

Aus der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. D. K. Bartsch
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



**Einfluss präoperativer Behandlung auf die Angiogenese und
Mikrogefäßdichte bei der Autoimmunhyperthyreose vom Typ
Basedow**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich der Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Haisam El Djabri

aus Andernach

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg am: 25.02.2010.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. I. Hassan

Korreferent: Prof. Dr. A. Steinmetz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1. Historischer Überblick	4
1.2. Problemdarstellung	5
1.3. Schilddrüse	7
1.3.1. Makroskopische Anatomie	7
1.3.2. Mikroskopische Anatomie	7
1.3.3. Physiologie der Schilddrüse	8
1.4. Struma	9
1.4.1. Medikamentöse Therapie	10
1.4.2. Operative Therapie	11
1.5. Hyperthyreose	12
1.5.1. Pathophysiologie	12
1.5.2. Klinik	12
1.5.3. Diagnostik	12
1.6. Morbus Basedow	13
1.6.1. Pathophysiologie	13
1.6.2. Histopathologie	14
1.6.3. Klinik	14
1.6.4. Diagnostik	15
1.6.5. Therapie	16
1.6.5.1. Medikamentöse Therapie	16
1.6.5.2. Radiojodtherapie (RJT)	17
1.6.5.3. Operative und präoperative Therapie	18
1.7. Neoangiogenese	20
1.7.1. Neoangiogenese der Schilddrüse	20
1.7.2. Vascular endothelial growth factor (VEGF)	21
1.7.3. Angiopoetine	22
1.7.4. Angiogenese-Inhibitoren	23
1.7.5. VEGF und Schilddrüse	23

2. Material und Methoden	27
2.1. Chemikalien	27
2.2. Antikörper	28
2.3. Geräte	28
2.4. Patientenkollektiv	30
2.5. Grundlagen der Immunhistochemie	31
2.5.1 Labeled avidin-biotin technique (LAB-Methode)	31
2.5.2. Hintergrundreaktivität	32
2.5.3. Antigendemaskierung (Antigen Retrieval)	33
2.6. Immunhistochemische Färbungen	34
2.6.1. Blutgefäßdarstellung mittels anti-CD31-Färbung	34
2.6.2. Anti-VEGF-Färbung	36
2.7. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	37
2.7.1. Messung der Mikrogefäßdichte	37
2.7.1.1. Bestimmung der Gefäßoberflächendichte	37
2.7.1.2. Bestimmung der Gefäßanzahl pro mm ²	
Stroma	39
2.7.2. Messung der VEGF-Expression	40
2.8. Statistische Analyse der Messergebnisse	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Gruppenvergleich der VEGF-Expression	43
3.2. Gruppenvergleich der Gefäßoberflächendichte	44
3.3. Gruppenvergleich der Gefäßanzahl pro mm ² Stroma	45
3.4. Abbildungen der immunhistochemischen Färbungen	47
4. Diskussion	49
5. Zusammenfassung	59
6. Literaturverzeichnis	60
7. Anhang	69
7.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer	69
7.2. Danksagung	70

Abkürzungsverzeichnis

Ang	Angiopoetine
Anti-TPO-AK	Anti-Thyreoidale Peroxidase-Antikörper
AR	Antigen Retrieval
CAMs	Cell adhesion molecules
CD31 = PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
EO	Endokrine Orbitopathie
LAB	Labeled avidin-biotin
MHC	Major histocompatibility complex
NVES	Number of vessels (= Gefäßanzahl pro mm ² Stroma)
PIGF	Placental growth factor
RJD	Radiojodtherapie
T3	Trijodthyronin
T4	Tetraiodthyronin
TRAK	TSH-Rezeptor-Auto-Antikörper
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF = VPF	Vascular endothelial growth factor
VPF	Vascular permeability factor
VSD	Vascular surface density
V _{V(STR)}	Relativer Anteil des Stromas

1. Einleitung

1.1. Historischer Überblick

Die Schilddrüse ist ein außerordentlich gut durchblutetes Organ. Sie weist eine der höchsten Blutflussraten pro Gramm Gewebe im menschlichen Körper auf. Eine Reihe von Schilddrüsenerkrankungen geht mit der Bildung neuer Blutgefäße und demzufolge mit einer gesteigerten Organdurchblutung einher, so z.B. die endemische Struma, verschiedene Thyreoditiden, maligne Tumoren und Autoimmunerkrankungen, wie der für diese Arbeit wichtige Morbus Basedow (Ramsden, 2000; Wang *et al.*, 1998).

Die klinischen Symptome des Morbus Basedow, bestehend aus Struma, Exophthalmus und Tachykardie, sind bereits Mitte des 19. Jahrhunderts durch zwei noch heute für dieses Krankheitsbild namengebende Personen beschrieben worden. Hierbei handelt es sich um Carl Adolph von Basedow (1845) und Dr. Robert James Graves (1840) (Meng *et al.*, 1999; Perros *et al.*, 1998).

Knapp 50 Jahre nach Beschreibung des Krankheitsbildes führte Ludwig Rehn die erste erfolgreiche halbseitige Strumektomie bei zwei Frauen mit schwerem Morbus Basedow durch. Dies sollte wegberaubend für die chirurgische Hyperthyreosebehandlung sein, die jedoch über Jahrzehnte hinweg problem- und komplikationsbelastet blieb. Bei hohem operativem Risiko mit lebensbedrohenden Blutungen sowie der Gefahr der Entwicklung thyreotoxischer Krisen war diese invasive Therapie heftig umstritten (Röher *et al.*, 1978, 1983).

In den Jahren nach Rehns erster erfolgreicher Exstirpation wurde sein Verfahren von dem Australier Sir Thomas Peel Dunhill aufgegriffen und durch eine subtotale Resektion der Schilddrüsengegenseite ergänzt (Selwyn, 1997).

Weiterhin bestand ein hohes Risiko für Patienten mit thyreotoxischen Krisen im Rahmen des Eingriffs zu versterben. Erst als Henry S. Plummer und Walter M. Boothby 1914-1918 eine Gruppe von Patienten mit Schilddrüsenüberfunktion präoperativ einer Jodbehandlung unterzogen, konnte das Komplikations- und Letalitätsrisiko deutlich gesenkt werden, da sich die Stoffwechsellage hierunter normalisierte. Diese Therapie wurde später nach Henry S. Plummer als *Plummerung* bezeichnet und mit Kaliumjodid (z.B. in Lugol'scher Lösung)

durchgeführt. Diese Jodgabe war umstritten, zumal ein Zusammenhang zwischen Jodexposition und der Entwicklung einer gefährlichen hyperthyreoten Krise bekannt war (Plummer *et al.*, 1923). Plummer beschrieb zusätzlich, dass sich unter der Jodbehandlung eine deutliche Schilddrüsenverfestigung mit Abnahme der Schilddrüsendurchblutung einstellte.

1.2. Problemdarstellung

Aufgrund der Blutfülle und Morphologie ist die Basedow Struma noch heute schwer zu operieren und mit einer hohen Komplikationsrate behaftet. Gefahren sind insbesondere schwer beherrschbare Blutungen, Verletzungen des Nervus recurrens sowie Verletzungen oder akzidentelle Entfernungen der Nebenschilddrüsen.

Bis heute kommt die nach ihrem Erfinder benannte *Plummerung* bei Eingriffen an Basedow Strumen mitunter nach erfolgloser monatelanger thyreostatischen Therapie zur Anwendung, um sich die bereits 1923 festgestellten Einflüsse von Jod auf die Schilddrüsendurchblutung zunutze zu machen (Siewert, Rothmund, Schumpelick, 2007).

Diese präoperative Jodbehandlung führt zu einer deutlichen Reduktion der Blutungsneigung und erleichtert so dem Operateur die Darstellung der Nervi recurrens sowie der Nebenschilddrüsen (Siewert, Rothmund, Schumpelick, 2007).

Die *Plummerung* wirkt zum einen normalisierend auf die hyperthyreote Stoffwechsellage, da Jod in hohen Dosen die proteolytischen Enzyme hemmt, die Thyroxin aus seiner Speicherform (Thyreoglobulin) freisetzen. Zum anderen vermindert die *Plummerung* die Schilddrüsendurchblutung, wobei der Mechanismus bis heute nicht geklärt ist (Aktories, 2005).

Nach der Entdeckung verschiedener Angiogenesefaktoren wurden insbesondere Erkenntnisse über die Rolle eines Bestimmten, des Vascular endothelial growth factors (VEGF) bei verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen gewonnen. Verschiedene Studien wie u.a. von Nagura *et al.* (2001) wiesen auf eine mögliche Korrelation zwischen der Höhe der VEGF-Expression und der Zunahme der Mikrogefäßdichte bei Patienten mit Morbus Basedow hin.

Basierend auf den vorbeschriebenen Erkenntnissen, ist es nun Ziel unserer Studie zu untersuchen, ob die *Plummerung* zu einer Reduktion der VEGF-Expression und/oder zu einer Drosselung der Mikrogefäßdichte führt. Als Untersuchungsmaterial werden resezierte und unterschiedlich vorbehandelte (Thyreostatika, Kaliumjodid) Basedow Strumen immunhistochemisch auf VEGF-Gewebeexpression sowie Mikrogefäßdichte untersucht und einer Gruppe von resezierten und mit L-Thyroxin behandelten multinodulären Strumen gegenübergestellt.

1.3. Schilddrüse

Die Schilddrüse (Glandula Thyroidea) gehört zu den endokrinen Organen. Sie nimmt durch die Produktion der Hormone Thyroxin und Trijodthyronin eine zentrale Rolle bei der Regulierung bzw. Beeinflussung des Wachstums sowie des Energiestoffwechsels ein. Das in den C-Zellen gebildete Hormon Calcitonin ist physiologischer Gegenspieler des Parathormons aus den Nebenschilddrüsen und greift in den Knochenstoffwechsel ein (Junqueira & Carneiro, 1996).

1.3.1. Makroskopische Anatomie

Die Schilddrüse ist ein paariges Organ bestehend aus zwei durch einen Isthmus verbundenen Lappen. Der Isthmus liegt der Trachea auf Höhe der 2.-3. Knorpelspange ventral an, die Lappen umgreifen die Trachea hufeisenförmig. In 30% der Fälle gibt es einen dritten Lappen, den sog. Lobus pyramidalis, der embryogenetisch als Residuum aus dem Ductus thyroglossus stammt und vom Isthmus der Schilddrüse ausgehend bis zum Foramen caecum der Zunge reichen kann (Benninghoff, 1994). Umgeben wird die Schilddrüse inklusive der Epithelkörperchen (Glandula parathyreoidea) von einer doppelten Organkapsel, von denen die äußere derber (Capsula fibrosa) ist als die Innere. Die Schilddrüse wird durch zwei paarig angeordnete Arterien versorgt. Hierbei handelt es sich zum einen um die A. thyroidea superior, die aus der A. carotis externa entspringt und zum anderen um die A. thyroidea inferior, die aus dem Truncus thyrocervicalis stammt. In 10 % der Fälle besteht zudem eine unpaare A. thyroidea ima, die entweder direkt aus der Aorta oder aus dem Truncus brachiocephalicus gespeist wird. Das venöse Blut wird über die V. thyroidea superior und die Vv. thyroideae mediae in die V. jugularis interna sowie über den Plexus thyroideus impar und die V. thyroidea inferior in die V. brachiocephalica sinistra geleitet. Der N. laryngeus recurrens (Ast des N. Vagus) verläuft in enger räumlichen Beziehung zum hinteren, medio-kaudalen Anteil der Schilddrüse (Junqueira & Carneiro, 1996).

1.3.2. Mikroskopische Anatomie

Ausgehend von der inneren Kapsel ziehen Bindegewebssepten in das Organ und unterteilen dieses in Läppchen (Lobuli). Charakteristisch für den Feinbau

der Schilddrüse sind rundliche bzw. ovale Schilddrüsenfollikel, deren Durchmesser 0,1-0,9 mm beträgt. Diese werden hauptsächlich von einem aus retikulären Fasern bestehenden Bindegewebe umgeben, welches von einer Vielzahl von Blut- und Lymphgefäßen durchzogen wird. Innerhalb der Schilddrüsenfollikel ist eine gelatinös homogene Substanz zu finden, das Kolloid. Hier erfolgt die Speicherung der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T₄) und Trijodthyronin (T₃) in inaktiver Form an Glykoprotein gebunden, als Thyreoglobulin. Ausgekleidet werden die Follikel von einem einschichtigen Epithel, welches, je nach Grad der Hormonaktivität, in seiner Höhe zwischen platt, kubisch und hochprismatisch variiert. So findet sich bei gesteigerter Syntheserate ein entsprechend höheres Epithel. Um den Stoffaustausch und die Hormonaufnahme ins Blut zu erleichtern sind die Schilddrüsenfollikel von einem dichten Netzwerk gefensterter Kapillaren umgeben.

Innerhalb des Bindegewebes zwischen den Follikeln sowie basal in das Follikel-epithel eingestreut befinden sich hell aussehende sog. C-Zellen (parafollikuläre Zellen), die in erster Linie für die Produktion des in den Knochenstoffwechsel eingreifenden Hormons Calcitonin verantwortlich sind (Junqueira & Carneiro, 1996).

1.3.3. Physiologie der Schilddrüse

Das Proteinbiosyntheseprodukt Thyreoglobulin wird von den Follikel-epithelzellen synthetisiert und an das Follikellumen abgegeben. Thyreoglobulin ist ein Glykoprotein mit vielen Resten der Aminosäure Tyrosin. Mit Hilfe einer Jodpumpe wird Jodid aus dem Blut in die Follikel-epithelzellen aufgenommen, durch eine Peroxidase in elementares Jod überführt und an eine Jodtransferase gebunden ins Follikellumen sezerniert. Nun werden die Tyrosinreste des Thyreoglobulins mit dem aufgenommenen Jod zu Monojodtyrosin- und Dijodtyrosinresten jodiert. Durch Verknüpfung zweier Dijodtyrosinreste entsteht Tetrajodthyronin (Thyroxin, T₄) und im wesentlich kleineren Umfang Trijodthyronin (T₃) aus einer Verschmelzung von Mono- und Dijodtyrosin (Horn, 2003).

Die Regulierung der Schilddrüsenaktivität erfolgt über einen Regelkreislauf von Hypothalamus, Adenohypophyse und Schilddrüse. Der Hypothalamus stimuliert

mit dem Hormon Thyreoliberin (TRH, Thyreotropin Releasing Hormon) die Adenohypophyse zur Ausschüttung von Thyreotropin (TSH, Thyreoidea stimulierendes Hormon), das direkt auf die Schilddrüse wirkt. Hierbei kann Thyreotropin über Interaktion mit seinem Rezeptor alle Stufen der Hormonbiosynthese aktivieren, von der Jodaufnahme bis zur Sezernierung des fertigen Thyroxins und Trijodthyronins.

Zwischen Schilddrüsenaktivität und den zentralen Steuerungsorganen Hypothalamus und Adenohypophyse besteht ein Rückkopplungsmechanismus. Hohe Konzentrationen der Schilddrüsenhormone wirken hemmend auf die übergeordneten Steuerungszentren, was letztlich zur verminderten Freisetzung von TRH und TSH führt. Liegen niedrige Hormonspiegel vor, kommt es zu einer gesteigerten TRH und TSH Freisetzung (Horn, 2003).

1.4. Struma

Als Struma bezeichnet man eine Vergrößerung der gesamten Schilddrüse oder von Teilen des Organs. Die Struma wird eingeteilt nach Morphologie, Funktion und Dignität.

Je nach Ausprägung unterscheidet man eine Struma diffusa (gleichmäßig vergrößert) von der Struma nodosa (Knoten vorhanden). Die Struma uninodosa weist einen einzelnen Knoten auf und ist vergleichsweise selten. Wesentlich häufiger ist die Struma multinodosa (mehrknotig) (Schumpelick, Bleese, Mommsen, 2000). Die Struma multinodosa weist in der Regel sowohl regressive als auch proliferative Bezirke auf. Zum Ausschluss autonomer Areale sind szintigraphische Untersuchungen erforderlich. Erfolgt hierdurch der Nachweis kalter Knoten, sind Feinnadelpunktionen zum Ausschluss einer Malignität notwendig (Renz-Polster, Krautzig, 2006).

Entsprechend der Lage unterscheidet man die eutopie (normale anatomische Lage) von der dystopen Struma (z.B. retrosternal, unter der Zunge bzw. hinter der Trachea).

In Abhängigkeit von der Quantität der Schilddrüsenhormonproduktion unterscheidet man euthyreote, hypothyreote und hyperthyreote Strumen. Die meisten Strumen sind euthyreot (80%, blande Strumen) als Folge eines endemischen Jodmangels. Hierbei kommt es durch ungenügende

Schilddrüsenhormonversorgung des Organismus zu einer kompensatorisch gesteigerten TSH Ausschüttung mit Stimulation des Schilddrüsenwachstums.

Hinsichtlich Dignität unterscheidet man von der blanden Struma bei Nachweis von Tumorzellen die Struma maligna.

Eine nach Therapie erneut auftretende Struma bezeichnet man als Rezidivstruma.

Makroskopisch wird die Strumagröße nach WHO wie folgt unterteilt (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: WHO-Struma-Klassifikation

- Oa Keine Struma
- Ob Tastbare, aber nicht sichtbare Struma
 - I Tastbare und bei zurückgebeugtem Kopf eben sichtbare Struma
 - II Sichtbare Struma
 - III Struma mit lokalen Komplikationen (Dyspnoe, Schluckstörung, obere Einflusstörung).

1.4.1. Medikamentöse Therapie

Für die medikamentöse antihyperplastische Strumatherapie stehen zwei Substanzen zur Verfügung: Thyroxin und Jodid. Jodid beseitigt den intrathyreoidalen Jodmangel und dadurch die kompensatorische Hyperplasie. Vor Therapiebeginn muss eine funktionell relevante Autonomie mittels TSH Bestimmung ausgeschlossen werden, um die Gefahr einer durch Jodgabe ausgelösten hyperthyreoten Dekompensation zu vermeiden.

