits im frühen Stadium einer KHK rupturieren. Je größer der Lipidkern und je dünner die fibrotische Kappe, desto größer ist hierbei die Gefahr einer Ruptur.

Eine Ruptur der fibrösen Kappe führt dazu, dass thrombogener Plaqueinhalt tritt ins Gefäßlumen übertritt und führt dort akut zur Thrombosierung des Gefäßes. Der dabei entstehende Thrombus verschließt das Gefäßlumen und führt zu einer Unterbrechung der Blutzufuhr im nachfolgenden Gefäßbett. Bei komplettem und länger anhaltendem Verschluss entwickelt sich ein „transmurales“ und damit alle Schichten der Organwand betreffender Myokardinfarkt mit ST-Hebung im EKG (STEMI). Bei inkomplettem Verschluss kommt es, je nach Ausmaß der Schädigung, zu einer UA (ohne nachweisbare Nekrose) oder zu einem „nicht-transmuralem“ Infarkt ohne ST-Hebung (NSTEMI).

IX.2.1 Risikofaktoren KHK

Folgende Risikofaktoren sind Ursache für endotheliale Dysfunktionen bzw. für koronare Atherosklerose:

- Hypercholesterinämie (Chol↑, LDL↑, HDL↓)
- Tabakkonsum
- Bluthochdruck (systol. > 130 mmHg, diastol. > 85 mmHg)
- Diabetes mellitus
- familiäre Belastung (positive Familienanamnese für kardiovask. Erkrankungen)
- Alter, Geschlecht
- Übergewicht, Fehlernährung, Bewegungsmangel
- Lipoprotein (a) > 300 mg/l
- psychosoziale Faktoren (z. B. niedriger sozialer Status)
- andere Faktoren (z. B. Hyperhomocysteinämie, Hyperfibrinogenämie, Pille)

IX.2.2 Klinik

Leitsymptom der KHK ist die Angina pectoris (Synonym: Stenokardie, Herzenge).

Der typische Angina-Schmerz wird als dumpf, drückend oder einschnürend beschrieben. Die Patienten klagen häufig über ein thorakales Engegefühl und retrosternale Schmerzen, die in Arme (meist links), zwischen die Schulterblätter, in den Hals bis zum Unterkiefer, den Rücken oder den Oberbauch ausstrahlen können. Man unterscheidet zwischen stabiler und instabiler angina pectoris. Typischerweise sind die Beschwerden der **stabilen Angina pectoris** durch körperliche Belastung, emotionalen Stress, ausgiebigen Mahlzeiten oder kalte Außentemperaturen auslösbar. Die Beschwerden manifestieren sich von Anfall zu Anfall relativ gleichartig (= stabil). Bei körperlicher Ruhe und/oder der Gabe von Nitropräparaten bessert sich die Symptomatik innerhalb weniger Minuten. Tritt die Angina pectoris erstmalig auf oder ändert sich das klinische Bild, so spricht man von einer **instabilen Angina pectoris (UA)**. Die UA wird aufgrund der hohen Herzinfarkttrate zum akuten Koronarsyndrom (ACS) gezählt. In ca. 20% der Fälle geht die UA in einen akuten Myokardinfarkt (AMI) über. Während des Anfalls ist die UA aufgrund der klinischen Symptomatik nicht vom AMI zu unterscheiden.

Meist werden die Symptome der UA von vegetativen Symptomen wie Blässe, Kaltschweißigkeit und Hypotonie begleitet. Zu beachten ist, dass insbesondere bei Patienten mit Diabetes mellitus (Neuropathie) oder bei älteren Menschen die typische Schmerzsymptomatik fehlen kann (**stumme Ischämie**, 20-30% der Fälle).

IX.2.3 Klinisch-chemische Diagnostik der KHK

In der Regel präsentiert sich ein Patient mit KHK dem Allgemeinmediziner mit dem Leitsymptom der Angina pectoris. In der aktuellen Leitlinie (Nationale Versorgungsleitlinie KHK) der Bundesärztekammer aus dem Jahr 2016 wird stufenweise folgendes Vorgehen empfohlen:

- Anamnese und körperliche Untersuchung
- Ruhe-EKG mit 12 Ableitungen
- Echokardiographische Untersuchung in Ruhe
- Nicht-invasive Verfahren
 - Belastungs-EKG
 - Stress-Echokardiographie
 - Nuklearmedizinische Perfusionsdiagnostik
 - Magnetresonanztomographie
 - Computertomographie
- Invasive Verfahren

Klinisch-chemische Laboruntersuchungen leisten bei der Diagnose einer KHK nur einen geringen Beitrag. Folgende Parameter können jedoch zur Diagnostik einen Beitrag liefern:

- Kleines Blutbild (Anämie?, Leukozytose?, Thrombozytose?)
- Lipide
 - Gesamt-Cholesterin
 - HDL-Cholesterin
 - LDL-Cholesterin
 - Triglyzeride
 - (Lipoprotein (a))
- Blutzucker (Diabetes mellitus?)

IX.3 Akuter Myokardinfarkt

Anders als bei der stabilen Angina pectoris ist die Schmerzsymptomatik durch körperliche Ruhe und Gabe von Nitro-Präparaten nicht beeinflussbar. 3-6% aller Notfallpatienten stellen sich mit Thoraxschmerzen vor. 4/5 der Fälle haben eine kardiale Ursache, 1/5 nicht (z. B. Lungenarterienembolie, akutes Aortensyndrom, Spannungspneumothorax, Ösophagusruptur nach Erbrechen). Insgesamt 20-25% der Patienten mit Thoraxschmerzen haben ein ACS. Dabei ist es abhängig wo und wie die Patienten untersucht werden. Nur ca. 5% der Patienten mit Thoraxschmerzen leiden unter einem ACS in der Allgemeinarztpraxis, ca. 25% der Patienten, die sich selbst in die Notaufnahme eingewiesen haben und ca. 40% der Patienten, die per Rettungswagen in die Notaufnahme eingewiesen werden.

IX.3.1 Klinik

Die häufigste Ursache (>95%) für einen AMI ist die KHK mit thrombotischem Gefäßverschluss infolge Atherosklerose. Bei 50% geht dem Infarkt ereignis eine UA voraus. 20-30% der Myokardinfarkte manifestieren sich ohne begleitende Schmerzsymptomatik. Infarkte häufen sich in den frühen Morgenstunden (40% der Infarkte zwischen 6-10 Uhr), wahrscheinlich durch die erhöhte Thrombogenität des Blutes aufgrund relativer Dehydratation.

Die Diagnostik für einen akuten Myokardinfarkt (AMI) stützt sich auf drei Säulen, von denen mindestens zwei vorhanden sein sollen:

- Beschwerden des Patienten (Thoraxschmerz > 20 min, in der Regel intensiver („vernichtend“) als bei einem Angina pectoris-Anfall)
- Infarkttypische Veränderungen im EKG
- Serologischer Nachweis erhöhter kardialer Troponine und weiterer herzmuskelspezifischer Enzyme

IX.3.2 Klinisch-chemische Diagnostik des akuten Myokardinfarktes

IX.3.2.1 Klinisch-chemische Marker beim akuten Myokardinfarkt

Die klinisch-chemische Diagnostik und Verlaufskontrolle des Herzinfarktes stützt sich auf Marker, wie die kardialen Troponine (cTn), Kreatinkinase (CK) und die Kreatinkinase-MB (CK-MB), wobei cTn inzwischen der wichtigste Marker ist. Auch die Bestimmung von Myoglobin ist von Bedeutung. Die früher eingesetzte GOT (ASAT) und LDH können heute als entbehrlich angesehen werden.

Nach dem akuten Infarkt ereignis zeigt die Aktivität bzw. Konzentration der verschiedenen Markerproteine im Blutplasma hinsichtlich Anstiegsbeginn, Gipfel und Normalisierung einen charakteristischen zeitlichen Verlauf. Es ist jedoch zu bedenken, daß die Verlaufskurven bei verschiedenen Patienten mit unterschiedlicher Infarktgröße und unterschiedlicher Infarktdurchblutung erheblich differieren können. Das zytosolisch gelöste Myoglobin, das vorwiegend über das venöse Blut das Serumkompartiment erreicht, ist als frühestes Markerprotein im Blut nachweisbar, gefolgt von CK und CK-MB. Diese Proteine erreichen relativ früh ihre Serummaximalwerte und werden rasch aus dem Serum eliminiert. So ist bereits nach 1 bis 2 Tagen ein akuter Myokardinfarkt nicht mehr sicher diagnostizierbar. Die Serumaktivität der LDH bzw. der HBDH (Isoenzyme LDH-1 und -2 werden zusammengefasst) steigt nur langsam an, bleibt jedoch relativ lange im Serum erhöht. Dieses Enzym wird deshalb vornehmlich für die Diagnostik des länger zurückliegenden Infarktes eingesetzt (Spätenzym).

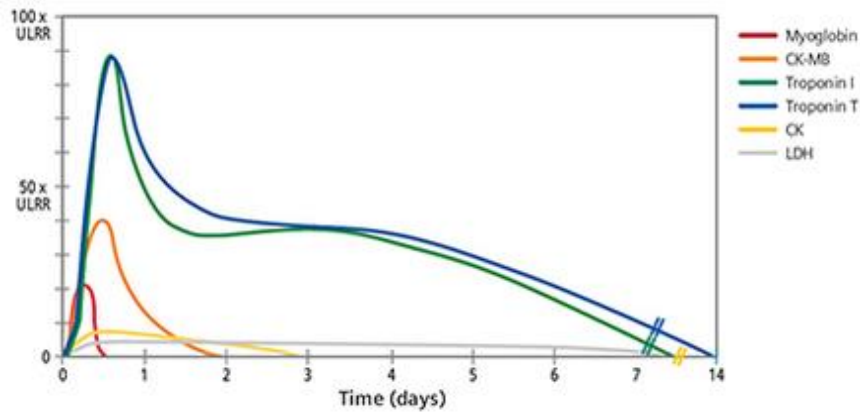


Abb.: Aktivitäts- bzw. Konzentrationskinetik wichtiger klinisch-chemischer Kenngrößen beim akuten Myokardinfarkt

Die Serumkonzentrationsänderung der Troponine unterscheidet sich signifikant von der Kinetik der konventionellen Enzyme. Das kardiale Troponin T oder I zeigt im Serum oder Plasma Konzentrationsänderungen, wie sie sowohl für zytosolisch gelöste Proteine, z.B. Myoglobin oder CK, als auch für strukturell gebundene Proteine, z.B. Myosinleichtketten, gefunden werden. Am ersten Tag nach Schmerzbeginn ist die Freisetzung des Troponins deutlich abhängig von der frühen Infarktdurchblutung. Die Kinetik dieser initialen Troponinfreisetzung entspricht der zytosolisch gelösten CK, so daß es sich hierbei wahrscheinlich um einen zytosolischen Troponinpool handelt. Bei Patienten mit erfolgreicher Rekanalisation einer verschlossenen Koronararterie (Thrombolyse oder PTCA) ist eine rasche Troponinauswaschung aus dem Infarktareal mit hohen Serummaximalwerten am ersten Tag zu beobachten. Die Höhe des Troponinspiegels am ersten Tag ist abhängig von der Dauer der Gefäßokklusion. Je früher ein Gefäß wiedereröffnet wird, desto höher ist die Troponinauswaschung. Dagegen ist die anhaltende Troponinfreisetzung, die bis zu 10 Tage nach Infarktbeginn nachweisbar ist, durch eine protrahierte Freisetzung aus dem Infarktareal bedingt, da die Serumhalbwertszeit von Troponin 120 Minuten beträgt. Durch die Freisetzung dieses strukturell gebundenen Troponinpools entsteht im Mittel vier Tage nach Schmerzbeginn ein zweiter Maximalwert. Diese anhaltende Troponinerhöhung entspricht somit der fortschreitenden proteolytischen Degradation des kontraktilen Apparates und zeigt demnach eine irreversible Herzmuskelnekrose an.

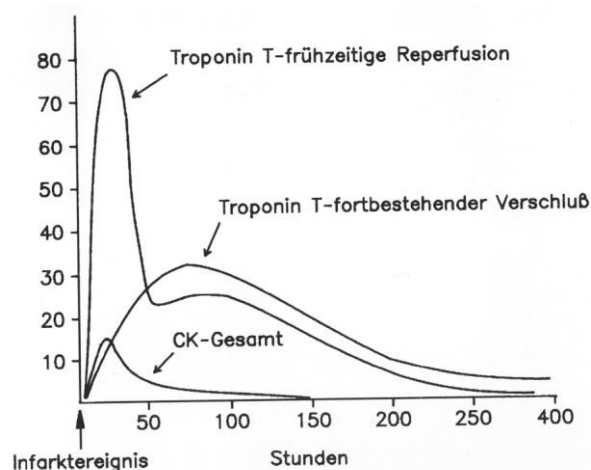


Abb.: Konzentrationskinetik von Troponin T beim akuten Myokardinfarkt

IX.3.2.2 Verbesserung der Herzinfarkt Diagnostik durch Troponine

Die kardialen Troponine T oder I sind herzspezifische Proteine. Innerhalb der Herzmuskulatur sind die Troponine überwiegend als Strukturproteine in den Myofibrillen lokalisiert. Die Konzentration dieser Troponine steigt beim Infarkt deutlich höher an, als dies für die CK- oder LDH-Aktivität gefunden wird. Es konnten Zunahmen der Troponinkonzentration im Serum auf das über 300 fache der unteren Nachweisgrenze des Assays beobachtet werden. Auch die Dauer der Troponinerhöhung im Serum ist wesentlich länger als dies für die CK- oder LDH-Aktivität gezeigt wird. Diese lang anhaltende Troponinfreisetzung erhöht die Wahrscheinlichkeit für ein positives Troponinergebnis, insbesondere in der subakuten Infarktphase.

Ein hoher Anteil von Patienten mit instabiler Angina pectoris zeigt grenzwertige bis deutlich erhöhte Troponinwerte. Es liegt nahe, daß bei einem Teil dieser Patienten bereits Mikroinfarktierungen eingetreten sind, insbesondere bei Patienten, bei denen anhaltende Troponinerhöhungen gefunden werden.

Mit den neu entwickelten, hoch sensitiven hs-cTnT- oder I-Assays steht ein Schädigungsmarker zur Verfügung, der die für die Infarkt Diagnostik geforderte Herzmuskelspezifität am besten aufweist. Diese Assays stellen demnach die Parameter der Wahl zur Diagnose eines Myokardinfarktes dar. Die Organspezifität bedingt eine überlegene diagnostische Spezifität. Aus einem sehr hohen Konzentrationsgefälle zwischen Herzmuskel und Blutplasma und damit verbunden einem hohen Troponinanstieg bei Zellschädigung resultiert die hohe diagnostische Sensitivität von Troponin, die nur noch von der immunologischen CK-MB-Massenbestimmung annähernd erreicht wird. So eröffnet sich für die Troponinbestimmung durch die Erkennung der prognostisch ungünstigen Mikroinfarkte bei der instabilen Angina pectoris ein wichtiges Indikationsgebiet. Erhöhte cTn-Konzentrationen korrelieren mit dem Schweregrad sowie mit einer schlechteren Prognose.

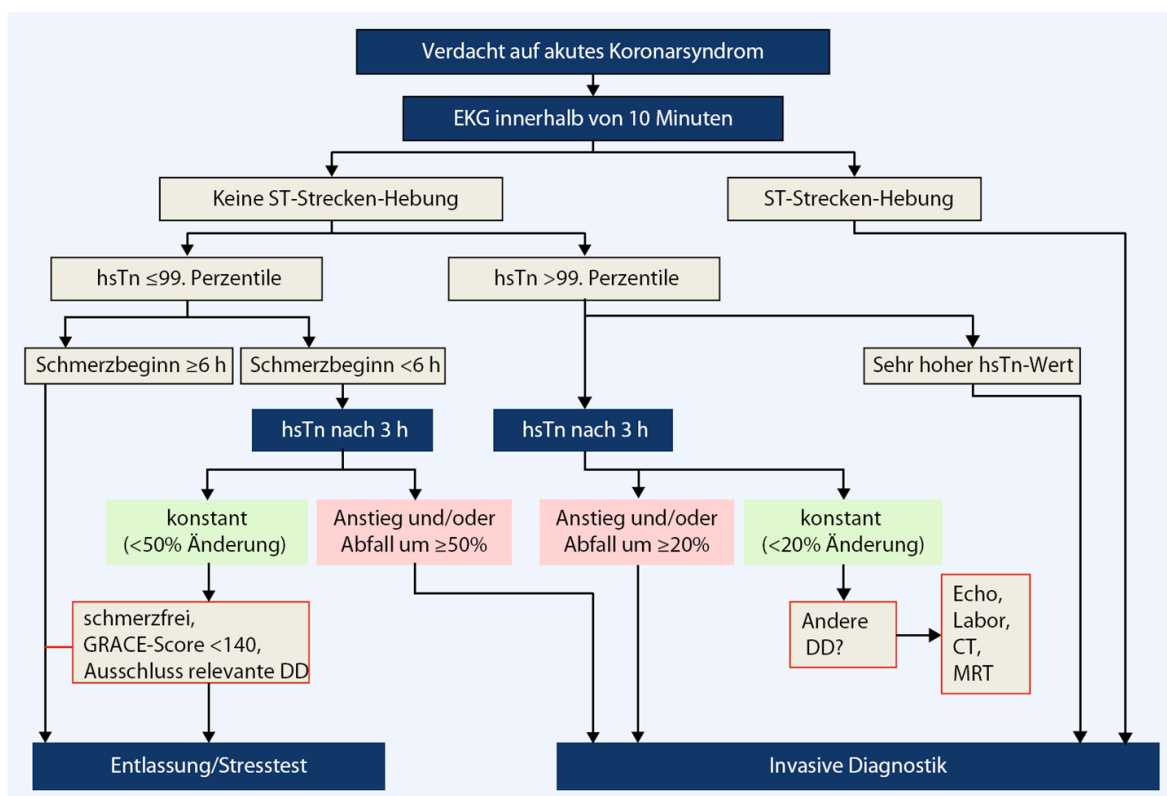


Abb.: Aktuelle Leitlinien 2012, Verdacht auf akutes Koronarsyndrom. M. Vafaie et al. Herz 2013, 38;821-827

Tab. 1 Kriterien für die Diagnose eines spontanen akuten Myokardinfarktes		
1. Hauptkriterien	a) Troponin-Grenzwertkriterium	Troponinkonzentration bei Aufnahme oder nach 3–6 h >99. Perzentil
	b) Troponin-Deltakriterium	Relevanter Anstieg und/oder Abfall der Troponinkonzentration innerhalb von 3–6 h
2. Nebenkriterien	a) Klinisches Kriterium	Symptome der Ischämie
	b) EKG-Kriterium	Neue ST-T-Veränderungen, neuer Linksschenkelblock oder Entstehung pathologischer Q-Zacken
	c) Bildgebendes Kriterium	Neuer Verlust von vitalem Myokard, neue Wandbewegungsstörungen oder intrakoronarer Thrombus

Für die Diagnose eines spontanen akuten Myokardinfarktes [ausgenommen sind Myokardinfarkte im Rahmen eines plötzlichen Herztodes oder im Zusammenhang mit perkutaner Koronarintervention (PCI) oder koronarer Bypassoperation (CABG)] sind beide Hauptkriterien (1a und 1b) sowie eines der Nebenkriterien (2a, 2b oder 2c) erforderlich.

Abb.: Aktuelle Leitlinien 2012, Verdacht auf akutes Koronarsyndrom. M. Vafaie et al. Herz 2013, 38;821-827

Bei Patienten mit ACS und fehlender charakteristischer ST-Streckenhebung im EKG spielt die Bestimmung von hs-cTn eine besondere Rolle in der Diagnose und Risikoabschätzung. Für die Diagnostik eines NSTEMI wurde 2015 von der European Society of Cardiology (ESC) ein neuer 0h/3h-Algorithmus entwickelt. Die Verwendung von hs-cTn-Testen ist hierzu obligatorisch.

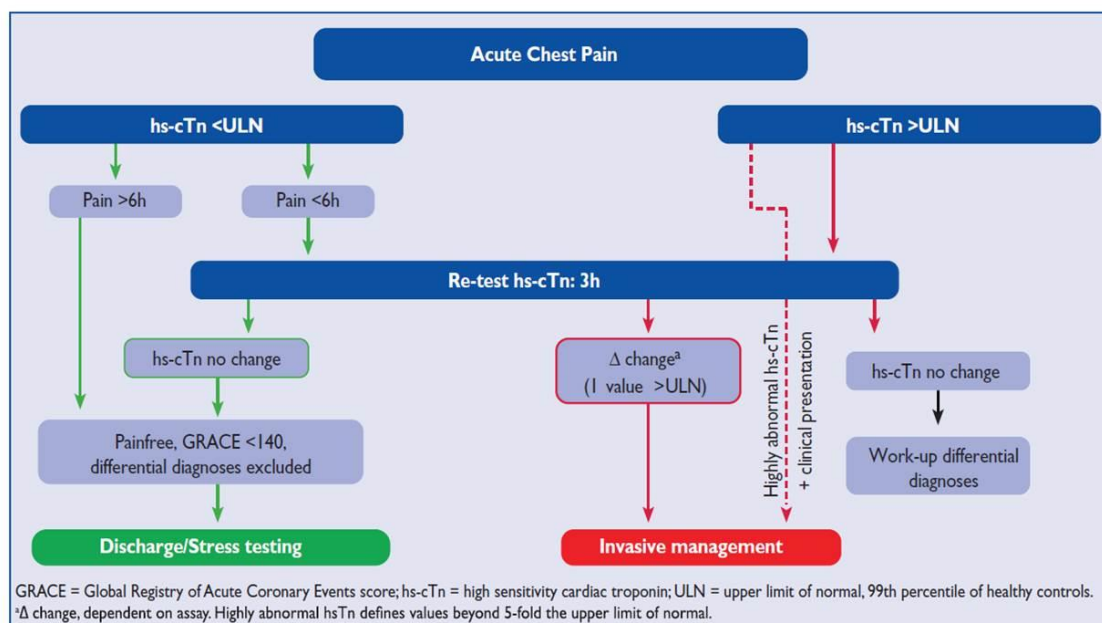


Figure 2 0 h/3 h rule-out algorithm of non-ST-elevation acute coronary syndromes using high-sensitivity cardiac troponin assays.

Abb.: 0h/3h-Algorithmus ESC-Guidelines 2015 für NSTEMI

Unter Verwendung von hs-cTn-Assays können Patienten, die sich mit Verdacht auf NSTEMI in der Notaufnahme vorstellen, bereits innerhalb von 1 h nach Vorstellung abgeklärt werden. Die Zeitpunkte 0 h und 1 h beziehen sich auf den Zeitpunkt des ersten Bluttestes bei der Aufnahme. „Rule-out“: Das Vorliegen eines NSTEMI kann bereits zum Zeitpunkt der

Vorstellung ausgeschlossen werden, wenn die hs-cTn-Konzentrationen sehr niedrig sind oder eine Kombination von niedrigen hs-cTn-Basissspiegeln und fehlendem relevanten Anstieg innerhalb von 1 h vorliegen. „Rule-in“: Patienten haben eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für einen NSTEMI, wenn die hs-cTn-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Vorstellung bereits deutlich erhöht sind oder die hs-cTn-Konzentrationen einen klaren Anstieg innerhalb von 1 h zeigen. Die verwendeten „cut off“-Spiegel sind Assay-spezifisch und können nicht auf andere Assays übertragen werden.

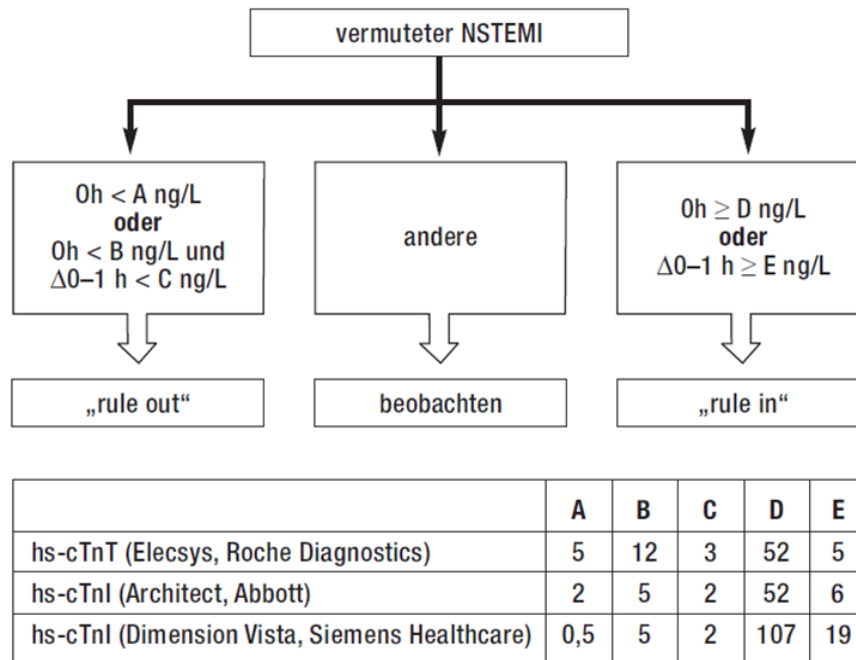


Abb.: 0h/1h-Algorithmus ESC-Guidelines 2015 für NSTEMI

IX.3.2.3 Limitierungen der Bestimmung von Troponinen in der Infarkt Diagnostik

Die Untersuchungsverfahren zur Troponinbestimmung wurden in den letzten Jahren immer weiter verbessert, die Referenzwerte wurden mehrfach gesenkt. Diese geringen Werte machen den Test sehr sensitiv. Andererseits ist Troponin ein Marker mit langsamer Kinetik. Das bedeutet, dass im Notfall ein einzelner Test nicht aussagekräftig ist, einen Herzinfarkt auszuschließen. Mindestens ein weiterer Wert nach 3 h (hs-cTn-Test) bzw. 1 h (bei NSTEMI-Verdacht und hs-cTn-Test) ist für die Diagnosestellung notwendig.

Erhöhte Troponine allein sind allerdings kein sicherer Beweis für das Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung, da Troponine bei jedem Myokardschaden ansteigen. Die Differentialdiagnosen bei erhöhtem Troponin sind unterschiedlich und schließen folgende Erkrankungen ein (Auswahl):

- schwere akute oder chronische Herzinsuffizienz
- chronische oder akute Nierenschädigung
- Entzündungen, z. B. Myokarditis
- Tachy- oder Bradyarrhythmien
- Apoplex oder Subarachnoidale Blutung (SAB)
- Lungenarterienembolien, schwere pulmonale Hypertonie
- Hypothyreose
- Verbrennungen (> 30% Körperoberfläche)

IX.3.2.4 Bestimmung von CK und CK-MB in der Infarkt Diagnostik

Die CK ist ein intrazelluläres Enzym und kommt in vier Isoformen vor: CK-MM (Skelettmuskel), CK-MB (Herzmuskel), CK-BB (Gehirn) und CK-MiMi (Mitochondrien). Im gesunden Myokard beträgt der Anteil an CK-MM 95% und CK-MB 5%. Der CK-MB-Anteil steigt erst bei Erkrankungen des Myokards auf Werte bis 20-30% an. Im Verlauf eines Myokardinfarkts steigt der relative Anteil der CK-MB-Aktivität innerhalb 4-10 h auf über 6% an (CK-MB/CK-Ratio). Das Maximum wird innerhalb von 24 h erreicht und fällt danach innerhalb von 2-3 Tage wieder in den Normalbereich ab. Bei der Interpretation gelten folgende Regeln für die Diagnose eines Herzinfarktes:

- > 6% Regel (wenn gleichzeitig CK > 200 U/l)
- < 25% Regel

Die Ratio CK-MB/CK liegt beim Myokardinfarkt in der Regel zwischen 10-20%. Verhältnisse über 25% sprechen für eine sogenannte Makro-CK oder auf CK-BB im Blut. CK-BB ist normalerweise nur in Spuren im Blut vorhanden, kann aber in größeren Mengen nachgewiesen werden z. B. bei Schädel-Hirn-Trauma, malignen Tumoren in Organen mit hohem CK-BB-Anteil, nekrotisierender Pankreatitis, akuter Lebernekrose und hämatologischen Erkrankungen. Falsch hohe CK-MB-Aktivitäten können auch bei starker Hämolyse auftreten, was zur Freisetzung der intrazellulären Adenylatzyklase führt, die die enzymatische CK- und CK-MB-Aktivitätsbestimmung stört. Auch bei chronisch geschädigten Muskeln und Leistungssportlern kann die CK-MB/CK > 6% liegen. Häufig finden sich im klinischen Alltag auch konstant erhöhte CK-MB/CK-Ratios. Bei der **Makro-CK** kommt es zur Beeinträchtigung der enzymatischen CK- und CK-MB-Aktivitätsbestimmung durch Makroenzyme. Entweder handelt es sich hier um Komplexe bestehend aus CK und Immunglobulinen (**Makro-CK Typ 1**) oder um Oligomere mitochondrialer CK-MiMi (**Makro-CK Typ 2**). Während Typ 1, der oft bei älteren Menschen auftritt, keinen Krankheitswert hat, findet sich die Makro-CK Typ 2 gehäuft bei Patienten mit malignen Tumoren, Lebererkrankungen oder sonstigen schweren Gewebszerstörungen.

