

6. Methoden

Als Grundlage für diese Arbeit wurden die histologischen bzw. immunhistochemischen Befundberichte des Leiters der Abteilung Herzpathologie im Deutschen Herzzentrum Berlin herangezogen und analysiert.

6.1 Immunhistochemische Aufarbeitung der Proben

Unterschiedliche oberflächliche Zellstrukturen können mittels spezifischer Antikörper markiert werden. Anhand der Ausprägung dieser oberflächlichen Zellstrukturen ist sowohl eine Aussage über den Zelltyp sowie dessen Aktivitätszustand möglich.

Seit 1996 wird diese Methode auch am Deutschen Herzzentrum Berlin als Zusatzuntersuchung an rechtsventrikulären Biopsien durchgeführt. Es werden für jede Biopsie Präparate mit immunhistochemischen Markern für T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Muskel-Aktin, Endothelzellen, HLA-DR sowie Kollagen III und V hergestellt.

Die Proben wurden in 4% gepuffertem Formol nach Lillie fixiert.

Nach Paraffineinbettung der formalinfixierten Proben wurden mit einem Serienschnittmikrotom ca. 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Hämalaun-Eosin (HE).

Im Vordergrund der immunhistochemischen Untersuchung stand die Ermittlung der HLA DR-Aktivität nach der APAAP-Methode.

Das verwendete Anti-Human HLA-DP, DQ, DR Antikörper, CR3/43, reagiert mit der β -Kette des α - β -Heterodimer aller Produkte der Genfamilien *DP*, *DQ* und *DR*.

Im normalen peripheren Blut färbt der Antikörper aktivierte T-Zellen, B-Zellen, sowie Monozyten [23,24,66].

Bei der in Abb. 2 dargestellten Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode bindet zunächst an einen unkonjugierten Primärantikörper (Fa. Dako Corporation, USA) ein Brückenantikörper (Fa. Dako ChemMate™ Detection Kit, USA), welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Darauf folgt der sogenannte APAAP-Komplex, welcher an den Brückenantikörper bindet.

