

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In die retrospektive Studie aufgenommen wurden 50 Patientinnen mit hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft, die in den Jahren 1996 bis 1998 in der Frauenklinik des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin entbunden wurden. Als Einschlusskriterium galt die klinische Diagnose einer Präeklampsie mit einem Hypertonus $\geq 140/90$ und einer Proteinurie $\geq 0,3\text{g}/24$ Stunden-Urin oder ein HELLP-Syndrom (Rath 2000). Ausgeschlossen wurden Patientinnen mit relevanten Vorerkrankungen, wie Diabetes, Proteinurie oder Hypertonie in der Anamnese.

In die Kontrollgruppe wurden insgesamt 50 Patientinnen aus der Charité, Standort Virchowklinikum, und aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin mit unauffälliger Schwangerschaft ohne relevante Vorerkrankungen eingeschlossen. In beide Gruppen wurden sowohl Patientinnen mit Frühgeburten als auch mit Reifgeburten aufgenommen. Nach immunhistochemischer Behandlung erfolgte eine Durchmusterung der Präparate auf Färbungsqualität, wobei insgesamt 9 Fälle bei nur regionaler Anfärbung ausgeschlossen wurden. Es verblieben 48 Frauen in der Kontrollgruppe und 43 in der HES-Gruppe. In der Kontrollgruppe beträgt der Mittelwert der Schwangerschaftswochen 35,96 bei einem Median von 37,4. Die entsprechende Verteilung der SSW in der Gruppe mit HES ist mit einem Mittel von 35,1 bei einem Median von 35,6 vergleichbar (Tab. 4). Beide Gruppen zeigen eine angenäherte Normalverteilung der SSW. Das Einverständnis aller Patientinnen zur Nutzung ihrer Daten lag vor.

Tabelle 4: Statistische Daten zu Alter und Schwangerschaftswoche

	Entbindungsalter Kontrollen in Jahren	SSW der Kon- trollgruppe	Entbindungsalter HES in Jahren	SSW der HES- Gruppe
Mittelwert	30,6	35,96	29,5	35,1
Maximum	40	41,6	41	40,5
Minimum	19	21	16	25,4
Median	30,5	37,4	29	35,6

Von allen Frauen wurden anamnestische Daten, Werte des Blutdruckmonitorings, das Ausmaß der Proteinurie sowie Labordaten (Transaminasen, Gerinnungsparameter, Thrombozytenzahl) dokumentiert und bewertet. Bei den Patientinnen lag mindestens ein Ultraschallbefund mit Beurteilung von Kindsgewicht, Fruchtwassermenge und Dopplerdarstellung des Flows fetaler und mütterlicher Gefäße vor.

2.2 Gewebepreparation

Von allen Plazenten waren in Paraffin eingebettete Plazentagewebeblöckchen vorhanden. Dazu wurde das Gewebe unmittelbar nach der Entbindung, respektive dem Abort, in fünfprozentiger Formalinlösung fixiert. Später erfolgte die Einbettung einzelner Plazentaabschnitte in Paraffinblöcke bei Temperaturen unterhalb von 56°C zur Minimierung der Proteindenaturierung.

Sämtliche Paraffinblöcke (100) wurden auf einem Mikrotom im Institut von Prof. Pickartz in 5 µm dünne Schnitte verarbeitet und auf Objektträger montiert. Alle Schnitte wurden gleich behandelt. Die Deparaffinierung erfolgte in einer aufsteigenden Xylol (2x5 min)/ Aceton (10min)/ Aceton-Trispuffer 1:1 (10 min)/Trispuffer Reihe.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 HER1

Eingesetzt wurde der primäre Antikörper Ab-10 der Firma NeoMarkers (Cat.# MS-378-R7) gegen die extrazelluläre Domäne von HER1, ehemals als EGFR bezeichnet. Kreuzreaktionen mit HER2/HER3/HER4 wurden seitens der Firma ausgeschlossen. Alle Schnitte wurden zur Antigendemaskierung mit Proteinkinase (7min) behandelt und anschließend mit Trispuffer gespült. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 100 µl Fötalem Kälberserum (FCS) pro Schnitt für 20 min in einer feuchten Kammer geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper für HER1 in einer Verdünnung von 1:50 in Tris-puffer erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4°C. Nach der Einwirkzeit wurden die Präparate 3x5 min mit Trispuffer gespült.