Alternativ zur CK-MB-Aktivität (Immunitest) kann die CK-MB-Masse (Immunoassay) bestimmt werden. Dieser ist sensitiver und spezifischer und wird daher in den aktuellen Empfehlungen bevorzugt. Allerdings erreicht auch die CK-MB-Masse nicht die Spezifität von Troponinen. CK-MB-Bestimmungen zur Diagnose werden von der ESC nur noch empfohlen, wenn Troponin-Teste nicht zur Verfügung stehen. Zur Verlaufskontrolle und zum Nachweis von Reinfarkten sind CK-MB und auch Myoglobin aufgrund ihrer kürzeren Halbwertszeit dem Troponin überlegen.

IX.3.2.5 Limitierungen der Bestimmung von CK und LDH in der Infarkt Diagnostik

Große transmurale Infarkte sind mit hoher Sicherheit durch infarkttypische EKG-Veränderungen und Enzymanstieg nachweisbar. *Erhebliche Probleme ergeben sich dagegen bei der Diagnose des kleinen transmuralen oder des nicht transmuralen Infarktes.* Hier ist die Sensitivität und Spezifität des EKG höchstens 80% bzw. 70%. Für die Diagnose des nicht transmuralen Infarktes sind Erhöhungen serologischer Parameter deshalb entscheidende diagnostische Kriterien für eine möglicherweise vorliegende Herzmuskelnekrose. *Zum Nachweis von Mikroinfarkierungen, wie sie bei Patienten mit instabiler Angina pectoris auftreten können, ist das EKG in der Regel nicht hilfreich.* Zwar finden sich hier nicht selten Zeichen einer anhaltenden myokardialen Ischämie, diese EKG-Veränderungen sind jedoch unspezifisch. Hier erweisen sich besonders die Troponine als moderne kardiale Marker als hilfreich.

Die Sensitivität der CK-Bestimmungen ist durch die relativ geringe Zunahme der CK-Aktivität im Serum über eine nur kurze Zeitdauer nach Schmerzbeginn sowie durch variable normale Serumspiegel begrenzt. Es muß deshalb mit einer signifikanten Anzahl falsch negativer Bestimmungen gerechnet werden, wenn das kleine diagnostische Zeitfenster bei der Messung verfehlt wird oder wenn die CK-Erhöhung die obere Normgrenze beim sehr kleinen Infarkt nicht überschreitet. Die LDH bleibt zwar lange im Serum erhöht, ihre relative Zunahme im Serum ist jedoch geringer als die der CK-Aktivität.

Die diagnostische Wertigkeit der konventionellen Herzinfarktparameter wird darüber hinaus durch die mangelnde diagnostische Spezifität dieser Markerproteine, die allesamt nicht herzspezifisch sind, eingeschränkt. So ist im Falle der CK-Gesamtaktivität oder des Myoglobins bei zusätzlichen Skelettmuskelschäden die Diagnostik eines gleichzeitig bestehenden Herzinfarktes nicht möglich. Aufgrund der ubiquitären Verteilung der LDH kann die Spezifität der serologischen Infarkt Diagnostik durch die Messung der LDH nicht verbessert werden.

IX.3.2.6 Wichtige Parameter

Troponin T Troponin I	Das Troponin T ist herzmuskelspezifisch. 95 % sind strukturgebunden und 5 % liegen in gelöster Form im Zytoplasma vor. Der Anstieg erfolgt bereits nach etwa 3 h nach Herzinfarkt. Das Maximum liegt bei ca. 20 h. Schäden werden über einen Zeitraum von etwa 10 - 14 Tagen angezeigt.
CK-Aktivität	Die CK kommt in Skelett-, Herz- und glatter Muskulatur in abnehmender Konzentration vor. Vier Stunden nach Herzinfarkt können erhöhte Spiegel gemessen werden. Das Maximum liegt bei etwa 24 h. Nach 3 - 4 Tagen haben sich die Werte wieder normalisiert. Die Werte schwanken bei Patienten mit Herzinfarkt zwischen 160 und 2000 U/l (24 h Wert, 95 % Bereich)
CK-MB-Aktivität CK-MB-Masse	Herzmuskelspezifischer Anteil. Diagnostisch verwertbar sind nur Werte über 10 U/l; gleichzeitig soll der CK-MB-Aktivitätsanteil über 6% der Gesamt-CK-Aktivität liegen. In den aktuellen Leitlinien zur Diagnostik nur noch empfohlen, wenn keine cTn-Teste zur Verfügung stehen.
LDH/HBDH	Die LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym und kommt ubiquitär vor. Es gibt 5 Isoenzyme. Die LDH1 kommt vor allem im Herzmuskel und Erythrozyten vor. Nach Infarkt steigen die Werte nach etwa 6 h an. Es werden dabei Anstiege auf das 2 - 8-fache erzielt. Das Maximum wird nach 30 - 72 h erreicht, nach 10 - 20 Tagen haben sich die Werte wieder normalisiert.
GOT/ASAT	Die Bestimmung der GOT wird eingesetzt in der Diagnostik von Schäden des Herzmuskels, der Skelettmuskulatur und der Leber.
Myoglobin	Das Myoglobin ist nicht Herzmuskel-spezifisch. Rasche Freisetzung bei Schädigung. Bereits ab 2,5 h werden erhöhte Werte gemessen. Sehr kurze Halbwertszeit mit 10 - 20 min.

IX.4 Herzinsuffizienz

Als Herzinsuffizienz bezeichnet man die Unfähigkeit des Herzens, trotz ausreichenden venösen Blutangebotes und Füllungsdrucks, sich selbst und die Körperperipherie nicht ausreichend mit Blut, Sauerstoff und Substraten zu versorgen. Die Prävalenz liegt in den westlichen Industrieländern bei 2% und steigt mit dem Alter (ca. 10% bei über 80-Jährigen). Die 5-Jahres-Mortalitätsrate liegt bei > 50%. Bei schwerer Herzinsuffizienz versterben ca. 50% der Patienten innerhalb eines Jahres. Die Schweregrade der Herzinsuffizienz werden klassifiziert nach der New York Heart Association (NYHA) in NYHA I-IV.

IX.4.1 Klinik

Man unterscheidet eine **akute** (Entwicklung innerhalb von Tagen – Wochen) von einer **chronischen Herzinsuffizienz** (Entwicklung innerhalb von Monaten – Jahren). Die akute Herzinsuffizienz ist meist Folge einer akuten Myokardischämie, der chronischen Form liegt meist eine KHK oder arterielle Hypertonie zu Grunde. Je nach Progressionsgeschwindigkeit, Lokalisation und Art der ventrikulären Funktionsstörung lässt sich die Herzinsuffizienz in verschiedene Formen mit unterschiedlicher Symptomatik differenzieren. Folgende Manifestationen sind dabei von besonderer Bedeutung:

- **Linksherzinsuffizienz** (Schädigung des linken Ventrikels des Myokards; Symptome: Abgeschlagenheit, Minderperfusion der Organe, pulmonale Stauung, Pleuraergüsse)
- **Rechtsherzinsuffizienz** (Schädigung des rechten Ventrikels des Myokards; Symptome: periphere Ödeme, gestaute Halsvenen, Stauungsleber, Aszites, Stauungsgastritis, Stauungsnieren)
- **Globalherzinsuffizienz** (entwickelt sich häufig im Krankheitsverlauf auf Grund der engen Kopplung beider Ventrikel; Symptome: stark eingeschränkte Belastbarkeit, ausgeprägte Atemnot, ausgeprägte Ödemneigung)

IX.4.2 Klinisch-chemische Diagnostik der Herzinsuffizienz

IX.4.2.1 Klinisch-chemische Marker bei Herzinsuffizienz

Die Diagnose Herzinsuffizienz wurde traditionell überwiegend klinisch gestellt. Erst seit kurzer Zeit stehen natriuretische Peptide im Mittelpunkt der Labordiagnostik der Herzinsuffizienz. Natriuretische Peptide sind Peptidhormone mit harntreibender, natriuretischer (Na⁺-Ionen-ausschwemmender) und blutdrucksenkender Wirkung. Sie spielen eine Rolle bei der Regulation des Elektrolythaushalts und des Blutdrucks. Zu dieser Familie zählen unter anderem das **ANP** (atrial natriuretic peptide, A-Typ), **BNP** (brain natriuretic peptide, B-Typ), **CNP** (C-type natriuretic peptide, C-Typ) und das **Urodilatin**. Die Peptide sind sich in ihrer Struktur und Funktion sehr ähnlich. Wichtigster Parameter ist das BNP und sein N-terminales Fragment **NT-proBNP**.

BNP wird als Präpropeptid in Myozyten der Herzkammern sowie zu einem geringeren Anteil auch in Myozyten der Herzvorhöfe synthetisiert. Wie die meisten Peptidhormone wird BNP als größeres Vorläufermolekül (prä-proBNP) gebildet. Nach Zunahme der ventrikulären Wanddehnung und Wandspannung durch Volumen- oder Druckerhöhung erfolgt im Herzmuskel eine Spaltung des prä-proBNPs in ein Signalpeptid und proBNP. Dieses pro-

BNP wird in ein biologisch aktives (BNP) und ein biologisch inaktives Fragment (NT-proBNP) gespalten und äquimolar vom Herzen in das Blut freigesetzt.

BNP wirkt natriuretisch, diuretisch, vasodilatierend und vermindert die Renin- und Aldosteronsekretion. Es gilt daher als endogener funktioneller Antagonist des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. BNP (Halbwertszeit: 20 Minuten) wird hauptsächlich über C-Rezeptoren der Leber, Lunge, Niere, Nebenniere und des Gefäßendothels sowie durch Endopeptidasen im Blut abgebaut. NT-proBNP (Halbwertszeit: 60-120 Minuten) hingegen wird ausschließlich über die Nieren (glomeruläre Filtration) ausgeschieden.

Die Höhe der BNP- oder NT-proBNP-Konzentration im Blut korreliert mit dem Schweregrad einer Herzinsuffizienz. Beide Marker eignen sich zur Prognosebeurteilung, Verlaufskontrolle und Therapieüberwachung bei Patienten mit bekannter Herzinsuffizienz. Jedoch zeigt das NT-proBNP einige Vorteile gegenüber BNP: es hat eine höhere Stabilität und Halbwertszeit (1-2 h statt 20 min) sowie eine höhere Konzentration im Blut als BNP. Intraindividuelle Schwankungen sind gering und es wird weniger von Medikamenten bei Herzinsuffizienz-Therapie beeinflusst als BNP. Bei Raumtemperatur ist BNP im EDTA-Plasma für 24 h stabil, NT-proBNP für 72 h und kann sowohl aus Serum als auch aus EDTA- und Heparin-Plasma bestimmt werden.

IX.4.2.2 Limitierungen der Bestimmung von BNP und NT-proBNP

Bei der Interpretation der Befunde müssen folgende Gegebenheiten in Betracht gezogen werden:

- BNP und NT-proBNP können bei **körperlicher Belastung** ansteigen, daher Blutentnahme nach einer Ruhephase.
- BNP- und NT-proBNP-Konzentrationen steigen mit dem **Alter** an, daher gibt es altersbezogene Referenzwerte.
- Östrogen stimuliert Synthese natriuretische Peptide, daher haben **Frauen** höhere Werte als Männer (geschlechtsspezifische Referenzwerte).
- Es besteht eine inverse Korrelation mit dem **BMI**, daher haben adipöse Patienten erniedrigte Werte.
- BNP- und NT-proBNP-Konzentrationen steigen an bei Einschränkung der **Nierenfunktion** und/oder Überwässerung.
- **Erhöhte Werte** finden sich u. a. auch bei pulmonaler und arterieller Hypertonie, Lungenembolie, Leberinsuffizienz, Tumoren, Anämie und Sepsis.
- **Erniedrigte Werte** finden sich u. a. auch bei Einnahme von Diuretika, ACE-Hemmern, Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, Betarezeptorblockern und Spironolacton.

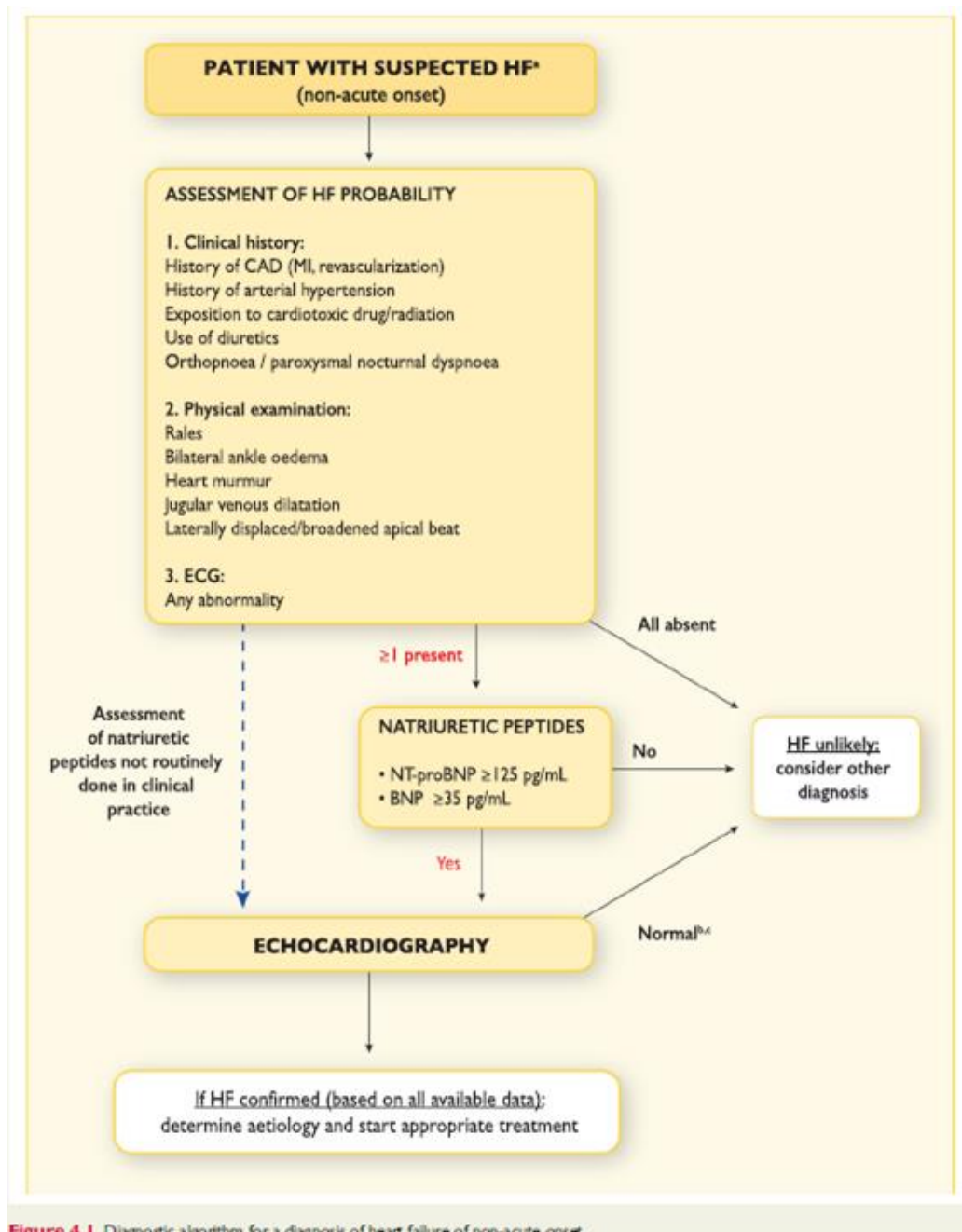


Abb.: Algorithmus bei Verdacht auf Herzinsuffizienz. ESC Pocket-Guidelines 2012 für Herzinsuffizienz.

IX.5 Klinische Chemische Analytik

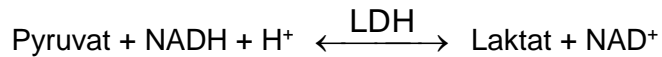
IX.5.1 Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wird in Units (U) angegeben (μmol Substratumsatz pro Minute pro Liter); es muß dabei sicher gestellt sein, daß die Reaktion unter optimalen Bedingungen abläuft (ausreichend Substrat, Puffer, optimaler pH-Wert, Elimination von Inhibitoren, definierte Temperatur). Enzymatische Reaktionen sind abhängig von der Temperatur: als Faustregel kann gelten, daß eine Temperaturzunahme um 1°C eine Aktivitätserhöhung um 10% bewirkt. Die Enzymaktivitäten werden überwiegend bei 25°C und 37°C bestimmt.

IX.5.2 Messverfahren

Enzymaktivitäten werden vorzugsweise im kinetischen Test bestimmt.

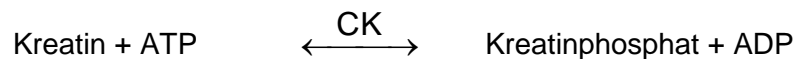
a) einfache enzymatische Messreaktion:



(Die Konzentration von NADH lässt sich bei 340 nm photometrisch erfassen. NAD⁺ absorbiert bei dieser Wellenlänge nicht => Extinktionsabnahme)

b) zusammengesetzte enzymatische Mess-Reaktion:

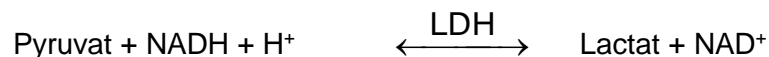
Mess-Reaktion mit Kreatinkinase (CK):



Hilfsreaktion mit Pyruvatkinase (PK):



Indikatorreaktion mit Lactatdehydrogenase (LDH):



c) einstufiges Sandwichprinzip:

Schritt 1: Bildung Sandwichkomplex (cTnT)

Inkubation der Probe mit biotinylierten monoklonalen anti-cTnT-Antikörper und mit einem mit Ruthenium-Komplex markiertem monoklonalen anti-cTnT-Antikörper => Sandwich-Komplex

Schritt 2: Bindung an Mikropartikel

Zugabe von Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln => Komplex wird über Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an Festphase gebunden.

Schritt 3: Messung

Überführung in Messzelle, Mikropartikel werden durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche der Elektrode fixiert. Ungebundene Substanzen werden durch Waschschrift entfernt. Anlegen einer Spannung => Chemilumineszenzemission wird induziert und mit Photomultiplier gemessen. Ergebnisse werden über Kalibrationskurve ermittelt.

IX.6 Fragen zur Lernevaluation

1. Welches sind die drei häufigsten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems?
2. Was versteht man unter einem akuten Koronarsyndrom (ACS) und welche drei Formen lassen sich differenzieren?
3. Wie entsteht eine koronare Herzkrankheit (KHK) und welche Folgen hat Sie? Welche Laborparameter stützen die Diagnose?
4. Welche Laborparameter sind besonders spezifisch zum Nachweis einer Myokardischämie bzw. einer Herzinsuffizienz? Welche Marker sind geeignet für die Verlaufskontrolle eines Herzinfarktes bzw. einen Reinfarkt?
5. Wie würden Sie nach den aktuellen Leitlinien bei Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom vorgehen?
6. Welche Ursachen können einer Erhöhung der CK-MB-Aktivität zugrunde liegen? Was versteht man unter einer Makro-CK?

X Labordiagnostik der Leber- und Pankreaserkrankungen

X.1 Lernziele

Leber:

- Einschätzung der Schwere eines Leberschadens (Konzentration der Transaminasen, Lokalisation der intrazellulären Enzyme → de-Ritis-Quotient = ASAT/ALAT).
- Bilirubin-Metabolismus, Bilirubinurie und Unterscheidung der Bilirubinformen.

Pankreas:

- Exogene und endogene Funktion des Pankreas.
- Keine quantitative Korrelation der Pankreas-Amylase und Lipase zur Schwere oder Ätiologie der Erkrankung.

X.2 Leber

X.2.1 Einleitung

Die Leber ist das wohl stoffwechselaktivste Organ des menschlichen Organismus. So werden eine Vielzahl von Funktionsproteinen in der Leber synthetisiert (z.B. Albumin, Gerinnungsfaktoren, akute Phase Proteine, Apolipoproteine etc.). Daneben ist sie neben der Niere das wichtigste Organ zum Abbau von Stoffwechselendprodukten (z.B. Hämoglobin, Ammoniak), Medikamenten und Toxinen. Zusätzlich hat die Leber zentrale Funktionen bei der Regulation des Kohlehydrat- (Glykogenspeicher) und Fettstoffwechsels (Aufnahme der Triglyceride) sowie der Verdauung (Galleproduktion). Aus diesem weiten Aufgabenspektrum lässt sich ableiten, dass Funktionsstörungen der Leber vielfältige Auswirkungen haben.

X.2.2 Klassifikation der Lebererkrankungen

Lebererkrankungen lassen sich anhand ihrer Pathogenese wie folgt unterteilen:

- a) Infektiöse Erkrankungen (z.B. Virushepatitis)
- b) Toxische Erkrankungen (z.B. alkoholtoxische Leberzirrhose)
- c) Immunologisch vermittelte Erkrankungen (z.B. Autoimmunhepatitis)
- d) Tumoren (z.B. primäres Leberzellkarzinom, Adenome)
- e) Cholestase/Gallestau (z.B. Gallensteine)
- f) Genetische Erkrankungen

X.2.3 Labordiagnostik

Zur Diagnostik von Lebererkrankungen existiert ein breites Spektrum von Parametern, die sich nach funktionellen Aspekten klassifizieren lassen.

- a) *Erfassung der Syntheseleistung der Leber:*
 1. Cholinesterase (CHE)
 2. Albumin
 3. Vitamin K- abhängige Gerinnungsfaktoren (Quick)

- b) *Erfassung der Entgiftungsleistung der Leberzellen:*
 - 1. Bilirubin
 - 2. Ammoniak

- c) *Erfassung eines Gallestaus:*
 - 1. γ -Glutamyltransferase (γ -GT)
 - 2. Alkalische Phosphatase (AP)
 - 3. Leuzin-Aminopeptidase (LAP)

- d) *Erfassung der Integrität der Leberzellen:*
 - 1. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT bzw. AST)
 - 2. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT bzw. ALT)
 - 3. γ -Glutamyltransferase (γ -GT)
 - 4. Glutamatdehydrogenase (GLDH)
 - 5. Laktatdehydrogenase (LDH)

- e) *Erfassung von Tumoren:*
 - 1. Tumormarker (z.B. α 1-Fetoprotein, CEA)

- f) *Erfassung von akuten, chronischen und zurückliegenden Infektionen:*
 - 1. Virusserologie (anti-HBs, anti-HBc etc.)

- g) *Erfassung von immunologisch vermittelten Lebererkrankungen:*
 - 1. Nachweis von Auto-Antikörpern (LKM, SLA etc.)

Erfassung der Integrität der Leberzellen:

Fast alle Lebererkrankungen gehen mit einer Beeinträchtigung der Integrität der Leberzellen einher. Dabei kommt es zur Freisetzung von intrazellulären Enzymen in die Zirkulation. Die intrazellulären Enzyme AST, ALT und γ -GT eignen sich sehr gut als Screening-Parameter bei der Frage, ob eine Lebererkrankung vorliegt oder nicht. Bei negativem Ergebnis ist eine relevante Lebererkrankung unwahrscheinlich. Sind AST, ALT oder γ -GT erhöht, dann korreliert die Höhe des Anstieges mit dem Umfang der Leberzellschädigung.

Die membrangebundene γ -GT ist der empfindlichste Indikator bei Störungen des Leber- und Gallengangssystems. Höchste Werte finden sich bei Cholestasen und alkoholtoxischen Hepatitiden. Bei alkoholbedingten Leberschäden ist die γ -GT zumeist der empfindlichste Indikator und steigt als erstes an.

Die ALT ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, während sich die AST zu 70% in den Mitochondrien und nur zu 30% im Zytoplasma befindet. Ein ausschließlich mitochondriales Enzym ist die GLDH. Das Verhältnis zwischen AST und ALT kann genutzt werden, um die Schwere eines Leberschadens abzuschätzen. Dazu wird der de Ritis-Quotient gebildet (AST/ALT). Bei einem leichten Leberschaden steigt zunächst die membrangebundene γ -GT und die zytoplasmatische ALT an (de Ritis-Quotient < 1). Die Leberzellen weisen dabei zumeist nur eine Permeabilitätsstörung auf, sind aber noch vital. Bei schweren Leberzellschäden kommt es zusätzlich zu einer Schädigung der Zellorganellen und somit zu einer vermehrten AST- und GLDH-Freisetzung. Dadurch wird der de Ritis-Quotient > 1.

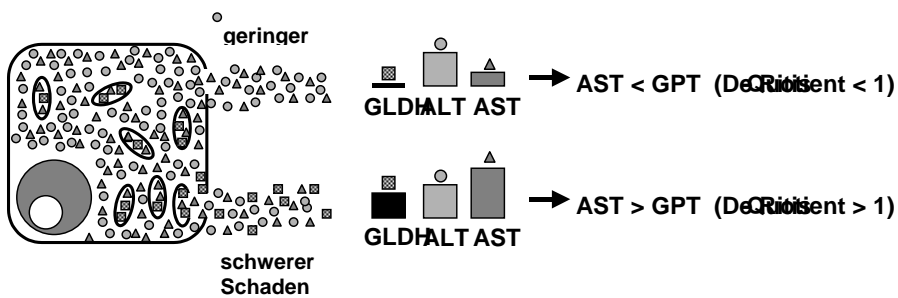


Abb. 1: Auswirkung der Verteilung der Leberenzyme in den Hepatozyten auf das Enzymmuster im Serum.

Da 30% der zellulären AST im Zytoplasma zu finden sind, kann es aber auch bei leichten Leberschäden zu milden AST-Anstiegen kommen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von AST (17 h) und ALT (47 h) sowie der Korrelation zwischen der Höhe des Enzymanstieges und dem Umfang der Schädigung eignen sich diese Parameter gut zur Verlaufsbeurteilung der verschiedensten Lebererkrankungen (Momentaufnahme).

Erfassung der Syntheseleistung der Leber:

Mit zunehmender Leberparenchymschädigung kommt es zu Einschränkungen der o.g. Leber-Teilfunktionen (Proteinsynthese, Entgiftungsleistung etc.). Die Proteinsynthese kann mittels Albumin-, CHE- und Quick-Wert-Bestimmung gut umschrieben werden. Auch die Eiweißelektrophorese ist ein sensitives Instrument, um Störungen der hepatischen Proteinsynthese anzuzeigen. Das Albumin steht quantitativ an erster Stelle der Serumproteine. Aufgrund seiner langen Halbwertszeit (HWZ: 15-20 Tage) reagiert es aber erst mit einer erheblichen zeitlichen Verzögerung. Zusätzlich wird die Albuminkonzentration stark von der Größe des plasmatischen Verteilungsraumes beeinflusst. Der plasmatische Verteilungsraum ist bei verschiedenen Lebererkrankungen sehr variabel, was zu Konzentrations- (z.B. Virushepatitis) bzw. Verdünnungseffekten (Leberzirrhose) führt und die Interpretation der Albuminwerte erschwert.

Die Cholinesterase wird ebenfalls von der Leber synthetisiert und steht in enger Korrelation mit der Synthese des Albumins und der Gerinnungsfaktoren. Aufgrund ihrer langen Halbwertszeit (HWZ 10 Tage) ist die CHE auch nicht zur Erfassung akuter Veränderungen geeignet. Bei allen chronischen Lebererkrankungen kommt es zu einer Verminderung der CHE (chron. Hepatitis, Zirrhose, Stauung). Ein stetes Absinken der CHE kann ein Hinweis auf ein sich ausbreitendes primäres Leber-Karzinom sein. Bei einer ausgeprägten Fettleber (meist alkoholbedingt) und beim Morbus Meulengracht (autosomal-dominant vererbte, nicht-hämolytische Hyperbilirubinämie, Störung des intrazellulären Bilirubintransportes und der Bilirubinkonjugation) kann die CHE erhöht sein.

Die Gerinnungsfaktoren II, V, VII, IX und X werden in der Leber gebildet. Bis auf Faktor V ist die Synthese Vitamin K-abhängig. Faktor VII (HWZ 2-5 h) und Faktor V (HWZ 10-15 h) sind sehr kurzlebig. Die Bestimmung der Gerinnungsfaktoren eignet sich daher gut, um die momentane Syntheseleistung der Leber zu erfassen. Da die Bestimmung der Einzelfaktoren sehr teuer ist und alle oben genannten Faktoren durch die Quick-Bestimmung erfasst

werden ist der Quick-Wert ein gutes diagnostisches Werkzeug zur Erfassung akuter Synthesestörungen.

Erfassung der Entgiftungsleistung der Leber:

Neben der Syntheseleistung ist die Entgiftungsfunktion der Leber von zentraler Bedeutung. Ist die Entgiftungsleistung der Leber beeinträchtigt, akkumulieren endogene, toxische Substanzen (z.B. Ammoniak, Bilirubin). Im Darm wird ständig in großer Menge Ammoniak aus Eiweiß gebildet und gelangt über die Vena portae in den Kreislauf. In der Leber wird der Ammoniak durch den Krebs-Zyklus zu Harnstoff entgiftet. Zu einem messbaren Anstieg des Ammoniaks kommt es erst nach einer starken Einschränkung der hepatischen Leistungsreserve. Eine besonders wichtige Rolle spielt die Ammoniak-Bestimmung bei der Diagnostik des Leberausfall-Komas.