Wenn sich nach 6 Monaten Jodtherapie kein Behandlungserfolg zeigt, wird auf eine Kombination mit L-Thyroxin und Jod umgestellt.

Eine Alternative ist die Substitution von Schilddrüsenhormonen (L-Thyroxin), welche vor allem bei großer Struma mit erhöhten TSH-Spiegeln erfolgreich sein kann. Thyroxin wird dabei so hoch dosiert, dass der TSH-Spiegel in einem niedrig-normalen Bereich fällt (0,3-0,5 mU/l) (Renz-Polster, Krautzig, 2006).

1.4.2. Operative Therapie

Die operative Therapie ist bei großen Knotenstrumen, insbesondere bei lokalen mechanischen Komplikationen oder bei Malignomverdacht indiziert. In der Regel werden beide Schilddrüsenlappen unter Belassung eines funktionsfähigen Restgewebes subtotal reseziert. Postoperativ ist eine Rezidivprophylaxe mit Jodid und ggf. eine Substitution mit L-Thyroxin erforderlich. Hierbei wird Thyroxin so hoch dosiert, dass der TSH-Spiegel im normalen bis niedrigen Bereich liegt (Renz-Polster, Krautzig, 2006).

Da konservative Therapiemaßnahmen bei kalten Knoten aufgrund regressiver, nicht ansprechender Areale sowie möglicher autonomer Knoten (Jodgabe kontraindiziert) problematisch sind, ist auch hier Therapie der Wahl die operative Entfernung mit subtotaler Schilddrüsenresektion bds. (Schumpelick, Bleese, Mommsen, 2000).

1.5. Hyperthyreose

Die Hyperthyreose (Schilddrüsenüberfunktion) ist eine Erkrankung bei der es zu einer gesteigerten Ausschüttung der Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 kommt.

1.5.1. Pathophysiologie

Man unterscheidet:

- Hyperthyreose bei Schilddrüsenautonomie (autonomes Adenom, multifokale Autonomie bzw. disseminierte Autonomie).
- Immunogene Hyperthyreose (Morbus Basedow).
- Seltenerer Formen der Hyperthyreose bei Thyreoiditis, Schilddrüsenkarzinomen, zentraler Regulationsstörung (TSH-Überproduktion durch Hypophysenadenom) und exogener Zufuhr von Schilddrüsenhormonen.

1.5.2. Klinik

Neben der sehr häufig bestehenden Struma (70-90% der Fälle) können folgende Symptome auftreten: Sinustachykardien, Extrasystolen, Vorhofflimmern, psychomotorische Unruhe, Gewichtsverlust, Wärmeintoleranz, Diarrhö, warme, feuchte Haut, Osteoporose, feinschlägiger Fingertremor sowie Haarausfall.

1.5.3. Diagnostik

Zur Diagnostik einer Hyperthyreose gehören neben der Anamnese (Frage nach der Einnahme jodhaltiger Medikamente, Röntgenkontrastmitteluntersuchungen) und den klinischen Symptomen, Laboruntersuchungen (TSH, fT3, fT4, TSH-Rezeptorautoantikörper=TRAK, Anti-TPO-AK) sowie bildgebende Verfahren (Sonographie und Szintigraphie).

Die Therapiewahl ist abhängig vom Patientenwunsch, Patientenalter und der Form der Hyperthyreose (Renz-Polster, Krautzig, 2006).

1.6. Morbus Basedow

Bei der Immunthyreopathie vom Typ Basedow handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung mit thyreoidalen (Struma) und extrathyreoidalen (Endokrine Orbitopathie, prätibiales Myxödem, Akropachie) Manifestationen. Sie ist häufig mit anderen Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem Typ I Diabetes Mellitus assoziiert.

Die Erkrankung tritt mit einer Prävalenz von 0,1-2 % und bevorzugt zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr auf. Das weibliche Geschlecht ist hierbei 5mal häufiger betroffen. Es scheinen gerade für Frauen prädisponierende Lebensabschnitte zu existieren, Phasen die mit einer Veränderung des Hormonhaushaltes (Pubertät, Peripartalzeit, Klimakterium) einhergehen (Siewert, Rothmund, Schumpelick, 2007).

1.6.1. Pathophysiologie

Man geht heute davon aus, dass es sich bei dem Morbus Basedow um eine Autoimmunerkrankung handelt, deren Entstehung äußerst komplex und multifaktoriell ist (Hofbauer *et al.*, 1996).

Wie für viele andere Autoimmunerkrankungen beschrieben wurde lässt sich auch hier eine genetische Prädisposition nachweisen. So scheinen bestimmte MHC- (Major histocompatibility complex) Antigene (HLA-B8, -DR3 und -DQA1) bei Patienten mit Morbus Basedow gehäuft vorzuliegen. Darüber hinaus spielen komplexe immunologische Prozesse, Umwelteinflüsse sowie psychosoziale Faktoren eine Rolle (Hofbauer *et al.*, 1996; Nawroth, Ziegler, 2001).

Nach dem heutigen Kenntnisstand existiert für die Pathogenese des Morbus Basedow folgende Hypothese. Bei gegebener genetischer Prädisposition wird durch eine virale oder bakterielle Infektion eine autoimmunologische Reaktion angestoßen (Krassas *et al.*, 2007). Es wurden in den letzten Jahren Gemeinsamkeiten in der molekularen Struktur verschiedener körpereigener Antigene (Schilddrüsenantigene, extrathyreoidal: Orbitagewebe und Prätibialregion) mit Oberflächen von Viren und Bakterien (z.B. *Yersinia Enterocolitica* Proteine) gefunden. Dies lässt vermuten, dass es während des Abwehrprozesses zu einer Kreuzreaktion der gegen die Krankheitserreger gebildeten Antikörper und dem humanen TSH-Rezeptor kommt, die letztlich für die gesteigerte Schilddrüsenaktivität verantwortlich ist. Der Verlust der natürlichen

Selbsttoleranz ist möglicherweise verantwortlich dafür, dass autoreaktive Lymphozyten Schilddrüsenantigene als fremd erkennen und Zytokine freisetzen. Durch diese Zytokine und verschiedene Signalstoffe wird eine humorale Immunantwort in Gang gesetzt, in deren Folge es zu einer Aktivierung von Plasmazellen und somit zur Bildung spezifischer Antikörper gegen Schilddrüsenantigene kommt. Von pathogenetischer Bedeutung sind dabei, neben Immunglobulinen gegen Thyreoglobulin und Peroxidase, u.a. die Anti-TSH-Rezeptor-Antikörper (IgG), die sowohl eine stimulierende als auch eine hemmende Wirkung auf den TSH-Rezeptor ausüben können. Aufgrund der Interaktion mit dem TSH-Rezeptor werden verschiedene intrazelluläre Signalwege (Bildung von cAMP und IP₃) aktiviert, die Jodaufnahme und das Schilddrüsenwachstum sowie die Bildung und Freisetzung von Schilddrüsenhormonen gesteigert (Hofbauer *et al.*, 1996; Renz-Polster, Krautzig, 2006).

1.6.2. Histopathologie

Im Rahmen des Morbus Basedow kommt es zu einer Vergrößerung der Schilddrüse. Sie zeigt makroskopisch eine rotbraune Farbe. Histologisch finden sich diffuse hyperplastische Follikel, die mit Ausnahme von Resorptionsvakuolen nur wenig Kolloid enthalten. Diese Resorptionsvakuolen sind Zeichen der hyperaktiven Schilddrüse. Die Follikel­epithelzellen weisen ein hohes, kubisches Epithel auf. Darüber hinaus finden sich wie bei der Hashimoto Thyreoiditis häufig lymphozytäre Infiltrate innerhalb der Schilddrüse (Bühling, Lepenies, Witt, 1995).

1.6.3. Klinik

Das klinische Bild des Morbus Basedow präsentiert sich bei ca. 50% der Patienten mit der typischen Symptomkonstellation, der *Merseburger Trias*, bestehend aus Struma, Tachykardie und Exophthalmus (Siewert, Rothmund, Schumpelick, 2007).

Die mit der Hyperthyreose einhergehende erhöhte Schilddrüsenhormonkonzentration im Blut hat eine Sensibilisierung bestimmter Organe für die Wirkung von Katecholaminen zur Folge. Daraus erklären sich gerade die zu Beginn der Erkrankung auftretenden Symptome wie Schweißneigung, Wärmeintoleranz, Gewichtsverlust, gesteigerter Appetit, innere Unruhe,

Schlaflosigkeit, Nervosität, Muskelkrämpfe und Durchfälle (Renz-Polster, Krautzig, 2006).

Die Immunhyperthyreose beginnt meist akut und mit ausgeprägter Symptomatik. Ältere Patienten zeigen jedoch häufig einen mono- bzw. oligosymptomatischen Verlauf mit uncharakteristischen Beschwerden (Anorexie, Müdigkeit, Kraftlosigkeit), die nicht selten als Altersbeschwerden verkannt werden (Renz-Polster, Krautzig, 2006).

Die häufigste und auffälligste extrathyreoidale Manifestation des M. Basedow ist die Endokrine Orbitopathie (EO), die in 50-70% der Fälle zu finden ist. Sie tritt meist in engem zeitlichen Zusammenhang mit der Hyperthyreose auf (+/-1 Jahr) und sichert die Diagnose. Die typischen Befunde, welche in der Regel beidseits aber durchaus auch asymmetrisch vorkommen, sind Protrusio bulbi (Exophthalmus), periorbitales Lidödem, Fremdkörpergefühl, Photophobie, Augentränen, Motilitätsstörungen und das Sehen von Doppelbildern (Nawroth, Ziegler, 2001).

1.6.4. Diagnostik

Um die Diagnose Morbus Basedow stellen zu können, müssen verschiedene Kriterien erfüllt werden.

Eine Erhöhung der Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin bei gleichzeitiger Supprimierung des TSH belegt eine hyperthyreote Stoffwechsellage.

Typisch ist der Nachweis von Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor (TRAK), welche im floriden Stadium der Erkrankung in 80-100% der Fälle nachweisbar sind. Im weiteren Krankheitsverlauf und unter Therapie ist der Titer oftmals rückläufig, was jedoch im Einzelfall keine prognostische Relevanz bezüglich Krankheitsdauer oder einer möglichen Spontanremission hat. Darüber hinaus lassen sich Antikörper gegen Thyreoglobulin (50-70%) und thyreoidale Peroxidase (60-80%) nachweisen. Die Endokrine Orbitopathie in Verbindung mit einer Schilddrüsenüberfunktion und zusätzlichem TRAK-Nachweis sind beweisend für das Vorliegen einer Immunthyreopathie vom Typ Basedow (Renz-Polster, Krautzig, 2006).

Zur Unterstützung der Diagnosefindung sowie zur Verlaufskontrolle können zusätzlich bildgebende Verfahren wie Sonographie und quantitative Szintigraphie herangezogen werden (Nawroth, Ziegler, 2001).

1.6.5. Therapie

Zur Behandlung des Morbus Basedow stehen drei Therapieverfahren zur Verfügung, die im Folgenden erläutert werden.

1.6.5.1. Medikamentöse Therapie

Die Therapie der Immunhyperthyreose vom Typ Basedow wird in erster Linie mit antithyreoidalen Substanzen, welche die Jodorganifizierung sowie die Verknüpfung von Mono- und Dijodthyronin hemmen, durchgeführt. Während in Europa Pharmaka der Thionamidgruppe wie Thiamazol und Carbimazol bevorzugt werden, kommen in den USA hauptsächlich Propylthiouracile zum Einsatz (Nawroth, Ziegler, 2001).

Die Behandlung beginnt im Allgemeinen mit der Erstmanifestation der Erkrankung und wird als Langzeittherapie durchgeführt (Schumm-Draeger, 1997).

Die individuelle Jodversorgung eines jeden Patienten sollte in die Therapieüberlegungen miteinbezogen werden. So reichen in Jodmangelgebieten niedrigere Dosierungen aus, da die antithyreoidalen Substanzen mit dem Jod um die Schilddrüsenperoxidase konkurrieren (Hofbauer *et al.*, 1996). Generell verfolgt man heute zunehmend ein Niedrigdosiskonzept. Dieses sieht initial für die Dauer von zwei bis vier Wochen eine hohe Dosis vor (Initialtherapie), während in der Erhaltungstherapie deutlich niedrigere Dosierungen gewählt werden (Nawroth, Ziegler, 2001; Aktories, 2005). Die antithyreoidale Therapie sollte für ca. ein Jahr mit der kleinstmöglichen Dosierung, mit der sich eine euthyreote Stoffwechsellage einstellen lässt, durchgeführt werden (Hofbauer *et al.*, 1996). Kürzere Zeiträume sind mit einer deutlich höheren Rezidivquote verbunden, wohingegen mit einer über ein Jahr hinausgehenden Medikationsdauer (15-18 Monate) keine besseren Remissionsergebnisse erzielt werden (Aktories, 2005).

Unter thyreostatischer Therapie können folgende unerwünschte Nebenwirkungen auftreten: Thrombo-/Leukozytopenie, Agranulozytose sowie

allergische Reaktionen (Exanthem), Gelenk- und Muskelschmerzen. Auftretende Tachykardien können durch zusätzliche Gabe von Betablockern (z.B. Propranolol) behandelt werden. Darüber hinaus hemmen Betablocker die Konversion von T4 zu T3 (Aktories, 2005).

Im Anschluss an die einjährige kontinuierliche Therapie wird ein Auslassversuch unternommen. Bei 40-70% der Fälle tritt hierbei innerhalb der ersten 6-12 Monate ein Rezidiv auf. Deshalb ist es notwendig, nach Behandlungsende regelmäßig Schilddrüsenfunktionsparameter zu bestimmen (Schumm-Draeger, 1997). Prinzipiell kann bei einem Hyperthyreoserezidiv für ein weiteres Jahr medikamentös behandelt werden. Jedoch spätestens nach einem zweiten Rezidiv sollten ablative Therapiemaßnahmen wie die Radiojodtherapie bzw. die chirurgische Therapie zur Anwendung kommen (Hofbauer *et al.*, 1996).

Bei bestehender Endokriner Orbitopathie ist ebenfalls eine euthyreote Stoffwechsellage anzustreben, wobei eine Hypothyreose vermieden werden sollte, da diese zu einer Verschlechterung der Endokrinen Orbitopathie führen kann. Neben lokalen Maßnahmen (getönte Augengläser, künstliche Tränentropfen) werden Kortikosteroide verabreicht (Aktories, 2005).

1.6.5.2. Radiojodtherapie (RJT)

1942 wurde erstmals ein Patient mit M. Basedow erfolgreich einer Radiojodbehandlung unterzogen (Hertz *et al.*, 1942).

Hierbei erfolgt durch die Radio-Jod-Applikation oral in Form einer Kapsel mit ¹³¹Jod, mit einer Herddosis von 150-200 Gy, eine relativ sichere Beseitigung der Hyperthyreose. Dieses Verfahren sollte der OP vorgezogen werden, insbesondere bei kleinem Schilddrüsenvolumen, diffuser Struma, zunehmendem Patientenalter und einem postoperativen Rezidiv. Die wichtigste Kontraindikation ist die Endokrine Orbitopathie, da die gesteigerte Antigenfreisetzung unter RJT zu einer Verschlechterung der Endokrinen Orbitopathie führt (Acharya *et al.*, 2008). Weitere Kontraindikationen sind Gravidität, Kinderwunsch in den nächsten sechs Monaten, Laktation, ein niedriger „Joduptake“ sowie Malignomverdacht bei gleichzeitig vorhandenen kalten Knoten (Moser *et al.*, 1997).

1.6.5.3. Operative und präoperative Therapie

Das Hauptziel einer Basedow Struma Operation besteht in der Vermeidung eines Hyperthyreoserezidivs (Hofbauer *et al.*, 1996). Es stehen dem Operateur die totale, die beidseits subtotale Thyroidektomie und die einseitige Lobektomie mit subtotaler Resektion der Gegenseite, die so genannte Dunhill-OP, zur Verfügung (Siewert, Rothmund, Schumpelick, 2007; Puls *et al.*, 1993). Hierbei sollte nur ein geringes Schilddrüsenvolumen von ca. drei bis fünf, maximal acht Gramm belassen werden, obwohl dies eine behandlungspflichtige Hypothyreose zur Folge haben kann (Hofbauer *et al.*, 1996). Größere Schilddrüsenreste sind mit einem erhöhten postoperativen Hyperthyreose- und Struma-rezidivrisiko verbunden (Dralle *et al.*, 1987). Neue Studien zeigen, dass die totale Thyroidektomie zu besseren Langzeitergebnissen vor allem hinsichtlich Erkrankungsverlauf und Endokriner Orbitopathie führt. Zusätzlich wird bei totaler Entfernung der Schilddrüse mit technischen Innovationen wie dem „Neuromonitoring“ durch elektrophysiologische Darstellung des N. laryngeus recurrens die Komplikationsrate gesenkt (Hussain, Hisham, 2008; Siewert, Rothmund, Schumpelick, 2007).

Indikationen für die Operation sind eine therapierefraktäre Schilddrüsenüberfunktion, eine große Struma ab 50-60ml mit oder ohne mechanische Beeinträchtigung, eine Endokrine Orbitopathie, eine stetige Größenprogredienz sowie der Verdacht auf Malignität (Renz-Polster, Krautzig, 2006; Siewert, Rothmund, Schumpelick, 2007).