Der sekundäre Maus-anti-Kaninchenantikörper mit Biotin-SP-Komplex wirkte im Verhältnis 1:400 über 30 min bei Raumtemperatur ein. Nach dem dreimaligen Spülen mit Trispuffer wurden alle Schnitte getrocknet. Der Streptavidin-AP-Komplex wurde in einer Verdünnung von 1:400 mit Trispuffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach dem Spülen mit Trispuffer getrocknet. Die Farbentwicklung erfolgte mit DAKO-Entwicklungslösung.



Abbildung 4: HER1-Expression: Zellmembran des Synzytiotrophoblasten von Plazentazotten mit typischer polarisierter Doppelfärbung basal und apikal, deutliche apikale Betonung Vergrößerung 1:1000

Für 2 ml Lösung wurden 60 µl Fuchsin und 60 µl Aktivierungssagens gemischt. Nach einer Minute wurde mit Buffered Substrat auf 2 ml aufgefüllt und die Schnitte 15 min inkubiert. Abgespült wurde mit Aqua dest. Gegengefärbt wurde mit Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE) für 25 Sekunden, worauf die Präparate anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen wurden. Eingedeckt wurde mit Glyceringelatine. Eine typische Darstellung zeigt Abb. 4.

2.3.2 HER2

Verwendet wurde der primäre Antikörper HER-2-Neu der Firma DAKO (Code-Nr.: N 629) in gebrauchsfertiger Mischung. Es handelt sich um einen polyklonalen primären Antikörper gegen das HER2-Onkoprotein. Ein typisches Färbemuster zeigt Abbildung 5.