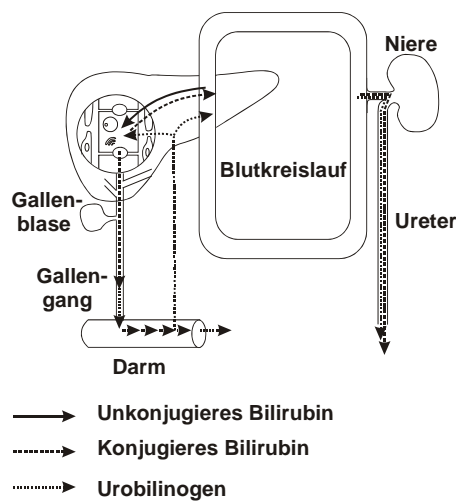


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung des Bilirubinstoffwechsels.

Ein weiterer Marker für die Entgiftungsleistung der Leber ist das Bilirubin. Bilirubin entsteht über mehrere Zwischenstufen aus dem Abbau von Hämoglobin. Dabei wird zunächst freies Bilirubin (Synonym: indirektes, unkonjugiertes, wasserunlösliches Bilirubin) gebildet. Durch Kopplung an Glukuronsäure in der Leber wird das primäre Bilirubin (Synonym: indirektes bzw. unkonjugiertes Bilirubin) in wasserlösliches, konjugiertes (Synonym: direktes) Bilirubin umgewandelt. Das konjugierte Bilirubin wird dann von den Leberzellen in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden und gelangt in den Darm. In der Gallenflüssigkeit und im Darm kommt es zur Bildung von Mesobilirubin, Mesobilinogen (=Urobilinogen) und Sterkobilinogen. Über den enterohepatischen Kreislauf gelangen Sterkobilinogen, Mesobilinogen, Sterkobilin und Mesobilin zurück in den Kreislauf und anschließend in den Urin. Bilirubin- und Urobilinogennachweis im Urin mittels Teststreifen eignen sich gut zum Screening.

Erhöhte Bilirubinwerte können durch prähepatische, hepatische und posthepatische Ursachen bedingt sein. Der prähepatische Ikterus ist durch einen vermehrten Anfall an unkonjugiertem (indirektem) Bilirubin aus untergegangenen Erythrozyten gekennzeichnet (erworbene und angeborene hämolytische Anämien). Ein posthepatischer Ikterus ist durch einen gestörten Galleabfluss (Cholezystitis, Gallengangssteine etc.) und/oder eine gesteigerte Urobilinogenbildung im Darm (Obstipation, Ileus, Enterokolitis) bedingt. Dabei kommt es zu einer gesteigerten Resorption von direktem Bilirubin und/oder einer gesteigerten Bildung und Resorption von Urobilinogen. Bei den

hepatischen Ursachen kommen Lebererkrankungen verschiedenster Genese in Frage. Die Exkretion des konjugierten Bilirubins sowie der Abbau des Urobilinogens sind dabei vermindert. Durch den reduzierten Abbau des Urobilinogens kommt es zu einer vermehrten Urobilinogenausscheidung über den Harn. Bei Vorhandensein von portokavalen Umgehungskreisläufen kommt es ebenfalls zu erhöhten Urobilinogen-Konzentrationen im Blut und Urin (z.B. bei Zirrhose, portaler Thrombose, Verschluss der V. hepatica). Pathologische Bilirubinwerte bedürfen in jedem Fall einer weiterführenden Abklärung. Dazu müssen direktes und indirektes Bilirubin im Serum gemessen werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Konstellationen bei prähepatischem, hepatischem und posthepatischem Ikterus.

Tabelle 1: Laborkonstellationen für die Differentialdiagnose des Ikterus.

	Prähepat. Ikterus	Hepat. Ikterus	Posthepat. Ikterus
direktes Bilirubin	n	+ bis ++	+ bis ++
indirektes Bilirubin	+ bis ++	n	n
AST	(+)	+++	(+) bis ++
ALT	n	+++	(+) bis ++
gamma-GT	(+)	+ bis ++	++ bis +++
Urin-Bilirubin	---	+	+
Urin-Urobilinogen	---	+	+

Legende: --- = fehlt (oder negativ) + = erhöht
n = normal ++ = sehr erhöht
(+) = schwach erhöht +++ = sehr stark erhöht

Erfassung von immunologisch vermittelten Lebererkrankungen:

Es gibt Erkrankungen der Leber, bei denen eine Reaktion des Immunsystems gegen hepatische Strukturen vorliegt (chronische Autoimmunhepatitis, primäre biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis). Eine solche Immunreaktion bedingt erhebliche Schäden am Leber-Gallengangs-System. In der Regel verlaufen diese Erkrankungen chronisch und führen zu einer progredienten Störung der verschiedenen Leberfunktionen. Häufig kommen derartige Erkrankungen im Zusammenhang mit anderen extrahepatischen Autoimmunerkrankungen vor (z.B. Autoimmunthyreoiditis, rheumatoide Arthritis, Vaskulitis, Vitiligo). Bei der Diagnostik autoimmunologischer Lebererkrankungen spielt der Nachweis von Autoantikörpern eine wichtige Rolle. Dabei muss man leberspezifische Autoantikörper wie LKM (Liver-Kidney-Microsome-AK = P450 Bestandteile) und SLA (Soluble Cytoplasmatic Liver-Cell Antigen = Zytokeratin) von nicht leberspezifischen Autoantikörpern wie SMA (Smooth Muscle Cell-AK), AMA (Anti-Mitochondrial-AK), ANA (Anti-Nuclear-AK) und ANCA (Anti-Neutrophilic-Cytoplasmatic-AK) unterscheiden. Die verschiedenen Autoantikörper kommen in verschiedenen Kombinationen bei den verschiedenen Erkrankungen vor. Dabei kommt es aber häufig zu Überlappungen, so dass das Vorkommen der verschiedenen Antikörper kein absolut spezifisches Kriterium ist. Hier muss zusätzlich der histologische Biopsie-Befund zur Diagnosestellung herangezogen werden.

Chronische Autoimmunhepatitis (CAH): SLA (SLA-positive CAH), LKM-1(LKM-1-positive CAH, DD: LKM-1-positive Hepatitis C), SMA und ANA's (klassische lupoide CAH), bei > 90% der Fälle finden sich spezifische Autoantikörper.

Primär biliäre Zirrhose (PBC): AMA > 95% der Fälle (4 Subtypen, AMA-2 spezifisch für PBC), Antikörper gegen Gallengänge

Primär sklerosierende Cholangitis (PSC): ANCA mit perinukleärem (p-ANCA) oder atypischem (x-ANCA) Muster in 80% d. Fälle positiv.

X.2.4 Analytik

Beim labordiagnostischen Nachweis der oben genannten Parameter des Leberstoffwechsels ist die Unterteilung in Enzyme (AST, ALT, γ -GT, Gerinnungsfaktoren etc.), nichtenzymatische Proteine (Albumin), Immunglobuline (SLA, LKM etc.) und niedermolekulare Substanzen (Ammoniak, Bilirubin) hilfreich. Während Proteine wie Albumin mittels eines spezifischen Antikörpers im Nephelometer (Trübungsreaktion) oder photometrisch (Bromkresolgrün-Methode) nachgewiesen werden können, analysiert man Autoantikörper mittels Immunfluoreszenz oder ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Assay). Enzyme hingegen werden meist mittels kinetischer Nachweisverfahren analysiert.

Da enzymatische Testverfahren in der Labormedizin weit verbreitet sind und eine korrekte Befundinterpretation nur bei entsprechendem Hintergrundwissen möglich ist, wird im Folgenden etwas näher auf die Enzymbestimmung mittels kinetischer Teste eingegangen.

Die enzymatische Aktivität eines Moleküls ist immer gleich. Folglich entspricht die Enzymaktivität einer Probe der Enzymkonzentration. Als Maß der Enzymaktivität kann der Substratumsatz pro Zeiteinheit (dS/dt) oder die Zunahme des Produktes (dP/dt) herangezogen werden. Je nach Grad der Substratsättigung unterscheidet man Reaktionskinetiken 1. Ordnung (Substratmangel, Substratmenge ist geschwindigkeitsbegrenzend) von Kinetiken 0. Ordnung (Substratüberschuss, Enzymmenge ist geschwindigkeitsbegrenzend) (Abbildung 3). Zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms im Blut gibt man in der Regel einen Substratüberschuss zur Probe, um eine Reaktionskinetik 0. Ordnung zu erhalten.

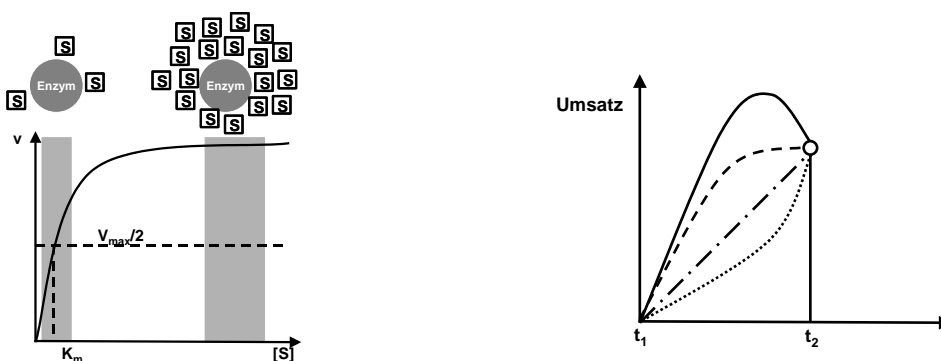


Abbildung 3: Verlauf einer Enzymreaktion gemessen an der Reaktionsgeschwindigkeit (v) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration [S]. **Abbildung 4: Mögliche Zeit-Umsatz-Kurven bei einer Zweipunktmessung**

Die Enzymaktivität wird anhand des Konzentrationsunterschiedes von Substrat oder Produkt an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten erfasst (Zweipunktmessung). Die Bestimmung von Substrat oder Produkt an nur zwei Zeitpunkten ermöglicht allerdings keine Beurteilung der Reaktionskinetik. Abbildung 4 zeigt einige mögliche Kurventypen. Obwohl alle Enzyme unterschiedliche Aktivitäten haben, kommt man mit einer Zweipunktmessung zu identischen Ergebnissen. Zur Vermeidung derartiger Fehler kann z.B. eine Verdünnung der Probe erfolgen. Dadurch versucht man, möglichst in den linearen Bereich der Zeit-Umsatz-Kurve zu gelangen. Moderne Analysegeräte überwachen den Reaktionsverlauf engmaschig, erkennen derartige Fehler und verdünnen oftmals bereits automatisch. Die Zeitspanne zwischen den Messzeitpunkten richtet sich nach der Enzymmenge und der enzymatischen Aktivität. Es gilt die Regel: so kurz wie möglich, so lang wie nötig. Das Messergebnis wird in Units (U) angegeben. $1U = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$.

Zur Messung des Umsatzes benötigt man Substanzen, deren Konzentrationsänderungen in einem optischen System gut messbar sind. Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) ist eine Substanz, deren Absorptionsspektrum sich bei Oxidation bzw. Reduktion ändert (Abbildung 5). Reduziertes NAD (NADH_2) absorbiert stark zwischen 300 und 370 nm (Maximum 340 nm). Durch Messung der Absorption bei einer geeigneten Wellenlänge (334, 340 oder 365 nm) kann die Oxidation bzw. Reduktion verfolgt werden.

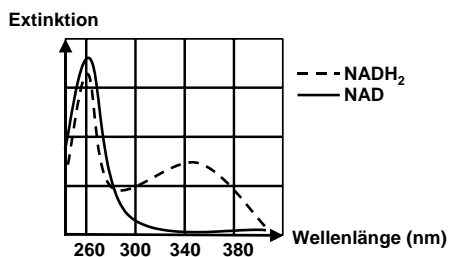
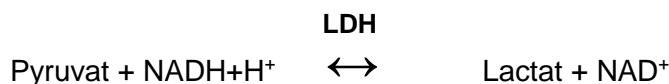


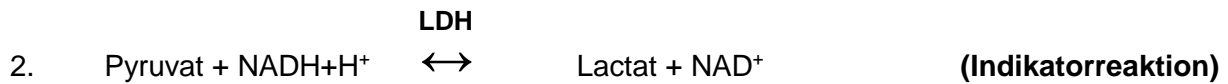
Abbildung 5: Absorptionsspektrum von NAD und NADH_2 .

Einige Enzyme wie die Laktatdehydrogenase (LDH) benötigen als Co-Substrat NAD bzw. NADH_2 . Die Aktivität dieser Enzyme kann direkt durch Zugabe von Substrat, Enzym und Coenzym gemessen werden. Solche Teste werden als einfache optische Teste bezeichnet.

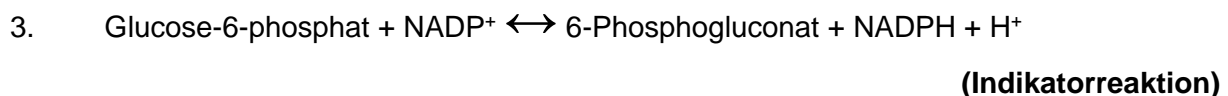
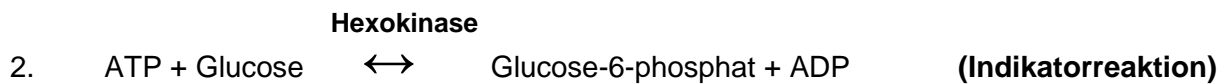


Nicht jedes Enzym reagiert mit dem Nicotinamid-Coenzym. Häufig ist jedoch die NAD/ NADH_2 -Indikatorreaktion mit der Messreaktion koppelbar. Dies ist z.B. bei der ALT der Fall. Wenn das Substrat der Messreaktion sowie das Enzyme und etwaige Coenzyme der Indikatorreaktion im Überschuss vorliegen, hängt der Umsatz ausschließlich von der Enzymmenge (-aktivität) der Messreaktion ab. Solche Testsysteme werden als optischer Test mit Indikatorreaktion bezeichnet.





Gelegentlich ist das Endprodukt einer Messreaktion nicht direkt mit einer Indikatorreaktion koppelbar. In diesem Fall muss eine Hilfsreaktion dazwischen geschaltet werden, die sich mit einer entsprechenden Indikatorreaktion kombinieren lässt. Die Enzyme und Co-Enzyme von Hilfs- und Indikatorreaktion müssen zusammen mit dem Substrat der Messreaktion im Überschuss vorliegen. Dann hängt der Umsatz pro Zeiteinheit ausschließlich von der Enzymmenge (-aktivität) der Messreaktion ab. Ein Beispiel hierfür ist die Bestimmung der Creatinkinase (CK).



X.3 Pankreas

IX.3.1 Allgemeines

Das Pankreas ist ein exokrin und endokrin aktives Organ. Unter den endokrinen Funktionen steht die Insulinsynthese und -sekretion an erster Stelle. Die exokrine Pankreasfunktion beinhaltet die Sekretion von täglich etwa 1,5 l alkalischem Pankreassekret. Darin sind neben Wasser, Chlorid und Bikarbonat zahlreiche Verdauungsenzyme enthalten. Die proteolytischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Carboxypeptidase werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) sezerniert und durch in der Darmwand gebildete Enzyme aktiviert. Dieser Mechanismus verhindert eine Verdauung körpereigenen Gewebes. Amylase und Lipase sind nicht in der Lage, körpereigenes Gewebe anzugreifen und werden deshalb in aktiver Form in das Pankreassekret abgegeben. Durch Kontakt der Duodenalschleimhaut mit HCl, Gallensäuren und Nahrungsmittel kommt es zur Freisetzung von Sekretin (stimuliert das Pankreas zur Freisetzung von Wasser und Bikarbonat) und Pankreozymin (stimuliert die Enzymsekretion).

Symptome einer Maldigestion treten erst ab einem 90%igem Ausfall der exokrinen Pankreasfunktion auf. Während Pankreatitiden die endokrine Pankreasfunktion mitbetreffen können, gehen Störungen der endokrinen Pankreasfunktionen in der Regel nicht mit einer Beeinträchtigung der exokrinen Pankreasfunktion einher.

Die diagnostischen Verfahren des Pankreas untergliedern sich in bildgebende Verfahren (Sonographie, CT, ERCP, Biopsie), Labordiagnostik (Lipase, Pankreasamylase, Pankreas-

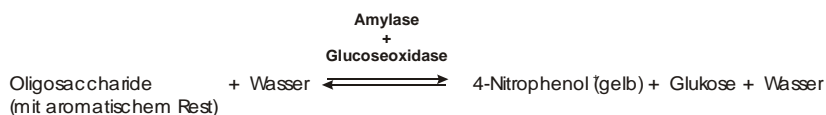
Elastase-1), Funktionsteste (Sekretin-Pankreozymin-Test, Fluorescein-Dilaurat-Test, Chymotrypsin und Elastase im Stuhl) und bakteriologische Untersuchungen. Im Folgenden möchten wir näher auf die Labordiagnostik der Pankreaserkrankungen eingehen. Störungen des endokrinen Pankreas werden an anderer Stelle in diesem Skript besprochen.

X.3.2 Labordiagnostik

Aus labormedizinischer Sicht ist die Pankreatitis-Diagnostik von besonderer Bedeutung. Die Ursachen der akuten Pankreatitis sind vielfältig. Gallenwegserkrankungen (45%) und Alkoholabusus (35%) stehen an erster Stelle. Andere Auslöser wie Infektionen, Bauchtraumen, massive Hypertriglyceridämien, Medikament und hereditäre Ursachen sind selten. In Anbetracht der genannten Ursachen ergibt sich die Notwendigkeit, hepatische (z.B. AST, ALT, CHE Albumin etc.) und cholestatische (γ -GT, LAP) Laborparameter in die Pankreatitidiagnostik einzubeziehen. Diese werden kombiniert mit der Messung der Amylase und Lipase im Serum. Zusätzlich sollten die allgemeinen Entzündungsparameter CRP und Leukozytenzahl hinzugezogen werden.

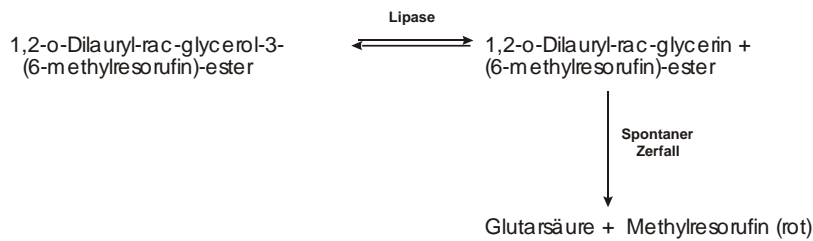
Die α -Amylase wird im sekretorischen Epithel von Pankreas (40%) und Mundspeicheldrüsen (60%) gebildet und ist deshalb nicht pankreasspezifisch. Neunundneunzig Prozent der α -Amylase werden beim Gesunden in den Intestinaltrakt abgegeben. Bei Abflussstörungen oder Entzündungen kommt es zu einem vermehrten Übertritt der Amylase in die Zirkulation. Der Anstieg der Amylaseaktivität im Blut reflektiert dabei nicht die Schwere der Erkrankung, korreliert aber mit der Krankheitsaktivität. Es ist wichtig zu wissen, dass die Pankreasamylase erst 1-2 Monate nach Geburt im Blut erscheint und der Referenzbereich Erwachsener etwa mit dem 5. Lebensjahr erreicht wird. Um die diagnostische Spezifität zu erhöhen, ist man inzwischen von der Messung der totalen α -Amylase zur direkten Bestimmung der Pankreasamylase übergegangen. Dies geschieht, indem man die Aktivität der Speicheldrüsenamylase durch zwei monoklonale Antikörper hemmt und anschließend die verbleibende Amylase-Aktivität misst.

Die quantitative Bestimmung der Amylase-Aktivität erfolgt durch die enzymatische Spaltung eines Oligosaccharid-Substrates. Dabei wird 4-Nitrophenol, ein gelbes Chromophor, freigesetzt. Die Extinktionszunahme je Minute bei 405 nm ist der Amylaseaktivität proportional.



Die humane Pankreaslipase ist ein organspezifisches Enzym, das Triacylglyceride bei pH 8,8-9,2 hydrolysiert. Es wird wie Amylase im sekretorischen Epithel des Pankreas synthetisiert und zu 99% in den Intestinaltrakt abgegeben. Die Messung der Lipaseaktivität war lange Zeit ein methodisches Problem. Zunächst setzte man eine titrimetrische Methode ein, bei der das Substrat Triolein unter Abspaltung von H^+ -Ionen in Diolein und Fettsäureanionen gespalten wird. Die freiwerdenden H^+ -Ionen werden mit 0,01 M Natronlauge neutralisiert und der Verbrauch an Natronlauge bestimmt. Bei Substratüberschuss entspricht der Verbrauch an Natronlauge der Lipaseaktivität. Später wurde dann eine turbidimetrische Methode entwickelt, bei der die Abnahme der Trübung in der Substratlösung gemessen wurde. Diese Methode ist jedoch außerordentlich unempfindlich. Beide Methoden sind für den Einsatz in einem klinisch-chemischen Großlabor ungeeignet. Mittlerweile ist man dazu übergegangen synthetische Substrate einzusetzen, die

während des enzymatischen Abbaus einen Farbstoff freisetzen, der photometrisch gemessen wird.



X.4 Fragen zur Lernevaluation

1. Welche pathobiochemischen Reaktionen der Leber gibt es und was fordern Sie im Labor an?
2. Wie unterscheiden sich akute und chronische Pankreatitis? Welche Rolle spielt das CRP (C-Reaktive Protein), welche Rolle spielt der Alkoholkonsum?
3. Was sind Isoenzyme (Erklärung am Beispiel der Amylase)?
4. Bei einem Patienten mit Verdacht auf akute Hepatitis erhalten Sie folgende Laborbefunde:
AST und ALT sehr stark erhöht, GLDH und Bilirubin (gesamtes und direktes) gering erhöht sowie GGT und AP leicht erhöht. Welche pathophysiologischen Ursachen erklären diese Befundkonstellation am ehesten?
5. Welche Parameter sind geeignet, um die Schwere eines Leberschadens abzuschätzen?
6. Welche Ikterus-Typen gibt es und wie unterscheiden sie sich anhand der Laborkonstellationen?

XI Kohlenhydratstoffwechsel

XI.1 Lernziele

1- Diagnostik

Neben den typischen Symptomen, Alter, familiärer Vorbelastung und Risikofaktoren (Übergewicht, Schwangerschaft, etc) - benötigen Sie für die Diagnostik, Screening, oder bei Verdacht auf Diabetes mellitus auch Labormarker:

- Nüchtern-Plasma-Glucose ≥ 126 mg/dl
- Nichtnüchtern-Plasma-Glucose ≥ 200 mg/dl. Dies muss mittels nüchtern-Plasma-Glucose bestätigt werden.
- Bei grenzwertigen nüchtern-Plasma-Glucosewerten (110-125 mg/dl): Plasma-Glucose 2 h nach oGTT Glucose ≥ 200 mg/dl
- Empfohlen wird die HbA1c%-Bestimmung für die Bestätigung der Erstdiagnose: $\geq 6,5\%$ (≥ 48 mmol/mol). HbA1c% 5,7-6,4% ist grenzwertig (Risikogruppe).
- Ggf. Auto-Antikörper oder C-Peptide, um DM Typ 1 und 2 unterscheiden zu können

Die Labor-Diagnostik sollte nach einem Zeitabstand wiederholt werden (auch ohne Symptome):

- Bei Risikogruppen: Familiäre Belastung, Risikofaktoren (Übergewicht, Schwangerschaft, Alkoholismus, weitere KHK-Risikofaktoren [Hypertonie, Hyperlipidämie mit \downarrow HDL-Cholesterin]).
- Wenn Plasma-Glucose nach oGTT 140-199 mg/dl ist.
- Bei erstmaligem HbA1c%-Wert von 5,7-6,4%.

HbA1c% ist für Erstdiagnostik in der Schwangerschaft nicht geeignet!

2- Monitoring bei Diabetikern

- Nüchtern Plasma Glucose ≥ 126 mg/dl
- HbA1c% Bestimmung: Zielwerte $< 6,5\%$

HbA1c% nicht unnötig in kurzen Zeitabständen (6-8 Wochen) anfordern!
oGTT darf nicht bei Diabetikern durchgeführt werden!

3- Weitere Risikofaktoren regelmäßig kontrollieren

bei DM Typ 2:

Nierenfunktionsmarker: Kreatinin, Cystatin C, Albuminurie

Lipoproteinstoffwechsel: Cholesterin, Triglyceride, HDL-C, LDL-C

bei jüngeren Patienten mit DM Typ 1:

Nierenfunktionsmarker: Kreatinin, Cystatin C, Albuminurie

4- Diagnose ist nicht gleich Therapie

XI.2 Einleitung

Der Diabetes mellitus ist von der WHO als ein Zustand der chronischen Hyperglykämie definiert. Der Diabetes mellitus ist ein Syndrom heterogener Krankheitsbilder und die Hyperglykämie, die zu seiner Diagnose führt, kann aus einer Vielfalt von Erkrankungen und Störungen resultieren. Ursachen der Hyperglykämie sind ein absoluter oder relativer Insulinmangel oder eine ungenügende Insulinwirkung an der Zelle (Insulinresistenz).

XI.3 Klassifikation des Diabetes mellitus

Die klinische Klassifikation des Syndroms Diabetes mellitus erfolgt nach den Empfehlungen der WHO. Die neue Klassifikation orientiert sich an ätiologischen Gesichtspunkten und verläßt die frühere, vorwiegend an der Therapie ausgerichtete Einteilung. Auf diese Weise werden die Begriffe wie IDDM (Insulin Dependent Diabetes Mellitus) und NIDDM (Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus) eliminiert und ausschließlich durch die Bezeichnungen Typ-1- beziehungsweise Typ-2-Diabetes ersetzt.

Es wird die Unterteilung des Typ-1-Diabetes in eine immunologisch bedingte Form (1 A) und eine idiopathische Form (1 B) vorgeschlagen.

Der Begriff der gestörten Glucosetoleranz (Impaired Glucose Tolerance; IGT) dient zur Beschreibung des Ausmaßes der Hyperglykämie oder des Stadiums der Erkrankung. Davon unberührt bleibt die Rolle der gestörten Glucosetoleranz als Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus und für makrovaskuläre Erkrankungen.

Der Begriff „abnorme Nüchtern glukose“ (Impaired Fasting Glucose; IFG) ist Äquivalent zur gestörten Glucosetoleranz.

Klassifikation des Diabetes mellitus

- I. Diabetes mellitus Typ 1 (β -Zellzerstörung, die zum absoluten Insulinmangel führt)
 - A. Immunologisch bedingt
 - B. Idiopathisch

- II. Diabetes mellitus Typ 2 (reicht vom Vorwiegen der Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zum Vorwiegen des Sekretionsdefizits mit Insulinresistenz)

- III. Andere Diabetestypen mit bekannten Ursachen
 - A. Genetische Defekte der β -Zellfunktion des Pankreas
 - B. Genetische Defekte der Insulinwirkung
 - C. Erkrankung des exokrinen Pankreas
 - D. Endokrinopathie
 - E. Medikamentös-toxisch induziert
 - F. Infektionen
 - G. Immunologisch bedingte Formen
 - H. Andere, manchmal mit Diabetes assoziierte Syndrome

- IV. Gestationsbedingte Diabetes mellitus

XI.4 Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus

Die Diagnose eines Diabetes mellitus kann anhand der Nüchternplasmaglukose oder des 2h-Plasmaglukosewertes beim oralen Glucose-Toleranz-Test (OGTT) gestellt werden. Die Grenzwerte sind im Plasma für den Glucose-Nüchternwert ≥ 126 mg/dl und für den 2h-Wert im OGTT ≥ 200 mg/dl festgesetzt worden.

Die Diagnose eines Diabetes darf nur mit Glucosewerten gestellt werden, die mit einer qualitätskontrollierten Labormethode gemessen wurden. Geräte zur Blutzuckerselbstmessung (oder sog. POCT-Geräte) eignen sich hierfür unter keinen Umständen. Die Messung sollte möglichst im venösen Plasma erfolgen. Für weitere Materialien ergeben sich ggf. andere Referenz- bzw. Grenzwerte.

Zusammenfassung der Diagnostischen Kriterien des Diabetes mellitus

Trotz derzeit noch kritischer Diskussion, wurde mit der Umsetzung der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Diabetologie aus dem Jahre 2010 erstmals der HbA1c-Wert als diagnostisches Kriterium zugelassen. Ausgehend von einem erhöhten Diabetes-Risiko (Bestimmung des Diabetes Risiko Test; DRT) und/oder Symptomen des Diabetes gilt:

- HbA1c-Wert $> 6,5$ % bzw > 48 mmol/mol stellt die Diagnose Diabetes mellitus.
- HbA1c-Wert $< 5,7$ % bzw < 39 mmol/mol Ausschluß eines Diabetes mellitus.
- Gelegenheits-Plasmaglukose ≥ 200 mg/dl / $11,1$ mmol/l zu einem beliebigen Zeitpunkt des Tages (ohne Rücksicht auf den Zeitpunkt der letzten Mahlzeiteinnahme).
- Nüchtern- Plasmaglukose ≥ 126 mg/dl / $7,0$ mmol/l
- 2h-Plasmaglukose ≥ 200 mg/dl / $11,1$ mmol/l während eines OGTT. Testdurchführung nach WHO-Richtlinien mit 75 g Glucose aufgelöst im Wasser.