Präoperativ sollte eine euthyreote Stoffwechsellage mittels antithyreoidalen Substanzen erreicht werden, um das Auftreten einer intraoperativen thyreotoxischen Krise zu verhindern (Siewert, Rothmund, Schumpelick, 1997). Bei sehr großen Strumen bzw. einer Unverträglichkeit der thyreostatischen Behandlung kann die *Plummerung* mit hohen Joddosen als direkte Vorbehandlung durchgeführt werden. Hierbei wird für die Dauer von 7-14 Tagen Lugol'sche Lösung (wässrige Lösung mit 5% Iod und 10% Kaliumjodid) mit z.B. 3x5 Tropfen (oral) pro Tag verabreicht, mit dem Ziel die Schilddrüsenhormonsekretion zu hemmen. Der Effekt tritt innerhalb von 24h ein und erreicht sein Maximum nach ungefähr 10-14 Tagen (Aktories, 2005). Die Operation sollte innerhalb dieses Zeitraumes erfolgen, da es im Anschluss zu einem Wirkungsverlust oder einem Wiederaufflammen der Hyperthyreose kommen

kann. Darüber hinaus gewinnt die Schilddrüse unter der *Plummerung* an Festigkeit und weist intraoperativ eine reduzierte Blutungsneigung auf, was den Eingriff erleichtert. Als Komplikationen der operativen Therapie der Immuntyreopathie sind in erster Linie die Parese des Nervus laryngeus recurrens, der Hypoparathyreoidismus und das Rezidiv zu nennen (Burgis *et al.*, 2001; Hofbauer *et al.*, 1996; Siewert, Rothmund, Schumpelick, 2007).

1.7. Neoangiogenese

Unter Angiogenese versteht man das Aussprossen neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Kapillaren. Endothelzellen wandern in die betreffende Region und ordnen sich zu einer tubulären Struktur an. Neben dem Errichten einer Basalmembran kommt es zur Umgestaltung der extrazellulären Matrix, um die neu gebildeten Gefäße zu stützen und zu erhalten. Bevor ein funktionelles Gefäßnetzwerk Bestand hat, muss eine Anastomosenbildung zwischen neuen und bereits existierenden Gefäßen stattfinden. Dieser Vorgang ist unabdingbar für die Gewebe- und Organentwicklung (Risau *et al.*, 1997).

Physiologisch kommt die Neoangiogenese im Rahmen der Embryonalentwicklung in den ersten fünf Tagen vor (Ramsden, 2000). Später, im Erwachsenenalter, ist die Angiogenese neben Wundheilungsprozessen und Menstruationszyklus in erster Linie unter pathologischen Bedingungen wie z.B. der diabetischen Retinopathie sowie der Tumorentstehung zu beobachten. Die Größenzunahme eines Primärtumors über einen Durchmesser von 2 mm hinaus erfordert die Bildung neuer Blutgefäße. Folkman folgerte hieraus bereits 1971, dass eine Hemmung der Angiogenese das Tumorwachstum und die Metastasierung verhindern könnte (Folkman *et al.*, 1971, 1995).

1.7.1. Neoangiogenese der Schilddrüse

Morbus Basedow geht mit einer dopplersonographisch messbaren gesteigerten Schilddrüsendurchblutung einher (Rangaswamy *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1987). Aus histopathologischer Sicht stellt der Nachweis der Hypervaskularisierung ein Hauptmerkmal dieser Erkrankung dar (Laesen *et al.*, 1992). Aus diesem Grund ist es notwendig die Mechanismen zu verstehen, die für die Bildung neuer Blutgefäße verantwortlich sind.

Wollman *et al.* führten 1978 Strumauntersuchungen im Tierversuch durch, wobei sie ihr Augenmerk auf histologische Veränderungen der Mikrogefäßdichte richteten. Hierbei wurde bei Ratten durch Thyreostatikagabe in TSH steigernder Dosierung die Schilddrüse zum Wachstum angeregt. Drei Tage nach Behandlungsbeginn zeigte sich eine deutliche Zunahme der Kapillarisation und nach zwanzig Tagen eine fast vollständige Gefäßendothelumrahmung der Follikel. Neben Kapillarfusionen konnten Endothelzellmitosen nachgewiesen werden. Die umliegenden Organe, wie die

Nebenschilddrüsen, zeigten hingegen keine Veränderung der Vaskularisierung. Im Rahmen dieses Experimentes fiel auf, dass das Follikelepithelzellwachstum erst einsetzte, nachdem die Gefäßendothelzellproliferation bereits fortgeschritten war (Wollman *et al.*, 1978).

Diese vorausgehende Vaskularisierung ist ein erforderlicher erster Schritt, um das Schilddrüsenwachstum zu ermöglichen. Man nimmt an, dass der Mechanismus zur Anregung der Angiogenese durch Ausschüttung entsprechender Stimulatoren durch Follikelepithelzellen reguliert wird (Wollman *et al.*, 1978; Deneff *et al.*, 1989), als Antwort auf niedrige Thyroxin- bzw. erhöhte TSH-Konzentrationen (Ramsden, 2000). Goodman & Rone (1987) fanden *in vitro* einen solchen von Schilddrüsenepithelzellen sezernierten Wachstumsfaktor, das VEGF (Vascular endothelial growth factor). Dieser regt die Endothelzellen zum Wachstum und zur Migration an (Soh *et al.*, 1997).

1.7.2. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Eine Reihe von Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Substanzen, aber auch Angiogenese-Inhibitoren sind potentiell für Veränderungen der Vaskularisierung und des damit verbundenen gesteigerten Blutflusses innerhalb der Schilddrüse verantwortlich (Dumont *et al.*, 1992).

Im Rahmen der Immunthyreopathie vom Typ Basedow ist der Wachstumsfaktor VEGF vermutlich an der Angiogenese-Induktion beteiligt (Itaka *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1995). VEGF ist ein homodimeres, heparinbindendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34-42 kDa, welches erstmals aus Follikelzellen der Hypophyse isoliert wurde (Soh *et al.*, 1997; Leung *et al.*, 1989). Dieses endothelzellspezifische Protein ist in der Lage Gefäßendothelzellen zur Proliferation anzuregen und dadurch Gefäßneubildungen zu induzieren (Soh *et al.*, 1997). Es ist ebenfalls unter der Bezeichnung VPF (Vascular permeability factor) bekannt, da VEGF neben seiner typischen proliferativen Wirkung auf das Endothel eine gefäßpermeabilitätssteigernde Wirkung besitzt (Keck *et al.*, 1989). Derzeit sind vier Isoformen des VEGF bekannt (VEGF-A, -B, -C und -D), welche alle vom selben Gen transkribiert und anschließend in die verschiedenen Typen überführt werden (Carmeliet *et al.*, 1997). Die Isoformen weisen unterschiedliche Gewebeexpressionen auf. VEGF-A scheint in erster Linie für die Endothelzellproliferation und die Steigerung der Gefäßpermeabilität

verantwortlich zu sein. VEGF-B wird hauptsächlich mit der Ausbildung von Koronargefäßen in Verbindung gebracht. Während die Isoformen C und D ihre Wirkung überwiegend im lymphatischen Gewebe ausüben (Yancopoulos *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2009). Allen gemeinsam ist die Affinität zu Tyrosinkinase-Membranrezeptoren, von denen drei identifiziert wurden, VEGFR-1 (Flt-1), -2 (Flk/KDR) und -3 (Flt-4). Im Rahmen angiogener Prozesse scheinen insbesondere die Rezeptoren 1 und 2 von Bedeutung zu sein, da sie hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert werden. VEGF A entfaltet seine Wirkung in erster Linie über diese beiden Rezeptoren. Es stellt prozentual den größten Anteil der VEGF-Isoformen dar (Ramsden, 2000). Ein dem VEGF-A in 46 % der Struktur identisches Protein ist der Placental growth factor (PlGF), welcher seinem Namen entsprechend in der Plazenta identifiziert wurde, jedoch ebenfalls in der Schilddrüse und anderen Organen wie Herz und Lunge exprimiert wird (Maglione *et al.*, 1991; Viglietto *et al.*, 1995). PlGF ist in der Lage über Interaktion mit dem VEGFR-1 und der Ausbildung eines Heterodimers mit VEGF das angiogene Potential des VEGF signifikant zu verstärken (Ramsden, 2000).

1.7.3. Angiopoetine

Den Angiopoetinen wird ebenfalls eine Rolle bei der Angiogenese zugeschrieben. Bisher sind die 4 Unterformen Ang-1 bis Ang-4 bekannt. Ihre membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptoren (Tie-2) werden wie die Rezeptoren des VEGF auf Endothelzellen exprimiert. Ang-1 scheint bei der Gefäßneubildung durch Stabilisierung der Gefäßwände beteiligt zu sein, indem die Interaktion zwischen den neu entstehenden Endothelzellen und den umliegenden Stromazellen hergestellt wird. Ang-2 wirkt dem Ang-1 als Antagonist entgegen, indem es neu gebildete Gefäße in unreife Gefäßendothelzellobstufen zurückführt. Insbesondere scheint bei Abwesenheit anderer angiogener Faktoren wie dem VEGF die Wirkung von Ang-2 verstärkt zu werden (Yancopoulos *et al.*, 2000).

1.7.4. Angiogenese-Inhibitoren

Neben angiogenen Faktoren existieren einige Substanzen, die einer Neubildung von Blutgefäßen entgegenwirken.

Thrombospondin-1 (TSP-1) wird in der Schilddrüse von Follikel epithelzellen gebildet und führt zu einer Unterdrückung des Endothelzellwachstums. Patel *et al.* wiesen 1996 eine Reduktion von TSP-1 nach TSH-Gabe bei der Strumaentstehung nach. In verschiedenen Schilddrüsentumoren wie dem follikulären oder undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom konnte eine Verringerung des Thrombospondin-1 nachgewiesen werden (Bunone *et al.*, 1999).

Endostatin ist ein endogener Angiogenese-Inhibitor, der die Proliferation und Migration von Gefäßendothelzellen hemmt. Es ist ein 20 kDa schweres Spaltprodukt vom Kollagen Typ XVIII (Kucharz *et al.*, 2003). Ye *et al.* konnten 2002 eine signifikante Reduktion der Tumorgöße beim follikulären Schilddrüsenkarzinom durch Einwirkung von Endostatin nachweisen. Serologische Endostatinbestimmungen bei hyperthyreoter sowie hypothyreoter Stoffwechsellage zeigten eine deutliche Reduktion des Endostatin bei Patienten mit Schilddrüsenüberfunktion (Kucharz *et al.*, 2003).

Angiostatin ist ein Fragment des Plasminogen (O`Reilly *et al.*, 1994) mit antiangiogener Wirkung. Es verhindert die Blutgefäßbildung und reduziert das Primärtumor- sowie Metastasenwachstum (Sim *et al.*, 1997). Angiostatin wurde u.a. in der Schilddrüse nachgewiesen. Im Gegensatz zu Thrombospondin-1 scheint TSH die Bildung von Angiostatin zu fördern (Mak *et al.*, 1984). Möglicherweise führt Angiostatin zu einer Limitierung des Strumawachstums (Ramsden, 2000).

1.7.5. VEGF und Schilddrüse

Die Rolle des VEGF als Stimulator der Angiogenese bei verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen.

Das der Morbus Basedow mit einer ausgeprägten Durchblutung einhergeht, lässt sich sonographisch (farbkodierte Duplexsonographie) (Itaka *et al.*, 1998), wie auch immunhistochemisch darstellen (Nagura *et al.*, 2001). Es zeigen sich bei Morbus Basedow Patienten, im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe, ein gesteigerter Vaskularisierungsgrad und erhöhte Serum VEGF

Konzentrationen in Korrelation mit einem gesteigerten intrathyreoidalen Blutfluss (Itaka *et al.*, 1998).

Wang *et al.* führten 1998 an Ratten-Schilddrüsen immunhistochemische Untersuchungen von Produktion und Verteilung des VEGF durch. Hierbei wurden gesunde Schilddrüsen mit Thyreostatika-induzierten Strumen verglichen. Die normalen Schilddrüsen zeigten große und mit reichlich Kolloid gefüllte Follikel. VEGF wurde hauptsächlich im Bereich der Gefäßendothelzellen und im Stromagewebe zwischen den Follikeln nachgewiesen. In Follikelepithelzellen konnte nur vereinzelt VEGF dargestellt werden. Im Gegensatz hierzu enthielten die Follikel der hyperplastischen Schilddrüsen weniger Kolloid, jedoch wesentlich mehr positiv gefärbte Areale für VEGF. Den Gefäßwachstumsfaktor fand man in vaskulären wie auch in follikulären Epithelzellen in annähernd gleicher Verteilung.

Im Jahre 1999 entdeckten Suzuki *et al.* einen Zusammenhang zwischen der Höhe des vorhandenen follikulären Thyreoglobulins und der VEGF-Expression. Es wurde beschrieben, dass Thyreoglobulin die VEGF-Bildung unterdrückt. Bekanntermaßen zeigt das histologische Bild einer Basedow Struma kleine Follikel mit vermindertem Gehalt an Kolloid. Daher wird vermutet, dass der erniedrigte Thyreoglobulingehalt die erhöhten VEGF-Werte bei Morbus Basedow mitbedingt (Suzuki *et al.*, 1999).

Die molekularbiologischen Mechanismen, die der VEGF-Expression zu Grunde liegen, stellen sich *in vitro* wie folgt dar. Autoantikörper vom IgG Typ (TRAK) führen durch TSH Rezeptor Bindung auf Follikelepithelzellen zu einer Aktivierung der cAMP- und Protein Kinase C Signaltransduktionswege. Schilddrüsenfollikelepithelzellen synthetisieren und sezernieren aufgrund dessen vermehrt VEGF. In Zellkulturversuchen ließen sich diese erhöhten VEGF-Konzentrationen auch mittels TSH und Insulin erzielen (Sato *et al.*, 1995). Bei Untersuchungen am Lebenden zeigten sich sowohl im Tierversuch als auch bei Basedow Patienten ähnliche Ergebnisse. Einige Studien demonstrierten, dass es innerhalb der Schilddrüse von mit Thyreostatika behandelten Ratten, im Anschluss an einen TSH-Anstieg, zu einer Zunahme von VEGF und VEGF-Rezeptoren Flt-1, Flk-1/KDR und zur Kapillarproliferation kommt (Viglietto *et al.*, 1997). VEGF scheint über eine negative Rückkopplung die Thyreozytenproliferation zu limitieren. Bei der Strumaentstehung entwickelt

sich zuerst ein Kapillarnetz, um den daraufhin proliferierenden Thyreozyten eine Grundversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über das Blut zu gewährleisten. Daher findet sich in der frühen Kapillarausbildungsphase nur eine sehr niedrige Teilungsaktivität der Stroma- und Follikel epithelzellen. Es ist anzunehmen, dass VEGF den lokal produzierten Wachstumsfaktoren wie Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) und Insulin like growth factor-1 entgegenwirkt, welche während der Strumaentstehung im Überschuss vorhanden sind und die proliferativ auf Stroma- und Follikel epithelzellen wirken (Becks *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1994).

VEGF und weitere angiogene Faktoren spielen ebenfalls beim Tumorwachstum der verschiedenen Schilddrüsenkarzinome eine bedeutende Rolle. So konnte bei Schilddrüsentumoren (follikuläre, papilläre, medulläre sowie anaplastische Schilddrüsenkarzinome) eine erhöhte VEGF-Präsenz im Vergleich zu normalen Schilddrüsenzellen nachgewiesen werden (Soh *et al.*, 1996, 1997). Jedoch differieren die verschiedenen Tumor-Entitäten hinsichtlich der Höhe der VEGF-Expression. Diese Erkenntnisse führten in den letzten Jahren zu Therapieansätzen, bei denen die Angiogenese durch VEGF-Antikörper oder VEGF-Rezeptorantikörper unterdrückt werden sollte, um eine Tumorreduktion oder -stagnation zu bewirken (Schoenberger *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2006).

Yamada *et al.* haben 2006 den Einfluss hoher Jodgaben auf menschliche Schilddrüsenfollikel epithelzellen *in vitro* untersucht. Die TSH-vermittelte Expression angiogenesestimulierender Faktoren wie VEGF und PlGF (Placental growth factor) nahm in Anwesenheit hoher Jodkonzentrationen ab. Gleichzeitig gab es einen Anstieg Angiogenese-inhibierender Faktoren. Yamada *et al.* folgerten hieraus, dass hohe Jodgaben, wie sie im Rahmen der präoperativen *Plummerung* bei Basedow Strumen noch heute verabreicht werden, über Beeinflussung proangiogener und antiangiogener Faktoren die Schilddüsendurchblutung reduzieren. Auf eine mögliche Reduktion der VEGF-Bildung durch Thyreostatika wurde von Itaka *et al.* 1998 hingewiesen. Unter thyreostatischer Therapie zeigte sich ein Absinken des im Serum gemessenen VEGF-Wertes und eine duplexsonographisch messbare Reduktion der Schilddrüsenorgandurchblutung. Zusammenfassend weisen die Studien von Yamada *et al.* und Itaka *et al.* auf eine mögliche Verminderung der Angio-

genese bei VEGF-Reduktion durch die Gabe hoher Joddosen wie auch Thyreostatika hin.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

- DAB-Chromogen (3,3` Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (S 3000, Dako, Deutschland)
- Eindeckmedium permanent (Roti Histokitt, 6638.1, Roth, Deutschland)
- Eosin Y alkoholisch (HT110-1-32, Sigma, Deutschland)
- Esel-Normalserum (cs-2044, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Ethanol (32205, Riedel-de Haen, Deutschland)
- Häkalaun nach Meyer (1.09249, Merck, Deutschland)
- Methanol (UN 1230, Riedel-de Haen, Deutschland)
- Streptavidin (Streptavidin-HRP, 554066, PharMingen, Deutschland)
- Wasserstoffperoxyd 30% (H₂O₂, 1.07209, Merck, Deutschland)
- Xylol (33817, Riedel-de Haen)
- Ziegen-Normalserum (X 0907, Dako, Deutschland)
- Citratpuffer: 0,01 M, pH 6,0
 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat (1.00242, Merck, Deutschland) in 1000 ml Aqua dest. lösen.
 Mit ca. 13 ml 2N Natronlauge (NaOH, 1.09137, Merck, Deutschland) pH-Wert auf 6,0 einstellen.
- PBS-Puffer:
Stammlösung
 29,25 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O Di-Natriumhydrogenphosphat (1.06566 Merck)
 4,90 g KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphosphat (5104, Merck)
 160 g NaCL Natriumchlorid (92930, Riedel-de Haen)
 Di-Natriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat in 500 ml Aqua dest. lösen.
 Dann das Natriumchlorid zugeben und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
 Mit 1N Natronlauge (NaOH) auf pH-Wert 7,2 einstellen.