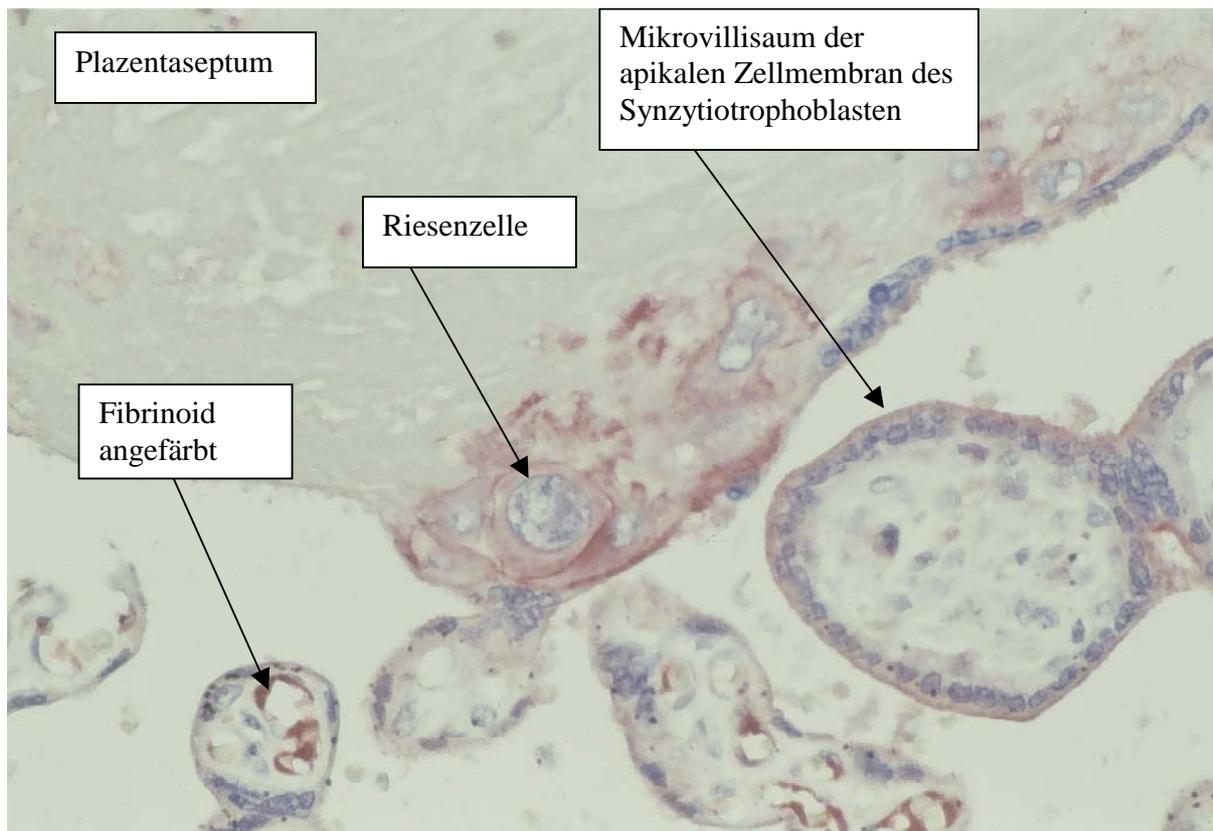


Abbildung 5: HER2-Expression: Riesenzelle extravillös, Saum mit apikaler Betonung der Synzytiotrophoblasten und Fibrinoidfärbungen, Vergrößerung 1:400

Als Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung wurde seitens des Herstellers das Kochen für 40 min bei 95°C empfohlen. In diesem Fall wurden alle Schnitte in Citratpuffer (pH 6) im Wasserbad jeweils 30 min in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt. Danach erfolgte 20 min das Abkühlen im Wasserbad auf Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden alle Schnitte 3 mal jeweils 5 min mit Trispuffer gespült.

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit FCS für 30 min geblockt. Die Inkubation mit dem gebrauchsfertigen primären Antikörper erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Bis auf die

Negativkontrollen wurden alle Schnitte bedeckt und zusätzlich noch Extraschnitte von bekannt HER2-exprimierendem Plazentagewebe inkubiert. Nach der Einwirkzeit wurde 3 mal 5 min mit Trispuffer gespült.

Die Färbereaktion wurde mit Biotin-SP-Komplex (Maus-anti-Kaninchen) im Verhältnis 1:500 begonnen. Dazu wirkten je Schnitt 100-200 µl über 30 min bei Raumtemperatur ein. Nach dem Spülen mit Trispuffer wurden alle Schnitte getrocknet. Der Streptavidin-Komplex wurde in einer Verdünnung von 1:1000 mit Trispuffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach dem Spülen mit Trispuffer getrocknet.

Die Farbentwicklung erfolgte mit jeweils frisch angesetzter Lösung: für 2 ml je ein Tropfen Lösung A und Lösung B. Nach 1 min Vermischungszeit wurde mit Puffer auf 2 ml aufgefüllt. Diese Lösung wirkte 15 min bei RT auf alle Schnitte ein. Abgespült wurde mit Aqua dest. Gegengefärbt wurde mit Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE) für 25 Sekunden und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Eingedeckt wurde mit Glyceringelatine.