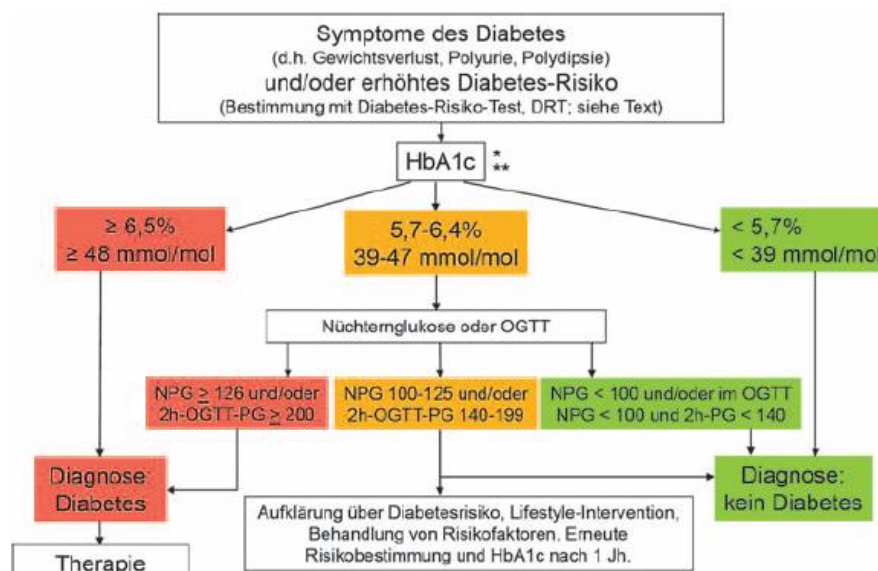


Bild aus DDG-Leitlinien 2010

XI.5 Labor-Diagnostik des Diabetes mellitus

Die Bestimmung der Glucose kann im kapillären oder venösen Vollblut sowie im Plasma oder Serum erfolgen. Ggf. jeweils eigene Referenzbereiche sind zu beachten.

A) Blutglucose

a) Nüchternglucose

b) Oraler Glucose-Toleranz-Test

Der orale Glucose-Toleranz-Test (oGTT) dient der Beurteilung der Glucosetoleranz unter standardisierten Stimulationsbedingungen.

Indikation:

Grenzwertige Nüchternblutzuckerwerte
 Glucosurie ohne Hyperglykämie
 V.a. postprandiale reaktive Hypoglykämie
 Schwangerschaftskomplikationen unklarer Ursache

Testdurchführung (nach WHO-Empfehlung):

Patienten innerhalb von 5 min eine Lsg. von 75 g Glucose oder Oligosacchariden in 300 ml Wasser trinken lassen.
 Blutglucosebestimmung nach 2 h. (Bei V.a. renale Glucosurie: nach Blutglucoseabnahme zusätzlich frisch gelassenen Urin auf Glucose testen.)

Bewertung 2 h-Blutglucose (nach DDG-Kriterien):

Normale Glucose-Toleranz	< 140 mg/dl	(< 7,8 mmol/l)
pathologische Glucose-Toleranz	140-199 mg/dl	(7,8 – 11,0 mmol/l)
Diabetes mellitus	≥ 200 mg/dl	(≥ 11,1 mmol/l)

c) HbA_{1c}

HbA_{1c} ist ein Hämoglobinderivat, das durch nichtenzymatische Reaktion von Glucose mit dem N-terminalen Valin der β -Kette des Hämoglobins entsteht. Es kommen auch Glykierungen von ϵ -Aminogruppen von Lysinresten vor, die von den meisten Analyseverfahren jedoch nicht erfaßt werden. HbA₁ umfaßt demgegenüber auch Glykierungsprodukte mit anderen Hexosen. Als Glykohämoglobin wird eine Mischung von Hämoglobinderivaten bezeichnet, die an unterschiedlichen Aminosäuren glykiert sind. Der Anteil des glykierten Hämoglobins korreliert mit Höhe und Dauer hyperglykämischer Stoffwechsellagen. Da die Glykierung irreversibel ist, wird glykiertes Hämoglobin erst mit dem Abbau der Erythrozyten aus dem Blut eliminiert (Blutglucosegedächtnis). Aufgrund der HWZ (ca. 120 d) der Erythrocyten erfaßt man mit dem HbA_{1c}-Wert rückwirkend einen Zeitraum von 4-6 Wochen.

Indikation:

Verlaufskontrollen
 Nach Therapie-Umstellung oder Stoffwechsellentgleisung (nach ca.2 Wochen)
 Unterstützung der Primärdiagnose des Diabetes mellitus

Untersuchungsmaterial:

EDTA-Blut, Heparin-Blut

Bewertung:

Mittlerweile wurde die Messung des HbA_{1c} international auf den sog. IFCC-Standard umgestellt. Dieser wird in der Einheit mmol/mol angegeben. Um weiterhin auch mit den noch gebräuchlichen %-Einheiten abreiten zu können, werden meist beide Werte/Einheiten angegeben.

HbA _{1c} -Referenzbereich bei Nicht-Diabetiker	< 5,7 % / 39 mmol/mol
HbA _{1c} -Zielwerte zur Diabeteseinstellung	≤ 7 % / 53 mmol/mol (optimal)
	≤ 8 % 64 mmol/mol (gut)
	> 8 % (therapiebedürftig)

d) Insulin, C-Peptid

In den β-Zellen der Langerhansinseln des Pankreas wird Proinsulin gebildet, das überwiegend in Insulin und C-Peptid gespalten wird. Insulin wird von der Leber aufgenommen und hat eine HWZ von ca. 5 Min. Die HWZ von Proinsulin und C-Peptid sind wesentlich länger.

Bei Insulinomen besteht eine autonome, auch unter Nahrungskarenz fortbestehende, endogene Insulinsekretion, die meist zu einer symptomatischen Hypoglykämie führt. Gegenüber den oft nicht eindeutig interpretierbaren Nüchtern-Blutspiegeln von Insulin und C-Peptid können Funktionsteste (z.B. Hungerversuch) eine verbesserte Aussage ergeben. Entdifferenzierte (maligne) Insulinome sezernieren häufig zusätzlich ein weiteres Hormon z.B. Gastrin, ACTH, Glucagon, Somatostatin, 5-Hydroxytryptamin, pankreatische Peptide, HCG. Andererseits können Insulinome auch zusammen mit anderen hormonproduzierenden Tumoren im Rahmen eines MEN-1-Syndrom (Multiple Endokrine Neoplasie 1) auftreten.

Indikation

V.a. Insulinom, V.a. Hypoglykämia factitia

Untersuchungsmaterial

Serum. (Patient 10-12 Std. nüchtern)

Bestimmungsmethode

Immunoassays

Bewertung

Insulin- und C-Peptidspiegel verhalten sich biologisch gleichsinnig. Unterschied beruhen auf den unterschiedlichen HWZ. Insulin und C-Peptid sind nur in Verbindung mit der korrespondierenden Blutglucosekonzentration beurteilbar.

Diagnose	Insulin	C-Peptid	Sulfonylharnstoff-Nachweis
Insulinom	n-↑	n-↑	negativ
Hypoglykämie factitia durch exogene Insulin	↑↑	↓	negativ
Hypoglykämie factitia durch Sulfonylharnstoff	↑	↑	positiv

d) Blutglucose-Selbstkontrolle

Ein Meßverfahren zur Selbstkontrolle durch den Patienten beruht auf der reflexionsphotometrischen Messung der Farbentwicklung eines Chromogens, aufgrund der Oxidation durch H_2O_2 . Letzteres entsteht durch Umsetzung von Glucose mittels Glucoseoxidase bzw. -peroxidase auf einen Teststreifen.

B) Uringlucose

Das Ausmaß der Glucosurie ist das Resultat aus der glomerulären Filtration und tubulären Reabsorption von Glucose. Bis zu einer Blutglucosekonzentration von 160-180 mg/dl (8,9-10,0 mmol/l), auch als Nierenschwelle bezeichnet, wird die glomerulär filtrierte Glucose tubulär resorbiert. Bei Glucosewerten oberhalb der Nierenschwelle kommt es zur Glucosurie und die Glucoseausscheidung ist indirekt ein Maß der Hyperglykämie. Der Nachweis einer Glucosurie ist deshalb verdächtig auf das Vorliegen eines Diabetes mellitus und jede Glucosurie bedarf der Abklärung.

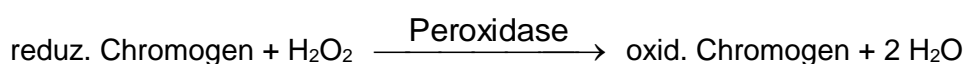
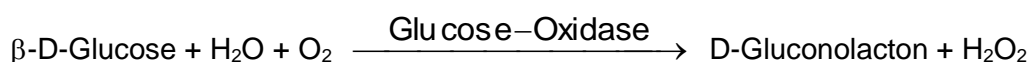
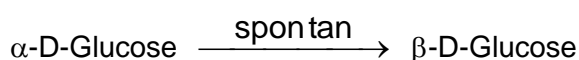
Die qualitative oder semiquantitative Bestimmung im Harn (Spontanharn oder Harn aus definierten Sammelperioden) erfolgt mit Reagenzträger-Methoden:

Das Reaktionsprinzip ist die Glucoseoxidase/Peroxidase-Reaktion mit Tetramethylbenzidin als Redoxindikator. Die Farbreaktion wechselt von gelb nach grün in Abhängigkeit der Glucosekonzentration der Probe. Andere Streifentests verwenden anstatt Tetramethylbenzidin ein Kaliumjodid-haltiges-Chromogen, das bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation mit zunehmender Glucosekonzentration einen Farbwechsel von grün nach braun zeigt. Bei den semiquantitativen Tests kann aus der sich ergebenden Farbe des Testfeldes die Höhe der Glucosekonzentration in g/l abgelesen werden.

XI.6 Bestimmungsmethoden der Glucose

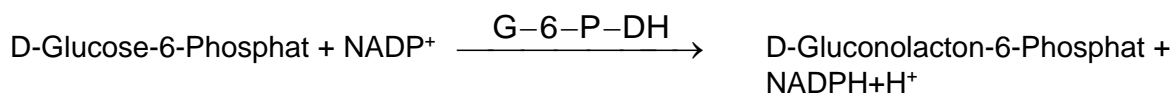
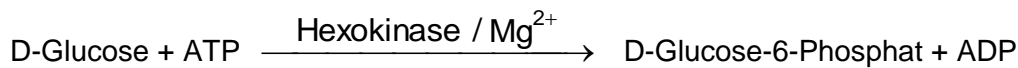
A. Glucoseoxidase-Methoden

Das Enzym Glucoseoxidase katalysiert die Oxidation von Glucose zu Gluconsäure und H_2O_2 . In der nachfolgenden Peroxidase-vermittelten Indikatorreaktion oxidiert H_2O_2 reduziertes Chromogen unter Bildung eines Farbkomplexes, der photometrisch gemessen wird. Die Farbintensität des Ansatzes ist proportional der Glucosekonzentration. Diese Methode wird beim Streifen-Test eingesetzt.



B. Hexokinase-Methoden

Glucose wird in Anwesenheit von Hexokinase mit ATP zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Dies reagiert mit NADP unter Bildung von 6-Phosphogluconat und NADPH₂. Die Reaktion wird durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) katalysiert. Meßgröße ist NADPH₂, die NADPH₂-Zunahme wird bis zum Stillstand der Reaktion gemessen. Die ermittelte Extinktionszunahme ist proportional der Glucosekonzentration im Testansatz.



XI.7 Fragen zur Lernevaluation

1. Bei einem 12-jährigen Mädchen (160 cm, 68 kg, ohne Vorgeschichte oder Symptome) messen Sie 2 St. nach der Mahlzeit (2 Scheiben Weisbrot, 1 Ei, 120 g Käse 45% Fett, 250 ml Cola, 1 Stück Kuchen) einen Blutzucker von 220 mg/dl. Ist dieser Wert normal? An was denken Sie? Wie gehen Sie weiter damit um?
2. Patienten mit dem Metabolischen Syndrom (Syndrom X: ↓ HDL-C, Hypertonie, Übergewicht, Diabetes) haben erhöhte KHK Morbidität und Mortalität. Welche Labormarker würden Sie regelmäßig kontrollieren?
3. Bei Patienten mit Typ 2 Diabetes: was sagt ein positiver Ketonkörper-test im Urin aus?
4. Bei Probanden ohne Diabetes: was sagt ein positiver Ketonkörper-test im Urin aus?
5. Bei einem nüchtern Blutzuckerwert von 150 mg/dl: wie wahrscheinlich findet man im Urintest erhöhte Zuckerwerte?
6. Eine schwangere Frau (35 SSW) hat bereits 16 kg zugenommen seit der Konzeption. Plasma-Glucose war 120 mg/dl (ohne Vorgeschichte), oGTT in der 22 SSW war nicht eindeutig pathologisch. Sie finden zufällig (+) für Glucose im Urinteststreifen. Ist das ein Hinweis für Gestationsdiabetes? Wie klären Sie das weiter ab?

XII Lipidstoffwechsel

XII.1 Lernziele

1) Beschreiben Sie den endogenen und exogenen Lipoproteinstoffwechsel

Berücksichtigen Sie hier insbesondere die Funktionen der Lipoproteinlipase und des Apolipoprotein C-II.

2) Benennen und beschreiben Sie Methoden der Lipoproteinanalytik

Berücksichtigen Sie dabei die Methoden a) Ultrazentrifugation b) LDL-Berechnung nach Friedewald, c) homogener Test für LDL- und HDL-Cholesterin, d) Lipidelektrophorese

3) Welche Funktion haben HDL-Partikel.

Berücksichtigen Sie dabei die Rolle des Apolipoprotein A-I und des LCAT-Enzyms

4) Beschreiben Sie die Klassifikation der Hyperlipoproteinämien nach Fredrickson

Die Klassifikation nach Fredrickson ist weitestgehend eine phänotypische Beschreibung. Die Einteilung hat heute klinisch an Bedeutung verloren, ist aber didaktisch immer noch wertvoll.

5) Beschreiben Sie das Krankheitsbild, die klinischen Zeichen und den molekularen Defekt der familiären Hypercholesterinämie.

Die familiäre Hypercholesterinämie ist die am besten molekular charakterisierte primäre Hyperlipoproteinämie.

6) Beurteilung des individuellen Atheroskleroserisikos

Bei der Beurteilung des individuellen Risikos ist das gesamte Risikoprofil eines Patienten zu beurteilen. Dies geschieht anhand mathematischer Modelle, den sogenannten Risiko-Scores.

XII.2 Biochemie

Die Nomenklatur der Lipoproteinklassen beruht auf zwei Trennverfahren: der Ultrazentrifugation und der Agarosegelelektrophorese. Die Einteilung nach Dichte hat sich heute weitestgehend durchgesetzt. Man kann nach steigender Dichte Chylomikronen ($d < 0,95$ g/ml), very low density Lipoproteine (VLDL; $d < 1,006$ g/ml), low density Lipoproteine (LDL; $d = 1,006-1,063$ g/ml) und high density Lipoproteine (HDL; $d = 1,063-1,210$ g/ml) unterscheiden (Abb.1). Die Lipoproteine haben eine kugelige Struktur. Im Zentrum der Partikel finden sich die hydrophoben Bestandteile, Triglyzeride und Cholesterinester, auf der Oberfläche sind die hydrophileren Bestandteile, Proteine (hier Apolipoprotein genannt), Phospholipide und freies Cholesterin.

Der Lipoproteinstoffwechsel unterteilt sich in einen exogenen und endogenen Stoffwechselweg.

Exogener Lipoproteinstoffwechsel

In den Enterozyten der Darmwand werden die Chylomikronen gebildet. Die Chylomikronen sind riesige, triglyzeridreiche Lipoproteinpartikel. Vor Abgabe der Chylomikronen in die Zirkulation werden die Apolipoproteine B-48, C-II und E in die Oberfläche eingefügt. Das Apolipoprotein B-48 ist ein wichtiges Strukturprotein und vermittelt die Lipidlöslichkeit. Chylomikronen werden durch Hydrolyse der Triglyzeride abgebaut. Die Hydrolyse der Triglyzeride erfolgt durch die Endothel-gebundene Lipoproteinlipase. Enzymatischer Cofaktor der Lipoproteinlipase ist das Apolipoprotein C-II. Nach Hydrolyse bleibt ein Triglyzerid-veramter Chylomikronen-Remnant Partikel übrig. Über den Apolipoprotein E Liganden bindet der Chylomikronen-Remnant Partikel an den Chylomikronen-Remnant Rezeptor der Leber und wird von der Leberzelle aufgenommen.

Endogener Lipoproteinstoffwechsel

In der Leber werden die Triglyzerid-reichen VLDL-Partikel gebildet. In der Oberfläche der Lipoproteinpartikel befinden sich u.a. die Apolipoproteine E, B-100 und C-II. Die Triglyzeride in den VLDL-Partikeln werden wiederum durch die Endothel-gebundene Lipoproteinlipase und ihrem Cofaktor Apolipoprotein C-II gespalten. Es entstehen die IDL-Partikel (=VLDL-Remnant-Partikel). Diese werden über den Apolipoprotein E Liganden an den LDL-Rezeptor der Leber gebunden und aufgenommen oder weiter durch die hepatische Lipoproteinlipase zu LDL-Partikeln abgebaut. Der LDL-Partikel enthält als einziges Apolipoprotein das Apolipoprotein B-100 und ist Ligand für den LDL-Rezeptor.

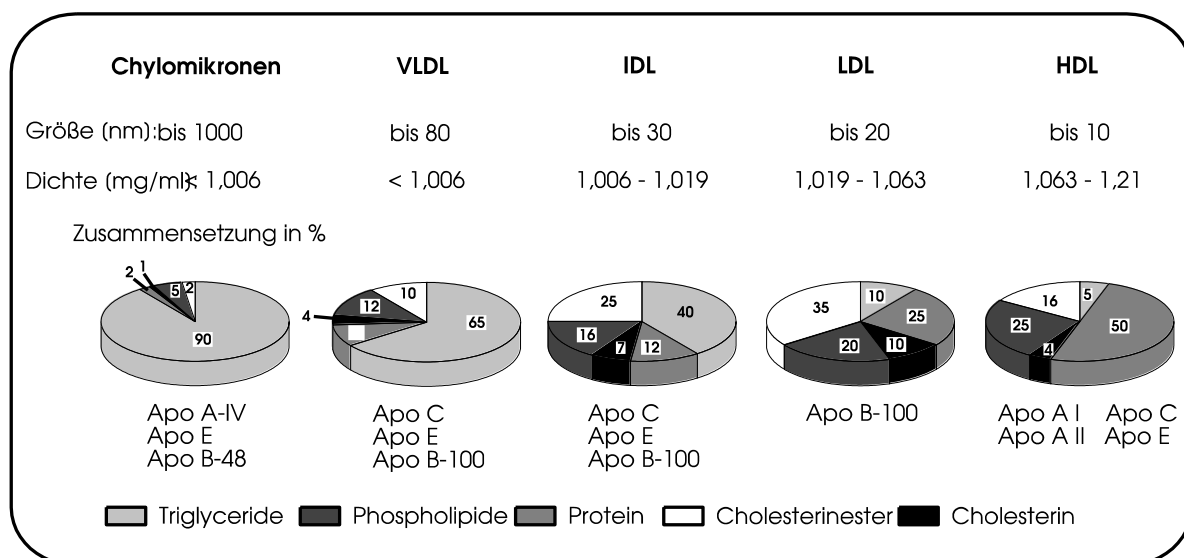


Abb.1: Zusammensetzung von Lipoproteinen

HDL-Stoffwechsel

Von der Leber und Darm werden kleine HDL-Partikel (nascent-HDL) in die Zirkulation abgegeben. Sie bestehen vor allem aus Phospholipiden und Apolipoproteinen. Nascent-HDL Partikel können auch durch Membranabschnürungen aus Chylomikronen und VLDL-Partikeln in Folge der Hydrolyse der Triglyzeride entstehen. Die unreifen HDL-Partikel können aus peripheren Zellen freies Cholesterin aufnehmen. Das Enzym LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase) bindet an die Oberfläche der HDL-Partikel und überführt das

freie Cholesterin in Cholesterinester. Das LCAT Enzym benötigt zur Ausübung seiner Funktion das Apolipoprotein A-I als Cofaktor. Die lipophilen Cholesterinester reichern sich im Zentrum der HDL-Partikel an.

XII.3 Einteilung von Fettstoffwechselstörungen

XII.3.1 Deskriptive Einteilung von Fettstoffwechselstörungen

Die erste Klassifikation der Hyperlipoproteinämie geht auf Fredrickson zurück (1965). Die Fredrickson Einteilung ist bis heute wertvoll in der Beschreibung eines Serums. Im Praktikum werden wir ihnen daher Seren zur Beurteilung der Fredrickson-Typen verteilen. In der klinischen Beurteilung besitzt die Fredrickson-Einteilung jedoch Defizite, so dass sie hier keine Anwendung mehr besitzt. Insbesondere finden die HDL-Partikel und das Lipoprotein(a) keine Berücksichtigung.

Typ	Bezeichnung	Lipoprotein	Plasma	Cholesterin	Triglyzeride
I	Chylomikronämie	Chylomikronen	Aufrahmung + (trüb)	+	+++
IIa	Hypercholesterinämie	LDL	Klar	++	Normal
IIb	Kombinierte Hyperlipidämie	VLDL + LDL	Trüb	++	+
III	Dysbeta- lipoproteinämie	IDL	Trüb	++	++
IV	Hypertriglyzeridämie	VLDL	Trüb	+	++
V	Kombinierte Hypertriglyzeridämie	Chylomikronen + VLDL	Trüb + Aufrahmung	+	++

Tabelle: Klassifikation der Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson

XII.3.2 Ursächliche Einteilung von Fettstoffwechselstörungen

Fettstoffwechselstörungen können primäre und sekundäre Ursachen haben. Vor der Diagnose einer primären Fettstoffwechselstörung müssen aber sekundäre Formen ausgeschlossen werden. Diabetes mellitus, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Nieren- und Lebererkrankungen können zu sekundären Hyperlipoproteinämien führen.

Primäre Fettstoffwechselstörungen

Die primären Fettstoffwechselstörungen werden in vier Gruppen eingeteilt:

- Hypercholesterinämie

- a) Polygene Hypercholesterinämie
- b) Familiäre Hypercholesterinämie (LDL-Rezeptorgendefekt)

- c) Familiär defektives Apolipoprotein B-100
- **Hypertriglyzeridämie**
 - a) Familiäre Hypertriglyzeridämie
 - b) Chylomikronämie-Syndrom
- **Gemischte Hyperlipidämie**
 - a) Familiäre Dysbetalipoproteinämie
 - b) Familiäre kombinierte Hyperlipidämie
- **Sonstige**
 - a) HDL Erhöhung (CETP Defekt)
 - b) HDL Erniedrigung (Tangier-Erkrankung, LCAT Defizienz, Apolipoprotein A-I Defekt)
 - c) Abetalipoproteinämie (Apolipoprotein B Defekt, MTP Defekt)

Aus didaktischen Gründen und aufgrund der klinischen Relevanz werden zwei primäre Hyperlipoproteinämie im Detail vorgestellt.

Chylomikronämie Syndrom:

Biochemie: Chylomikronen werden in der Darmwand gebildet. Die endothelständige Lipoproteinlipase spaltet die Triglyzeride in freie Fettsäuren und Glycerin. Die Lipoproteinlipase ist zunächst funktionell inaktiv und muss durch das Apolipoprotein C-II aktiviert werden. Somit kann ein Defekt der Lipoproteinlipase, aber auch des Aktivators, Apolipoprotein C-II, zu einem Abbaufekt der Chylomikronen führen. Im Blut reichern sich die Chylomikronen an. Bei einem kompletten Ausfall des Enzyms oder Aktivators liegt eine Typ I Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson vor. Hat das Enzym noch Restaktivitäten findet sich eine Typ V Hyperlipoproteinämie.

Häufigkeit: 1:1.000.000

Klinik: Hohe Triglyzeride unabhängig von der Ursache, erhöhen das **Pankreatitisrisiko**. In der Literatur wird ein Schwellenwert von 1000 mg/dl genannt. Je größer die Lipoproteinpartikel sind, umso höher ist das Pankreatitisrisiko. Das Pankreatitisrisiko ist bei identischem Triglyzeridwert beim Vorliegen von Chylomikronen im Vergleich zu VLDL-Partikel deutlich erhöht.

Familiäre Hypercholesterinämie:

Biochemie: LDL-Partikel werden über den LDL-Rezeptor in die Zelle aufgenommen. Liegt eine Mutation im LDL-Rezeptorgen vor, ist die Aufnahme der LDL-Partikel in die Zelle gestört. Die LDL-Partikel reichern sich im Blut an. Die familiäre Hypercholesterinämie folgt einem autosomal dominantem Erbgang. Entsprechend unterscheidet man klinisch eine heterozygote und homozygote familiäre Hypercholesterinämie. Bei der heterozygoten Form liegen die LDL-Cholesterinspiegel zwischen 250 und 450 mg/dl, bei der homozygoten Form werden LDL-Cholesterinspiegel über 550 mg/dl gefunden.

Häufigkeit: heterozygote Form 1:500, homozygote Form 1:1.000.000

Klinik: In der homozygoten Form findet sich eine manifeste Atherosklerose bereits im Kindesalter. Unbehandelt versterben die Betroffenen bereits vor dem Erwachsenwerden. In

der heterozygoten Form ist bei Männern ab 45 Jahren und Frauen ab 55 Jahren mit einer manifesten Atherosklerose zu rechnen.

Von allen primären Fettstoffwechselstörungen ist sicherlich die familiäre Hypercholesterinämie die am besten untersuchte Erkrankung. Weltweit sind über 1500 unterschiedliche Mutationen beschrieben. Die Verteilung der Mutationen ist weltweit kartiert und über das Internet abzurufen. Die molekulare Aufklärung der familiären Hypercholesterinämie hat einen bedeutenden Anteil für die Entwicklung neuer Therapieformen, wie z.B. Statine und LDL-Apherese.

Von der familiären Hypercholesterinämie ist das familiär defekte Apolipoprotein B-100 zu unterscheiden. Im Apolipoprotein B-100 liegt eine Mutation vor, so dass die Bindung des Apolipoprotein B-100, Ligand im LDL-Partikel für den LDL-Rezeptor, gestört ist. Liegt der Defekt heterozygot vor, ist er dem klinischen Bild der familiären Hypercholesterinämie ähnlich. Im Unterschied zur familiären Hypercholesterinämie mit mehr als 1500 unterschiedlichen Defekten, gibt es im Apolipoprotein B-100 nur eine klinisch relevante Mutation, der Arginin nach Glutamin Austausch in Aminosäureposition 3500

Sekundäre Fettstoffwechselstörungen

Sekundäre Hyperlipoproteinämie sind deutlich häufiger anzutreffen als primäre Formen. Entsprechend ist zunächst immer eine sekundäre Hyperlipoproteinämie auszuschließen, bevor die Diagnose einer primären Hyperlipoproteinämie gestellt wird. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Ausschnitt von häufigen Ursachen einer sekundären Hyperlipoproteinämie.

Tabelle 3 : Ursache sekundärer Hyperlipoproteinämien

Usache	Cholesterin	Triglyzeride
Diabetes mellitus		↑↑
Alkohol		↑↑
Glukokortikoide		↑↑
Schilddrüsenüberfunktion	↓	
Schilddrüsenunterfunktion	↑↑	
Nephrotisches Syndrom	↑↑	↑↑
Cholestase	↑↑	

XII.4 Diagnostik von Fettstoffwechselstörungen

Die **Basis-Diagnostik** umfasst folgende Parameter

- Gesamtcholesterin
- Triglyzeride
- LDL-Cholesterin
- HDL-Cholesterin

Die Bestimmung der Lipidparameter sollte nüchtern erfolgen (12 h nach der letzten Nahrungsaufnahme). Die Nahrungsaufnahme hat jedoch nur einen geringen Einfluß auf das Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterin. Steht die Beurteilung dieser Parameter im Vordergrund, kann in Ausnahmefällen auf die Nüchternblutabnahme verzichtet werden.

Für die Basis-Diagnostik stehen die nachfolgend aufgelisteten Methoden und Verfahren zur Verfügung.

Gesamt-Cholesterin und Triglyzeride: Beide Parameter werden über enzymatische Farbteste bestimmt. In der Laborroutine sind die beiden Tests an automatisierten Systemen adaptiert. Einzelheiten zu den Tests sind auf der Homepage des Zentrallabors unter Analysenspektrum/Referenzwerte nachzulesen.