Gebrauchslösung

50 ml PBS-Stammlösung mit 950 ml Aqua dest. verdünnen.

- TRIS-HCL-Puffer: 0,05 M, pH 7,6
6,1 g TRIS-Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 4855.2, Roth, Deutschland) in 50 ml Aqua dest. lösen.
37 ml 1N Salzsäure (HCL, 1.09057, Merck, Deutschland) hinzufügen und anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

2.2. Antikörper

Donkey

- anti-CD31 PECAM-1/M-20 (sc-1506, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Sekundärantikörper: Donkey anti-goat IgG, (sc-2042, Santa Cruz Biotechnology)

Rabbit

- anti-VEGF A20 (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Sekundärantikörper: Goat anti-rabbit, (sc-2040, Santa Cruz Biotechnology)

2.3. Geräte

- Sicherheitswerkbank (Hera safe, Heraeus, Deutschland)
- Computer mit Auswertungssoftware (Q500MC, Leica, Deutschland)
- Microsoft Office Excel 2003
- SPSS (Version 12,0, Chicago, USA)
- Deckgläser (Menzel-Gläser)
- Diverse Glasgefäße, Messzylinder und Küvetten
- Feuchte Kammern für die Inkubationen (Klinikeigenbau der Feinmechanik)
- Kühlschrank (Duofrost, Linde)
- Wärmeschrank (Heraeus, Deutschland)
- Mikroskop (DMLB, Leica, Deutschland)
- Mikrotom (1515, Leitz, Deutschland)
- Objektträger
- pH-Meter (WinLab, Windaus-Labortechnik)
- Pipetten (Eppendorf Reference), Pipettenspitzen

- Pipetten (pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte)
- Waage (Typ 1801, Sartorius)
- Wägebapier (MN 226, Macherey-Nagel)

2.4. Patientenkollektiv

Bei dieser an der Philipps-Universität Marburg durchgeführten Studie handelte es sich um eine experimentelle, immunhistochemische Untersuchung an 43 Schilddrüsengewebeproben. Das Untersuchungsmaterial bestand aus Gewebeproben von 36 Morbus Basedow und 7 multinodulären Strumen.

Durch Aktenstudie wurden die vorangegangene medikamentöse Therapie sowie die Behandlungsdauer rekonstruiert. Alle Basedow Patienten waren mit den Thyreostatika Thiamazol, Carbimazol oder Propylcil vorbehandelt worden. Die Patienten, die zum geplanten Operationstermin keine befriedigende euthyreote Stoffwechsellage erreicht hatten, klinische Zeichen einer Hyperthyreose bzw. auskultatorisch noch ein deutliches Schwirren aufwiesen, wurden darüber hinaus mehrtägig mit Kaliumjodid behandelt (*Plummerung*). Anhand der gewonnenen Patientendaten wurden zwei Gruppen gebildet. Zum einen die rein thyreostatisch behandelte Patientengruppe, bestehend aus 20 Gewebeproben, und zweitens die zur thyreostatischen Therapie zusätzlich *geplummerte* Patientengruppe, bestehend aus 16 Gewebeproben.

Alle 36 Basedow-Proben wurden einem Patientenkollektiv von 153 Morbus Basedow Patienten entnommen, die zwischen 1987 und 2001 in der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg operiert wurden. Die resezierten Strumen wurden anschließend im Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und archiviert. Sämtliche 16 Patienten des Kollektivs, welche präoperativ einer *Plummerungsbehandlung* unterzogen wurden, gingen in die vorliegende Studie ein. Zusätzlich wurden 20 der lediglich mit Thyreostatika therapierten Patienten aus den restlichen 137 Patienten randomisiert.

7 Struma multinodosa wurden als randomisierte Kontrollgruppe mituntersucht. Hierbei handelt es sich um hypothyreote Strumen, die präoperativ über einen Zeitraum von c.a. 1-2 Jahren mit L-Thyroxin behandelt wurden. Die demographischen Daten des Patientenkollektivs sind **Tabelle 2** zu entnehmen.

Tabelle 2: Demographische Patientendaten in den Behandlungsgruppen

	L-Thyroxin	Thyreostatika	Thyreostatika + Plummerung
Strumatyp	Multinodulär	M. Basedow	M. Basedow
Anzahl (n)	7	20	16
Geschlecht (m/w)	0/7	5/15	1/15
OP-Alter (Median)	34 (28-53)	34 (16-66)	36 (15-64)

2.5. Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zum Nachweis von Antigenen in histologischen Gewebepreparaten. Hierbei macht man sich die Eigenschaften von Antikörpern (Immunglobuline) zunutze, mit ihren entsprechenden Antigenen eine spezifische Bindung einzugehen. Um eine Antigen-Antikörper-Bindung erfassen zu können, ist es notwendig, den Antikörper mit einem Enzym zu koppeln, welches nach Substratzugabe eine Farbreaktion auslöst (Noll, Schaub-Kühnen, 2000).

2.5.1. Labeled avidin-biotin technique (LAB-Methode)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete LAB-Methode ist eine sog. indirekte oder auch 2-Schritt-Methode. Hierbei bindet ein spezifischer, aber unkonjugierter Antikörper (Primärantikörper) an das Gewebeanigen. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper), welcher gegen das FC-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, hinzugegeben. Das Enzym des Sekundärantikörpers reagiert daraufhin mit einem zugegebenen Substrat zu einem Farbkomplex. Da die Sekundärantikörper mit verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren können, gelangen mehr Enzyme an den Ort des Antigens und verstärken damit das Signal. Dieses Verfahren ist wesentlich empfindlicher als die direkte Methode, bei der ein enzymmarkierter Antikörper mit dem Gewebeanigen reagiert, so dass pro Antigen lediglich ein Enzymmolekül bindet. Dieses Verfahren findet daher heute kaum noch Anwendung (Noll, Schaub-Kühnen, 2000; Boenisch, 1996).

Bei der LAB-Methode (**Abbildung 2.1**) macht man sich die hohe Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin zunutze, um das Enzym an den Sekundärantikörper zu binden. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein und besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Der Sekundärantikörper wird mit dem Vitamin Biotin konjugiert. Das Enzym, hier die Peroxidase, ist an das Streptavidin gekoppelt und über dessen Bindung an Biotin mit dem Sekundärantikörper verbunden. Da an das Streptavidin mehrere Enzymmoleküle gebunden sind, wird nochmals eine Sensitivitätssteigerung des Verfahrens erzielt. Die Peroxidase ist in der Lage mit zugegebenen Substraten, wie in unserem Fall dem DAB (3,3`Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), eine mikroskopisch erfassbare braune Farbreaktion hervorzurufen (Noll, Schaub-Kühnen, 2000; Boenisch, 1996).

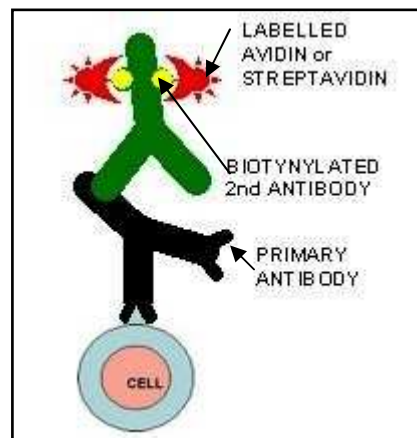


Abbildung 2.1: Labeled avidin-biotin technique (LAB-Methode), (Flow Cytometry Facility)

2.5.2. Hintergrundreaktivität

Hintergrundfärbungen gehören zu den am häufigsten auftretenden Problemen in der Immunhistochemie (Noll, Schaub-Kühnen, 2000).

Immunglobuline, wie der hier verwendete Primärantikörper, können aufgrund hydrophober Anziehungskräfte unspezifisch an Proteine binden und dadurch zu einer Hintergrundfärbung führen. Diese nicht Antigen-Antikörper vermittelten Bindungen des Primärantikörpers lassen sich durch vorheriges Auftragen von Normalserum (Non- oder Nichtserum) reduzieren. Hierbei handelt es sich um nicht konjugiertes Serum, welches aus derselben Tierspezies stammen sollte wie der Sekundärantikörper. Man geht davon aus, dass nichtimmunisierte Tiere

keine Antikörper gegen eigene Serumproteine bilden. Durch Absättigung der hydrophoben Bindungsstellen im Gewebe mit Normalserum können so unspezifische Anlagerungen der meist hydrophoben IgG`s vermindert werden. Zudem weisen IgG`s meist eine negative Oberflächenladung auf, so dass sie mit positiv geladenen Gewebeproteinen in Wechselwirkung treten können. Diese Wechselwirkung kann jedoch durch die Verwendung geeigneter Puffer vermindert werden (Noll, Schaub-Kühnen, 2000; Boenisch, 1996).

Trotz Fixierung und Einbettung des Gewebes wird die vorhandene Aktivität von Enzymen, die mit dem verwendeten Substrat reagieren können, nicht völlig aufgehoben. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, diese endogenen Enzyme bei immunhistochemischen Färbungen zu blockieren, um falsch positive Ergebnisse zu vermindern. Die hier verwendete Peroxidase, die aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen wird, ist in vielen unterschiedlichen Zellen nachweisbar (z.B. Erythrozyten). Sie kann eine Substrat-Chromogen-Reaktion hervorrufen. Eine der einfachsten Methoden zur Eliminierung der endogenen Peroxidase ist, wie in dieser Arbeit geschehen, eine Inkubation des Gewebes mit 3% Wasserstoffperoxid (Noll, Schaub-Kühnen, 2000; Boenisch, 1996).

2.5.3. Antigendemaskierung (Antigen Retrieval)

Formaldehyd ist eines der gängigsten Fixierungsmittel. Um eine Zerstörung der Proteine durch Autolyse oder Fäulnis zu verhindern, sollte möglichst schnell nach Gewebeentnahme die Fixierung mittels 4%ig gepuffertem Formalin erfolgen. Gegenüber anderen Fixierungsmitteln, wie z.B. Alkohol, ist Formalin zur Gewebeerhaltung am besten geeignet. Es führt durch Reaktion mit in erster Linie basischen Aminosäuren zu einer Ausbildung vernetzender Methylenbrücken (Aldehydvernetzungen), wodurch die Durchlässigkeit für Makromoleküle reduziert wird. Diese Quervernetzungen führen jedoch zu einer Veränderung der Protein-Antigenstruktur (Maskierung). Ohne vorherige Aufhebung dieses Zustandes ist die spezifische Antikörperbindung erschwert. Es sind mehrere Antigendemaskierungsverfahren bekannt (Noll, Schaub-Kühnen, 2000; Boenisch, 1996).

Bei der enzymatischen (chemischen) Demaskierung werden die Aldehydvernetzungen durch Andauung mittels verschiedener Enzyme wie Trypsin, Protease oder Pepsin gelöst. Hier ist es notwendig, sich strikt an

Protokollvorgaben zu halten, da Abweichungen zu unterschiedlichen Färberegebnissen führen können. Die häufigsten Fehlerquellen liegen in der Austitrierung der Enzymkonzentration sowie in dem Erfassen des optimalen Zeitpunktes der Enzymaktivität. Sowohl zu lange als auch zu kurze Inkubationszeiten können mit schwachen bzw. negativen Färberegebnissen einhergehen (Noll, Schaub-Kühnen, 2000; Boenisch, 1996).

Bei der hitzeinduzierten (physikalischen) Demaskierung werden die Proteinvernetzungen durch Erhitzen der Präparate in einer kalziumpräzipitierenden Lösung (Citratpuffer pH 6,0) aufgespalten. Auf diese Weise werden die Epitope, die für die Antikörperbindung notwendig sind, freigelegt, so dass Antigen-Antikörper-Reaktionen ablaufen können. Die Wärmeeinwirkung kann mittels verschiedener Geräte erzielt werden: Mikrowelle, Dampfdruckkochtopf, Autoklav, Wasserbad, Wärmeschrank. Letzterer wurde innerhalb dieser Arbeit zur Antigendemaskierung verwendet (60°C für 36 Stunden). Aufgrund der Möglichkeit der Geräteeinstellung (Temperatur, Zeit) ist dieses Verfahren vergleichsweise einfach durchzuführen. Kombinationen aus chemischer und physikalischer Methode sind ebenfalls möglich. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Präparate zunächst erhitzt und erst anschließend enzymatisch behandelt werden, da bei hohen Temperaturen Enzymaktivität verloren gehen kann (Noll, Schaub-Kühnen, 2000; Boenisch, 1996).

2.6. Immunhistochemische Färbungen

2.6.1. Blutgefäßdarstellung mittels anti-CD31-Färbung

Für die immunhistochemische Darstellung von Blutgefäßen ist es notwendig, Antigene zu finden, welche vorrangig auf Gefäßendothelzellen lokalisiert sind. Es bedarf spezifischer Antikörper gegen diese Endothelzellantigene, um gezielt Gefäße darzustellen und unerwünschte Farbreaktionen im umliegenden Gewebe zu vermeiden. Die in dieser Arbeit verwendete Gefäßdarstellung durch anti-CD31-Färbung basiert auf der Bindung von Antikörpern mit Adhäsionsmolekülen, den Cadherinen (Integrine), die an der Aufrechterhaltung des Zell-Zell-Kontaktes beteiligt sind. Man spricht hier von Cell adhesion molecules (CAMs), die aus der Gruppe der Immunglobulin-Großfamilie stammen (Löffler &

Petrides, 1997). In dieser Arbeit wird das Endothelzellantigen CD31 (= Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, kurz PECAM-1) dargestellt.

Von den in Paraffin eingebetteten Schilddrüsengewebebeobachten werden mit Hilfe eines Mikrotoms jeweils 30 Schnitte angefertigt und in ein Wasserbad gelegt. Jeder Schnitt wird daraufhin auf einen Objektträger aufgetragen und über Nacht im Wärmeschrank bei 30°C getrocknet. Eine ausreichende lange Trocknungszeit ist notwendig, da verbliebenes Wasser unter dem Schnitt zur Zerstörung des Präparates während der Antigendemaskierung führen kann. Darüber hinaus sollte die Temperatur 60°C nicht überschreiten, um einer Antigenzerstörung vorzubeugen (Noll, Schaub-Kühnen, 2000).

Die Entparaffinierung der Präparate wird durch Anschmelzen im Wärmeschrank bei 60°C vorbereitet. Die vollständige Ablösung des Paraffins erfolgt dann durch 20minütiges waschen in Xylol (4 x 5 min). Der Wasserverlust im Rahmen der Paraffin-Einbettung wird mittels anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (für je 5 Minuten 100%, 100%, 85%, 70%) wieder ausgeglichen.

Die Demaskierung der Antigene erfolgt durch 36stündige Citratpufferinkubation (pH 6,0) im Wärmeschrank bei 60°C.

Nach 20minütigem Abkühlen der Präparate blocken wir die endogene Peroxidaseaktivität mit 3% H₂O₂ (30 %iges H₂O₂ verdünnt mit Methanol) mit 30 Minuten Einwirkzeit.

Sämtliche Inkubationen (Blockserum, Primär- und Sekundärantikörper, Streptavidin und DAB-Chromogen) finden in Feuchtkammern statt. Der kurzen Reinigung in Aqua dest. schließt sich die Auftragung des Blockserums an, um unspezifische Proteinbindungsstellen innerhalb des Gewebes abzusättigen. Hierfür wird Eselserum mit PBS/BSA (Phosphat gepufferte Salzlösung/Bovines Serum Albumin) 1:20 verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgetragen. Anschließend wird der 1:1000 mit PBS verdünnte Primärantikörper (anti-CD31) appliziert. Die Präparate werden über Nacht (18 Stunden) im Kühlschrank bei 4°C belassen. Am nächsten Tag erfolgen drei Waschschriffe für je 10 Minuten mit PBS, um den nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die anschließende Sekundärantikörper-Inkubation wird 30 Minuten lang, mit einer Verdünnung von 1:500, durchgeführt. Nach erneutem Waschen in PBS (3 x 2 Minuten) folgt die Auftragung des Peroxidase-

konjugierten Streptavidins, für erneut 30 Minuten (Verdünnung 1:100). Nach letztmaligem Waschen in PBS wird das DAB-Chromogen, zusammen mit 150 µl H₂O₂, für 10 Minuten hinzugegeben. Da es sich bei DAB und Streptavidin um lichtempfindliche Verbindungen handelt, werden die Inkubationen im Dunkeln durchgeführt. Einer Präparatespülung mit Aqua dest. schließt sich die Gegenfärbung mit Hämalan (nach Mayer) in einer Verdünnung von 1:5 an. Nach 20 Sekunden werden die Schnitte aus dem Hämalan entnommen und daraufhin in warmem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut.

Es erfolgt die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85%, 100%, 100% für je 5 Minuten) sowie in 20minütiger Xylol-Behandlung (4 x 5 Minuten). Abschließend werden die Präparate mit Roti Histokitt beschickt und mit Deckgläschen abgedeckt.

2.6.2. Anti-VEGF-Färbung

Mit einem spezifischen Antikörper gegen VEGF, sind wir in der Lage, diesen hier zu untersuchenden Gefäßwachstumsfaktor immunhistochemisch darzustellen und dadurch dessen Verteilung und mengenmäßiges Vorkommen zu bestimmen.

Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper der Klasse IgG, welcher vorrangig drei der vier Hauptkonfigurationen der vorherrschenden VEGF-Isoform A markiert: VEGF121, VEGF165, VEGF189.

Die Reaktivität dieses VEGF-Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology) mit in Paraffin eingebettetem Schilddrüsengewebe wurde bereits dokumentiert (Soh *et al.*, 1997).

Die Anfertigungen der Gewebeschnitte, die Verfahren der Entparaffinierung, Rehydrierung, Antigendemaskierung sowie Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgen nach dem gleichen Prinzip, wie für die anti-CD31-Färbung beschrieben (**Kapitel 2.6.1**). Ebenso sind sämtliche Inkubationszeiten (Primärantikörper, Sekundärantikörper, Streptavidin, DAB-Chromogen) identisch.

Im Folgenden werden kurz die Abweichungen vom oben beschriebenen Färbeprotokoll aufgeführt. Blockserum ist bei der anti-VEGF-Färbung Ziegenserum 1:20 mit PBS/BSA verdünnt. Die Inkubation des Primärantikörpers (anti-VEGF) erfolgt in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBS. Der

Sekundärantikörper ist ein anti-Rabbit IgG von der Ziege, verdünnt 1:200. Die DAB-Chromogen-Inkubation erfolgt hier mit 400 μ l H₂O₂.

2.7. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

2.7.1. Messung der Mikrogefäßdichte

Um den Vaskularisierungsgrad der Schilddrüse abschätzen zu können, werden zwei Parameter bestimmt. Die Gefäßoberflächendichte pro μ m Stroma (engl. Vascular surface density = VSD) und die Gefäßanzahl pro mm² Stroma (Number of vessels = NVES) (Barth *et al.*, 1996).

2.7.1.1. Bestimmung der Gefäßoberflächendichte

Die Darstellung der Blutgefäße erfolgt, wie bereits in **Kapitel 2.6.1** geschildert, durch anti-CD31-Färbung.

Pro Gewebekblock werden jeweils drei aus der Mitte entnommene Schnitte immunhistochemisch gefärbt und pro Schnitt jeweils 20 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung ausgewertet. Bei einer Vergrößerung von 0,63 zur Videokamera ergibt sich eine resultierende Gesamtvergrößerung von 252. Mit Hilfe eines Computers werden 512 x 512 Pixel große Bilder eingescannt. Die sich daraus ergebene Fläche beträgt 0,0256 mm² mit einer Kantenlänge von 160 μ m. Die einzelnen Gesichtsfelder werden von einem computergenerierten Gitter überlagert und die Kreuzungspunkte der Blutgefäßwände (I_n) mit den Gitternetzlinien per Monitor ausgezählt (**Abbildung 2.2**). Da es sich bei dem Schilddrüsengewebe bezogen auf die stark variierende Follikelgröße um ein sehr inhomogenes Gewebe handelt, ist es notwendig, den reinen Stromaanteil des jeweiligen Gesichtsfeldes einzuschätzen. Hierzu werden die Gitterkreuzungspunkte gezählt, die über dem Stroma liegen (I_{STR}). Der Quotient aus den gezählten und der Gesamtanzahl der Gitterkreuzungspunkte (K_N) ergibt einen Annäherungswert für den relativen Stromaanteil ($V_{V(STR)}$), wie in **Gleichung 1** dargestellt.

Innerhalb dieser Arbeit kommt ausschließlich ein 4 x 4 Gitter zur Anwendung. Vergleichende Messungen mit unterschiedlichen Gittern zeigen im selben Gesichtsfeld gleiche VSD-Werte. Eine Variation der Gitterlinienanzahl ist daher nicht erforderlich (Barth *et al.*, 1996).

Gleichung 1: relativer Anteil des Stromas ($V_{V(STR)}$)

$$V_{V(STR)} = \frac{I_{STR}}{K_N} [\%]$$

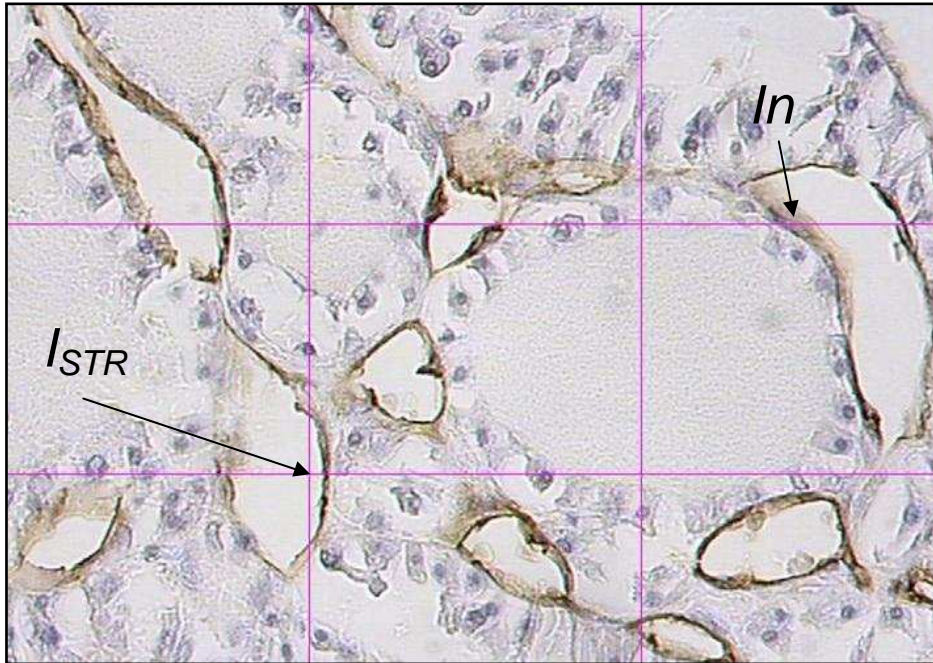


Abbildung 2.2: Basedow Struma, anti-CD31-Gefäßdarstellung
In: Kreuzungspunkte der Blutgefäßwände und Gitternetzlinien
I_{STR}: Gitterkreuzungspunkte, die über Stromagewebe zu liegen kommen

Die Berechnung der Gefäßoberflächendichte im Messfeld (VSD) erfolgt nach **Gleichung 2**. Hierbei stellt „*In*“ die Summe der Kreuzungspunkte zwischen Gitterlinien und Blutgefäßen dar. Der im Nenner des Quotienten stehende Parameter L_R steht für die Gesamtlänge der Testlinien. Er lässt sich durch Multiplikation der Gitterlinienanzahl mit der Testlinienlänge (Kantenlänge) bestimmen. Die Kantenlänge beträgt bei der hier gewählten Mikroskop-einstellung $160 \mu\text{m}$, so dass z.B. bei 4×4 Gitterlinien der L_R Wert $2560 \mu\text{m}$ beträgt ($4 \times 4 \times 160 \mu\text{m}$).

Gleichung 2: Gefäßoberflächendichte im Messfeld (VSD)

$$VSD = \frac{\sum In * 2}{L_R}$$

Die Dimension der Gefäßoberflächendichte VSD ist $1/\mu\text{m}$, was gleichbedeutend ist mit der Gefäßoberfläche pro Einheit Gewebevolumen ($1/\mu\text{m} = \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$). Da die folliculären Bereiche des Schilddrüsengewebes avaskulär sind, wurde die VSD lediglich für das Stromakompartiment berechnet. Hierfür wurden **Gleichung 1** und **Gleichung 2** zu **Gleichung 3** miteinander verknüpft.

Gleichung 3: Gefäßoberflächendichte im Stroma (VSD)

$$VSD = \frac{\sum In * 2}{L_R * V_{V(STR)}}$$

2.7.1.2. Bestimmung der Gefäßanzahl pro mm^2 Stroma

Hierbei handelt es sich um die Anzahl der Gefäße pro mm^2 Schilddrüsengewebe (Number of vessels = NVES). Innerhalb des Gesichtsfeldes werden die Gefäßanschnitte (N) unabhängig von Gitternetzlinien gezählt. Dem zu Folge werden auch die Blutgefäße registriert, die in den Zwischenräumen des Gitternetzes zu finden sind. Der relative Stromaanteil ($V_{V(STR)}$) wird wie oben beschrieben bestimmt. Aus der Anzahl der Gefäßanschnitte und dem relativen Stromaanteil wird ein Quotient gebildet (**Gleichung 4**), der die Gefäßanschnitte im Stromaanteil angibt.

Gleichung 4: Gefäßanzahl pro mm^2 Stroma (NVES)

$$NVES = \frac{N}{V_{V(STR)}}$$

2.7.2. Messung der VEGF-Expression

Die Berechnung der Fläche der durch anti-VEGF-Antikörper markierten Follikelepithelzellen erfolgt mit Hilfe eines Computersystems. Hierbei kommt ein digitales Bildauswertungssystem (Q500MC) mit der Software Qwin der Firma Leica zur Anwendung. Diese ist auf einem PC mit Intel 80486 Prozessor mit 66 MHz Taktfrequenz und einem Microsoft-Betriebssystem (Windows 3.1) installiert. Das Programm dient der digitalen Erfassung von Bildern, deren Bearbeitung und Auswertung. Um die einzelnen Bilder von dem Mikroskop (DMLB von Leica) in den Computer einlesen zu können, wird ein Farb-Videokamerakopf der Firma JVC verwendet. Dieser ist mit einem Einzel-CCD-Komplementärfarbensystem ausgestattet und besitzt eine maximale Auflösung von 752 x 582 Bildpunkten. Die einzelnen Bilder können in verschiedenen Größen und Farbkodierungen eingelesen werden. Damit eine spätere Zuordnung der gespeicherten Bilder zu den jeweiligen Präparaten möglich ist, wird vor dem Einscannen eine Nummer eingegeben, unter welcher die Bilderspeicherung erfolgt. Wenn das Einlesen der einzelnen Bilder abgeschlossen ist, wird die Anzahl der Bilder und jede Bildnummer mit dem zugehörigen gescannten Bild an das Datenverarbeitungsprogramm Excel (Microsoft) übermittelt.

Die Messung der mit anti-VEGF-Antikörpern durchgeführten Färbungen erfolgt in drei Schritten: Einscannen und Abspeichern der einzelnen Gesichtsfelder eines Präparates (**Abbildung 2.3**), Färbedetektion sowie die abschließende Nachbearbeitung mit Berechnung des Stromaanteils.

Die Hauptfunktion der hier verwendeten Software ist das Erkennen von Farben bzw. Farbunterschieden und der anschließenden Vermessung der auszuwertenden Areale. Der Untersucher entscheidet selbst, welche Strukturen innerhalb des Gesichtsfeldes vom Programm erkannt bzw. markiert werden sollen. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Farberkennung auf dunkelbraun eingestellt. Auf diese Weise werden sämtliche DAB-gefärbten Bereiche, also alle VEGF-exprimierenden Follikelepithelzellen erfasst (**Abbildung 2.4**).

In Anbetracht der von Präparat zu Präparat stark variierenden Schilddrüsen-follikelgröße, ist es sinnvoll, die Follikellumenfläche zu markieren, ihre Fläche zu berechnen und von der Gesamtfläche des Gewebes abzuziehen (**Abbildung 2.5**), woraus der reine Stromaanteil resultiert.

Des Weiteren müssen etwaige Risse, hervorgerufen durch das Anfertigen der Schnitte, von der Ermittlung des Gewebeanteils ausgeschlossen werden.

Die VEGF-Expression wird als prozentualer Anteil der VEGF bildenden Follikel­epithelzellen von der ermittelten Fläche des Schilddrüsenstromas nach **Gleichung 5** berechnet.

Die Bestimmungen werden von einer einzigen Person durchgeführt. Alle Präparate sind nummeriert und mit Krankheitsbild sowie Therapie dokumentiert. Zum Zeitpunkt der Untersuchung ist der ausmessenden Person die Behandlungsgruppenzugehörigkeit der Präparate jedoch nicht bekannt. Die Zuordnung der Ergebnisse zu den jeweiligen Behandlungsgruppen erfolgt erst nach Abschluss der Messungen. Hierbei handelt es sich um das Prinzip der Verblindung.

Gleichung 5: Berechnung der VEGF Expression

$$VEGF[\%] = \frac{VEGF - Fläche[\mu m^2] * 100}{Gesamtstromafläche[\mu m^2]}$$

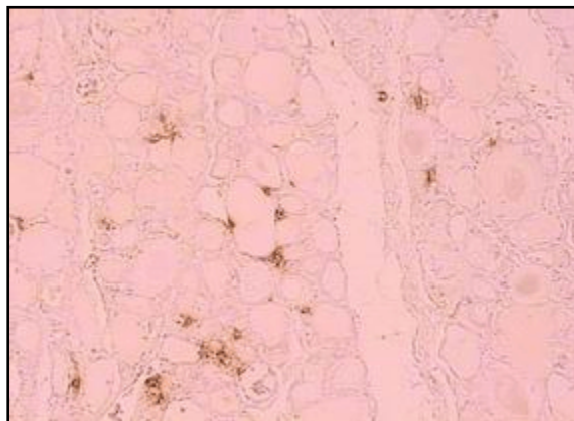


Abbildung 2.3: Struma multinodosa
anti-VEGF-Färbung
Bild einscannen

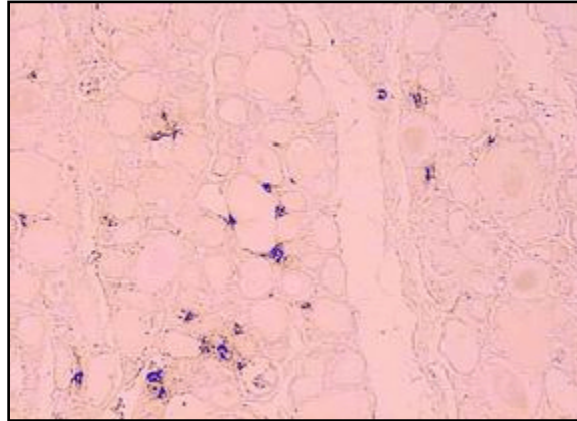


Abbildung 2.4: Struma multinodosa
anti-VEGF-Färbung
Färbedetektion

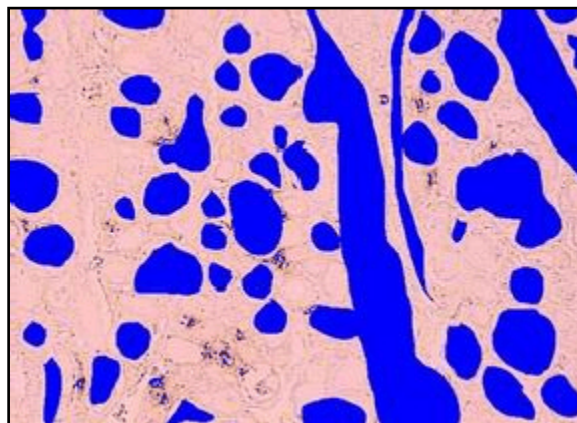


Abbildung 2.5: Struma multinodosa
anti-VEGF-Färbung
**Berechnung des
Stromaanteils**

2.8. Statistische Analyse der Messergebnisse

Die in den einzelnen Messreihen ermittelten Daten für VEGF, VSD und NVES werden mit Hilfe des statistischen Programms SPSS (Version 12.0, Chicago, USA) zunächst deskriptiv analysiert. Der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen erfolgt mit den beiden nichtparametrischen Tests nach Mann-Whitney und Wilcoxon. Das Signifikanz-Niveau wird bei $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Gruppenvergleich der VEGF-Expression

Die einzelnen Gruppen zeigen signifikante Unterschiede im immunhistochemischen Nachweis von VEGF. Während in der Gruppe der mit L-Thyroxin behandelten multinodulären Strumen alle 7 Präparate eine positive VEGF-Färbung aufweisen, lässt sich in der thyreostatisch therapierten Basedow Gruppe lediglich bei 15% (3/20) der Präparate VEGF nachweisen. In der Gruppe der *geplummerten* Basedow Strumen zeigen 62,5% (10/16) der Präparate einen immunhistochemischen Nachweis für VEGF (**Tabelle 3**).

Bei längerer thyreostatischer Behandlungsdauer (>1 Jahr) ergeben sich in beiden Basedow Gruppen niedrigere VEGF-Konzentrationen als bei einer Therapiedauer von unter einem Jahr (**Tabelle 3a**).