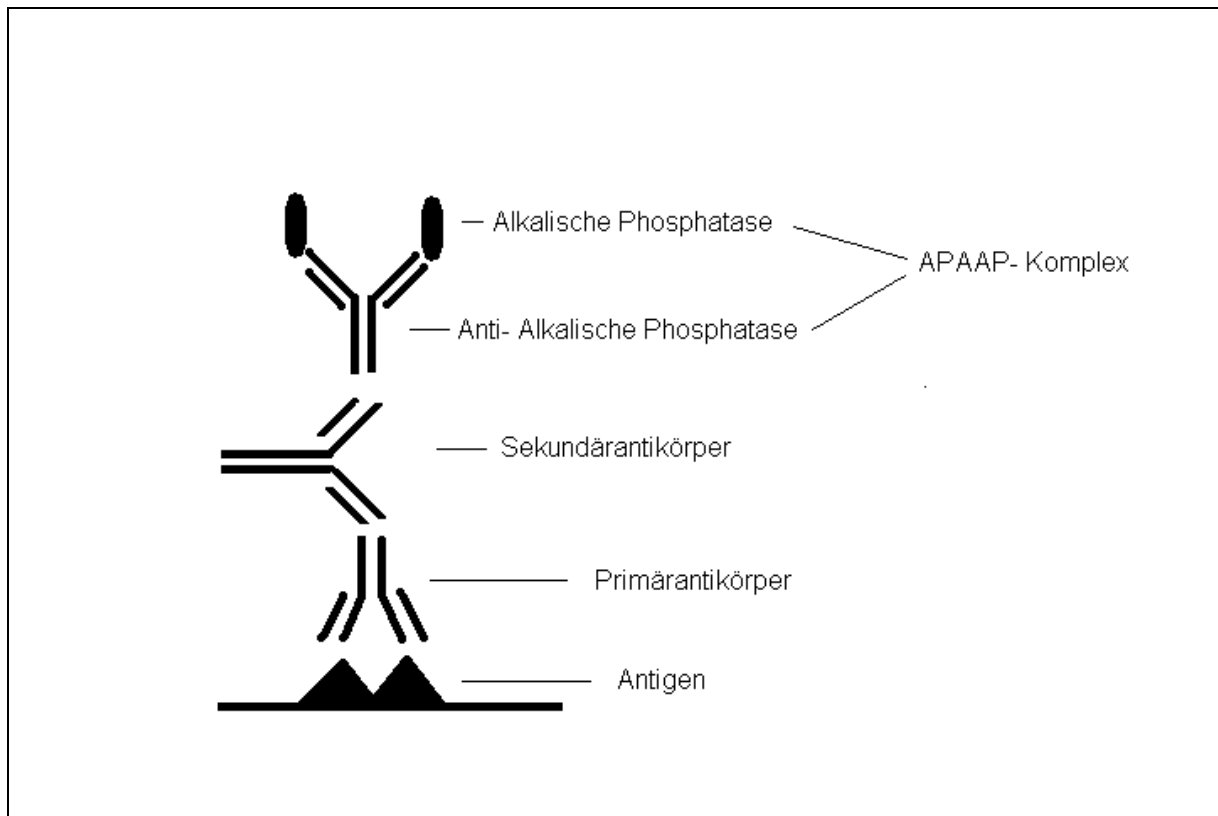


Abb. 2 Schema der APAAP-Methode

Der APAAP-Komplex besteht aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und aus einem Antikörper, der gegen das Enzym Alkalische Phosphatase gerichtet ist. Der Primärantikörper und der Antikörper des APAAP-Komplexes stammen von derselben Spezies, so dass der Brücken- bzw. Sekundärantikörper diese verbinden kann.

Die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben wurden wie folgt verarbeitet:

Zuerst wurden die Schnitte im Brutschrank bei 60 °C getrocknet.

Zur Entwässerung und Entparaffinierung wurden die Schnitte in Xylol und in eine Alkoholreihe mit absteigender Konzentration eingetaucht und anschließend mit Aqua destillata kurz gespült.

Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper, ein monoklonaler Maus-Antikörper (HLA DR-Antikörper, Fa. Dako Corporation, USA), sowie eine Spülung mit Tris-Puffer (Trizma-Base in Aqua destillata gelöst). Der Sekundärantikörper (Anti-Maus Immunglobuline aus dem Kaninchen-rabbit Anti-

Mouse Ig, Code No.K 5000, Dako ChemMate™ Detection Kit, USA), der eine Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Komplex bildet, wurde zur Reaktion zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurde erneut mit Tris-Puffer gespült.

Der Enzym-anti-Enzym-Komplex (Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase, Firma Dako, USA) wurde auf die Schnitte aufgetragen.

Zuletzt erfolgte die Zugabe des Farbstoffes für die Immunhistochemie (eindecken in Kaisers Glycerin-Gelatine).

Das Chromogen für die Reaktion mit alkalischer Phosphatase ist „Fast Red“ (rotbraunes Farbprodukt), zur Gegenfärbung wurde Hämalaun (blau) verwendet.

Die angefertigten histologischen Präparate mit immunhistochemischen Markern zur HLA DR-Expression wurden histomorphometrisch ausgewertet. Die Bewertung der histologisch festgestellten Abstoßungsepisoden erfolgte nach den Kriterien der ISHLT und der Berliner Ergänzung.

Die Bewertung der vaskulären Reaktion erfolgt nach der oben genannten hauseigenen Einteilung.

6.2. Statistik

Zur statistischen Datenverarbeitung kam das Statistikprogramm SPSS® Version 11.0 (SPSS Inc., Cincinnati, USA) zum Einsatz.

Für die deskriptive Auswertung erfolgte die Berechnung der Mittelwerte, der Standardabweichung und der Varianz. Die Zusammenhänge zwischen qualitativen Daten (HLA DR-Expression/ Rejektion) wurden anhand eines Vierfeldertestes dargestellt. Ferner wurde ein Risikovergleich der Parameter (HLA DR-Expression/ fehlende HLA DR-Expression in Bezug zur Rejektion) durchgeführt.

Die Schätzung der Überlebensrisiken bzw. der Überlebenswahrscheinlichkeiten erfolgte nach Kaplan-Meier. Mit dem Cox-Modell konnte der Einfluss der untersuchten Parameter HLA DR, Wandverdickung und Endothelschwellung auf die Überlebenszeit beschrieben werden. Positive Koeffizienten $\beta > 0$ bedeuten Verringerung der Überlebenszeit, $\beta < 0$ bedeuten Verlängerung der Überlebenszeit. $\exp(\beta)$ beschreibt dabei das Risiko der Merkmalsstufen untereinander.

Das Risiko, dass das Zielereignis eintritt, steigt bei Werten von $\exp(\beta) > 1$ um das $\exp(\beta)$ -fache und fällt bei $\exp(\beta) < 1$ um diesen Wert.

Das Signifikanzniveau wurde auf 1% festgelegt.

Die ermittelten Daten sind verbal, tabellarisch sowie graphisch dargestellt.