Lipoprotein-Ultrazentrifugation: Ist das älteste Verfahren und gilt heute noch als Referenzmethode. Die Methode ist jedoch sehr aufwendig und ist damit heute nur spezialisierten Laboratorien vorbehalten. Um z.B. die HDL-Partikel nach ihrer Dichteklasse abzutrennen, bedarf es einer Umdrehungszahl von 45.000 über 18 Stunden. Zum Vergleich Serum/Plasma wird bei 4.000 Umdrehungen für 10 Minuten abgetrennt.

Lipoprotein-Elektrophorese: Dieses Verfahren findet immer noch Erwähnung in den Lehrbüchern, spielt aber in der Routine-Lipoproteindiagnostik keine Rolle.

Homogene Test für HDL- und LDL-Cholesterin: Die Reagenzien des Kits sind so modifiziert, dass nur das Cholesterin in den HDL-Partikeln bzw. den LDL-Partikeln gemessen wird. Die Messung des Cholesterins entspricht dem eines enzymatischen Farbtests und ist ebenfalls automatisierbar. Dieses Verfahren ist heute in der niedergelassenen Laboratoriumsmedizin am weitesten verbreitet.

Friedewald-Formel: Mit dieser Formel kann zuverlässig das LDL-Cholesterin berechnet werden, wenn bereits das Gesamt-Cholesterin, die Triglyzeride und das HDL-Cholesterin vorliegen. Die Friedewald-Formel darf nicht eingesetzt werden, wenn die Triglyzeride > 400 mg/dl sind, Chylomikronen oder IDL (VLDL-Remnant)-Partikel vorliegen. In der ursprünglich publizierten Formel wurde der Quotient Triglyzeride/5 eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, dass der Quotient Triglyzeride/6,5 zuverlässigere LDL-Cholesterinergebnisse liefert (modifizierte Friedewald-Formel).

$$\text{LDL-Cholesterin} = \text{Gesamt-Cholesterin} - \text{Triglyzeride}/6,5 - \text{HDL-Cholesterin}$$

Im Zentrallabor messen wir zunächst Gesamt-Cholesterin, Triglyzeride und HDL-Cholesterin. Sind die Triglyzeride unter 400 mg/dl und liegen keine Chylomikronen vor, wird das LDL-Cholesterin über die modifizierte Friedewald-Formel berechnet. Liegen die Triglyzeride über 400 mg/dl oder treten Chylomikronen auf, erfolgt die Analytik durch die Lipoprotein-Ultrazentrifugation.

Atherogener Index: Ein erhöhtes LDL-Cholesterin kann teilweise durch ein erhöhtes HDL-Cholesterin kompensiert werden. Andererseits kann ein LDL-Cholesterin im Referenzbereich bei niedrigem HDL-Cholesterin mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko verbunden sein. Der atherogene Index setzt die Atherogenität und Anti-Atherogenität in Beziehung und erlaubt eine grobe Abschätzung des atherogenen Risikos. Der atherogene Index LDL-/HDL-Cholesterin sollte unter 3 liegen, bzw. der Gesamt-Cholesterin/HDL Index unter 4,5.

Die Basis-Diagnostik kann durch eine **erweiterte Diagnostik** ergänzt werden. Zur erweiterten Diagnostik können folgende Parameter aufgeführt werden:

Kühlschranktest: Der Kühlschranktest ist zwar banal, wird aber in der täglichen Routineanalytik selten durchgeführt. Aus diesem Grund wird der Test unter der

erweiterten Diagnostik aufgeführt. Bleibt Serum längere Zeit stehen, üblicherweise über Nacht im Kühlschrank, flotieren die großen und leichten Chylomikronen an die Oberfläche. Eine sogenannte Aufrahmung zeigt das Vorhandensein für Chylomikronen an. Der Nachweis von Chylomikronen ist zur Abschätzung des Pankreatitisrisikos von Bedeutung.

Lipoprotein(a): Ist ein unabhängiger Risikofaktor der Atherosklerose. Über 90 % der Serumkonzentration sind genetisch determiniert. Bis heute gibt es keine medikamentöse Möglichkeit erhöhte Lipoprotein(a)werte zu senken. Etwa 60 Personen werden in Deutschland über eine Apherese für Lipoprotein(a) behandelt. Das Lipoprotein(a) ist durch immunologische Methoden automatisierbar zu bestimmen.

Apolipoprotein A-I: Das Apolipoprotein A-I ist das Hauptapolipoprotein der HDL-Partikel. Das Apolipoprotein A-I korreliert somit gut zum HDL-Cholesterin und spiegelt die antiatherogene Kapazität wieder. Das Apolipoprotein A-I ist durch immunologische Methoden automatisierbar zu bestimmen.

Apolipoprotein B: Das Apolipoprotein B ist das einzige Apolipoprotein der LDL-Partikel. Studien zeigen, dass das Apolipoprotein B die Anzahl der atherogenen Partikel besser widerspiegelt als das LDL-Cholesterin. Trotz seiner vermeintlichen Überlegenheit in der Abschätzung des atherogenen Risikos, hat sich das Apolipoprotein B nicht in der Praxis und den Empfehlungen durchgesetzt. Das Apolipoprotein B ist durch immunologische Methoden automatisierbar zu bestimmen.

Apolipoprotein E Genotyp: Das Apolipoprotein E ist neben dem Apolipoprotein B-100 ebenfalls Ligand für den LDL-Rezeptor. Das Apolipoprotein E ist 299 Aminosäuren lang und besitzt an Position 112 und 158 variable Aminosäurepositionen. An beiden Positionen können jeweils die Aminosäuren Cystein und Arginin vorkommen. Entsprechend der Aminosäureverteilung unterscheidet man die Allele:

E2: Position 112, Cystein; Position 158 Cystein

E3: Position 112, Cystein; Position 158 Arginin

E4: Position 112, Arginin; Position 158 Arginin

Tabelle: Apolipoprotein E Genotypen in der Bevölkerung

Genotyp	Häufigkeit (%)
E2/E2	1
E2/E3	12
E2/E4	1,5
E3/E3	59,8
E3/E4	22,9
E4/E4	2,8

Die Bestimmung der Apolipoprotein E Genotypen wird mit zwei Fragestellungen durchgeführt. Für die Manifestation der Typ III Hyperlipoproteinämie ist der Genotyp E2/E2 Voraussetzung. Da nur einer von 100 E2/E2 Trägern eine Typ III Hyperlipoproteinämie entwickelt, ist ein zweiter Risikofaktor notwendig. Dies kann z.B. eine sich manifestierende Schilddrüsenfunktionsstörung sein. Unbehandelt ist die Typ III Hyperlipoproteinämie eine Erkrankung mit hohem atherogenen Risiko. Typisch sind die auf den Händenflächen sich manifestierenden Palmarxanthome. Die zweite Indikation zur Apolipoprotein E Genotypisierung besteht in der Abschätzung des Alzheimerrisikos. Personen mit dem Genotyp E4/E4 haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko.

Apolipoprotein B Mutation (Arginin3500→Glutamin). Der Aminosäureaustausch in Position 3500 des Apolipoprotein B Gens ist die einzige relevante Mutation, die zur Hypercholesterinämie führt. Die Abklärung einer primären Hypercholesterinämie kann so durch einen genetischen Test in einfacher Weise durchgeführt werden. Die Erfolgsquote ist jedoch nicht allzu hoch, da die meisten Fälle der schweren primären Hypercholesterinämie durch einen LDL-Rezeptorgendefekt verursacht werden.

Ergänzt wird die erweiterte Diagnostik durch eine Vielzahl von Spezialparametern. Die Spezialparameter werden eingesetzt für gezielte seltene Fragestellungen einerseits, oder sind bisher nicht hinreichend validiert. Die Spezialparameter finden hier daher keine Berücksichtigung.

XII.5 Risikofaktoren der Atherosklerose

Die Riskofaktoren LDL-Cholesterinerhöhung, niedriges HDL-Cholesterin, Triglyzerid-erhöhung und erhöhtes Lipoprotein(a) werden ergänzt durch weitere wichtige Risikofaktoren. Die Riskofaktoren werden dabei häufig in nicht modifizierbare und modifizierbare Risikofaktoren unterschieden.

Nicht modifizierbare Risikofaktoren

- Alter
- Positive Familienanamnese
- männliches Geschlecht

Modifizierbare Risikofaktoren

- Hyperlipidämie
- Rauchen
- Hypertonie
- Diabetes mellitus
- Adipositas
- eingeschränkte körperliche Aktivität

XII.6 Bewertung des Atheroskleroserisikos

Die Therapiebedürftigkeit einer Fettstoffwechselstörung richtet sich nach dem Absolutrisiko eines Patienten. Zur Abschätzung des Risikos sind Berechnungen über einen Score sehr hilfreich. Die Lipide, aber auch andere Riskofaktoren werden gemeinsam beurteilt und daraus das 10 Jahres-Erkrankungsrisiko berechnet. Mehrere konkurrierende Scores sind im Einsatz. Im Praktikum wird der Procarn-Score zur Berechnung des 10-Jahres-Herzinfarkttrisikos eingesetzt.

Aus dem individuellen Atheroskleroserisiko sind die Therapieziele für den Patienten festzulegen.

Patient	LDL-Cholesterinzielwert
Patienten mit sehr hohem Risiko	< 55 mg/dl und \geq 50% Senkung LDL-C
Manifeste koronare Erkrankung Diabetes Mellitus mit Endorganschäden Schwere Niereninsuffizienz, GFR < 30	

ml/min/1,73 m ² Kalkulierter Risiko-Score $\geq 10\%$	
Patienten mit hohem Risiko	< 70 mg/dl und $\geq 50\%$ Senkung LDL-C
prominente einzelne Risikofaktoren, z.B. LDL > 190 mg/dl, Familiäre Hypercholesterinämie, Blutdruck $\geq 180/110$ mmHG Diabetes mellitus ohne Endorganschäden moderate Niereninsuffizienz, GFR 30-59 ml/min/1,73 Kalkulierter Risiko Score 5 bis < 10	
Patienten mit moderatem Risiko	< 100 mg/dl
Jüngere Patienten mit Diabetes mellitus Kalkulierter Risiko Score ≥ 1 und < 5	
Patienten mit niedrigem Risiko	< 116
Kalkulierter Risiko Score < 1	

Tabelle: Empfohlene Zielwerte für LDL-Cholesterin in Abhängigkeit des Gesamtrisikos (<https://academic.oup.com/eurheartj/article/41/1/111/5556353>)

XII.7 Praktikum

Erster Abschnitt:

- Messung von Gesamt-Cholesterin mittels Streifentests
 - a) Messung: Qualitätskontrolle
 - b) Messung: Patient
- Berechnung des LDL-Cholesterins mittels Friedewald-Formel
- Berechnung des atherogenen Index
- Berechnung des individuellen Risiko durch den Procain Score

Zweiter Abschnitt:

- Visuelle Beurteilung eines Serums und Versuch der Fredrickson-Typisierung

XII.8 Fragen zur Lernevaluation

- 1) Im Nüchtern-Serum weisen Sie Chylomikronen nach. Durch welches klinische Ereignis sind die Patienten mit einer Chylomikronämie gefährdet und welche pathobiochemischen Störungen vermuten Sie?
- 2) Die Friedewald-Formel liefert zuverlässige Ergebnisse des LDL-Cholesterins und wird in der Routinediagnostik des Zentrallabors am UKS eingesetzt. Wann darf die Friedewaldformel nicht eingesetzt werden?
- 3) Was ist der pathobiochemische Grund, dass freies Cholesterin aus dem Cholesterinrücktransport durch das Enzym LCAT verestert werden muss?

- 4) Benennen Sie Ursachen, die zum Auftreten einer Typ IV Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson führen können?
- 5) Bei einem 9-jährigen Kind messen Sie ein LDL-Cholesterin von 850 mg/dl. An welches Krankheitsbild denken Sie. Ist eine Behandlung des Kindes notwendig?
- 6) Der Procam-Score wird in Deutschland häufig zur Beurteilung des individuelle Risikos eingesetzt. Wo wurden die zugrundliegenden Daten des Procam-Scores erhoben.

XIII Liquordiagnostik

XIII.1 Lernziele

- Untersuchungsgang: Akut-Parameter („Notfall-Programm“), zeitverzögerte Untersuchungen
- Wie sind die Normwerte der Akut-Parameter (Farbe/Aussehen, Zellzahl, Eiweiß, Glucose, Laktat)?
- Wie sind diese Parameter verändert bei: Viraler Meningitis (akut), bakterieller Meningitis, Neuroborreliose, Subarachnoidalblutung (SAB), Neuro-Tuberkulose, Multiple Sklerose?
- Liquorproteine: Blut-Liquor-Schranke, Albuminquotient, Schrankenstörung
- Reiber-Diagramm: Schrankenstörung, intrathekale Immunglobulin-Synthese (Einteilung und Auswertung des Reiber-Diagramms)
- Isoelektrische Fokussierung (IEF): oligoklonale Banden, häufige Diagnosen
- Immunglobulin-Indizes

XIII.2 Liquor-Produktion

Der Liquor cerebrospinalis wird überwiegend im Plexus choroideus gebildet („Ultrafiltrat des Blutplasma“). Nach Zirkulation durch die inneren und äußeren Liquorräume findet an den Arachnoidalzotten eine Übernahme ins venöse Blut statt.

Täglich werden etwa 500 ml gebildet, das Gesamtvolumen von etwa 150 ml wird also mehrmals am Tag umgesetzt. Den größten Anteil des Liquorvolumens enthält der „Lumbalsack“.

XIII.3 Diagnostik

Normalbefunde der wichtigsten Parameter des Liquor cerebrospinalis

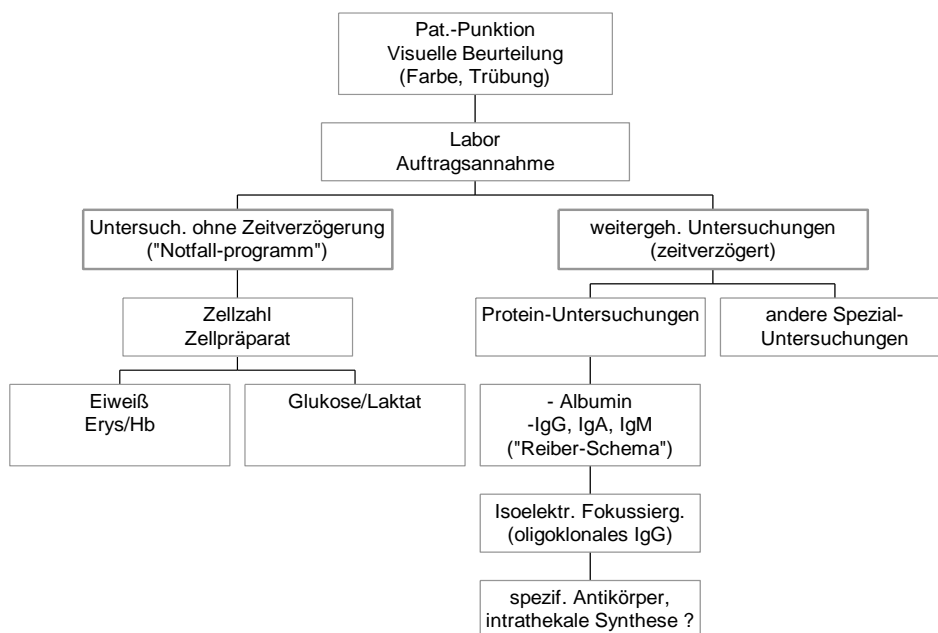
Farbe/Aussehen	wasserklar/farblos; Patholog. Veränderungen: Xanthochromie durch zugemischtes freies Hb (nach Hirnblutungen, SAB), u. Bilirubin, auch bei sehr hohem Eiweißgehalt. Beurteilung der Xanthochromie des Liquors nach Zentrifugation. Artefiziell zugemischtes Blut (Punktionsartefakt) ergibt eine Rosa bis Rotfärbung und Trübe durch Blutzellen.
Leukozyten	0 – 12/3 pro μ l (nur Lymphozyten und Monozyten)
Erythrozyten	nicht nachweisbar (s. o. bei Farbe/Aussehen)
Eiweiß (lumbal)	15 – 45 mg/dl (150 – 450 mg/l), ventrikulärer u. cysternaler L. sind Eiweiß-ärmer. Zum Vergleich: Im Blutserum ist die Eiweißkonzentration rund 7 g/dl.
Glukose	50 – 75 % der Blutglukose (beide messen!)
Laktat	1,2 – 2,1 mmol/l (Vergleich mit Blut nicht erforderlich) Glukose erniedrigt u. Laktat erhöht bei: bakter. Meningitis (Anstieg nach Therapie) tuberkulöser Meningitis, Meningeosis leucaemica und Pilzmeningitiden. Unterscheidung von viraler und bakter. Meningitis durch Laktatbestimmung (neben der Zelldifferenzierung): Werte > 3,4 mmol/l nur bei bakterieller Genese.

Liquor-Punktion

Ohne besondere Indikation wird die Punktion von Liquor lumbal durchgeführt (zwischen 3. und 4. oder zwischen 4. und 5. Lendenwirbel). Normbereiche sind üblicherweise für lumbalen Liquor angegeben. Wird der Liquor suboccipital oder aus Ventrikeln entnommen, so sind im besonderen für den Eiweißgehalt eigene Normwerte gültig.

Eine Liquorpunktion verbietet sich, wenn das Hirnparenchym unter Druck steht (Augenhintergrund untersuchen!).

Liquor-Untersuchungsgang



Regeln zur Liquoruntersuchung

- Zur Zell-Untersuchung ist nur frischer Liquor geeignet (innerhalb 1 h nach Punktion).
- Eiweiß-Untersuchungen können später erfolgen.
- Glukose- und Laktatmessung sollten innerhalb 2 h durchgeführt werden.

Zellzählung

Zur Anfärbung der Zellen wird in einer Leukozytenpipette Liquor mit Farblösung gemischt (10 Teile Liquor + 1 Teil Farbe). Der gefärbte Liquor wird in eine Zählkammer (Fuchs-Rosenthal-) mit 3,2 µl Inhalt gegeben. Die gezählten Zellen aller 16 x 16 Zählquadrate des Zählfeldes entsprechen der Zellzahl/3µl). Bei hohen Zellzahlen wird eine Auswahl von Feldern gezählt.

Zellpräparation zur Erstellung eines Liquor-Differentialzellbilds (frischer Liquor!)

- a) zur schnellen Orientierung, vor allem bei Verdacht auf virale oder bakterielle Meningitis, kann ein „Schnellpräparat“ auf vorgefärbtem Objektträger mikroskopiert werden.
- b) Sedimentationsverfahren nach Sayk (schonendstes Verfahren). In der Kammer, mit Tubus, Saugpapier und Objektträger, werden die Zellen von 1 ml Liquor zur Sedimentation

- gebracht. Nach der Trocknung wird gefärbt, z.B. nach Pappenheim.
- c) Zytozentrifugation: Sedimentgewinnung in einer Zentrifuge mit spezieller Einrichtung bei niedriger Tourenzahl.

XIII.4 Zellsyndrome, Zellreaktionen

Die Höhe der Zellzahl korreliert in der Regel mit Schwere und Akuität des Prozesses.

Entzündliche Syndrome

- Virale Meningoenzephalitis (akute) verursacht lymphozytäre Zellbilder, Zellzahl von normal bis etwa 1000/3 pro μl
- Bakterielle Meningitis: in der Regel massenhaft Granulozyten im akuten Stadium, von etwa 500 bis etwa 100.000/3 μl . Nach wirksamer Therapie fällt die Zellzahl, der Lymphozytenanteil nimmt zu und die Glukose steigt in den Normbereich.
⇒ unbehandelt: Glukose erniedrigt, Laktat erhöht im Liquor.
- Tuberkulöse Meningitis: Gemischtes Zellbild (Granuloz. + Lymphozyten)
⇒ Glukose erniedrigt, Laktat erhöht im Liq.
- Lues u. Borreliose des ZNS: i.d.R. lymphozytäre Zellbilder, Zellzahl bis etwa 1000/3 pro μl
- Multiple Sklerose (chronische ZNS-Entzündung): Zellzahl von normal bis etwa 100/3 pro μl . Man findet typische zelluläre Entzündungszeichen: aktivierte Lymphozyten, häufig auch Plasmazellen

Blutungen

Durch eine Subarachnoidalblutung fließen massenhaft Blutzellen in die Liquorräume, die bereits nach wenigen Stunden eine typische Phagen-Reaktion hervorrufen: Hämatophagen mit Erythrozyten und eisenhaltigen Hämosiderin-Einschlüssen. Später wird auch eisenfreies, gelbes kristallines Hämatoidin erkennbar.

Tumoren, Metastasen, Leukosen

Primäre Tumoren des ZNS siedeln selten in die Liquorräume ab. Als Ausnahme gilt das Medulloblastom, das sich recht häufig durch seine Zellen im Liquor manifestiert. Metastasen und Leukosen können bei Befall des ZNS durch maligne Zellen im Liquor dokumentiert werden („Meningeosis carcinomatosa“, „Meningeosis leucaemica“).

Phagenreaktion/Reizreaktion

Die Abräumreaktion durch Phagozyten, überwiegend aus dem monozytären System entstanden, betrifft sowohl Erreger als auch Zellen und unbelebtes Material. Phagozytose tritt vor allem auf nach Entzündungen, Blutungen, Tumoren, Bandscheibenvorfällen.

XIII.5 Eiweißuntersuchung

Neben der Frage nach einer „Blut/Liquor-Schrankenstörung“ (Gesamt-Eiweiß, Albumin erhöht im Liquor), ist eine Abgrenzung einer Liquor- bzw. ZNS-eigenen Proteinreaktion Ziel der Eiweißuntersuchung (z.B. autochthone Immunglobulinsynthese bei Entzündungen).

Grundlegende Vorgabe: Nahezu alle Proteine im Liquor stammen im Normalfall aus dem Blutserum. Daher ist die gleichzeitige Betrachtung des entsprechenden Serumparameters erforderlich, will man eine autochthone Bildung von dem normalen Protein-Übergang an der Blut-Liquor-Grenzfläche abgrenzen.

Albumin, das autochthon nie gebildet wird, sondern passiv vom Blut in den Liquor übertritt, dient zur Beschreibung der Durchlässigkeit der „Blut-Liquor-Schranke“ für Proteine. Im Normalfall ist der Liquor/Serum-Quotient des Albumins etwa 1 : 200. Mit einem Anstieg des L/S-Albumin-Quotienten steigen auch die L/S-Quotienten der Immunglobuline entsprechend ihrer Molekülgröße an.

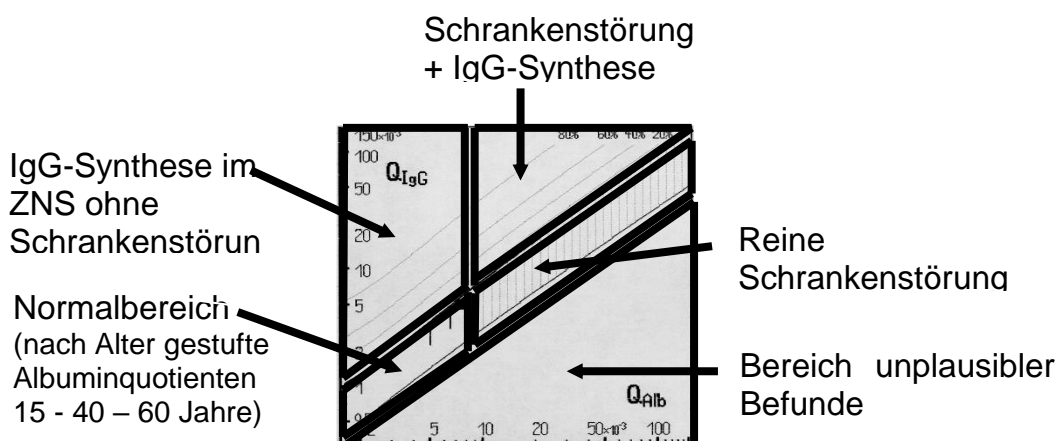
Hilfsmittel der Proteinanalyse

- **Liquor/Serum-Protein-Quotienten-Schemata** (z.B. Variante nach Reiber für IgG, IgA und IgM mit Albumin als Bezugsprotein): Es werden Albumin- und Ig-Konzentrationen für Liquor und Serum nephelometrisch bestimmt und die Liquor/Serum-Quotienten der Parameter in das Schema übertragen.

Man erkennt eine „Schrankenstörung“ über den Albumin-Quotienten. Die unterschiedlich im Diagramm vorgegebenen Grenzquotienten geben die Altersabhängigkeit der Schrankenfunktion wieder: im Alter bis 15 Jahre gilt eine Grenze von 5,0, bei Erwachsenen bis 40 Jahre bzw. 60 Jahre gelten Grenzen von 6,5 bzw. 8,0 für Q-Albumin. Überschreitungen sind als erhöhte Durchlässigkeit für Proteine oder vermehrter Übertritt von Proteinen zu interpretieren.

Eine weitere wichtige Aussage ermöglicht das Schema: die autochthone IgG-Bildung bei entzündlichen Reaktionen des ZNS, die durch Überschreitung der oberen Grenzlinie indiziert wird.

Bereiche im Reiber-Diagramm



Protein-Quotientenschema nach Reiber für 3 Ig-Klassen

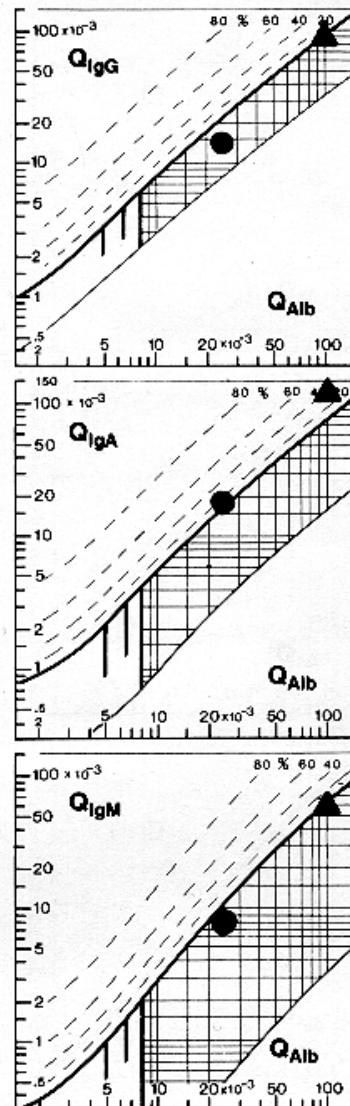
(Neue Darstellungsform mit hyperbolischen Grenzlinien)

Die eingetragenen senkrechten Markierungen im Normbereich sind die unterschiedlichen oberen Grenzwerte der normalen Albumin-Quotienten für die 3 Altersstufen: bis 15 Jahre, bis 40 Jahre und bis 60 Jahre.

Dargestellt sind auch Linien für die intrathekal gebildeten IgG-, IgA- und IgM-Fractionen, berechnet in % des gemessenen Gesamt-Ig im Liquor.

Hier: Beispiele zweier Pat. mit Neuro-Tuberkulose (tuberkulöser Meningitis).

Ein hoher Anteil der Pat. mit Neuro-Tuberkulose zeigen bereits im Liquor der ersten Punktion nach Aufnahme ein Dominieren der Produktion von IgA.



- Im rechnerischen Verfahren der **Indexbildung** werden Liquor/Serum-Proteinquotienten verwendet. Als Referenz dient Albumin als rein hepatogenes Protein: z.B.

$$\text{IgG - Index} = \frac{\text{IgGLiq} / \text{IgGSerum}}{\text{AlbuminLiq} / \text{AlbuminSerum}}$$

Ist das Liquor-IgG komplett aus dem Blut transudiert, so ergeben sich im Mittel IgG-Indizes zu 0,5. Sind autochthon gebildete Anteile im Liquor-IgG, wird der Index > 0,65.

Die Auswertung der Proteindaten im Reiber-Quotientenschema erübrigt die Indexberechnung für die Diagnostik. Als rechnerische Größe zur Dokumentation von Krankheits- oder Therapieverläufen ist die Index-Darstellung jedoch gut geeignet.

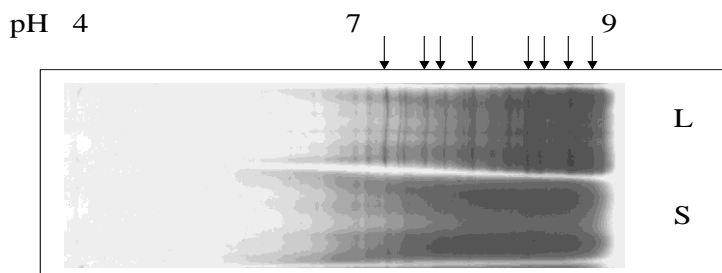
- elektrophoretischer Nachweis autochthoner Proteine („oligoklonale“ IgG-Fractionen mit **Isoelektrischer Fokussierung**)
Nach Auftrennung der Proteine von Liquor, im Vergleich mit Serum, sind im pH-Gradienten-Gel durch einige ZNS-ständige Plasmazell-Klone gebildete IgG-Fractionen als oligoklonale Banden nachweisbar. Die Empfindlichkeit des Nachweises von

oligoklonalem IgG mithilfe dieser Methode ist sehr hoch, sodass man bei Pat. mit Multipler Sklerose in über 98 % autochthones IgG nachweist, während mithilfe des Reiber-Schema dieser Nachweis in nur etwa 60 % gelingt.