Tabelle 3: VEGF-Gruppenvergleich

	THERAPIE	VEGF +	VEGF -	Ø VEGF insg. (in %) [SD]	Ø VEGF pos. Präp. (in %) [SD]
Multinoduläre Strumen	L-Thyroxin n=7	7	0	2,73 [1,19]	2,73 [1,19]
Basedow Strumen	Thyreostatika n=20	3	17	0,43 [0,19]	2,87 [0,88]
Basedow Strumen	Thyreostatika + <i>Plummerung</i> n=16	10	6	1,26 [0,76]	2,02 [0,75]

- Ø VEGF insg. (in %) = prozentualer Mittelwert des VEGF-Gewebeanteils aller Präparate einer Behandlungsgruppe (pro Gewebeblock drei Präparate mit jeweils drei Färbe- und Messdurchgängen).
- Ø VEGF pos. Präp. (in %) = prozentualer Mittelwert des VEGF-Gewebeanteils nur der VEGF-positiv gefärbten Präparate der jeweiligen Behandlungsgruppe (s.o.)
- n = Anzahl untersuchter Strumen in der jeweiligen Behandlungsgruppe.
- [SD] = Standardabweichung

Der Gruppenvergleich hinsichtlich des positiven VEGF-Nachweises erfolgte mit Hilfe der nicht-parametrischen Tests nach Mann-Whitney und Wilcoxon (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Signifikanz der Unterschiede in der Anzahl der VEGF-positiv gefärbten Präparate:

- Multinoduläre Strumen, Thyroxin (7/7) > Basedow Strumen, *Plummerung* (10/16),
[p = 0,001]

- Multinoduläre Strumen, Thyroxin (7/7) > Basedow Strumen, Thyreostatika (3/20), [p = 0,001]
- Basedow Strumen, *Plummerung* (10/16) > Basedow Strumen, Thyreostatika (3/20), [p = 0,002]

Tabelle 3a: VEGF-Gruppenvergleich der Therapiedauer

	THERAPIE	THERAPIE-DAUER	VEGF +	VEGF -	Ø VEGF insg. (in %)	Ø VEGF pos. Präp. (in %)
Multinoduläre Strumen	L-Thyroxin n=7	1 ½ - 2 Jahre	7	0	2,73	2,73
Basedow Strumen	Thyreostatika n=20	> 1 Jahr n=7	1	6	0,37	2,59
		< 1 Jahr n=13	2	11	0,46	2,99
Basedow Strumen	Thyreostatika + <i>Plummerung</i> n=16	> 1 Jahr n=8	4	4	0,82	1,64
		< 1 Jahr n=8	6	2	1,93	2,57

- Ø VEGF insg. (in %) = prozentualer Mittelwert des VEGF-Gewebeanteils aller Präparate einer Behandlungsgruppe (pro Gewebeblock drei Präparate mit jeweils drei Färbe- und Messdurchgängen).

- Ø VEGF pos. Präp. (in %) = prozentualer Mittelwert des VEGF-Gewebeanteils nur der VEGF-positiv gefärbten Präparate der jeweiligen Behandlungsgruppe (s.o.)

- n = Anzahl untersuchter Strumen in der jeweiligen Behandlungsgruppe.

3.2. Gruppenvergleich der Gefäßoberflächendichte

Der Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen ergibt keine signifikanten Unterschiede der VSD. In der Gruppe der *geplummerten* Basedow Strumen werden für die VEGF-positiven Präparate leicht erhöhte VSD-Werte gegenüber den VEGF-negativen Präparaten nachgewiesen. Bei den >1 Jahr thyreostatisch therapierten *geplummerten* Basedow Strumen fallen niedrigere VSD-Werte gegenüber den <1 Jahr therapierten auf. Im Gegensatz hierzu zeigen die rein thyreostatisch behandelten Basedow Strumen höhere Werte der VSD in der >1 Jahr behandelten Gruppe gegenüber den <1 Jahr therapierten Strumen (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: VSD-Gruppenvergleich

	THERAPIE	THERAPIE-DAUER	VSD (1/ μ m) bei VEGF+	VSD (1/ μ m) bei VEGF-	$\bar{\sigma}$ VSD (1/ μ m) [SD]
Multinoduläre Strumen	L-Thyroxin n=7	1 ½ - 2 Jahre	0,27	-	0,27 [0,11]
Basedow Strumen	Thyreostatika n=20	> 1 Jahr n=7	0,50 n=1	0,33 n=6	0,35 [0,13]
		< 1 Jahr n=13	0,21 n=2	0,29 n=11	0,27 [0,09]
Basedow Strumen	Thyreostatika + <i>Plummerung</i> n=16	> 1 Jahr n=8	0,24 n=4	0,20 n=4	0,22 [0,06]
		< 1 Jahr n=8	0,32 n=6	0,24 n=2	0,30 [0,09]

- $\bar{\sigma}$ VSD (1/ μ m) = Mittelwerte der Gefäßoberflächendichte (Vascular surface density) aller Präparate einer Behandlungsgruppe.
- n = Anzahl untersuchter Strumen in der jeweiligen Behandlungsgruppe.
- [SD] = Standardabweichung

3.3. Gruppenvergleich der Gefäßanzahl pro mm² Stroma

Die mit L-Thyroxin behandelten multinodulären Strumen zeigen durchschnittlich leicht erhöhte Werte der NVES gegenüber den beiden anderen Gruppen. Innerhalb der *geplummerten* Gruppe haben die VEGF-positiven Präparate durchschnittlich gegenüber den VEGF-negativen Präparaten leicht erhöhte NVES-Werte. Die NVES-Werte liegen in der *geplummerten* Gruppe bei einer thyreostatischen Therapie von >1 Jahr niedriger als bei einer Behandlungsdauer von <1 Jahr. In der rein thyreostatischen Therapiegruppe fallen keine signifikanten Unterschiede der NVES-Werte hinsichtlich der Behandlungsdauer auf (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: NVES-Gruppenvergleich

	THERAPIE	THERAPIE- DAUER	NVES bei VEGF+	NVES bei VEGF-	Ø NVES [SD]
Multinoduläre Strumen	L-Thyroxin n=7	1 - 2 Jahre	24,04	-	24,04 [6,54]
Basedow Strumen	Thyreostatika n=20	> 1 Jahr n=7	22,32 n=1	22,53 n=6	22,49 [3,76]
		< 1 Jahr n=13	18,82 n=2	21,93 n=11	21,45 [3,98]
Basedow Strumen	Thyreostatika + <i>Plummerung</i> n=16	> 1 Jahr n=8	23,53 n=4	16,77 n=4	20,15 [4,63]
		< 1 Jahr n=8	24,78 n=6	18,88 n=2	23,30 [6,26]

- Ø NVES = Mittelwerte der Anzahl der Gefäße pro mm² Stroma aller Präparate einer Behandlungsgruppe
- n = Anzahl untersuchter Strumen in der jeweiligen Behandlungsgruppe.
- [SD] = Standardabweichung

3.4. Abbildungen der immunhistochemischen Färbungen

Die folgenden Abbildungen (**Abbildungen 4.1-4.8**) zeigen die immunhistochemischen anti-VEGF und anti-CD31-Färbungen in den einzelnen Gruppen (L-Thyroxin, Thyreostatika, Thyreostatika mit *Plummerung*) mit Beispielen des fehlenden VEGF-Nachweises in der Thyreostatikagruppe sowie der zusätzlich geplummerten Behandlungsgruppe.

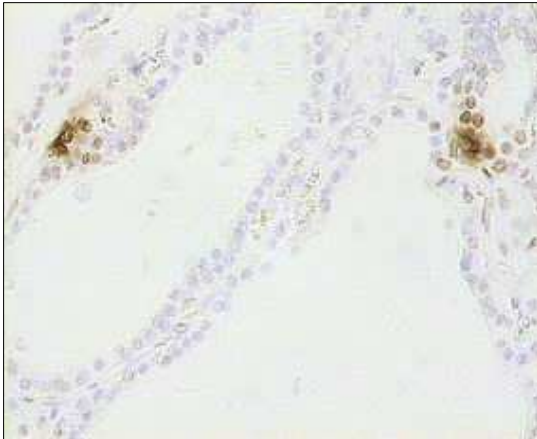


Abbildung 4.1:
Struma multinodosa, L-Thyroxin
Präparat 19, anti-VEGF-Färbung
positiv

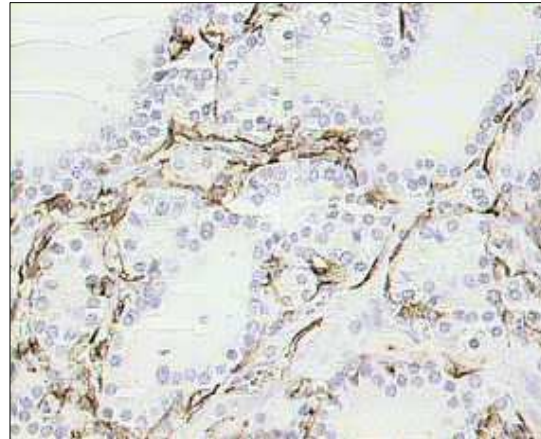


Abbildung 4.2:
Struma multinodosa, L-Thyroxin
Präparat 19, anti-CD31-
Blutgefäßdarstellung

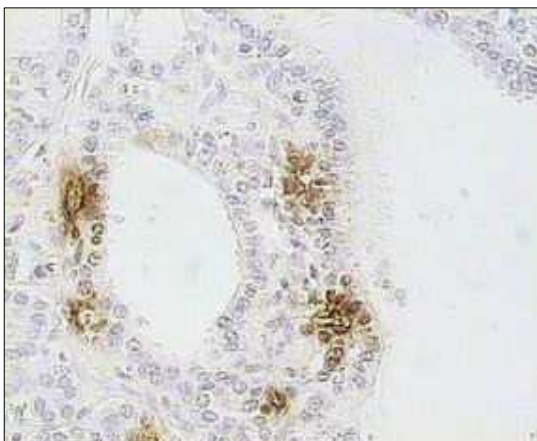


Abbildung 4.3:
Basedow Struma, *Plummerung*
Präparat 5, anti-VEGF-Färbung
positiv

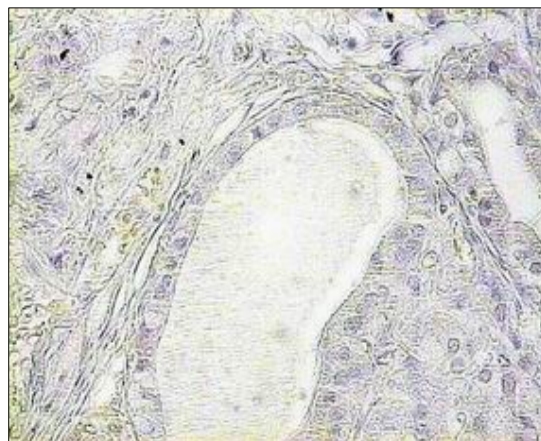


Abbildung 4.4:
Basedow Struma, *Plummerung*
Präparat 12, anti-VEGF-Färbung
negativ

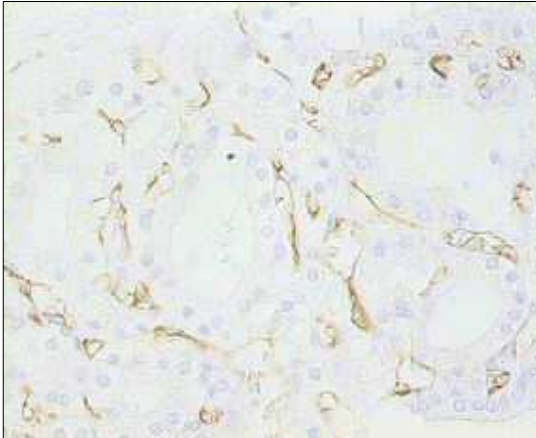


Abbildung 4.5:
Basedow Struma, *Plummerung*
Präparat 14, anti-CD31-
Blutgefäßdarstellung

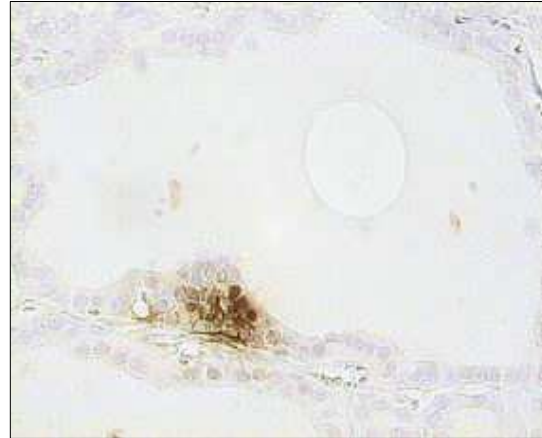


Abbildung 4.6:
Basedow Struma, Thyreostatika
Präparat 26, anti-VEGF-Färbung
positiv

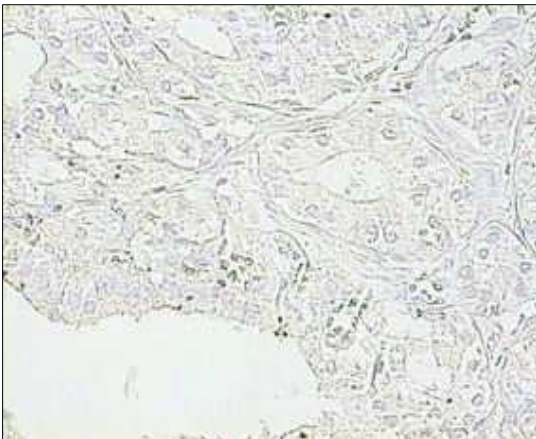


Abbildung 4.7:
Basedow Struma, Thyreostatika,
Präparat 43, anti-VEGF-Färbung
negativ

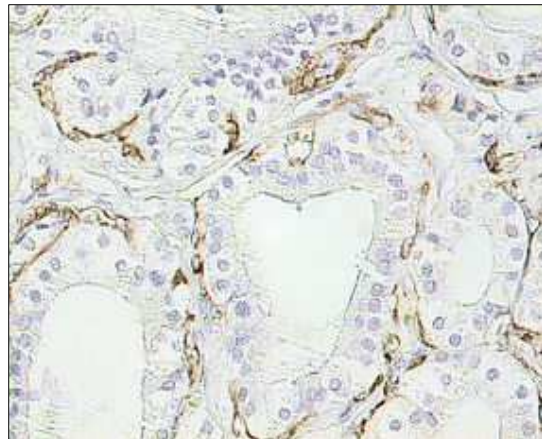


Abbildung 4.8:
Basedow Struma, Thyreostatika
Präparat 27, anti-CD31-
Blutgefäßdarstellung

4. Diskussion

Noch heute ist die chirurgische Hyperthyreosebehandlung des Morbus Basedow aufgrund der weichen, gefäßreichen Strumamorphologie schwierig und zeigt erhöhte Komplikationsraten mit gesteigerter Blutungs- bzw. Nachblutungsgefahr.

Immunhistochemische Untersuchungen an Basedow Strumen zur Beurteilung der Mikrogefäßdichte sowie zum Nachweis von VEGF zeigen kontroverse Ergebnisse. Während Untersuchungen von Nagura *et al.* 2001 eine gesteigerte Mikrovaskularisierung sowie eine erhöhte VEGF-Präsenz innerhalb basedowinischer Strumen ergeben, weisen neuere Studien keine gesteigerte VEGF-Bildung gegenüber anderen Schilddrüsenerkrankungen auf (Jebreel *et al.*, 2007).

Im Folgenden soll zunächst die Technik der VEGF-Darstellung kritisch betrachtet werden, da die korrekte Ermittlung der VEGF-Konzentration die Grundlage für alle hier gezogenen Schlussfolgerungen darstellt.

Das vor Beginn der Untersuchungsreihe erstellte immunhistochemische Färbeprotokoll hat sich sowohl in den Vorläufer-Testreihen als auch in den eigentlichen Färbedurchgängen bewährt und zu einer durchweg guten VEGF-Darstellbarkeit mit geringer Hintergrundreaktivität geführt. Da jedoch einige Präparate der Thyreostatika- und Plummerungsgruppe keine detektierbare VEGF-Anfärbung zeigten, wurde das Protokoll nochmals zur Überprüfung bzw. Bearbeitung herangezogen. Hierbei empfahl es sich ein gewisses Schema bei der Bearbeitung des Färbeprotokolls einzuhalten, um Schritt für Schritt etwaige Fehlermöglichkeiten auszuschließen. Alle Gewebeproben wurden in dem Zeitraum von 1987-2001 im Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Bereits im Vorfeld wurden die Präparate durch Anfertigungen von Hämatoxylin-Eosin Färbungen auf ihre Qualität untersucht und bei Nachweis eines schlechten Zustandes aussortiert (5 von insgesamt 48 Gewebeproben). Durch mikroskopische Kontrollen konnten daher zum Teil Rückschlüsse auf die Gewebequalität vor der Formalinfixierung gezogen werden. Wären vor der Fixierung autolytische

Gewebeprozesse eingetreten, hätte eine fehlende Färbung zu einem falsch-niedrigen Ergebnis geführt.

Eine weitere Möglichkeit, die bei ausbleibender immunhistochemischer Antigendarstellung in Erwägung gezogen werden sollte, ist die Überfixation. Hierbei kann durch lange (>24 Stunden) oder zu starke (10%iges Formalin) Materialfixierung eine gesteigerte Vernetzung der Proteinstrukturen hervorgerufen werden. In diesem Fall könnten einfache Demaskierungsverfahren daran scheitern, die Antigene freizulegen. Bei den hier bearbeiteten Färbereihen wurde das "Antigen Retrieval" durch 36stündige Citratpufferinkubation (pH 6,0) im Wärmeschrank bei 60°C durchgeführt (**Kapitel 2.5.3.**). Hierbei handelt es sich um ein sehr effektives und insbesondere gewebeschonendes Verfahren. Im Nachhinein ist es problematisch zu klären, ob bzw. in wie weit eine Überfixation stattgefunden hat. Um diese Fehlermöglichkeit in Betracht zu ziehen, wurden die Präparate, die keine VEGF-Färbung zeigten, nochmals verschiedenen Demaskierungsverfahren unterzogen. Zur Anwendung kamen u.a. Verlängerungen der Citratpufferinkubationszeiten, Hitzedemaskierungen in der Mikrowelle und im Wasserbad sowie enzymatische Antigendemaskierungsmethoden mit Trypsin (**Kapitel 2.5.3.**). Auch hierunter stellten sich keine detektierbaren Färbereale ein. Es zeigte sich, dass durch diese Verfahren das Schilddrüsengewebe sehr in Mitleidenschaft gezogen wurde und dadurch insgesamt die Qualität des Färberegebnisses verschlechtert wurde.

Neben den unterschiedlichen Demaskierungsdurchläufen war eine weitere Überlegung, die VEGF-negativen Präparate nochmals mit verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers zu inkubieren. Die höheren Antikörperkonzentrationen führten jedoch ebenfalls nicht zu einer spezifischen VEGF-Anfärbung, sondern erhöhten lediglich das Auftreten unspezifischer Hintergrundreaktionen.