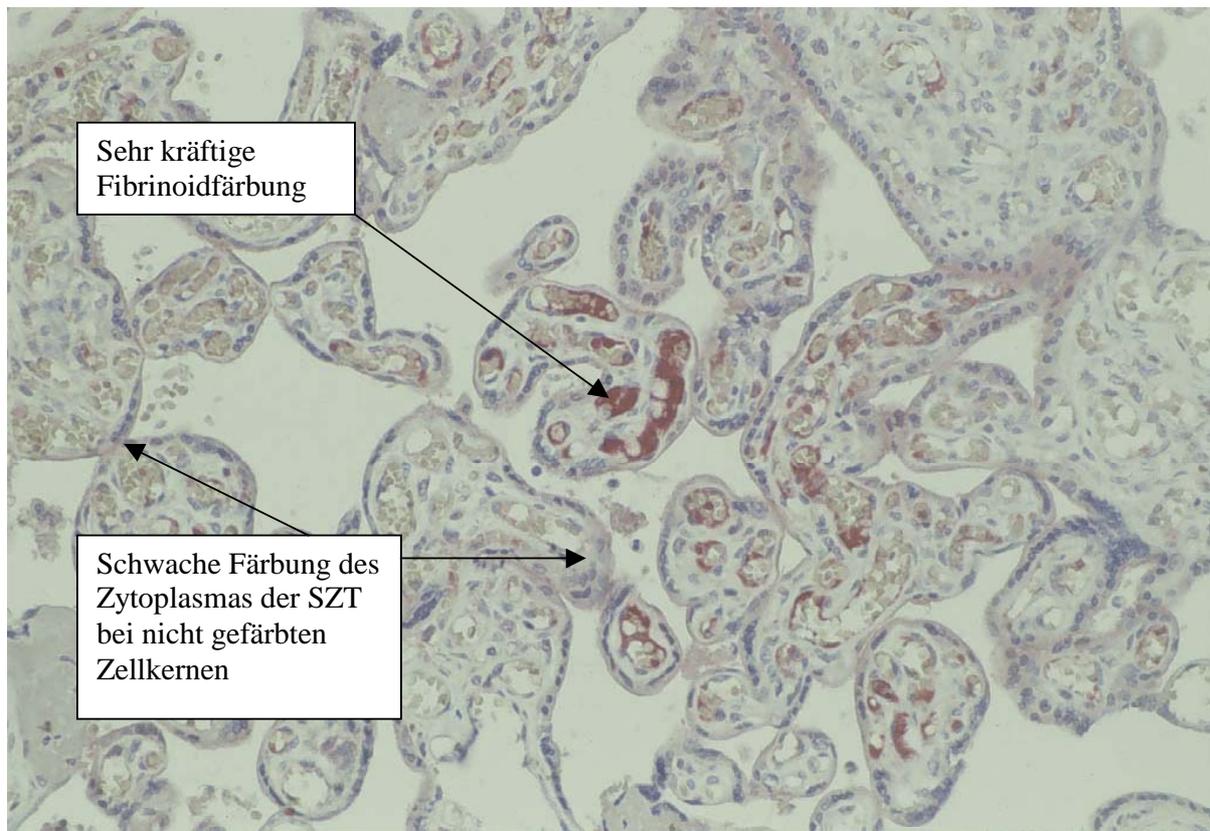


Abbildung 6: HER3-Übersichtsdarstellung, Vergrößerung 1:200, typische blasse Zytoplasma/Zellmembranfärbung und kräftige Anfärbung des Fibrinoids

2.3.3 HER3 / HER4

Für HER3 (Abb. 6) wurde ein an p160 am Karboxyterminalen Ende von HER3 bindender Antikörper (C17) der Firma Santa Cruz Biotechnology (Kat.: sc-285) als primärer Antikörper verwendet. Als Antikörper für HER4 (Abb. 7) wurde ein ebenfalls am Karboxyterminalen Ende von HER4 bindender Antikörper (C18) der Firma Santa Cruz Biotechnology (Kat.: sc-283) eingesetzt.