Beispiel:

Darstellung „**oligoklonaler Banden**“ durch Isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamid-Gel mit pH-Gradienten

Dem „polyklonal verteilten IgG sind in der Liquorprobe oligoklonale, im ZNS gebildete IgG-Fractionen überlagert (Pfeilmarkierung).



- Zum Nachweis des infektiösen Agens einer ZNS-Infektion ist die serologische Bestimmung von Erreger-spezifischen Antikörpern im subakuten Stadium (frühestens 1 – 4 Wochen nach Infektion) geeignet. Mithilfe der Liquor/Serum-Gradienten der IgG-Antikörpertiter und des Gradienten des Gesamt-IgG wird durch Division ein Antikörper-Index errechnet. Also $\text{AK-Titer Liq.} / \text{AK-Titer Ser.}$ wird dividiert durch $\text{IgGgesamt Liq.} / \text{IgGgesamt Serum.}$ Indizes > 1 zeigen autochthon produzierte IgG-Antikörper an (aufgrund erhöhter Liq.-Antikörper-Titer).

Zusammenfassung Liquordiagnostik bestimmter Erkrankungen

	Bakterielle Meningitis	Virale Meningitis	SAB	Neuroborreliose	Neuro-TB	MS
Aussehen	weißlich/ trüb	farblos/ klar	blutig, xanthochrom	farblos, klar	farblos, klar	farblos, klar
Zellzahl	mehrere tausend/ μ l	bis mehrere hundert	stark erhöht	normal – erhöht	mehrere hundert	normal – leicht erhöht
Zellbild	granulozytär	lymphozytär	gemischt, blutig	lymphozytär	gemischt, lymphozytär	normal, lymphozytär
Lactat (mmol/l)	> 3,5	< 3,5	erhöht	normal – erhöht	> 3,5	normal
Albumin-Q/ Eiweiß (mg/dl)	sehr hoch, Eiweiß > 120	normal	erhöht	normal – erhöht	Eiweiß massiv erhöht, >120	Eiweiß normal bis leicht erhöht
Reiber- Diagramm	Schrankenst., evtl. IgA- Synthese	normal bis mäßige Schrankenst.	Schrankenst.	Mäßige Schrankenst., Intrathekale IgM-Synthese (IgM>IgA>IgG)	Schrankenst., Intrathek. IgA- Synthese (IgA>IgG)	normal bis leichte Schranken- störung, Intrathekale IgG- Synthese
IEF	Ident. Banden, Oligoklonale Banden möglich	Oligoklonale Banden möglich		Oligoklonale Banden	Ident. Banden, Oligoklonale Banden möglich	Oligoklonale Banden

XIII.6 Fragen zur Lernevaluation

1. Welche Zählkammer wird zur Zellzählung im Liquor benutzt?
2. Wie können Sie anhand des Liquores eine artefizielle Blutung (Punktionsartefakt) von einer Einblutung in die Liquorräume (Hirnblutung, SAB) unterscheiden?
3. Sie bekommen einen xanthochromen Liquor. Worauf beruht diese Färbung? Welche typischen Zellen können Sie in einem daraus angefertigten Zellpräparat beobachten?
4. Was gibt der Albumin-Quotient an?
5. Wie kann eine intrathekale IgG-Synthese nachgewiesen werden?
6. Wie unterscheiden sich die Liquorbefunde von bakterieller und viraler Meningitis?
7. Wie werden die Immunglobulin-Indizes berechnet?
8. Warum soll der Liquor möglichst rasch ins Labor transportiert werden?
9. Warum muss gleichzeitig mit dem Liquor auch Blut entnommen werden?
10. Was ist die Isoelektrische Fokussierung (IEF)?

XIV Endokrinologische Diagnostik

XIV.1 Lernziele

1) Schilddrüse (SD):

Biosynthese der SD-Hormone (Iodination, Iodisation, TPO, Thyreoglobulin, T₄, T₃, rT₃)
 Freie SD-Hormone (FT₄, FT₃) und Gesamt-SD-Hormone (obsolet: T₄, T₃)
 Eiweißbindung der SD-Hormone (TBG, Transthyretin, Albumin)
 Hypophysärer SD-Regelkreis (TRH, TSH, FT₄, FT₃)
 Beurteilung der Schilddrüsenfunktion mit Hilfe von TSH, FT₄ und FT₃
 Unterscheidung: manifeste und latente SD-Funktionsstörung
 Bedeutung, Durchführung u. Beurteilung des TRH-Testes
 Funktionelle Sensitivität des TSH-Assays, Klinik der Hyper- und Hypothyreose
 SD-Erkrankungen: Struma, funkt. Autonomie, Immunthyreopathien (M. Basedow, Hashimoto-Thyreoiditis), iodinduz. Hyperthyreose, Neugeborenenhypothyreose, Neoplasien
 Hypothyreose-Screening bei Neugeborenen
 Autoimmundiagnostik der SD: TSH-R-AK (TRAK), Anti-TPO, Anti-TG

2) Nebennierenrinde (NNR):

Regelkreis Hypophyse-NNR (CRH, ACTH, Cortisol)
 Zirkadianer Cortisol-Rhythmus, biolog. Wirkungen des Cortisols
 Hyperkortisolismus (exogen, endogen: ACTH-abhängig (HVL-Adenom, paraneoplast. ACTH-Produktion)/ unabhängig (NNR-Tumor))
 Klinik des Hyperkortisolismus, Dexamethason-Hemmtest (1 bzw. 8mg), CRH-Test
 Hypokortisolismus (primär: M. Addison, Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom, sekundär: HVL-Insuffizienz, iatrogen), Klinik des Hypokortisolismus, ACTH-Kurztest, CRH-Test

3) Nebennierenmark und Phäochromozytom

Biosynthese und Abbau der Katecholamine (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin)
 Abbauprodukte: Homovanillinsäure (HVS), Metanephine, Vanillinmandelsäure (VMS))
 Symptome des Phäochromozytoms: Hypertonie, Kopfschmerzen, Fieber, Schwitzen, Tachykardie. Hereditäre Erkrankungen mit erhöhtem Risiko: Multiple endokrine Neoplasie Typ II a und b, Neurofibromatose, von Hippel-Lindau-Erkrankung u.a.
 Labordiagnostik: Methode der Wahl, wenn verfügbar: Metanephine im Blutplasma
 Alternativ: Katecholamine, Metanephine, HVS, VMS im angesäuerten 24h-Sammelurin
 Einfluss- und Störfaktoren für die Katecholaminbestimmung im Sammelurin
 Indikation, Durchführung und Beurteilung des Clonidin-Testes

XIV.2 Schilddrüse

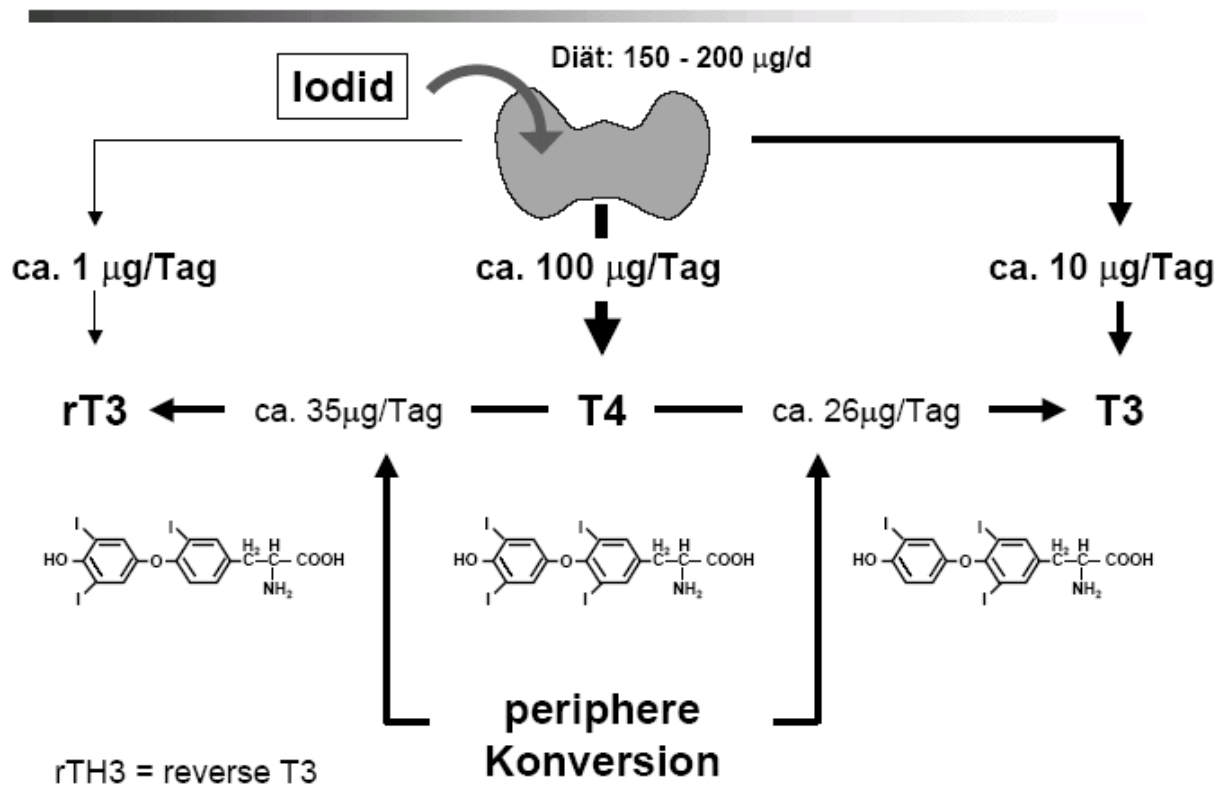
XIV.2.1 Biosynthese der Schilddrüsenhormone

Für eine ausreichende Jodversorgung sollten täglich 150-200 µg Jod aufgenommen werden. Von der Schilddrüse werden täglich ca. 100 µg T₄ (Thyroxin), 10 µg T₃ (Trijodthyronin) und 1 µg reverse T₃ sezerniert. Die Biosynthese der Schilddrüsenhormone T₄ (Thyroxin) und T₃ (Trijodthyronin) erfolgt in den folgenden Schritten: Die Schilddrüse nimmt Jodid aktiv auf, das in der Schilddrüse zum Jod oxidiert wird (Jodination). Im Bereich der äußeren apikalen Zellmembran der Thyreozyten werden die Tyrosylreste des Thyreoglobulins unter Katalyse durch die membrangebundene Thyreoperoxidase (TPO) iodiert (Jodisation). Die Monojod- und Dijodtyrosylreste im Thyreoglobulin lagern sich, ebenfalls katalysiert durch die Peroxidase, durch oxidative Kondensation in einer intramolekularen Reaktion zu den entsprechenden Tetrajod- bzw. Trijodthyronylresten um. Thyreoglobulin wird in den

Schilddrüsenfollikeln gespeichert. Zur Freisetzung der Schilddrüsenhormone T4 und T3 wird Thyreoglobulin durch Proteasen und Peptidasen hydrolysiert. Die Synthese und Freisetzung der Schilddrüsenhormone wird durch das Hypophysenhormon TSH stimuliert.

Das im Vergleich zum T4 etwa 3fach biologisch aktivere T3 wird hauptsächlich in der Peripherie durch Monodejodination des T4 gebildet (tägliche T3-Bildung durch periphere Konversion ca. 26 µg). Dabei entsteht auch täglich etwa 35 µg des biologisch inaktiven reverse T3 (rT3). Die Halbwertszeit des T4 beträgt 190 h, die Halbwertszeit des T3 nur 19 h.

Hormonsekretion der Schilddrüse



XIV.2.2 Proteinbindung des T4 und T3

Über 99,9% des T4 und 99,7% des T3 werden im Blut proteingebunden transportiert. 75% des T4 sind an Thyroxin-bindendes Globulin (TBG), 15% an Thyroxin-bindendes Präalbumin (Transthyretin) und 10% an Albumin gebunden. T3 ist zu 38% an TBG, zu 35% an Albumin und zu 27% an Transthyretin gebunden. Medikamente und Hormone können die Proteinbindung der Schilddrüsenhormone beeinflussen. Die biologisch aktiven und diagnostisch relevanten freien Hormone (freies T3 = FT3 und freies T4 = FT4) haben daher sehr niedrige Serumkonzentrationen.

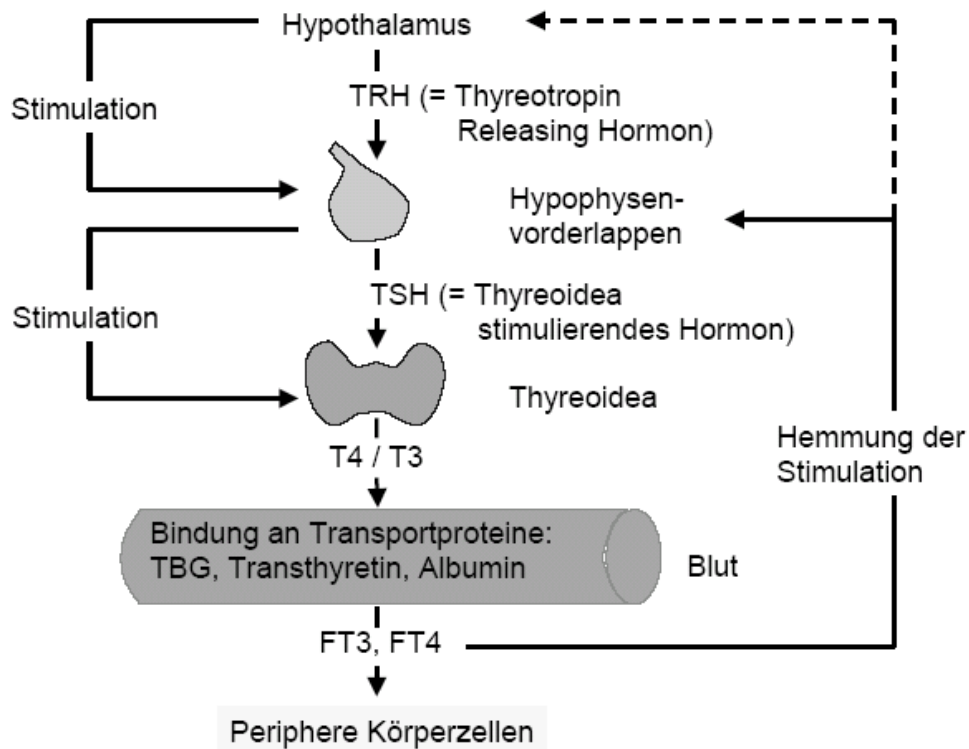
Die Gesamthormonkonzentrationen (TT4 und TT3) entsprechen der Summe aus dem freien und dem proteingebundenen Anteil. Als Laborparameter sind TT4 und TT3 jedoch obsolet, weil die TT4- und TT3-Konzentrationen wesentlich variabler sind und zu Fehlinterpretationen führen können. So kommt es in der Schwangerschaft und unter Östrogenmedikation zu einer TBG-Erhöhung, die mit einem Anstieg der Gesamthormonkonzentrationen einhergeht. Weitere Ursachen für eine TBG-Erhöhung sind genetische Varianten, Hepatopathien, Medikation mit Opiaten, Clofibrat oder 5-Fluoro-Uracil. Bei einer Erniedrigung der TBG (genetische Varianten, Proteinverlustsyndrome, Malnutrition, Kortikosteroide) sinken die Gesamthormonkonzentrationen.

XIV.2.3 Regelkreis der Schilddrüsenhormone

Die Regulation der Schilddrüsenfunktion erfolgt über Thyreotropin (TSH), das in den basophilen, thyreotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet wird. TSH

beschleunigt die Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone. Die TSH Sekretion des Hypophysenvorderlappens untersteht der Regulation des TRH (Thyreotropin Releasing Hormon), das im Hypothalamus gebildet wird. Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 wirken im Sinne einer negativen Rückkoppelung inhibitorisch auf die Freisetzung des TSH und TRH. Bei der Hyperthyreose führen erhöhtes T4 und/oder T3 zu einer TSH-Suppression, d.h. zu einem Abfall der TSH-Serumkonzentration. Dagegen führen bei der Hypothyreose erniedrigte Schilddrüsenhormonkonzentrationen zu einem Anstieg der TSH-Serumkonzentration.

Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis



XIV.2.4 Störungen der Schilddrüsenfunktion

Die wichtigsten Symptome der Hyper- und der Hypothyreose werden in der Tabelle zusammengefasst.

Hyperthyreose	Hypothyreose
Ruhetachykardie	Verlangsamung
innere Unruhe	Ödeme, Gewichtszunahme (Myxödem)
Nervosität	Obstipation
Gewichtsabnahme	Kälteintoleranz
gesteigerter Appetit	Schlitzaugen (periorbitale Ödeme)
feinschlägiger Fingertremor	raue, heissere Stimme
feuchte Haut	allgemeine Schwäche
vermehrtes Schwitzen	kühle, trockene, schuppige und blasse Haut
Schlafstörungen	ganzloses, struppiges Haar
Exophthalmus (fakultativ)	leichte Ermüdbarkeit

Ursachen der Hyperthyreose sind der M. Basedow (Autoimmunthyreopathie durch stimulierende Autoantikörper gegen TSH-Rezeptoren), die funktionelle Schilddrüsenautonomie, Thyreoiditiden (mit wechselnder Schilddrüsenfunktion) und die Jodinduktion (nach Kontrastmittelgabe, Amiodaron-Medikation). Die Hypothyreosen kommen bei der Hashimoto-Thyreoiditis, im Rahmen der kongenitalen Hypothyreose (bes. bei Jodmangel) sowie iatrogen (durch Thyreostatika, Jodexzess, Lithium, Z.n. Schilddrüsenresektion, Z.n. Radiojodtherapie) und bei der seltenen sekundären Hypothyreose vor.

XIV.2.5 Labordiagnostik

XIV.2.5.1 TSH

Die Serumkonzentration des TSH stellt den wichtigsten Laborparameter der Schilddrüsendiagnostik dar.

Indikation: Screeninguntersuchung bei V.a. Schilddrüsenfunktionsstörungen, Neugeborenen-screening (angeborene Hypothyreose), V.a. sekundäre Hypothyreose, präoperativ, vor Gabe Jod-haliger Kontrastmittel, Therapiekontrolle bei Schilddrüsenhormonsubstitution, Abklärung der Hypercholesterinämie und Hyperprolaktinämie.

Methode: Es werden Sandwich Immunoassays mit einer hohen analytischen Sensitivität verwendet. Hierfür sind z.B. Chemilumineszenz- oder Fluoreszenz-Immunoassays geeignet (s. Kapitel Immunoassays). Die maximal zulässige Unpräzision beträgt nach den Richtlinien der Bundesärztekammer 6%. Ein Qualitätskriterium der Assays ist die funktionelle Sensitivität. Unter funktioneller Sensitivität versteht man die niedrigste Konzentration eines Hormones, die noch mit einem Variationskoeffizienten von unter 15% gemessen werden kann. Aufgrund der funktionellen Sensitivität werden vier Generationen von TSH-Assays unterschieden:

Generation	Funktionelle Sensitivität (mIU/l)
1	1-2
2	0,1-0,2
3	0,01-0,02
4	0,001-0,002

Mit den TSH-Assays der ersten Generation war eine Differenzierung zwischen latenter, manifester Hyperthyreose und Euthyreose nicht möglich. Daher mußte sehr häufig der TRH-Test durchgeführt werden. Heute dürfen TSH-Assays der ersten Generation nicht mehr verwendet werden. Die TSH-Assays der dritten Generation sind bereits weit verbreitet.

Ein weiteres Qualitätskriterium ist die analytische Spezifität des TSH-Assays. Die Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers gegenüber strukturell verwandten Hormonen

wie HCG, LH, FSH sollte möglichst gering sein (<0,001%). Diese drei Hormone sind Heterodimere mit einer gemeinsamen α -Untereinheit. Sie unterscheiden sich nur in ihrer β -Untereinheit.

Bewertung: Liegt TSH im Referenzbereich, wird eine euthyreote Stoffwechsellaage angenommen. Es kann dann i.d.R. auf eine weitere Labordiagnostik der Schilddrüse verzichtet werden. Bei erniedrigtem oder erhöhtem TSH wird die Bestimmung des FT4 und FT3 durchgeführt. Bei der Hyperthyreose werden erniedrigte TSH-Werte (TSH-Suppression durch erhöhte Schilddrüsenhormone) und bei der Hypothyreose erhöhte TSH-Werte (fehlende negative Rückkoppelung durch die erniedrigten Schilddrüsenhormone) gemessen. Bei der L-Thyroxin-Substitutionstherapie (z.B. nach Schilddrüsenresektion oder Radiojodtherapie) wird für eine optimale Dosierung des L-Thyroxins ein TSH-Wert im unteren Referenzbereich angestrebt. Normale bis erhöhte TSH-Werte weisen auf eine ungenügende L-Thyroxin-Substitution hin. Bei einer thyreostatischen Therapie der Hyperthyreose sollte TSH im Referenzbereich liegen und der TRH-Test ein normales Ergebnis zeigen.

Einfluß- und Störfaktoren: Einflußgrößen des TSH-Wertes sind das Lebensalter (deutliche Veränderung des Referenzbereiches vor allem im ersten Lebensjahr) und die Schwangerschaft (TSH↓). Während der Schwangerschaft kann die Kreuzreaktivität des TSH-Assays mit HCG bedeutsam werden, so dass die TSH-Werte mit Vorsicht zu interpretieren sind. Im Immunoassay werden häufig monoklonale Antikörper von der Maus verwendet. Beim Vorliegen von humanen Anti-Maus-Antikörpern (heterophile Antikörper) kann daher der Immunoassay gestört werden.

Referenzbereich: 0,35 - 4,5 mIU/l (Serum, Erwachsene)

XIV.2.5.2 FT4 und FT3

Indikation: Die Bestimmung des FT4 und FT3 bei V.a. eine Störung der Schilddrüsenfunktion wird i.d.R. nur durchgeführt, wenn der TSH-Wert nicht im Referenzbereich liegt.

Methode: kompetitive Immunoassays mit einer hohen analytischen Sensitivität, insbes. Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-Immunoassays. Die Unpräzision sollte unter 8% liegen.

Bewertung: Die Schilddrüsenhormone FT3 und FT4 sollten zusammen mit dem TSH-Wert beurteilt werden. Wenn FT3 und FT4 bei erniedrigtem TSH im Referenzbereich liegen, ist eine latente Hyperthyreose anzunehmen. Bei der manifesten Hyperthyreose sind FT4 und/oder FT3 erhöht. Die Hypothyreose kann mit Hilfe der Bestimmung des FT3 und FT4 in eine latente oder manifeste Hypothyreose differenziert werden. Die verschiedenen Befundkonstellationen sind in der Tabelle zusammengefasst.

Befund	Interpretation
TSH, FT4 und FT3 normal	Euthyreose
TSH ↓ und FT4 und FT3 normal	latente Hyperthyreose
TSH ↓ und FT4 ↑ und FT3 ↑	manifeste Hyperthyreose
TSH ↓ und FT4 normal und FT3 ↑	isolierte T3-Hyperthyreose
TSH ↑ und FT4 und FT3 normal	latente Hypothyreose
TSH ↑ und FT4 ↓ bzw. FT3 ↓	manifeste Hypothyreose
TSH normal und FT3 ↓ (evtl. auch FT4 ↓)	Low T3-Syndrom (bei schweren Allgemeinerkrankungen, mit euthyreoter Stoffwechsellaage)
TSH normal bis ↓ und FT4 ↓ und FT3 ↓	hypophysäre, sekundäre Hypothyreose (sehr selten)
TSH ↑ und FT4 ↑ und FT3 ↑	TSH-produzierender Tumor, Schilddrüsenhormonresistenz (sehr selten)

Einfluss- und Störfaktoren: Einflussgrößen sind das Lebensalter (altersabhängige Referenzbereiche bei Kindern) und die Schwangerschaft. Beim Fasten, bei der diabetischen Ketoazidose und bei Heparin-gabe kommt es zu einem Anstieg der freien Fettsäuren, die T4 aus der Proteinbindung verdrängen (FT4↑). Auch verschiedene Medikamente (ASS, Phenytoin, Carbamazepin, Furosemid) können T4 aus der Proteinbindung verdrängen. Bei der familiären dysalbuminämische Hyperthyroxinämie kommen aufgrund eines erblich abnorm bindendes Albumins erhöhte FT4-Werte vor. Störfaktoren sind heterophile Antikörper und Autoantikörper gegen Schilddrüsenhormone.

Referenzbereich: FT4: 0,89 - 1,80 ng/dl, FT3: 2,3 - 4,2 pg/ml (Serum, Erwachsene)

XIV.2.5.3 TRH-Test

Das Thyreotropin Releasing Hormon TRH fördert die Synthese und Sekretion von TSH. Durch i.v. Injektion von synthetischen TRH kann die Stimulierbarkeit der Hypophyse geprüft werden. Dabei wird TSH vor und nach TRH-Gabe bestimmt. Durch die verbesserte Sensitivität der TSH-Assays ist der Einsatz des TRH-Testes erheblich zurückgegangen. Die Indikation des TRH-Tests beschränkt sich auf die folgenden Fälle: Überprüfung der TSH-Sekretionsreserve bei grenzwertigen Schilddrüsenfunktionsstörungen, Nachweis einer Sekretionsstarre bei hypophysären Erkrankungen oder bei TSH-produzierenden Tumoren, Nachweis einer Schilddrüsenhormonresistenz (überhöhte Stimulierbarkeit).

XIV.2.5.4 Schilddrüsen-Autoantikörper

Gegen verschiedene Strukturen der Schilddrüse können Autoantikörper gebildet werden. Pathophysiologisch haben die Autoantikörper gegen TSH-Rezeptoren (TSH-Rezeptor-Antikörper, TRAK), die praktisch regelmäßig beim M. Basedow auftreten, eine wichtige Bedeutung. Durch Bindung an den TSH-Rezeptor imitieren sie die Wirkung des TSH und führen zur Hyperthyreose und Struma. Das Auftreten von Autoantikörpern gegen die Thyreoperoxidase (Anti-TPO) ist i.G. zu den TRAK nicht mit dem Vorliegen einer Autoimmunthyreopathie gleichzusetzen. Sie treten bei der Hashimoto-Thyreoiditis (60-90%), beim primären Myxödem (40-70%), bei der postpartalen Thyreoiditis (50-70%) und beim M. Basedow (60-70%) auf, sind jedoch bei der subakuten Thyreoiditis de Quervain (<5%), bei der Schilddrüsenautonomie (<5%) und bei der euthyreoten Struma (<5%) selten. TPO ist Hauptbestandteil des mikrosomalen Antigens. Die Bestimmung der TPO-AK wird heute der Bestimmung der mikrosomalen Antikörper (MAK) vorgezogen.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Thyreoglobulin (TAK) hat differentialdiagnostisch nur eine geringe Bedeutung. Jedoch stellt Thyreoglobulin einen wichtigen Tumormarker der Schilddrüse dar, dessen Bestimmung durch Thyreoglobulin-Antikörper gestört werden kann. Autoantikörper gegen die Schilddrüsenhormone T3 und T4 kommen sehr selten vor und können die Bestimmung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen stören. Die Bestimmung von Schilddrüsenautoantikörpern erfolgt mit Hilfe von Immunoassays und der indirekten Immunfluoreszenz.

XIV.3 Nebenniere

XIV.3.1 Nebennierenrinde

Die NNR wird unterteilt in die Zona glomerulosa (Aldosteron-Synthese), Zona fasciculata (Kortisol-Synthese) und die Zona reticularis (DHEA-Synthese). Die NNR-Steroide werden aus der Vorstufe Cholesterin gebildet.

Die Produktion der NNR-Steroide unterliegt der übergeordneten Regulation durch das HVL-Hormon ACTH. Jedoch wird die Aldosteron-Synthese vor allem durch Angiotensin II stimuliert und ist nur teilweise ACTH-abhängig. Die hypophysäre ACTH-Sekretion wird durch das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) reguliert. Im Sinne der negativen Rückkoppelung wirkt Kortisol inhibitorisch auf die ACTH-Sekretion der Adenohypophyse und auf die CRH-Sekretion des Hypothalamus. Kortisol fördert den Eiweißkatabolismus (→Muskelatrophie, Osteoporose) und stimuliert die Glukoneogenese (→patholog.

Glukosetoleranz) und verändert den Fettstoffwechsel (→Hyperlipidämie, Stammfettsucht). Bei ausgeprägtem Hyperkortisolismus treten auch mineralokortikoide Wirkungen auf (→hypokaliämische Alkalose).

XIV.3.1.1 Hyperkortisolismus

Ursachen des Hyperkortisolismus sind das ACTH-produzierende Hypophysenadenom (M. Cushing), ektope ACTH-produzierende Tumoren (z.B. kleinzelliges Bronchialkarzinom), das iatrogene Cushing-Syndrom bei Glukokortikoidmedikation, NNR-Tumoren und die idiopathische NNR-Hyperplasie. Begleiterscheinungen des Hyperkortisolismus sind: Hypertonie, Stammfettsucht, Büffelnacken, Vollmondgesicht, Gewichtszunahme, Muskelschwäche, Osteoporose, psychiatrische Symptome, Diabetes, Menstruationsstörungen, Hirsutismus etc.