Aus den Problemen der dargestellten Schritte des VEGF-Nachweises folgt, dass das in dieser Studie verwendete Färbeprotokoll (**Kapitel 2.6.2.**) hinsichtlich Spezifität und Hintergrundreaktion das eindeutig beste Färberegebnis liefert. Daher gehen wir davon aus, dass bei den Präparaten mit fehlender VEGF-Färbung tatsächlich weniger VEGF vorhanden war. Dies lässt den Schluss zu, dass die Basedow Strumen der Thyreostatikagruppe mit nur 15% (3/20) VEGF-Nachweis kein bzw. deutlich weniger VEGF exprimiert haben, als

die Basedow Strumen der zusätzlich geplummerten Gruppe mit 62,5% (10/16). Beide dieser thyreostatisch behandelten Gruppen zeigten wiederum niedrigere VEGF-Expressionen als die Gruppe der nicht-thyreostatisch behandelten multinodulären Strumen mit 100% (7/7) VEGF-Expression.

Nach der Diskussion der Methoden unserer Studie, werden nun Ergebnisse verwandter Studien den unseren gegenübergestellt.

Ein Zusammenhang zwischen Thyreostatikatherapie und einer verminderten VEGF-Expression wurde bereits von Itaka *et al.* 1998 beschrieben. Hierbei wurde der VEGF-Serum-Spiegel sowie der intrathyreoidale Blutfluss (Farbkodierte Doppler Sonographie, FKDS) bei Morbus Basedow Patienten vor und nach thyreostatischer Behandlung gemessen und mit den Ergebnissen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die Messwerte für VEGF fielen unter Therapie, mit dem Erreichen einer euthyreoten Stoffwechsellage, deutlich ab. Sie lagen danach immer noch über den Messwerten der Kontrollgruppe. Der Nachweis der VEGF-Reduktion unter Thyreostatikatherapie stützt unsere Ergebnisse. Itaka *et al.* haben eine serologische Bestimmung des VEGF vorgenommen. Bekanntermaßen wird dieser Gefäßwachstumsfaktor (VEGF) in den verschiedensten Organen wie Lunge, Uterus, Nieren, Ovarien, Gehirn, Herz, Haut und Hypophyse gebildet (Ferrara *et al.*, 1992). Dem zu Folge gibt eine Serumbestimmung keinen genauen Aufschluss über das Herkunftsorgan des VEGF. In unserer Studie wurde die Schilddrüse als Herkunftsorgan des VEGF direkt untersucht und damit die VEGF Produktion der Schilddrüse organspezifischer nachgewiesen.

Alle sieben Präparate der mit L-Thyroxin behandelten multinodulären Strumen, unserer Kontrollgruppe, zeigten ein detektierbares Färbeergebnis für VEGF und wiesen darüber hinaus, verglichen mit den VEGF-positiven Präparaten der Vergleichsgruppen, die durchschnittlich höchsten VEGF Gewebekonzentrationen auf (**Tabelle 3**). Die gegenübergestellten basedowinischen Strumen, die zum einen rein thyreostatisch und zum anderen thyreostatisch mit anschließender präoperativer *Plummerung* mit Lugol'scher Lösung behandelt wurden, wiesen durchschnittlich deutlich niedrigere Werte für VEGF auf (**Tabelle 3**), so dass der Schluss nahe liegt, eine thyreostatische Therapie führe

zu einer deutlichen Reduktion der VEGF-Bildung. Die multinodulären Strumen wurden im selben Zeitraum (1987-2001) reseziert und in Paraffin eingebettet, so dass wir von einer vergleichbaren Gewebequalität und demnach auch von einer erhaltenen, vergleichbaren Antigenqualität ausgehen. Neuere Studien stützen diese Ergebnisse. Jembreel *et al.* (2007) führten immunhistochemische Untersuchungen an verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen hinsichtlich der VEGF-Gewebeexpression sowie der Mikrogefäßdichte durch. So zeigten u.a. multinoduläre Strumen eine höhere VEGF-Expression gegenüber Autoimmunerkrankungen wie dem Morbus Basedow und der Hashimoto Thyreoiditis. Leider werden in dieser Studie keine Angaben bezüglich einer vorangegangenen medikamentösen Therapie gemacht. Es ist jedoch anzunehmen, dass die an Morbus Basedow erkrankten Patienten präoperativ mit thyreostatischen Medikamenten behandelt wurden. Möglicherweise erklärt dies den verminderten VEGF-Nachweis, wie bei unseren Untersuchungen vermutet. Davon ausgehend, dass Jembreels *et al.* Patienten, ebenso wie unsere thyreostatisch behandelt wurden und damit die VEGF-Werte beeinflusst wurden, stehen seine Ergebnisse nicht unbedingt im Widerspruch zu Unseren.

Die von Nagura *et al.* 2001 durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten in allen Basedow Strumen eine VEGF-Färbung. Die Patienten waren im Vorfeld ebenfalls mit antithyroidalen Medikamenten behandelt worden, so dass zum Operationszeitpunkt euthyreote sowie zum Teil hypothyreote Stoffwechselsituationen bestanden. Die Resultate widersprechen den Unseren und denen von Jembreel *et al.* Es geht aus der Studie nicht klar hervor, welche Schilddrüsengewebeproben als Kontrollgruppe untersucht wurden und ob es sich dabei um endemischen Strumen oder Thyreoiditiden handelte. Es werden auch keine Angaben über mögliche Vorbehandlungen der Kontrollgruppen-Patienten gemacht. Ihre Ergebnisse einer gesteigerten Mikrogefäßdichte der Basedow Strumen im Vergleich zum angegebenen Schilddrüsennormalgewebe lassen daher einen direkten Vergleich zu unseren Ergebnissen nur bedingt zu.

Suzuki *et al.* beschrieben 1999 einen möglichen Zusammenhang zwischen der Höhe des follikulären Thyreoglobulins und der VEGF-Expression. Sie äußerten

den Verdacht, Thyreoglobulin unterdrücke die VEGF-Bildung der Follikel-epithelzellen, da die niedrigsten Expressionswerte bei hohem Thyreoglobulingehalt ermittelt wurden. Histologische Zeichen einer basedowinischen Struma sind u.a. hyperplastische Follikel mit sehr geringem Gehalt an Kolloid und darin enthaltenem Thyreoglobulin als Zeichen einer hohen Schilddrüsenaktivität. Hohe VEGF-Werte, wie sie bei Morbus Basedow bereits beschrieben wurden (Itaka *et al.*, 1998), können so neben der Stimulation durch TRAK (s.u.) auch auf eine fehlende bzw. verminderte suppressive Wirkung des Thyreoglobulins zurückzuführen sein.

Itaka *et al.* 1998 fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass unter thyreostatischer Therapie die TRAK-Konzentration in der Basedow-behandlungsgruppe deutlich abfiel. Sie vermuteten, dass die Autoantikörper einen positiven Einfluss auf die VEGF-Expression ausüben, die Thyreostatika also indirekt durch TRAK-Reduktion die VEGF-Expression mindern. Der reduzierte Thyreoglobulingehalt bei thyreostatisch behandelten Basedow Strumen scheint die VEGF-Expression nicht zu steigern. Die Aufhebung der VEGF-Inhibition durch vermindertes Thyreoglobulin reicht, verglichen mit der stärkeren Unterdrückung durch Thyreostatika, nicht aus, um die VEGF-Expression relevant zu steigern.

Die Stoffwechsellage bei Morbus Basedow sollte insbesondere vor OP euthyreot sein. In unserer Studie wurden alle Patienten, welche zum Operationszeitpunkt hyperthyreot waren, einer *Plummerung* unterzogen. In der rein thyreostatisch behandelten Gruppe waren alle Patienten zum Operationstermin euthyreot. Unsere Messergebnisse zeigen, dass die Gruppe der zum OP-Zeitpunkt hyperthyreoten Patienten höhere VEGF-Konzentrationen aufwies als die der Euthyreoten. Es liegt nahe eine Wirkung der Stoffwechsellage auf die VEGF-Expression anzunehmen.

In wie weit das längerfristige Erhalten einer euthyreoten Stoffwechsellage für die Reduktion der VEGF-Expression notwendig ist, konnte nicht geklärt werden. Patientenaktenanalysen konnten keine genaueren Aufschlüsse über die Patienten Compliance bzw. über den exakten Therapie- und Behandlungserfolg hinsichtlich einer längerfristigen euthyreoten Einstellung liefern.

Itaka *et al.* fanden darüber hinaus eine Korrelation zwischen Höhe des VEGF-Spiegels und der farbkodiert-dopplersonographisch gemessenen Schilddrüsen-durchblutung. Bei sinkendem VEGF-Wert unter thyreostatischer Therapie konnte ebenfalls eine Reduktion der Organdurchblutung festgestellt werden. Zwar lassen unsere Untersuchungen keine Verlaufsbeurteilung der VEGF-Gewebeexpression bzw. der Schilddrüsenvaskularisierung zu, jedoch können wir Vergleiche zwischen länger (>1Jahr) und kürzerer (<1Jahr) thyreostatischer Therapie bei Morbus Basedow ziehen. In der Gruppe der geplummerten Basedow Strumen zeigte sich eine Reduktion der Gefäßoberflächendichte (VSD) bei thyreostatischer Behandlungsdauer von über einem Jahr im Vergleich zur Behandlungsdauer von unter einem Jahr. Ebenso verhielten sich die Werte der NVES, jedoch ohne Signifikanz (**Tabelle 4, VSD und Tabelle 5, NVES**). Zwischen multinodulären und Basedow Strumen ergab sich kein Unterschied. Die gemessenen Werte für die NVES wiesen für einen Großteil der Präparate deutliche Schwankungen auf, so dass eine Beurteilung dieser Werte bei insgesamt hohen Standardabweichungen schwierig erscheint.

Jede Strumaentstehung geht mit der Bildung neuer Blutgefäße einher (Wollman *et al.*, 1978), wie auch bei den hier untersuchten multinodulären Strumen. Im Vergleich hierzu sind Basedow Strumen noch stärker vaskularisiert (Jebreel *et al.*, 2007; Tseleni-Balafouta *et al.*, 2006). Die fehlenden Unterschiede des Vaskularisierungsgrades im Vergleich der basedowinischen Strumen zur Kontrollgruppe könnten auf die thyreostatische Therapie zurückzuführen sein. Es ist eine Reduktion der Mikrogefäßdichte auf das Niveau der untersuchten Kontrollgruppe denkbar. So könnte es durch Abnahme der VEGF-Expression zu einer Unterdrückung der Angiogenese gekommen sein, was die Werte der Gefäßparameter erklären würde. Ohne thyreostatische Behandlung würde man nach dieser These einen deutlich höheren Vaskularisierungsgrad der Basedow Strumen erwarten, aus ethischen Gründen gibt es eine solche unbehandelte Vergleichsgruppe jedoch nicht. Ob es hier unter Therapie zu einer Verminderung der Mikrogefäßdichte gekommen ist, lässt sich anhand der erhobenen Daten daher nicht sicher beweisen.

Die genauen molekularbiologischen Mechanismen, die der VEGF-Suppression unter Thyreostatikatherapie zu Grunde liegen sind unklar. Thyreostatika führen

zu einem Absinken der Serum-Spiegel für fT3 und fT4. Durch positive Rückkopplung über das Hypothalamus-Hypophysen-System bei niedrigen Schilddrüsenhormonspiegeln kommt es zu einer gesteigerten TSH-Ausschüttung. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon) die Thyreozyten zur VEGF-Synthese anregt (Sato *et al.*, 1995; Viglietto *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 2004) und dadurch die Strumaentstehung fördert. Darüber hinaus üben weitere Substanzen, wie Insulin oder die TSH-Rezeptorautoantikörper (TRAK), ähnliche Effekte auf Schilddrüsenfollikelzellen aus. Insbesondere die TRAK werden für die gesteigerte VEGF-Expression in Basedow Strumen verantwortlich gemacht. Wie oben bereits beschrieben sinken die TRAK unter Thyreostatikagabe und damit die VEGF-Konzentration (Itaka *et al.*, 1998). Wir nehmen an, dass bei verminderter VEGF-Konzentration die Vaskularisation erniedrigt und damit das Strumawachstum reduziert ist. Dies würde den fehlenden Unterschied in der Vaskularisation zwischen unserer Behandlungsgruppe der multinodulären Strumen und der Gruppe der Basedow Strumen erklären.

Die freien Schilddrüsenhormone T3 und T4 scheinen ebenfalls einen direkten Einfluss auf die VEGF-Bildung auszuüben. Jiang *et al.* 2008 konnten im Tierversuch eine gesteigerte VEGF-Bildung in Ratten-Ovarien nach L-Thyroxin-gabe nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Anjos-Ramos *et al.* (2005) an Ratten-Herzen nach T4-Gabe. Eine Zunahme der Mikrogefäßdichte konnte nicht nachgewiesen werden, wurde allerdings zu einem späteren in dieser Studie nicht untersuchten Zeitpunkt erwartet. In unserer Studie wurden die höchsten VEGF-Konzentrationen bei den mit L-Thyroxin (T4) behandelten multinodulären Strumen gefunden. Dies lässt vermuten, dass T4 neben Organen wie Herz und Ovar auch eine positive Wirkung auf die VEGF-Bildung der Schilddrüse selbst ausübt. Basedow Strumen produzieren vermehrt T4, was eine VEGF-Steigerung erwarten ließe. Jedoch wurde die T4-Produktion in unserer Studie durch Thyreostatikatherapie unterdrückt, um eine Hyperthyreose zu vermeiden. Wir erklären daher die höheren VEGF-Werte bei den multinodulären Strumen durch die stärkere T4-Präsenz bei Substitution im Gegensatz zur T4-Unterdrückung durch Thyreostatikagabe bei Basedow Strumen.

Seit der ersten durchgeführten *Plummerung* 1923 sind die Mechanismen, die zu einer deutlichen Reduktion der Schilddrüsendurchblutung und dadurch zu einer Verringerung der intraoperativen Blutungskomplikationen führen, noch immer ungeklärt. Der Großteil der Arbeiten, die sich mit diesem Thema beschäftigten, beruhten auf dopplersonographischen Untersuchungen der Schilddrüsenarterien (Art. thyreoidea sup.). Diese zeigten durchweg eine signifikante Reduktion der Schilddrüsendurchblutung bei Morbus Basedow unter mehrtägiger Substitution mit Lugol'scher Lösung (Rangaswamy *et al.*, 1989; Rodier JF *et al.*, 1998). Klinisch imponiert die Hyperperfusion der Basedow Struma gehäuft als so genanntes auskultatorisches "Schwirren", was durch die *Plummerung* deutlich verringert wird. In unserer Studie vergleichen wir den Vaskularisierungsgrad der *geplummerten* mit der lediglich thyreostatisch therapierten Basedowgruppe. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (**Tabelle 4, VSD und Tabelle 5, NVES**). Unsere Untersuchungen zeigen mikroskopisch weder Veränderungen der intrathyreoidalen Gefäßarchitektur noch eine Reduktion der Mikrogefäßdichte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Möglicherweise übt Kaliumjodid seine Wirkung über eine Blutdrosselung bzw. Blutumverteilung zu Ungunsten der Schilddrüse aus. Eine Überlegung wäre, dass Jod lokale, auf die Schilddrüse bezogene vasoconstringierende Eigenschaften besitzt. Unserer morphometrischen Messung der anti-CD31-Gefäßdarstellung entzieht sich jedoch eine solche Beurteilung, da sie eine Vasokonstriktion nicht darstellen kann.

Neben VEGF spielen weitere angiogene aber auch angiogeneseinhibierende Faktoren bei der Gefäßneubildung in der Schilddrüse eine Rolle (**Kapitel 1.7.3 und 1.7.4**). Folglich ist die Bildung bzw. Unterdrückung der Angiogenese nicht alleine auf einen Parameter zurückzuführen, sondern vielmehr das Ergebnis komplexer Zusammenspiele verschiedener Faktoren (Ramsden, 2000). Beobachtungen von Sato *et al.* (2001) wiesen eine VEGF-A-Reduktion nach Gabe hoher Jod-Dosen in vitro nach, auch wenn dieser Effekt nur kurzzeitig darstellbar war. Sato *et al.* gehen davon aus, dass die *Plummerung* zu einer Unterdrückung angiogenese-stimulierender und/oder zu einer Aktivierung angiogenese-inhibierender Faktoren führt, wobei VEGF in diesem Zusammenhang nicht der wichtigste Faktor zu sein scheint. In unserer Studie

zeigte die *Plummerungsgruppe* jedoch mehr VEGF als die reine Thyreostatikagruppe. Der Widerspruch dieser Ergebnisse könnte auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. So führten Sato *et al.* ihre Untersuchungen vollständig *in vitro* durch, während unsere Grundlagen Gewebeproben *in vivo* behandelter Patienten waren. Die Einflussnahme des Jods auf die einzelnen Angiogenesefaktoren und -inhibitoren bzw. die Schilddrüsendurchblutung ist nach wie vor unklar und Bedarf weiterer Untersuchungen.

Proangiogene Faktoren wie VEGF scheinen ebenfalls bei den verschiedenen Schilddrüsenkarzinomformen in Bezug auf Tumorwachstum und Angiogenese eine entscheidende Rolle zu spielen (Hoffmann *et al.*, 2006). So konnten u.a. Soh *et al.* 1997 in den häufigsten Schilddrüsenkarzinomen (papilläres, follikuläres und medulläres Schilddrüsenkarzinom sowie Hürthel-Zell-Tumor) eine gesteigerte Präsenz von VEGF nachweisen. Die von ihnen durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an Schilddrüsentumoren zeigten im Vergleich zu Basedow Strumen und normalem Schilddrüsengewebe durchweg stärkere Färbungen für VEGF. Die Erkenntnis der VEGF-Steigerung bei diesen Karzinomen führte zur Erforschung neuer Behandlungsstrategien. Es liegen mehrere Studien vor, die über VEGF-Antikörper bzw. VEGF-Tyrosinkinase-Rezeptor-Blocker versuchen Angiogenese und Tumorzellwachstum zu unterdrücken. So konnten Hoffmann *et al.* 2006 über einen Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) *in vitro* eine Reduktion der Tumorzellproliferation in undifferenzierten Schilddrüsentumorzelllinien nachweisen. Eine weitere Studie zu Tyrosinkinase-Inhibitoren zeigte *in vivo* sowohl eine deutliche Reduktion des Tumorumfanges von über 40% als auch der Neoangiogenese bei wenig differenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinomen (Schoenberger *et al.*, 2004).