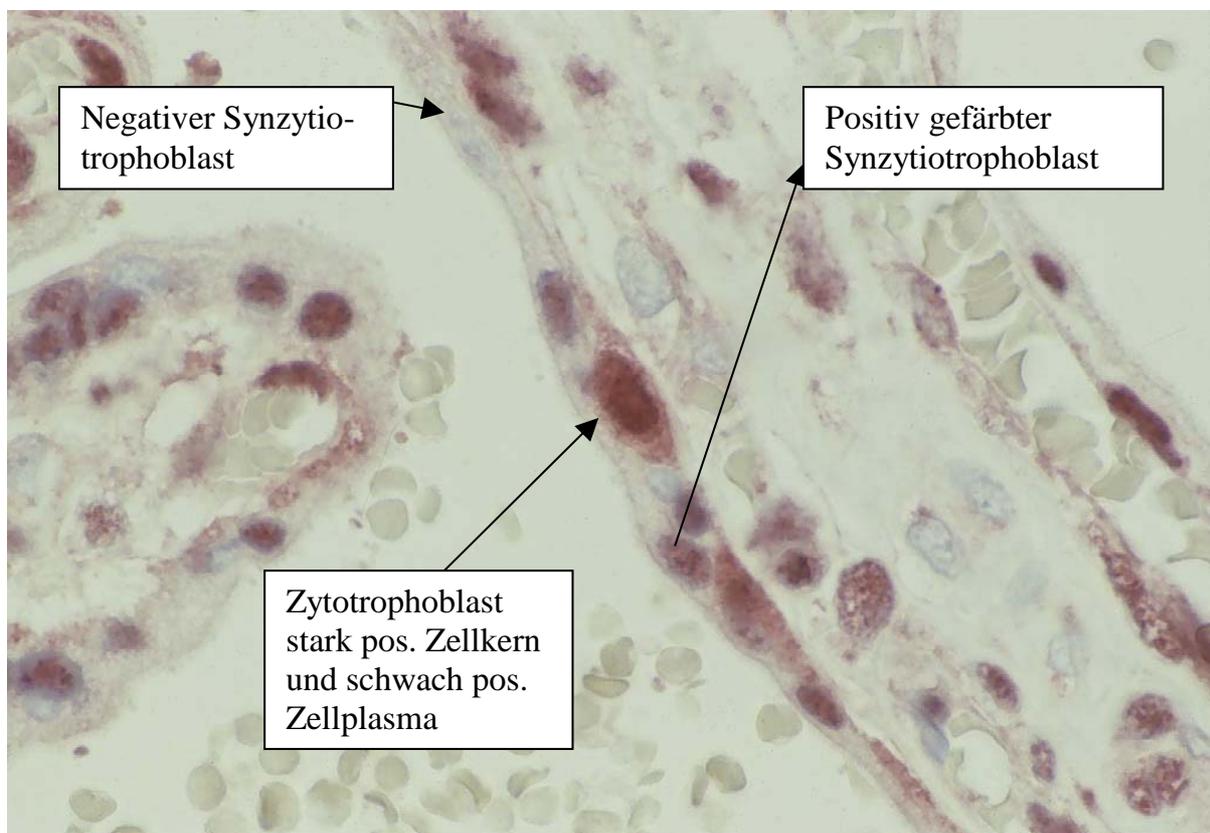


Abbildung 7: HER4-Expression: Zellkernfärbung der Zytotrophoblasten und teilweise der Synzytiotrophoblasten (Vergrößerung 1:1000)

Entsprechend den Empfehlungen zur Antigendemaskierung wurden alle Schnitte in Citratpuffer (pH 6) im Wasserbad bei 95°C jeweils zweimal 5 min erhitzt. Danach erfolgte für 20 min das Abkühlen im Wasserbad auf Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden alle Schnitte 3 mal jeweils 2 min mit Trispuffer gespült. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit FCS für 30 min geblockt und anschließend nicht gespült.

Die Inkubation erfolgte mit dem primären Antikörper für HER3 in einer Verdünnung von 1:25 und dem primären Antikörper für HER4 in einer Verdünnung von 1:40 für 60 min bei Raumtemperatur. Bis auf die Negativkontrollen wurden alle Schnitte bedeckt und zusätzlich noch Extraschnitte von bekannt HER3 und HER4 exprimierendem Plazentagewebe inkubiert. Nach der Einwirkzeit wurde 3 mal 5 min mit Trispuffer gespült.

Der sekundäre Maus-anti-Kaninchenantikörper mit Biotin-SP-Komplex der Firma Santa Cruz Biotechnology (Kat.: sc-2359) wirkte im Verhältnis 1:400 über 30 min bei Raumtemperatur ein. Nach dem dreimaligen Spülen mit Trispuffer wurden alle Schnitte trockengewischt. Der Streptavidin-AP-Komplex wurde in einer Verdünnung von 1:400 mit Trispuffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach dem Spülen mit Trispuffer getrocknet. Die Farbentwicklung erfolgte mit DAKO-Entwicklungslösung. Für 2 ml Lösung wurden 60 µl Fuchsin und 60 µl Aktivierungsgens gemischt. Nach 1 min wurde mit Buffered Substrat auf 2 ml aufgefüllt und die Präparate 15 min inkubiert. Abgespült wurde mit Aqua dest. Gegengefärbt wurde mit Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE) für 25 Sekunden und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Eingedeckt wurde mit Glyceringelatine.

2.4 Histomorphologische Auswertung

Die Beurteilung aller Schnitte erfolgte unabhängig von den klinischen Daten. Die Zuordnung der einzelnen Färbungen zu Kontrollgruppe oder HES-Patientinnen war nicht bekannt. Alle Präparate wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Färbungen hinsichtlich Zellmembranfärbung, Zellkernfärbung und Zytoplasmafärbung beurteilt.