Basisdiagnostik: Zum Nachweis bzw. Ausschluß eines Hyperkortisolismus muß der Dexamethason-Hemmtest durchgeführt werden. Die Bestimmung des freien Kortisols im 24h-Sammelurin kann ergänzend durchgeführt werden.

Weiterführende Diagnostik: bei nachgewiesenem Hyperkortisolismus Hochdosis Dexamethason-Hemmtest, CRH-Test.

XIV.3.1.2 Hypokortisolismus

Ursachen der primären NNR-Insuffizienz sind der M. Addison (autoimmun mit Nachweis von Auto-AK), Infektionen der NNR (Tbc, CMV-Adrenalitis bei AIDS), Einblutungen (Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom) und Metastasen. Die sekundäre NNR-Insuffizienz kommt vor bei Steroidmedikationen und bei hypothalamisch-hypophysären Erkrankungen. Leitsymptome der manifesten NNR-Insuffizienz sind: Schäche und rasche Ermüdbarkeit, Pigmentierung (M. Addison), Gewichtsverlust, Hypotonie und Hypoglykämie.

Basisdiagnostik: ACTH-Kurztest. Das freie Kortisol im 24h-Sammelurin ist zum Nachweis bzw. Ausschluß des Hypokortisolismus weniger geeignet.

Weiterführende Diagnostik: CRH-Test, NNR-Autoantikörper, Aldosteron.

XIV.3.1.3 Labordiagnostik

XIV.3.1.3.1 Kortisol

Indikation: Die isolierte Kortisolbestimmung im Plasma oder Serum hat aufgrund der Tagesrhythmik eine geringe Aussagekraft. Zum Nachweis eines Hyper- oder Hypokortisolismus sollte die Kortisolbestimmung im Rahmen standardisierter Funktionsteste (s. Dexamethason-Hemmtest, ACTH-Kurztest) durchgeführt werden. Das freie (nichtprotein-gebundene) Kortisol im 24h-Sammelurin unterliegt im Vergleich zum Plasmakortisol geringeren Schwankungen.

Methode: Kompetitiver Immunoassay. Nach den Richtlinien der Bundesärztekammer beträgt die maximal zulässige Unpräzision 8%.

Einfluss- und Störfaktoren: Physiologischerweise unterliegt Kortisol einer zirkadianen Rhythmik mit Maxima am Morgen und Minima am Abend. Zum Nachweis der Tagesrhythmik kann ein Kortisol-Tagesprofil durchgeführt werden. Stress führt zu einem Anstieg des Kortisols. Kreuzreaktivitäten mit Glukokortikoidpräparaten und Metaboliten können u. U. bedeutsam werden (z.B. 21-Desoxycortisol beim 21-Hydroxylase-Mangel).

Bewertung: s. Funktionsteste

XIV.3.1.3.2 ACTH

Indikation: Die ACTH-Bestimmung sollte nicht isoliert, sondern im Zusammenhang mit der Kortisolbestimmung oder im Rahmen von Funktionstesten (s. CRH-Test) durchgeführt werden.

Methode: Sandwich Immunoassay, max. Unpräzision 8%.

Einfluss- und Störfaktoren: ACTH hat eine zirkadiane Rhythmik mit einem Minimum am Morgen und einem Maximum am Abend. Nach der Blutentnahme sollte die Probe gekühlt werden, da das Peptidhormon ACTH relativ instabil ist.

Bewertung: Stark erhöhte ACTH-Werte bei niedrigen Kortisolwerten weisen auf eine primäre NNR-Insuffizienz hin. Normal bis erniedrigte ACTH-Werte bei gleichzeitig erniedrigtem Kortisol kommen bei der sekundären/ tertiären NNR-Insuffizienz vor. Beim Hyperkortisolismus ermöglicht die ACTH-Bestimmung die Differenzierung zwischen ACTH-abhängigen und ACTH-unabhängigen Formen.

XIV.3.1.3.3 Funktionsteste

XIV.3.1.3.3.1 Dexamethason-Hemmtest

Der Test ist als Screening-Test zum Nachweis bzw. Ausschluß eines Hyperkortisolismus geeignet und ist auch ambulant durchführbar. Beim Dexamethason-Hemmtest wird geprüft, ob durch die Gabe von 1 mg Dexamethason p.o. (Niedrigdosis) eine Suppression des Kortisolspiegels erzielt werden kann. Physiologisch ist eine deutliche Suppression des Kortisolwertes. Damit kann ein Hyperkortisolismus mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei ausbleibender Kortisolsuppression liegt ein Hyperkortisolismus vor.

Bei nachgewiesenem Hyperkortisolismus wird für die Differentialdiagnose zwischen hypophysärer und adrener Genese unter stationären Bedingungen der Dexamethason-Hemmtest mit der Hochdosis (8 mg) durchgeführt. Beim hypophysären Hyperkortisolismus wird i.d.R. eine Suppression des Kortisolausgangswertes von mindestens 50% erzielt. Beim adrenalen und beim ektopten Hyperkortisolismus wird keine Suppression beobachtet.

XIV.3.1.3.3.2 ACTH-Kurztest (Synacthen®-Test)

Mit dem ACTH-Kurztest wird bei v.a. NNR-Insuffizienz durch die i.v. Gabe von ACTH bzw. Synacthen® die Stimulationsfähigkeit der NNR geprüft. Kortisol wird vor und nach ACTH-Gabe gemessen. Bei physiologischer Kortisolstimulation kann eine NNR-Insuffizienz ausgeschlossen werden. Bei der NNR-Insuffizienz (M. Addison) kommt es zu einem unzureichendem Kortisolanstieg. Beim zentralen Hypokortisolismus kann der Kortisolanstieg ebenfalls gering oder zeitlich verzögert sein.

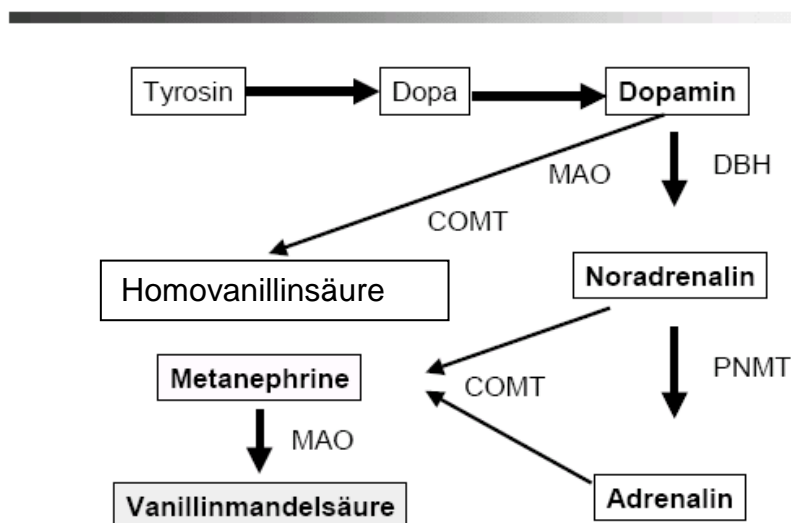
XIV.3.1.3.3.3 CRH-Test

Beim CRH-Test werden die ACTH- und Kortisol-Sekretionsantwort nach CRH-Stimulation überprüft. Dieser Funktionstest erlaubt die Differenzierung des ACTH-abhängigen vom ACTH-unabhängigen Hyperkortisolismus und die Differenzierung zwischen sekundärer (ACTH-Ausfall) und tertiärer (als Folge einer Therapie mit Kortikoiden) NNR-Insuffizienz. Physiologisch ist ein Anstieg des ACTH auf das 2-3fache des Ausgangswertes und ein Anstieg des Plasmakortisols. Bei der sekundären NNR-Insuffizienz wird kein Anstieg des ACTH und des Kortisols beobachtet. Bei der tertiären NNR-Insuffizienz findet man bei erniedrigten Basalwerten einen verzögerten, erniedrigten Anstieg. Beim zentralen Cushing-Syndrom kommt es zu einem starken ACTH- und Kortisol-Anstieg, beim adrenalen Cushing-Syndrom fehlt der ACTH- und Kortisolanstieg.

XIV.3.2 Nebennierenmark

Katecholamine werden in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes und des sympathischen Nervensystems gebildet. Sie werden dort gespeichert und können durch zahlreiche Stimuli freigesetzt werden. Die Abbildung zeigt die Bildung und den Abbau der Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Die Katecholamine werden durch die Catechol-O-methyltransferase und die Monoaminoxidase inaktiviert.

Stoffwechsel der Katecholamine



MAO: Monoaminoxidase
DBH: Dopamin- β -hydroxylase

COMT: Catechol-O-methyltransferase
PNMT: Phenylethanolamin-N-methyltransferase

Katecholamine werden bei der Diagnostik catecholaminproduzierender Tumoren bestimmt (Phäochromozytom, Paragangliom, Neuroblastom). Die klinische Symptomatik variiert erheblich. Neben dem Leitsymptom Hypertonie (permanent oder intermittierend) kommen häufig Kopfschmerzen, Fieber, Schwitzen, Tachykardie, Tremor, Nervosität und Gewichtsverlust vor.

Ein Phäochromozytom sollte in den folgenden Fällen ausgeschlossen werden: Hypertonie, insbes. bei jungen Patienten (max. Häufigkeit im 4. und 5. Lebensjahrzehnt) mit paroxysmalen Blutdruckanstiegen, bei Tumoren der Nebennierenregion, bei Erkrankungen mit erhöhtem Risiko: Multiple endokrine Neoplasie Typ II a und b, Neurofibromatose von Recklinghausen, von Hippel-Lindau-Erkrankung, Phäochromozytom bei Verwandten ersten Grades (autosomal-dominant erbliche Form).

XIV.3.2.1 Labordiagnostik

Als Basisdiagnostik zum Nachweis bzw. Ausschluß eines catecholaminproduzierenden Tumors wird die Bestimmung der freien Metanephrine (Normetanephrin und Metanephrin) im Plasma und die Bestimmung der fraktionierten Metanephrine (Normetanephrine und Metanephrin) im 24h-Sammelurin empfohlen.

XIV.3.2.1.1 Freie Metanephrine im Plasma

Indikation: Screening bei V.a. Phäochromozytom, Paragangliom

Präanalytik: Die Blutentnahme muss im Liegen unter Ruhebedingungen (mind. 30 min) über einen venösen Zugang erfolgen. Zahlreiche Medikamente können die Plasmakatecholamine beeinflussen und müssen ggf. vorher abgesetzt werden. Stress, Hypoglykämie und Niereninsuffizienz führen zu erhöhten Plasmakonzentrationen.

Methode: Probenvorbereitung mit Festphasenextraktion und Messung mit Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD)

Bewertung: Die freien Plasmametaneprine (Metanephrin und Normetanephrin) haben eine hohe Sensitivität (>95%) und Spezifität (ca. 95%) in der Diagnostik des Phäochromozytoms. Ein Grund hierfür sind die kontinuierliche Produktion von Metanephrinen durch den Tumor unabhängig von der Ausschüttung der Katecholamine.

XIV.3.2.1.2 Fraktionierte Metanephrine im 24h-Sammelurin

Indikation: Screening bei v.a. Phäochromozytom, Paragangliom

Präanalytik: In den Urin-Sammelbehälter muss für die Probenstabilität konz. Salzsäure vorgelegt werden. Außerdem muss das Sammelgefäß im Kühlschrank aufbewahrt werden. Vor und während der Sammelperiode sollte der Patient bestimmte Lebensmittel vermeiden (Nüsse, Bananen, Zitrusfrüchte, Schwarztee, Kaffee, Vanille). Auch bestimmte Medikamente (Diuretika, trizyklische Antidepressiva, Theophyllin, MAO-Hemmer, L-Dopa) sollten vermieden werden.

Methode: Da die Metanephrine im Urin überwiegend in einer konjugierten Form vorliegen, wird zunächst eine saure Hydrolyse durchgeführt, um die dekonjugierten bzw. freien Metanephrine freizusetzen. Nach einer Aufreinigung und Anreicherung der freien Metanephrine mittels Festphasenextraktion erfolgt die Messung mit der Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) oder der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion

Bewertung: Die fraktionierten Metanephrine im Sammelurin haben eine hohe Sensitivität (ca. 93%) bei einer ähnlich hohen Spezifität.

XIV.3.2.1.3 Weitere Analysen

Die Bestimmung der Katecholamine im Plasma ist weniger sensitiv und spezifisch als die Bestimmung im 24h-Sammelurin, da die Plasmakonzentrationen erheblichen Schwankungen unterliegen.

Die Katecholamine sowie das Abbauprodukt Vanillinmandelsäure (VMS) im 24h-Sammelurin hat im Vergleich zu den Metanephrinen eine deutlich niedrigere Sensitivität (47-74%).

Die Bestimmung der Homovanillinsäure (HVA) im 24h-Urin wird in der Diagnostik vorwiegend dopaminsezernierender Tumoren (z.B. Neuroblastom) v.a. in der Pädiatrie durchgeführt.

XIV.3.2.1.4 Clonidin-Test

Clonidin wirkt zentral hemmend auf den Sympathikus. Eine durch einen erhöhten Sympathikotonus bedingte Katecholaminfreisetzung wird nach Clonidingabe unterdrückt, nicht jedoch eine autonome Katecholaminfreisetzung beim Phäochromozytom. Beim Clonidin-Test wird die Normetanephrin im Plasma vor und 3 Stunden nach Clonidin-Gabe bestimmt. Ein Abfall des Normetanephrinkonzentration nach der Clonidin-Gabe um mindestens 40% gegenüber dem Ausgangswert spricht gegen das Vorliegen eines Phäochromozytoms.

XIV.4 Fragen zur Lernevaluation

- 1) Warum sollten heute nur noch die freien SD-Hormone bestimmt werden?
- 2) Welche Testresultate (TSH, FT4, FT3) erwarten Sie bei den folgenden SD-Funktionsstörungen: primäre manifeste und latente Hypo- und Hyperthyreose?
- 3) Welches Ergebnis erwarten Sie im TRH-Test bei einer Hyperthyreose?
- 4) Wie diagnostizieren Sie den M. Basedow?
- 5) Welche Folgen hat eine unentdeckte Neugeborenenhypothyreose?
- 6) Wie weisen Sie einen Hyperkortisolismus nach u. unterscheiden die versch. Formen?
- 7) Wie diagnostizieren Sie den M. Addison?
- 8) Wann wird der Clonidin-Test eingesetzt? Welches Ergebnis spricht beim Clonidin-Test für einen Katecholamin produzierenden Tumor?

XIV.5 Immunoassays

Hormone, Antikörper und Proteine ohne Enzymaktivität werden mit immunologischen Methoden bestimmt. Daher erfolgt hier eine Erläuterung der Meßprinzipien immunologischer Bestimmungsmethoden.

XIV.5.1 Direkte Messung von Antigen-Antikörper-Reaktionen:

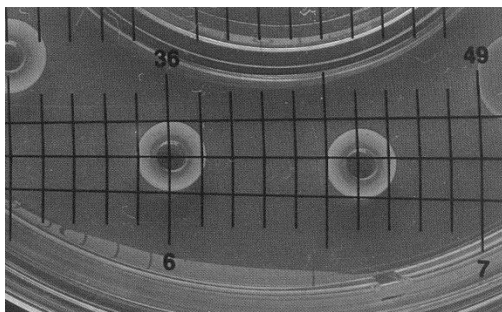
Diese Methoden setzen die Bildung sichtbarer Agglutinate oder großer Immunkomplexe voraus.

XIV.5.1.1 Agglutination

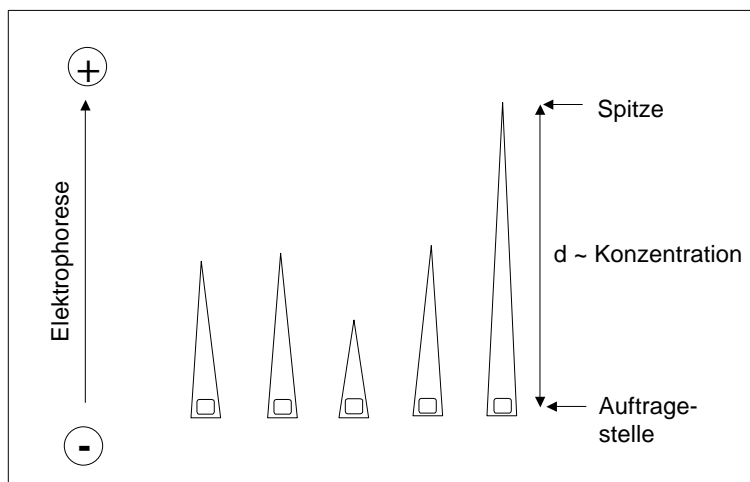
Hierbei werden korpuskuläre Antigene durch Antikörper zur Agglutination gebracht. Beispiele hierfür sind der Hämagglutinationstest zur Blutgruppenbestimmung (Antigen-Nachweis) und die direkte Bakterienagglutination nach Widal (Antikörper-Nachweis). Durch Verdünnungsreihen sind die Antikörper im Patientenserum als Titer quantifizierbar.

XIV.5.1.2 Immunpräzipitation in Gelen

Bei der radialen Immundiffusion nach Mancini wird das zu quantifizierende Antigen in ein gestanztes Loch in einem Gel aufgetragen, das einen spezifischen Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen enthält. Dieser Antikörper ist gleichmäßig im Gel verteilt. Das Antigen diffundiert von dort radial nach außen. Am Ende entsteht ein Präzipitationsring, dessen Durchmesser sich proportional zur Antigenkonzentration in der Probe verhält.



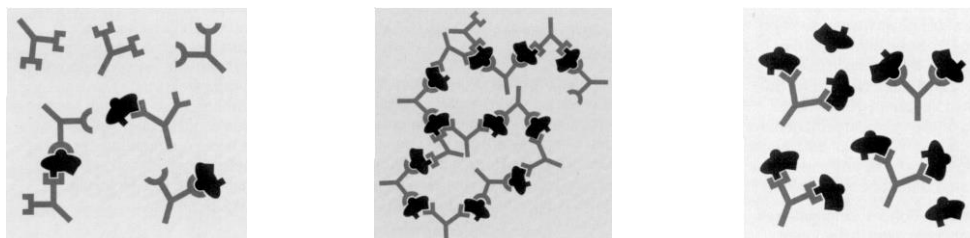
Bei der Rocket-Elektrophorese (Laurell-Elektrophorese) wird die Probe ebenfalls in ein vorgestanztes Loch in einem Gel aufgetragen, in dem ein spezifischer Antikörper gleichmäßig verteilt ist. Danach wird das Gel einer Elektrophorese unterzogen. Dabei wandert das zu bestimmende Antigen im elektrischen Feld. Es entstehen raketenförmige Präzipitatlinien, die mit einer Färbung im Anschluß an die Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Der Abstand zwischen Auftragestelle und der Spitze der Präzipitationslinie wird vermessen. Diese Distanz verhält sich proportional zur Antigenkonzentration der Probe.



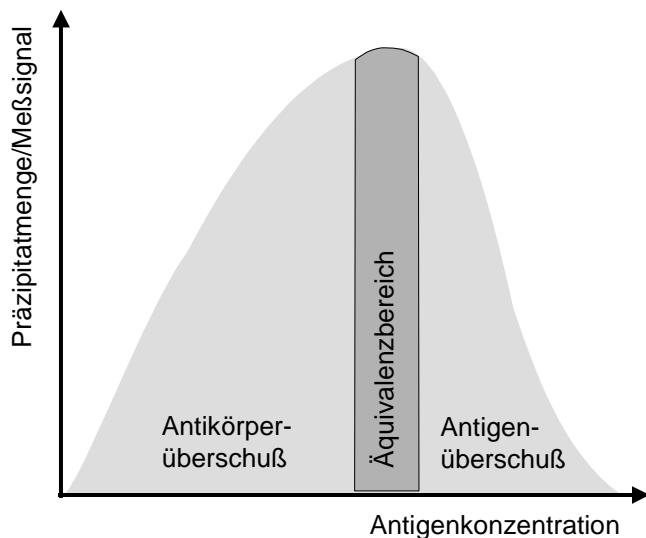
Die Immundefixation wird in der Laboratoriumsmedizin vor allem zum qualitativen Nachweis der Monoklonalität von Immunglobulinen bzw. der Immunglobulinketten sowie zu deren Typisierung (schwere Ketten: γ , μ , α , ϵ , δ , leichte Ketten: λ , κ) eingesetzt. Hierbei werden zunächst die Serumproteine auf mehreren Auftragsstellen in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach werden auf jede Elektrophoresespur verschiedene Antiseren aufgetragen, die jeweils spezifisch mit einem bestimmten schweren oder einem bestimmten leichten Kettentyp reagieren. Danach wird das Gel gewaschen, wobei nur die hochmolekularen Immunkomplexe im Gel zurückbleiben. Die Immunpräzipitate werden mit einer Proteinfärbung sichtbar gemacht. Monoklonale Immunglobuline sowie monoklonale leichte oder schwere Ketten führen zu kräftigen, scharf begrenzten Banden, die sich deutlich von den diffusen, breiten Banden der polyklonalen Immunglobuline unterscheiden.

XIV.5.1.3 Nephelometrie und Turbidimetrie

Bei der Immunreaktion zwischen Antigen und Antikörper entstehen Immunkomplexe, deren Größe vom Verhältnis zwischen Antigen- und Antikörperkonzentration abhängt. Im Antikörper- und Antigenüberschuß entstehen nur kleine Immunkomplexe. Im Äquivalenzbereich entstehen große Immunkomplexe.

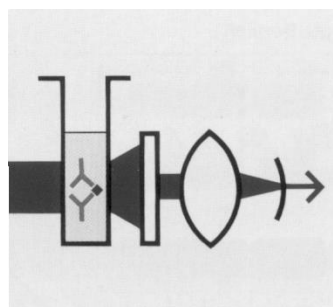
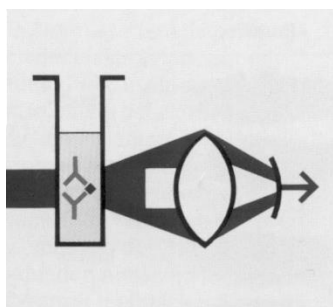


Die Kurve nach Heidelberger und Kendall zeigt die Menge des entstehenden Immunpräzipitates in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration. Die Immunpräzipitattmenge bestimmt wiederum die Intensität des gestreuten Lichtes, das beim Durchtritt eines Lichtstrahles durch die Meßküvette entsteht.



Aufgrund des Verlaufes der Heidelberger-Kendall-Kurve können bei sehr hohen Antigenkonzentrationen falsch-niedrige Konzentrationen gemessen werden.

Der Nachweis der Immunkomplexe in der Messküvette kann mit der Nephelometrie oder der Turbidimetrie erfolgen. Bei der Nephelometrie wird nur das durch die Immunkomplexe gestreute Licht nachgewiesen. Hierbei wird das zentrale Lichtbündel, das die Messküvette ohne Ablenkung passiert, ausgeblendet. Dagegen wird bei der Turbidimetrie nur das zentrale Lichtbündel gemessen und das gestreute Licht ausgeblendet.



Indem die analytischspezifischen Antikörper an Latexpartikel gekoppelt werden (latexverstärkte Immunnephelometrie), kann die Nachweisempfindlichkeit der Methode deutlich gesteigert werden. Für Substanzen mit sehr niedrigen Konzentrationen (z.B. Hormone) ist die Methode nicht geeignet.

XIV.5.2 Indirekte Messung der Antigen-Antikörperreaktion

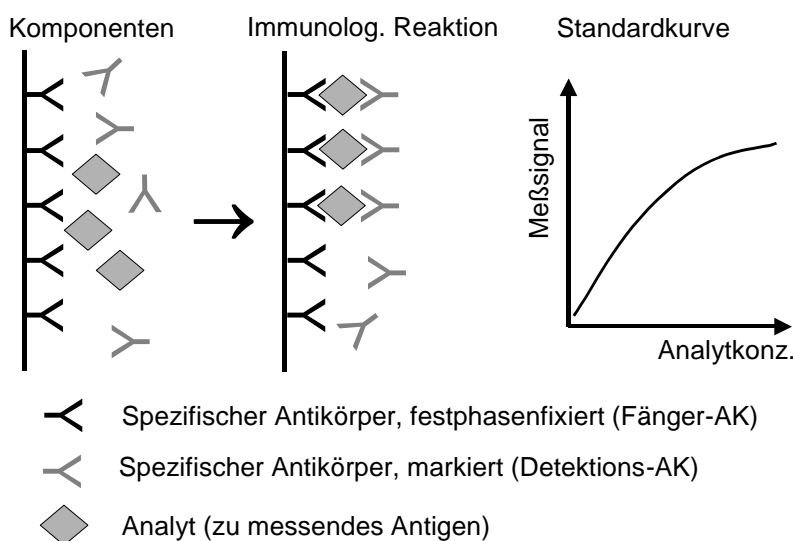
Bei diesen Verfahren werden Markierungen von Antigenen oder Antikörpern mit Fluorophoren, Enzymen, radioaktiven Isotopen oder Luminogenen vorgenommen. Indirekte Methoden ermöglichen eine wesentlich höhere analytische Sensitivität als direkte Methoden.

Die verwendeten Markierungen haben einen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit immunchemischer Methoden. Mit der Chemilumineszenz und der Fluoreszenz kann eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit (bis 10^{-20} M) der Immunoassays erzielt werden. Enzymatische Markierungen mit photometrischer Detektion haben im Vergleich zu den anderen Markierungen eine geringere Nachweisempfindlichkeit (bis. ca. 10^{-16} molar). Die Nachweisempfindlichkeit eines immunologischen Testes hängt jedoch auch von den Eigenschaften der verwendeten Antikörper und weiteren Faktoren ab.

Bei den heterogenen Immunoassays sind Wasch- bzw. Trennschritte erforderlich. Hierbei muß der nicht gebundene Tracer (Antikörper oder markierter Analyt) vom gebundenen Tracer entfernt werden. Typische heterogene Immunoassays sind der ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) und der RIA (Radioimmunoassay).

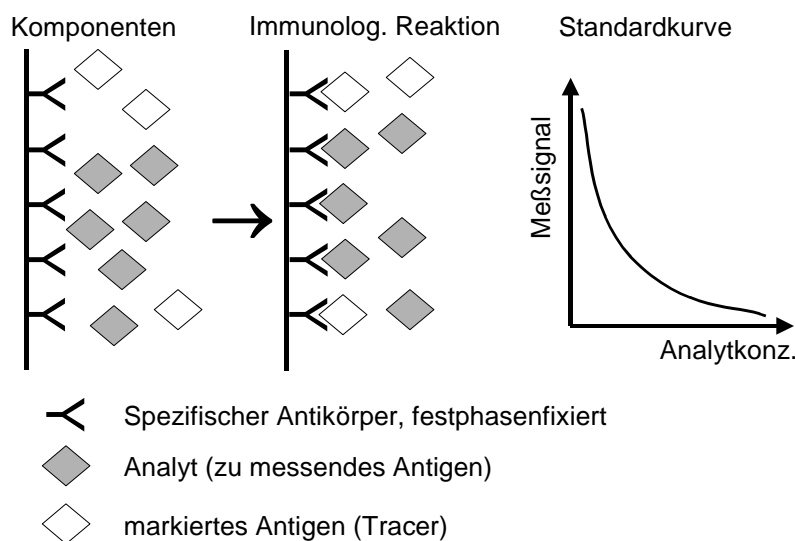
XIV.5.2.1 Sandwich-Immunoassay

Beim Sandwich-Immunoassay ist das Reaktionsgefäß (z.B. Mikrotiterplatte) oder ein Partikel (magnetische oder andere Partikel) mit einem Fängerantikörper beschichtet, der den Analyten bindet. Nach der Bindung des Analyten an den Fänger-Antikörper ist ein Waschschrift erforderlich. Hierbei werden alle nicht gebundenen Bestandteile der Probe entfernt. Danach wird ein markierter Detektionsantikörper zugesetzt, der an dem bereits gebundenen Analyten bindet. Dabei entsteht der sog. Sandwich-Komplex. Im folgenden Waschschrift müssen alle nicht gebundenen Detektionsantikörper entfernt werden. Die folgenden Schritte hängen von der Art der Markierung ab. Bei einer enzymatischen Markierung (z.B. Alkalische Phosphatase) wird ein entsprechendes Substrat zugesetzt. Aus dem Substrat wird ein Farbstoff gebildet, dessen Konzentration sich proportional zur Konzentration des Analyten verhält.



XIV.5.2.2 Kompetitiver Immunoassay

Beim kompetitiven Immunoassay konkurrieren der Analyt der Probe und der Tracer um die Bindung an einen Antikörper an einer Festphase (Gefäßwand, Magnetpartikel etc.). Als Tracer wird eine markierter Analyt verwendet. Die Anzahl der analytspezifischen Antikörper ist begrenzt. Je höher die Analytkonzentration der Probe ist, desto weniger Tracermoleküle können an den spezifischen Antikörpern binden. Bei niedriger Analytkonzentration binden entsprechend mehr Tracermoleküle an den Antikörper. Nach der Inkubationsphase erfolgt ein Waschschrift, bei dem alle nicht gebundenen Tracermoleküle entfernt werden. Das Messsignal steht somit mit der Analytkonzentration in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis.