Eine Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren wurde bislang bei Morbus Basedow noch nicht untersucht. Möglicherweise ergibt sich hieraus in Zukunft eine Möglichkeit zur Reduktion des Strumavolumens analog zur Reduktion des oben beschriebenen Tumorumfanges.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Fazit. Bei hoher Sensitivität und Spezifität der VEGF-Darstellung sind unsere Messergebnisse valide. Sie lassen zusammen mit zitierten Studien Schlussfolgerungen über die Regulation von

VEGF und Vaskularisation in Basedow Strumen zu. Eine längerfristige Behandlung mit Thyreostatika führt zu einer Verminderung der Schilddrüsenmikrogefäßdichte, während VEGF steigernd auf die Vaskularisierung wirkt. VEGF als wichtiger Gefäßwachstumsfaktor unterliegt seinerseits einer multifaktoriellen Regulation. TSH, T4 und TRAK scheinen einen steigernden Einfluss auf die VEGF-Expression auszuüben. Thyreostatika und Thyreoglobulin hingegen schreiben wir einen hemmenden Effekt auf die VEGF-Bildung zu.

Es ist zu erwarten, dass Basedow Strumen aufgrund der TRAK und der hohen T4-Konzentrationen viel VEGF exprimieren und hierdurch stimuliert eine stärkere Mikrogefäßdichte aufweisen. Die in unserer Studie untersuchten Basedow Strumen wurden im Vorfeld thyreostatisch behandelt, wodurch TRAK und T4-Konzentrationen abnahmen, VEGF folglich durch diese nicht gesteigert und zusätzlich durch Thyreostatika direkt supprimiert wurde. Dies sind mögliche Gründe für die fehlenden Unterschiede im Vaskularisierungsgrad zwischen den Basedow Strumen und den multinodulären Strumen.

5. Zusammenfassung

Die Behandlung von Morbus Basedow Patienten mit hohen Joddosen vor Strumektomie, die so genannte *Plummerung*, führt zu einer deutlichen Reduktion der Blutungskomplikationen. In dieser Studie soll untersucht werden, ob dieser Effekt der *Plummerung* auf eine Reduktion der Mikrogefäßdichte zurückzuführen ist.

Hierzu bestimmten wir nach immunhistochemischer Färbung die Anzahl der Gefäßanschnitte pro Gesichtsfeld und den wichtigsten angiogenese-stimulierenden Wachstumsfaktor VEGF in Gewebeschnitten. Verglichen wurden thyreostatisch vorbehandelte Basedow Strumen mit und ohne *Plummerung*, multinoduläre Strumen dienten als Kontrollgruppe.

Die Bestimmung der Mikrogefäßdichte zeigte in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. VEGF wurde in allen Präparaten der Kontrollgruppe nachgewiesen, seltener in der Plummerungsgruppe und kaum bei den rein thyreostatisch behandelten Basedow Strumen. Bei längerer thyreostatischer Behandlung zeigten sich in der Plummerungsgruppe niedrigere VEGF-Werte als bei kürzerer Behandlung.

Ausgehend davon, dass unbehandelte Basedow Strumen stärker vaskularisiert sind als multinoduläre Strumen ist der hier dargestellte fehlende Vaskularisationsunterschied bereits als Reduktion der Mikrogefäßdichte unserer Basedow Strumen unter thyreostatischer Therapie zu deuten. VEGF ist unter Thyreostatikagabe deutlich reduziert. Hieraus schließen wir, dass die Thyreostatika über eine Hemmung der VEGF-Bildung den Vaskularisationsgrad erniedrigen. Um die *Plummerung* ohne diesen Effekt der Thyreostatika bewerten zu können, wäre es sinnvoll nicht thyreostatisch behandelte Basedow Gruppen mit und ohne *Plummerung* zu untersuchen.

Eine Verminderung der Gefäßdichte unter Plummerung konnten wir nicht nachweisen. Die Plummerung übt ihre blutungsreduzierende Wirkung folglich über andere Mechanismen aus.

6. Literaturverzeichnis

Acharya SH, Avenell A, Philip S, Burr J, Bevan JS, Abraham P: Radioiodine therapy (RAI) for Graves`disease (GD) and the effect on ophthalmopathy: a systematic review. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:943-50.

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier (Urban & Fischer). 9. Auflage. 2005.

Anjos-Ramos L, Carneiro-Ramos MS, Diniz GP, Martins-Silva J, Barreto-Chaves ML: Early cardiac hypertrophy induced by thyroxine is accompanied by an increase in VEGF-A expression but not by an increase in capillary density. *Virchows Arch* 2006;448:472-79.

Barth PJ, Weingärtner K, Köhler HH, Bittinger A: Assessment of the Vascularization in Prostatic Carcinoma: A Morphometric Investigation. *Human Pathology* 1996;27:1306-10.

Becks GP, Logan A, Phillips ID, Wang JF, Smith C, DeSousa D, Hill DJ: Increase of basic fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor RNA during rat thyroid hyperplasia: temporal changes and cellular distribution. *Journal of Endocrinology* 1994;142:325-38.

Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie. Elsevier (Urban & Fischer), München. 15. Auflage. 1994.

Boenisch T: Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden. Dako. 1996.

Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Butó S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I: Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol.* 1999;155:1967-76.

Burgis E. Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pharmakologie. Urban & Fischer. 2. Auflage. 2001.

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban & Schwarzenberg. 1. Auflage. 1995.

Carmeliet P, Collen D: Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol.* 1997;273:2091-104.

Chang DC, Wheeler MH, Woodcock JP, Curley I, Lazarus JR, Fung H, John R, Hall R, McGregor AM: The effect of preoperative Lugol's iodine in thyroid blood flow in patients with Graves`hyperthyroidism. *Surgery* 1987;102:1055-61.

Denef JF, Ovaert C, Many MC: Experimental goitrogenesis. *Ann Endocrinol (Paris)* 1989;50:1-15.

Dralle H, Schober O, Hesch RD: Operatives Therapiekonzept der Immunthyreopathie. *Langenbecks Arch Chir.* 1987;371:217-32.

Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C: Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev.* 1992;72:667-97.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family proteins. *Endocr Rev.* 1992;13:18-32.

Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285:1182-86.

Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1:27-31.

Goodman AL, Rone JD: Thyroid angiogenesis: endotheliotropic chemoattractant activity from rat thyroid cells in culture. *Endocrinology* 1987;121:2131-40.

Hertz S, Robert A: Application of radioactive iodine in the therapy of Graves' disease. *J Clin Invest.* 1942;21:64.

Hill DJ, Phillips ID, Wang JF, Becks GP: Basic fibroblast growth factor (basic FGF) in isolated ovine thyroid follicles: thyrotropin stimulation and effects of basic FGF on DNA synthesis, iodine uptake and organification and the release of insulin-like growth factor (IGFs) and IGF binding proteins. *Thyroid* 1994 Spring;4:77-85.

Hofbauer LC, Hörmann R, Heufelder AE. Morbus Basedow: Neuester Stand zur Pathogenese, Diagnostik und Therapie. *Dtsch. Ärzteblatt* 1996;93:1900-6

Hoffmann S, Hofbauer LC, Scharrenbach V, Wunderlich A, Hassan I, Lingelbach S, Zielke A: Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factors in thyroid cancer cells <in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:6139-45.

Hoffmann S, Gläser S, Wunderlich A, Lingelbach S, Dietrich C, Burchert A, Müller H, Rothmund M, Zielke A: Targeting the EGF/VEGF-R system by tyrosine-kinase inhibitors-novelantiproliferativ/anti-angiogenic strategy in thyroid cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2006;391:589-96.

Horn F, Lindenmeier G, Moc I: *Biochemie des Menschen.* Thieme Verlag. 2. Auflage. 2003.

Hussain M, Hisham AN. Total thyroidectomy: the procedure of choice for toxic goitre. *Asian J Surg.* 2008;31:59-62.

Iitaka M, Miura S, Yamanaka K, Kawasaki S, Kitahama S, Kawakami Y, Kakinuma S, Oosuga I, Wada S, Katayama S: Increased serum vascular endothelial growth factor levels and intrathyroidal vascular area in patients with Graves disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3908-12.

Jebreel A, England J, Bedford K, Murphy J, Karsai L, Atkin S: Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid disorders. *Int J Exp Pathol.* 2007;88:271-7.

Jiang JY, Miyabayashi K, Nottola SA, Umezu M, Cecconi S, Sato E, Macchiarelli G: Thyroxine treatment stimulated ovarian follicular angiogenesis in immature hypothyroid rats. *Histol Histopathol.* 2008;23:1387-89.

Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie.* Springer Verlag. 4. Auflage. 1996.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309-12.

Koch M, Dettori D, Van Nuffelen A, Souffreau J, Marconcini L, Wallays G, Moons L, Bruyère F, Oliviero S, Noel A, Foidart JM, Carmeliet P, Dewerchin M: VEGF-D deficiency in mice does not affect embryonic or postnatal lymphangiogenesis but reduces lymphatic metastasis. *J Pathol.* 2009;219:356-64.

Krassas GE, Tziomalos K, Pontikides N, Lewy H, Laron Z: Seasonality of month of birth of patients with Graves' and Hashimoto's diseases differ from that in the general population. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:631-6.

Kucharz EJ, Kotulska A, Kopeć M, Stawiarska-Pieta B, Pieczyrak R: Serum level of the circulating inhibitor endostatin in patients with hyperthyroidism or hypothyroidism. *Wien Klin Wochenschr.* 2003;115:179-81.

Laesen PR, Ingbar SH: The Thyroid gland, in Wilson JD, Foster DW (eds): Williams`Textbook of Endocrinology (ed8). Philadelphia, PA, Saunders. 1992;418-37.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular epithelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989;246:1306-9.

Löffler G, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag. 6. Auflage. 1997.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG: Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:9267-71.

Mak WW, Eggo MC, Burrow GN: Thyrotropin regulation of plasminogen actiator activity in primary cultures of ovine thyroid cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984;123:633-40.

Meng W: Carl Adolph von Basedow -on the 200th anniversary of his birth. Z Ärztl Fortbild Qualitätssich. 1999;93:5-10.

Moser E: Radiojodtherapie – Gibt es einen therapeutischen Standard? Zentralbl. Chir. 1997;122:227-30.

Nagura S, Katoh R, Miyagi E, Shibuya M, Kawaoi A: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptor-1 (flt-1) in Graves Disease possibly correlated with increased Vascular Density. Hum Pathol. 2001;32:10-7.

Nawroth PP, Ziegler R: Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. Springer Verlag. 2001.

Noll S, Schaub-Kühnen S: Praxis der Immunhistochemie. Urban & Fischer. 1. Auflage. 2000.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79:315-28.

Patel VA, Hill DJ, Eggo MC, Sheppard MC, Becks GP, Logan A: Changes in the immunohistochemical localisation of fibroblast growth factor-2, transforming growth factor- β 1 and thrombospondin-1 are associated with early angiogenic events in the hyperplastic rat thyroid. *J Endocrinol.* 1996;148:485-99.

Perros P, Kendall-Taylor P: Natural History of Thyroid Eye Disease. *Thyroid* 1998;8:423-5.

Plummer HS: Results of administering iodine to patients having exophthalmic goiter. *JAMA* 1923;80:1955.

Plummer HS, Boothby MB: The value of iodine in exophthalmic goiter. In *Collected papers of the Mayo Clinic and the Mayo Foundation* 1923: 565-76.

Puls T: The changing aspect of thyroid surgery: A review of 130 consecutive cases. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1993;47:351-4.

Ramsden JD: Commentary: Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol.* 2000;166:475-80.

Rangaswamy M, Padhy AK, Gopinath PG, Shukla NK, Gupta K, Kapoor MM: Effect of Lugol's iodine on the vascularity of the thyroid gland in hyperthyroidism. *Nucl Med Commun.* 1989;10:679-84.

Renz-Polster H, Krautzig S: Basislehrbuch Innere Medizin. Elsevier (Urban & Fischer). 3. Auflage. 2006.

Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.

Rodier JF, Janser JC, Petit H, Schneegans O, Ott G, Kaissling A, Grob JC, Velten M: Effect of preoperative administration of Lugol's Solution on thyroid blood flow in hyperthyroidism. *Ann Chir.* 1998;52:229-33.

Röher HD: Morbus Basedow: Chirurgische Behandlung. *Langenbecks Arch. Chir.* 1978;347:137-44.

Röher HD, Wahl RA: *Chirurgische Endokrinologie.* Georg Thieme Verlag 1983.

Sato K, Yamazaki K, Shizume K, Kanaji Y, Obara T, Ohsumi K, Demura H, Yamaguchi S, Shibuya M: Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Graves' Immunglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA in the rat thyroid in vivo. *J Clin Invest.* 1995;96:1295-302.

Sato K: Vascular Endothelial Growth Factors and Thyroid Disorders. *Endocr J.* 2001;48:635-46.

Schoenberger J, Grimm D, Kossmehl P, Infanger M, Kurth E, Eilles C: Effects of PTK787/ ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor, on the growth of a poorly differentiated thyroid carcinoma: an animal study. *Endocrinology* 2004;145:1031-8.

Schumm-Draeger PM: Hyperthyreose Typ Basedow – Gibt es einen therapeutischen Standard? Konservative Therapie. *Zentralbl. Chir.* 1997;122: 224-26.

Schumpelick V, Bleese NM, Mommsen U: *Chirurgie.* Enke im Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 5. überarbeitete Auflage. 2000.

Selwyn T: Sir Thomas Peel Dunhill (1876-1957). *World J. Surg.* 1997;660-62.

Sim BK, O'Reilly MS, Liang H, Fortier AH, He W, Madsen JW, Lapcevic R, Nacy CA: Recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res.* 1997;57:1329-34.

Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V: *Praxis der Viszeralchirurgie und Endokrinen Chirurgie*, Springer Verlag. 2. Auflage. 2007.

Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, Garcia YK, Min YD, Grossman RF, Siperstein AE, Clark OH: Vascular endothelial growth factor is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3741-7.

Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY: Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 1996;120:944-7.

Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ullianich L, Kohn LD: Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodine symporter gene. *Endocrinology* 1999;140:5422-30.

Tseleni-Balafouta S, Kavantzias N, Balafoutas D, Patsouris E: Comparative Study of Angiogenesis in Thyroid Glands with Graves Disease and Hashimoto's Thyroiditis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14:203-7.

Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G: Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and down-regulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995;11:1569-79.

Viglietto G, Romano A, Manzo G, Chiappetta G, Paoletti I, Califano D, Galati MG, Mauriello V, Bruni P, Lago CT, Fusco A, Persico MG: Upregulation of the angiogenic factors PIGF, VEGF and their receptors (flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization. *Oncogene* 1997;15:2687-98.

Wang JF, Milosveski V, Schramek C, Fong GH, Becks GP, Hill DJ: Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *J Endocrinol.* 1998;157:5-12.

Wollman SH, Herveg JP, Zeligs JD, Ericson LE: Blood capillary enlargement during the development of thyroid hyperplasia in the rat. *Endocrinology* 1978;103:2306-14.

Yamada E, Yamazaki K, Takano K, Obara T, Sato K: Iodide inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression in Cultured Human Thyroid Follicles: A Microarray Search for Effects of Thyrotropin and Iodide on Angiogenesis Factors. *Thyroid* 2006;16:545-54.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.

Ye C, Feng C, Wang S, Liu X, Lin Y, Li M: Antiangiogenic and antitumor effects of endostatin on follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology* 2002;143:3522-8.

7. Anhang

7.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Hochschuldozenten:

In Marburg: Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Behr, Bertalanffy, Bien, Cetin, Christiansen, Daut, Eilers, Feusser, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Görg, Gotzen, Griss, Grzeschik, Happle, Hasilik, Hassan, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Herzum, Hesse, Hoeffken, Hoffmann, Hofmann, Joseph, Jungclas, Kaiser, Kann, Kern, Klenk, Klose, Köhler, Koolmann, Kretschmar, Krieg, Kroll, Lammel, Lang, Lennartz, Leppek, Lippert, Löffler, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schulz, Schulze, Seitz, Steiniger, Sommer Sundermeyer, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Walters, Weihe, Werner, Zielke.

In Dresden: Eckelt, Köhne, Lehmann, Reichmann, Schackert, Schulze, Zwipp.

7.2. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. A. Zielke für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die vielen Anregungen bedanken. Durch diese Arbeit konnte ich mir moderne Methoden der Immunhistochemie und Methoden der computergestützten, morphometrischen Auswertung erarbeiten. Darüber hinaus habe ich einen faszinierenden Blick in die Angiogenese der Schilddrüse erhalten.

Herrn Prof. Dr. I. Hassan und Herrn PD Dr. S. Hoffmann möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit und die konstruktive Kritik bei der schriftlichen Ausarbeitung danken.

Für die hervorragende Einarbeitung und die Hilfestellung bei den experimentellen Arbeiten danke ich Frau Dr. rer. nat. A. Wunderlich und Frau S. Lingelbach.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich während des Studiums und der Promotion stets unterstützt und motiviert haben.

Der letzte Dank gilt besonders meiner Freundin Sonja Dahmann für ihre Unterstützung und Zuversicht.