Als Positivkontrolle dienten jeweils bekannt HER1, HER2, HER3 oder HER4 exprimierendes Plazentagewebe oder Mammakarzinomgewebe. Für die Negativkontrollen wurde nur mit Serum anstatt primären Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper ergab gelegentlich geringe Hintergrundanfärbungen.

Eine vergleichende immunhistomorphologische Kontrolle und Zellsubpopulationsbestimmung erfolgte an ausgewählten Präparaten für jeweils alle vier Rezeptorfärbungen in Kooperation mit Prof. Vogel, Leiter der Abteilung Paidopathologie, Universitätsklinikum Charite, Standort Wedding.

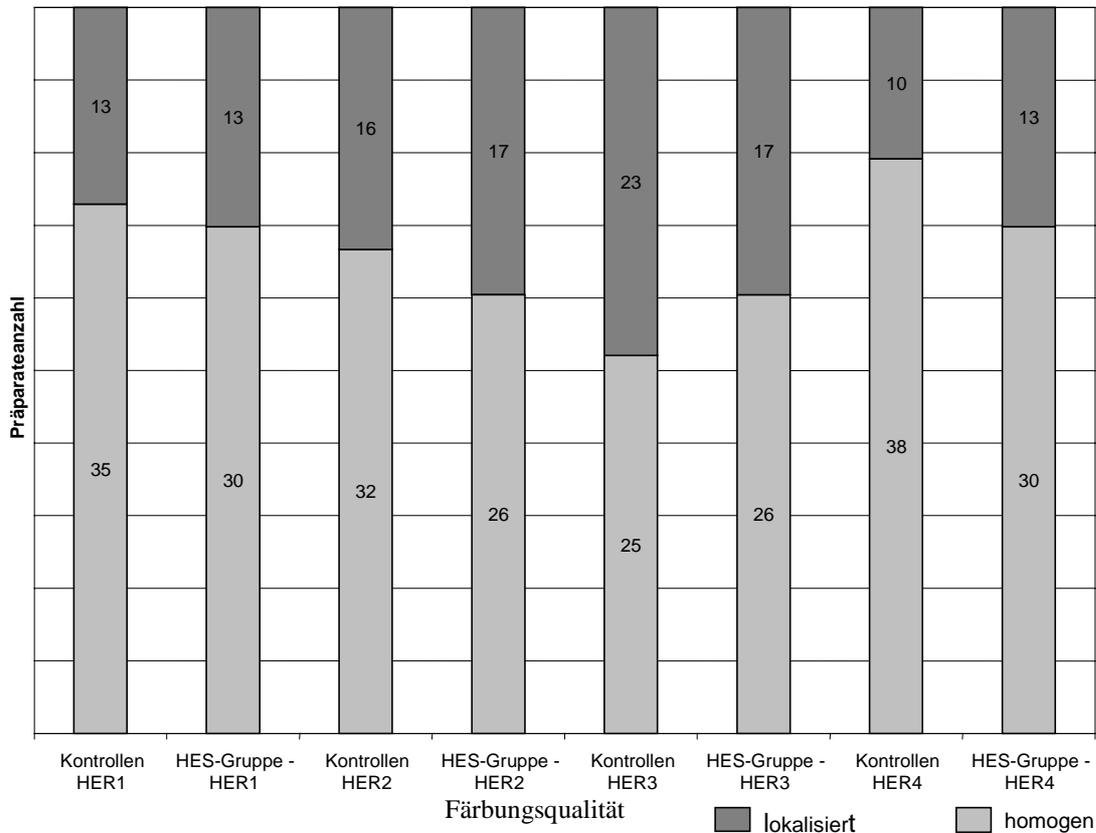


Abbildung 8: Färbungsqualität aller Präparate für HER1, HER2, HER3, HER4 jeweils für Kontrollgruppe und HES-Gruppe

In der Beurteilung wurde die Färbintensität in einer Ordinalskala in Anlehnung an den Dako-Herceptest mit der Ausprägung von 0 = keine Färbung über 1 = schwache Färbung bis zu 2 = starke Anfärbung angegeben. Problemfälle wurden mit Prof. Vogel diskutiert. Eine prozentuale Angabe der gefärbten Zellen der einzelnen Subpopulationen entfiel wegen der fast durchgehend 100%-igen Anfärbung aller Zellen. Neben der Ausprägung der Kernfärbungsaffinität wurden charakteristische membranständige Zytoplasmafärbungen erfasst, unterteilt nach Rezeptoren.