XIV.5.2.3 Indirekte homogene Immunoassays

Beim homogenen Immunoassay ist nach der Antigen-Antikörper-Reaktion kein Trennschritt erforderlich, da das Messsignal direkt für die Berechnung der Analytkonzentration der Probe verwendet werden kann.

XIV.5.2.3.1 Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA)

Der Probenanalyt konkurriert mit einem Tracer um die Bindung an einem gelösten freien Antikörper. Der Tracer ist mit einem Fluorophor markiert. Der Tracer wird mit polarisiertem Licht angeregt. Je nachdem wieviel Tracer an den Antikörper gebunden ist, hat das emittierte Licht entweder einen hohen oder einen niedrigen Polarisationsgrad. Der ungebundene Tracer bewegt sich im Vergleich zu dem höhermolekularen Immunkomplex stärker und emittiert das Licht daher mit einem niedrigeren Polarisationsgrad. Aus dem Polarisationsgrad des emittierten Lichtes kann die Analytkonzentration der Probe berechnet werden. Je höher die Analytkonzentration der Probe ist, desto weniger Tracer bindet an den Antikörper und desto niedriger ist demzufolge der Polarisationsgrad des emittierten Lichtes.

XIV.5.2.3.2 EMIT

Beim Emit (Enzyme-Multiplied Immunotechnique) werden zum Antigen-Nachweis Antikörper-Enzym-Konjugate verwendet. Das an den Antikörper gebundene Enzym hat die Eigenschaft durch die Bildung des Immunkomplexes sterisch inhibiert zu werden. Bei einer hohen Analytkonzentration wird die Enzymaktivität stärker inhibiert als bei einer niedrigen Analytkonzentration.

XV Urin-Diagnostik

XV.1 Lernziele

1) Beurteilung der Nierenfunktion

Beurteilen Sie die Parameter Kreatinin, Harnstoff, Kreatinin-Klearance, MDRD-Formel und Cystatin C hinsichtlich Einflußgrößen, Störfaktoren und Sensitivität eine Nierenfunktionseinschränkung zu beurteilen.

2) Beschreiben Sie die beiden Methoden der Urin-Basisuntersuchung

Der Urinstreifentest ist die häufigste Urinuntersuchung im Labor. Werden hier Auffälligkeiten gefunden, schließt sich die Untersuchung des Urinsediments an. Im normalen Urinsediment werden vereinzelt Erythrozyten (<2 pro Gesichtsfeld), Leukozyten (< 5 pro Gesichtsfeld), vereinzelt Plattenepithelien und Kristalle gefunden.

3) Abklärung einer Proteinurie nach ihrer Lokalisation

Eine Proteinurie sollte immer abgeklärt werden. Dabei wird die Proteinurie nach ihrer Lokalisation in prärenal, renal und postrenal unterschieden. Die renale Proteinurie wird zusätzlich in eine glomeruläre, tubuläre und gemischte Proteinurie unterschieden. Für die Lokalisation der Proteinurie ist die qualitative und/oder quantitative Beurteilung der ausgeschiedenen Proteine nach ihrer Größe die Grundlage. Bei der quantitativen Beurteilung durch Einzelproteine werden das Albumin (Marker für selektiven glomerulären Schaden), IgG (Marker für unselektiven glomerulären Schaden) und α 1-Mikroglobulin (Marker für tubulären Schaden) eingesetzt. Die Auftrennung nach Größe in der Elektrophorese erfolgt durch die spezielle SDS-PAGE Elektrophorese und ist ein typisch qualitatives Verfahren.

XV.2 Uringewinnung

- Spontan-Urin, zur Untersuchung des Urin-Status, qualitativ
- 1. Morgenurin, zum Nitrit-Nachweis bei bakter. Infektionen des Uronenitaltrakts
- 2. Morgenurin, Untersuchung auf Eiweiß-Ausscheidung
- 24-h Urin zur quantitativen Untersuchung der Tagesausscheidung einer Substanz

XV.3 Beurteilung der GFR

- Kreatinin im Serum/Plasma

Kreatinin entsteht aus muskulärem Kreatin. Seine Bildung ist abhängig von der Muskelmasse und vom Lebensalter. Bei normaler Nierenfunktion wird Kreatinin fast vollständig glomerulär filtriert, was eng begrenzte Serum-Konzentrationen zur Folge hat. Die Kreatinin-Bestimmung im Plasma eignet sich deshalb als Marker der glomerulären Filtrationsleistung der Niere. Eine normale Kreatininkonzentration im Serum schließt eine eingeschränkte Nierenfunktion jedoch nicht aus, da erst eine Einschränkungen der

glomerulären Filtrationsleistung auf < 50% einen Anstieg der Serumkreatinin-Konzentration hervorruft.

- **Kreatinin-Clearance**

Genauer und früher erfasst die Kreatinin-Clearance eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsleistung. Es wird die Ausscheidung im Urin ins Verhältnis gesetzt zur Serum-Konzentration und auf Körperoberfläche bezogen.

$$\text{Kreatinin-Clearance (ml/min.)} = \frac{\text{Urin-Kreatinin (mg/dl)} \times \text{Volumen (ml)}}{\text{Serum-Kreatinin (mg/dl)} \times \text{Zeit (min.)}}$$

Ist die Körperoberfläche abweichend von der Norm (etwa Kinder und sehr große Personen), so wird korrigiert mit der aus Nomogrammen für Größe und Gewicht zu ermittelnden realen KO:

$$\text{Clearance} \times 1,73 / \text{KO}$$

Die Kreatinin-Clearance bei Erwachsenen liegt zwischen 95 und 160 [ml/min/1,73 m² KO]. Sinkt die glomeruläre Filtrationsrate, so erhält man geringere Clearance-Werte.

Beachten: Vollständige Sammlung des Tages-Urins ist wichtig.

Zu vermehrter Kreatinin-Ausscheidung führen exogene Kreatininzufuhr (vermehrter Fleischgenuß) und gesteigerte Muskeltätigkeit während der Sammelperiode. Clearance-Bestimmungen bei Zirrhotikern und Muskelkranken sind eingeschränkt beurteilbar.

- **Harnstoff im Serum/Plasma**

Harnstoff wird in der Leber als Endprodukt des Aminosäureabbaus aus NH₃ und CO₂ gebildet und überwiegend renal in Abhängigkeit von der Diurese ausgeschieden. Routinemäßige Parallelbestimmungen von Kreatinin und Harnstoff zur Beurteilung der Nierenfunktion ist nicht gerechtfertigt. Die Harnstoffkonzentration ist stark von der Proteinzufuhr, Katabolismus und Diurese abhängig. Erhöhte Serumkonzentrationen treten erst bei einer Einschränkung der Nierenfunktion auf < 25 % auf.

- **Cystatin C**

Cystatin C wird in allen kernhaltigen Zellen gebildet. Cystatin C wird nicht durch Einflussgrößen wie Ernährung oder Muskelmasse beeinflusst. Cystatin C im Plasma steigt bereits bei einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsleistung < 80 ml/min an. Cystatin C liefert in der Diagnostik somit vergleichbare Aussagen wie die Bestimmung der Kreatinin-Clearance. Der Vorteil gegenüber der Kreatinin-Clearance besteht darin, dass die lästige Sammeln des Urins vermieden wird. Nachteilig ist jedoch der z.Z. noch relativ hohe Preis.

XV.4 Urin Basis-Diagnostik

XV.4.1 Urin-Teststreifen

Routinemäßige Suchtests mit Mehrfelder-Teststreifen (Erhebung eines „Urin-Status“). Mit Hilfe von Teststreifen erhält man rasch einen Gesamtstatus von Urinproben. Am wichtigsten sind die Testfelder für den Nachweis von Blut, Hb, Entzündungsparameter (Leukozyten, Nitrit, Bakterien). Die einzelnen Testparameter sind unterschiedlich empfindlich gegen

Verunreinigungen. Sorgfältige Probengewinnung, insbesondere im Hinblick auf Hygienemaßnahmen, ist deshalb sehr wichtig.

a) Leukozyten

Der Test weist die Esterase-Aktivität von Granulozyten und Histozyten, auch bereits lysierter Zellen, nach und gibt Hinweise auf entzündliche Erkrankungen der Nieren und der ableitenden Harnwege: kontrollbedürftig sind 10 - 20, pathologisch > 20 Leukozyten/ μ l.

b) Nitrit

Die häufigsten Erreger von Harnwegsinfekten reduzieren im Harn vorhandenes Nitrat, das im Testfeld durch rosarote Verfärbung angezeigt wird. Es werden dadurch nitritbildende Keime nachgewiesen. Voraussetzungen: Nitrat in der Nahrung, Urin hat mindestens 4 Stunden in der Blase verweilt, also ersten Morgenurin verwenden. Unter Antibiotika-Therapie ist eine positive Reaktion wegen einer Bakterienhemmung nicht zu erwarten.

c) Eiweiß

Das Eiweiß-Testfeld reagiert ab etwa einer Konzentration von 6 mg/dl. Mikroproteinurien sind nicht nachweisbar. Persistierende Proteinurien können auf Nierenerkrankungen hinweisen und sind Begleitphänomene des Diabetes mellitus sowie von Hypertonien. Gutartige, im Tagesverlauf ansteigende Proteinurien können auftreten infolge körperlicher Belastung (Sport) oder Streß.

d) Glukose

Der einfache, schnelle Harnzuckernachweis ist die wichtigste Methode zur Fahndung nach unerkannten Diabetikern. Verstärktes Auftreten von Glukose im Urin wird durch die Höhe des Blutzuckerspiegels bestimmt, kann jedoch auch durch eine Herabsetzung der sogenannten Nierenschwelle für Glukose (normal 160 - 180 mg/dl) aufgrund einer Störung der Nierenfunktion bedingt sein. Kurzfristige Anstiege nach übermäßiger Kohlenhydratbelastung können bei stoffwechsellnormalen Personen mit normaler Nierenschwelle auftreten. Störungen durch größere Mengen Ascorbinsäure (Vitamin C) im Urin werden bei Glukosekonzentrationen unterhalb von 100 mg/dl als falsch erniedrigte oder negative Glukose-Werte beobachtet. Im Zweifelsfall ist der Urin nach Absetzen von Vitamin C-haltigen Getränken oder Speisen zu kontrollieren.

e) Ketonkörper

Präkomatöse und komatöse Zustände bei Diabetes mellitus sind fast immer von einer Ketoazidose und Ketonurie begleitet. Ferner findet man Ketonkörper im Urin bei Hungerdiäten, Hyperemesis gravidarum und bei fieberhaften Infekten. Besonders empfindlich reagiert das Testfeld auf Acetessigsäure, die Empfindlichkeit für Aceton ist geringer. Falsch positive Reaktionen können durch Captopril und andere Sulfhydrylgruppen enthaltende Pharmaka hervorgerufen werden.

f) Urobilinogen

Die vermehrte Ausscheidung von Urobilinogen (UBG), einem Stoffwechselprodukt des Bilirubins, kann hinweisen auf 1) eine gestörte Leberfunktion infolge einer primären Lebererkrankung bzw. als Folge einer Leberbeteiligung bei anderen Erkrankungen oder 2) auf einen gesteigerten Hämoglobin-Umsatz bei hämolytischen Erkrankungen.

g) Bilirubin

Durch Abbau von Hämoglobin entsteht Bilirubin. Eine Ausscheidung von Bilirubin im Harn kann man finden bei intra- und extrahepatischem Verschlussikterus, Parenchymikterus,

akuter und chronischer Hepatitis sowie Leberzirrhose. Nachgewiesen wird das ausscheidungsfähige konjugierte (direkt reagierende) Bilirubin. Die Nachweisgrenze der Methode für Bilirubin im Urin liegt bei 0,5 mg/dl (9 µmol/l). Bei Anwesenheit von Nitrit oder großen Mengen von Ascorbinsäure ist die Empfindlichkeit herabgesetzt. Falsch negative Ergebnisse können durch langes Stehen im Licht verursacht werden; Medikamente mit roter Eigenfarbe, wie Phenazopyridin, lassen den Test falsch positiv ausfallen.

h) Erythrozyten/Hämoglobin

Die Ausscheidung von Erythrozyten im Harn kann viele Ursachen haben, die unbedingt eine Abklärung erfordern. Hauptursachen einer Hämaturie sind Erkrankungen der Nieren und des Urogenitaltraktes wie Steinbildung, Tumore, Glomerulonephritis, Pyelonephritis, Hämophilie, Koagulopathie sowie hämorrhagische Diathesen bei Therapie mit Antikoagulantien, Thrombozytopenie u. a. Freies Hämoglobin tritt auf, wenn ein Erythrozytenzerfall intravasal, intrarenal oder im Urin selbst stattgefunden hat.

Die Empfindlichkeit des Tests ist hoch und liegt bei ca. 5 Erythrozyten/µl oder dem Hämoglobin aus etwa 10 Erythrozyten/µl. Außer Hämoglobin reagiert im Teststreifen auch Myoglobin, das z. B. bei Muskelnekrosen freigesetzt wird. Bei Frauen ist eine Blutbeimengung durch Menstruation oder Schmierblutung auszuschließen.

XV.4.2 Urin-Sediment

Wird mit Teststreifen eine positive Reaktion auf Erythrozyten, Leukozyten, Nitrit oder Protein befundet, empfiehlt sich bei Verdacht auf eine Erkrankung der Niere oder der ableitenden Harnwege eine Untersuchung des Urin-Sediments (frischer Harn!).

Als Probenmaterial wird zweiter Morgenurin verwendet, der aus dem Mittelstrahl gewonnen wird. (Genitalhygiene streng beachten! Während der Menstruation gewonnener Urin ist nur unter besonderen Kautelen verwertbar). Die Untersuchung sollte innerhalb von 2 Stunden erfolgen.

Im Mikroskop dürfen pro Gesichtsfeld keine bis nur wenige Zellen, Zylinder und Epithelien nachweisbar sein (Erythrozyten < 2, Leukozyten < 5, keine bis wenige hyaline Zylinder, vereinzelt Plattenepithelien, keine Nierenepithelien).

Wichtige Aussagen sind: Hämaturie, Entzündung (mit Leukozyten und Bakterien-Nachweis), kristalline Konkremete (Hinweise auf Steinleiden). Zylinderförmige Leukozyten- und Erythrozytenkonkremete deuten auf die Niere als Herkunftsort dieser Zellen.

Als weitere Maßnahme zur Unterscheidung von renalen und postrenalen Blutungen wird vom erfahrenen Mikroskopiker die Beurteilung der Erythrozyten-Morphologie vorgenommen: eumorphe Erythrozyten stammen aus Blase und Harnwegen, dysmorphe aus der Niere. Etwa 80 % der Hämaturien sind postrenal verursacht.

XV.5 Proteinurien

Das glomeruläre Nierenfilter lässt nur Spuren von großen Proteinen passieren, die kleinen (< 60 KD) werden komplett filtriert und dann fast vollständig im tubulären Abschnitt rückresorbiert oder verstoffwechselt. In der Analytik von Proteinurien kann das Ausmaß und die Art einer Nierenschädigung (glomeruläre, tubuläre oder extrarenale Störung) erfaßt werden.

Die Natriumdodezylsulfat-Elektrophorese auf Polyacrylamid (SDS-PAGE) liefert eine Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße. Nachteilig ist dabei die fehlende Quantifizierung des Proteinurie- Ausmaßes.

Hier bietet die Bestimmung von Markerproteinen im Urin eindeutig Vorteile. Durch die Kombination unterschiedlich großer Markerproteine kann gleichzeitig auf den Ort und die

Art der Schädigung geschlossen werden: eine gestörte glomeruläre Filtration erkennt man an der Ausscheidung von Albumin und größerer Proteine, wie Transferrin und IgG. Ein tubulär lokalisierter Nierenschaden zeigt sich an der Ausscheidung von Proteinen, die kleiner sind als Albumin, wie etwa α_1 -Mikroglobulin. Neben entzündlichen Ursachen sind häufig toxische Reaktionen auf Medikamente oder Gifte die Ursache für eine tubuläre Proteinurie. In vielen Fällen wird durch den Einsatz der Markerproteine im Urin die SDS-PAGE überflüssig. Als Probenmaterial wird der zweite Morgenurin empfohlen. Alternativ können die Analysen auch aus Sammelurin durchgeführt werden. Bei der Analyse der Markerproteine aus dem zweiten Morgenurin wird die Proteinausscheidung zusätzlich pro Gramm Kreatinin angegeben. Bei positivem qualitativem Proteinfund sollte in jedem Fall eine Klärung der Ursache der Proteinurie angestrebt werden.

Folgende Proteinurie-Muster werden unterschieden:

Selektive glomeruläre Proteinurie: Albumin alleine oder in Kombination mit Transferrin werden verstärkt im Urin ausgeschieden.

Unselektive glomeruläre Proteinurie: Neben der Albuminbande erscheinen Plasmaproteine mit höherem Molekulargewicht. (z.B. IgG)

Tubuläre Proteinurie: Die Albuminbande ist normal, im Harn werden vorwiegend niedermolekulare Proteine ausgeschieden. Als Markerprotein ist α_1 -Mikroglobulin geeignet (33 kD)

Gemischte glomerulo-tubuläre Proteinurie: Neben einer verbreiterten Albuminbande treten sowohl klein- als auch höhermolekulare Proteine im Urin auf.

Wichtiger Kontroll-Parameter für die Nierenfunktion bei Diabetes- und Hochdruck-Patienten ist Albumin (68 kD). Die Höhe der Albumin-Ausscheidung ist ein Maß des Fortschreitens der Nephropathie (Normalbereich: bis 30 mg/24 h; Mikro-Albuminurie: 30 - 200 mg/24 h, Makro-Albuminurie: über 200 mg/24 h). Die Mikroalbuminurie ist noch reversibel und durch therapeutische Maßnahmen beeinflussbar, während die Makroalbuminurie auf ein prognostisch ungünstiges Spätstadium der Nephropathie hinweist.

Reversible Proteinurien können auftreten bei körperlicher Belastung (Sport) und Stress.

Von der Nierenfunktion unabhängige Proteinurien

- **Überlaufproteinurie:** Die Überschreitung der Rückresorptionskapazität der intakten Tubuli durch starke Vermehrung eines glomerulär filtrierbaren kleinen Proteins im Blutplasma (z. B. Immunglobulinleichtketten beim Plasmozytom, Hämoglobin bei intravasalen Hämolysen und Myoglobin bei Muskelschaden) führt zu einer Ausscheidung im Urin. Diese Form der Eiweißausscheidung wird auch als prärenale Proteinurie bezeichnet.
- **postrenale Proteinurie:** im Urin sind Proteine aus den ableitenden Harnwegen (z. B. bei Entzündungen, Tumoren in Blase oder Harnleiter) vorhanden. Diese Proteinbeimengung stammt aus Blut, das durch die Läsionen gesickert ist. Als Markerproteine eignen sich Plasma-Proteine, die das glomeruläre Filter normalerweise nicht passieren (Apolipoprotein A-I, Bande im tubulären Bereich um 28 kD, oder α_2 -Makroglobulin).

XV.6 Gezielte Urin-Diagnostik

- Glukose, als Suchtest auf Diabetes, mithilfe von Teststreifen durchzuführen;
Ketone als Test auf metabolische Azidosen, Gallenfarbstoffe zur Leberkontrolle
- Porphyrine und Vorstufen zur Diagnostik von genetisch bedingten Porphyrien und toxischen Leberschädigungen, z.B. Bleivergiftung: Vortest auf die Porphyrinvorstufe Porphobilinogen (PBG) nach Hoesch oder Schwartz-Watson, quantitative Messung der Porphyrine sowie Vorstufen PBG und delta-Aminolävulinsäure (Urin vor Licht schützen !) im 24h Sammelurin. Die häufigste Form der Porphyrien, die hereditäre schubförmig verlaufende „akute intermittierende Porphyrie“, geht mit erhöhter Ausscheidung der Vorstufen und der Porphyrine im Schub einher. Sie beruht auf einem Defekt des Enzyms Uroporphyrinogen-Synthase, das zwischen Vorstufen und den Porphyrinen wirkt.
- Katecholamine (Messung bei Bluthochdruck): erhöhte Ausscheidung der Amine und ihrer Metaboliten bei Tumoren der Nebennierenrinde, z.B. beim Phäochromozytom. Bestimmt werden Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin aus 24-h Urin, der über HCl gesammelt wurde, bevorzugt mithilfe der HPLC.
- Kupfer (M. Wilson): Mangel an Cu-bindendem Coeruloplasmin im Blutplasma führt zu verminderter Kupferkonzentration im Blut und verstärkter Ausscheidung im Urin. Kupfer lagert sich in Geweben ab, was zu Schäden der Leber, des Gehirns und anderer Organe führt. Im Serum ist das Coeruloplasmin der Erkrankten erniedrigt.
- Schwangerschaftstests: Ab 4. Woche nach Konzeption ist ein deutlicher Anstieg von hCG im Harn festzustellen. Heute werden qualitative Schnelltests verwendet, die bereits nach Ausbleiben der Regel positiv sein können.
- Albumin: Der quantitative Albuminnachweis wird zur Verlaufskontrolle der Mikroangiopathie bei Diabetes mellitus und Hypertonie verwendet. Die Mikroalbuminurie (20-200 mg/l bzw. 24-200 mg/g Kreatinin im zweiten Morgenurin) kann nicht mit dem Urin-Teststreifen nachgewiesen werden.
- Monoklonale Gammopathien (z.B. Plasmozytom) führen häufig zum Nachweis von „Bence-Jones-Proteinen“ im Urin aufgrund einer insuffizienten tubulären Rückresorption der im Blutplasma vorliegenden monoklonalen leichten Kette: elektrophoretische Darstellung von monomeren und dimeren leichten gamma-Globulin-Ketten (Banden bei etwa 22 und 44 KD in der SDS-PAGE). Bestimmung des kappa/lambda-Verhältnisses im Urin (normal etwa 0,75 - 4,5). Monoklonale Bence-Jones-Proteine sind entweder vom kappa- oder vom lambda-Typ, sodass man dann κ/λ - Quotienten $> 5,2$ oder < 1 findet.
- Toxikologie: Suche nach Medikamenten, Suchtmitteln und deren Metaboliten, Schwermetallen im Urin. Dopingkontrollen

XV.7 Praktische Übungen

- 1) Urinstatus mit dem Teststreifen: Den Teststreifen bis zur Markierung kurz in den Urin eintauchen, dann den Streifen kurz längs abstreifen und anhand der Vergleichsskala nach einer Minute auswerten.
- 2) Anfertigung und Beurteilung eines Urin-Sediments:
20 μ l des resuspendierten Sediments werden auf Objektträger überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Beurteilung des Sediments mit dem 40x Objektiv. Beurteilt werden insbesondere Anzahl der Erythrozyten und Leukozyten pro Gesichtsfeld, Epithelien, Zylinder und Kristalle.

Normaler Urin:	Erythrozyten < 2 pro Gesichtsfeld
	Leukozyten < 5 pro Gesichtsfeld
	Plattenepithelien vereinzelt
	hyaline Zylinder keine bis wenige

- 3) Beurteilung der Proteinurie anhand der Einzelproteine
Bestimmung von Gesamt-Eiweiß, Albumin, α_1 -Mikroglobulin, IgG und Kreatinin im frischen konzentrierten Urin (2. Morgenurin). Der Bezug der Einzelproteine auf g Kreatinin verbessert die Aussagekraft der Einzelproteine.
- 4) Beurteilung der Proteinurie anhand der SDS-PAGE Elektrophorese.
Im SDS-Page Gel ist orientierend die Albuminbande zu charakterisieren. Ausgehend von der Albuminbande ist das Proteinmuster zu beurteilen.
 - nur Albuminbande verstärkt nachweisbar → selektive glomeruläre Proteinurie
 - zusätzlich höhermolekulare Proteinurie nachweisbar (insbes. Immunglobuline) → unselektive glomeruläre Proteinurie
 - niedermolekulare Proteine verstärkt nachweisbar (insbes. α_1 -Mikroglobulin und freie Leichtketten) → tubuläre Proteinurie

XV.8 Fragen zur Lernevaluation

- 1) Die Präanalytik ist in der Urinanalytik von großer Relevanz. Sie finden im Urinsediment zahlreiche Plattenepithelien. An welchen präanalytischen Fehler denken Sie sofort?
- 2) Sie werden nach den Vorteilen und Nachteilen von Cystatin C gefragt. Welche Auskunft geben Sie?
- 3) Sie wollen einen Patienten mit Vancomycin behandeln. Der 60 jährige männliche Patient hat eine deutlich eingeschränkte Nierenfunktion (Serum-Kreatinin: 2,0 mg/dl). Um wie viel reduziert sich die zu verabreichende Medikamentendosierung.
- 4) Bei der Beurteilung der Einzelproteine im Urin ist der Bezug mg Protein/g Kreatinin bevorzugt. Wo liegen die Vorteile gegenüber der üblichen Einheit mg Protein/l.
- 5) Die Summe der Einzelproteine in Bezug auf das gemessene Gesamt-Protein beträgt 20%. An welche Erkrankung denken Sie?

XVI Blutgase/Säuren-Basen-Status

Die Blutgasanalyse stellt ein diagnostisches Verfahren dar, um mit den Parametern pH-Wert, CO₂-Druck (pCO₂) und Basenüberschuß, respiratorische und metabolische Azidosen bzw. Alkalosen zu unterscheiden.

Der Säure-Basen-Status ist eng mit dem Wasser- und Elektrolythaushalt verbunden. Zur Abklärung einer Störung des Säure-Basen-Status sollten daher immer Na, K, Cl und gegebenenfalls zusätzlich die Ausscheidung dieser Elektrolyte im Urin bestimmt werden.

An der Regulation der Wasserstoffionenkonzentration sind Puffersysteme des Blutes, die Lungen und die Nieren beteiligt. Zu den Puffersystemen gehören das Bicarbonat/Kohlensäure-, das Phosphat-, das Protein- und Hämoglobin-Puffersystem. Wichtigster Puffer ist das Bicarbonat/Kohlensäure-System. Der pH-Wert stellt sich entsprechend der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ein:

$$pH = 6,11 + \lg \frac{[HCO_3^-](Niere)}{0,0304 \cdot pCO_2(Lunge)}$$

Indikation für die Blutgasanalyse sind sehr vielfältig: obstruktive und restriktive Ventilationsstörungen, Erkrankungen des Lungenparenchyms und der Bronchien, Störungen der Lungenperfusion, Kreislaufinsuffizienz, Hypovolämie, Schock, Niereninsuffizienz, tubuläre Nierenerkrankungen, dekompensierter Diabetes mellitus, komatöse Zustände, Intoxikationen, gastrointestinale Erkrankungen (Erbrechen, Durchfall), Galle- und Pankreasfisteln, Hypo- und Hyperkaliämie, Hypo- und Hyperchlorämie, Störungen der Nebennierenrindenfunktion. Überwachung therapeutischer Maßnahmen wie Infusionsbehandlung, künstliche Beatmung, künstliche Ernährung, Hämodialyse, Hämofiltration u. ä. Verfahren, Massentransfusion, Diuretika-Therapie, Corticoid-Therapie.

Aus arteriellem Blut bzw. Kapillarblut werden pH, pCO₂ und pO₂ mit spezifischen Elektroden gemessen und HCO₃⁻, Base Excess sowie Sauerstoffsättigung aus dem gemessenen Parametern berechnet.

Präanalytische Fehler durch zu lange Lagerung oder Erwärmung der Blutprobe, Aspiration von Luft, fehlerhafte Punktion (Verwechslung von arteriellen und venösen Zugängen) sind häufig. Analysen müssen grundsätzlich innerhalb 1h nach Blutentnahme (kühle Lagerung) durchgeführt sein.

Referenzbereiche:

Erwachsene	Einheit	Blut, arteriell	
		Männer	Frauen
pH-Wert		7,34 - 7,44	7,35 - 7,45
pCO ₂	mmHg	35 - 45	32 - 42
pO ₂	mmHg	69 - 116	
aktuelles HCO ₃ ⁻	mmol/l	22 - 26	20 - 24
Base Excess	mmol/l	-2,4 bis +2,3	-3,3 bis + 1,2
Standardbikarbonat	mmol/l	22 - 26	
Gesamt-CO ₂	mmol/l	23 - 27	21 - 25
O ₂ -Sättigung	%	95 - 99	

Anionenlücke = $\text{Na}^+ - (\text{HCO}_3^- + \text{Cl}^-)$;

Referenzbereich: 7 - 16 mmol/l

	respiratorische Azidose		respiratorische Alkalose	metabolische Azidose	metabolische Alkalose
	akut	chronisch			
pH	↓	↓	↑	↓	↑
pCO ₂	↑↑	↑	↓	↓	↑
BE	n	↑	↓	↓	↑

XVII Wichtige World Wide Web (WWW)-Adressen

1) www.dgkl.de

Homepage der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.

2) www.uniklinik-saarland.de/zentrallabor

Homepage des Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes

3) http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/deutsch.htm

Interessantes Programm zur hämatologischen Fortbildung

Über Anregungen freuen wir uns immer:
juergen.geisel@uks.eu