Die histologischen Präparate von allen 100 Frauen, jeweils 50 in der Kontrollgruppe und in der HES-Gruppe, wurden zunächst auf Gleichmäßigkeit und Intensität der Färbung orientierend gemustert. Nur Präparate mit einer über die gesamte Fläche sichtbaren Färbereaktion (als homogen bezeichnet) und allenfalls mit Negativarealen von weniger als 20 % (als regional bezeichnet) der Gesamtfläche wurden zur Qualitätssicherung in die Auswertung eingeschlossen, wodurch die Gesamtanzahl auf 91 sank (Abb. 8).

2.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in einer Microsoft-Access-Datenbank gesammelt und nach Rezeptoren und Zelltypen geordnet. Die Vergleichbarkeit von HES-Gruppe (n=43) und Kontrollgruppe (n=48) wurde anhand von Mittelwert und Median der SSW geprüft. Die klinischen Daten wurden mit den Färbungsintensitäten, respektive den Rezeptorexpressionen korreliert. Eine Normalverteilung der Stichproben konnte bei ordinalem Skalenniveau und $n < 50$ nicht gesichert werden. Dementsprechend wurden nichtparametrische Tests verwendet.

Für die statistische Auswertung wurde das Auswertungsprogramm SPSS Version 10.0 verwendet. Den erhobenen Variablen wurde ein entsprechendes Skalenniveau zugeordnet. Die inferenzstatistische Testung erfolgte für nominale Variablen (Gruppenzuordnung) und ordinale Variablen (Rezeptorexpressionen) nach Zuordnung in Kreuztabellen (Tab. 5) mit dem Chi-Quadratstest. Hierzu wurde mit SPSS das Pearson-Chi-Quadrat und das Likelihood-Quotienten-Chi-Quadrat berechnet (Abb. 9). Für reine 2x2 Feldertafeln wurde das korrigierte Chi-Quadrat nach Yates bestimmt. Falls in einem Feld eine erwartete Häufigkeit < 5 vorkam, wurde der exakte Test nach Fischer verwendet.

Kreuztabelle

			Zuordnung		Gesamt
			Kontrollen	HES-Gruppe	
SZT4Kern- färbung	0	Anzahl	6	21	27
		Erwartete Anzahl	14,2	12,8	27,0
	1	Anzahl	5	9	14
		Erwartete Anzahl	7,4	6,6	14,0
	2	Anzahl	37	13	50
		Erwartete Anzahl	26,4	23,6	50,0
Gesamt	Anzahl	48	43	91	
	Erwartete Anzahl	48,0	43,0	91,0	

Tabelle 5: Kreuztabelle aus SPSS – hier beispielsweise SZT-Kernexpression für HER4

Metrische Variablen lagen nicht vor. Korrelationen sind bei Vierfelder-/ Mehrfeldertafeln aus nominalen und ordinalen Daten sowie kleinen Umfängen ($n < 100$) nicht verwertbar.

Getestet wurde, ob eine Abhängigkeit der Rezeptorexpression von der jeweiligen Gruppenzugehörigkeit vorlag. Für alle Tests wurde der Signifikanzpunkt bei $p < 0,05$ festgesetzt. Als Nullhypothese galt jeweils, dass es keine unterschiedliche Rezeptorexpression im Plazentagewebe von gesunden Frauen und Frauen mit hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft gibt. Bei $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt.

Dies bedeutet, dass bei einem Chi-Quadrat-Test mit asymptotischer Signifikanz $p < 0,05$, die getestete Rezeptorexpression in Kontrollgruppe und HES-Gruppe signifikant differiert. Eine Aussage über die Richtung oder Stärke der abhängigen Differenz war nicht möglich.

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	20,784 ^a	2	,000
Likelihood-Quotient	21,719	2	,000
Anzahl der gültigen Fälle	91		

a. 0 Zellen (0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 6,62.

Abbildung 9: Chi-Quadrat-Test mit hochsignifikanten Werten $p < 0,001$, berechnet aus den Daten der Kreuztabelle in Tab. 5