

Tobias Maximilian Steffek

Dr. med.

Apoptose und assoziierte Proteine bei Abstoßungsepisoden nach Herztransplantation -Immunhistochemische Untersuchungen rechtsventrikulärer Endomyokardbiopsien-

Geboren am 06.09.1974 in Frankfurt am Main

Reifeprüfung am 17.06.1994 in Tübingen

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis SS 2001

Physikum am 02.09.1996 an der Universität Tübingen

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Schwetzingen

Staatsexamen am 10.05.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Ph. A. Schnabel

In der vorliegenden Arbeit wurde die Quantität des apoptotischen Zelltodes im humanen Herzmuskel bei akuten Abstoßungsepisoden nach orthotoper Herztransplantation bestimmt. Als Untersuchungsmaterial dienten Paraffinserienschnitte formalinfixierter rechtsventrikulärer Endomyokardbiopsien, eingeteilt in zwei Hauptgruppen mit den Rejektionsgraden 1a und 3a (nach den Kriterien der ISHLT), letztere weiter unterteilt nach dem Vorhandensein nicht-invasiver Quilty A- und invasiver Quilty B-Effekte.

Zum Nachweis Apoptose-typischer DNA-Strangbrüche diente die TUNEL-Methode immer mit gleichzeitiger Beurteilung geforderter morphologischer Kriterien apoptotischer Zellen, Einordnung betroffener Zellarten und genauer Quantifizierung. Im Vorfeld der Serienuntersuchungen sollte der Einfluß verschiedener publizierter Vorbehandlungen auf die Ergebnisse der TUNEL-Färbung geklärt werden. Desweiteren wurde die Expression ausgewählter Apoptose-assoziiierter Faktoren immunhistochemisch untersucht. Schließlich erfolgte eine Analyse zu Korrelationen der genannten Proteine untereinander und mit den Ergebnissen der TUNEL-Methode nach dem endgültig verwendeten Protokoll.

Es zeigte sich, daß das Ausmaß der TUNEL-Positivität in Abhängigkeit von der Vorbehandlung erheblich, im Sinne unterschiedlicher, zum Teil sehr hoher Raten TUNEL-positiver Zellen variierte, ohne daß positiv markierte Zellen hierbei morphologische Kriterien der Apoptose erfüllten. Unter Einsatz der Fluoreszenz-Methode ohne spezielle Vorbehandlung wiesen alle TUNEL-positiven Zellen, hierunter vorwiegend interstitielle Zellen und nur ein einziger Kardiomyozyt eine Apoptose-typische

Morphe auf. Zwischen QE A und B zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der TUNEL-Positivität.

Das anti-apoptotische Bcl-2 wurde in IZ während höhergradiger Rejektion signifikant häufiger exprimiert, wobei Endomyokardbiopsien mit QE B solche mit QE A noch übertrafen. In QE B zeigte sich gegenüber QE A eine signifikant höhere Expression. Kardiomyozytär ergab sich kein Unterschied. Die Bcl-x_L-Expression lag in allen Kollektiven auf ähnlichem Niveau. Das pro-apoptotische Bax wurde bei geringgradiger Rejektion kardiomyozytär tendenziell stärker, in IZ tendenziell häufiger exprimiert. In QE B zeigte sich gegenüber QE A eine signifikant höhere Expression. Endothelial fand sich kein Unterschied. Das pro-apoptotische Fas und der Proliferationsmarker Ki 67 waren kardiomyozytär nicht nachweisbar und boten bei IZ und den verschiedenen QE keine signifikanten Differenzen. Die endotheliale Fas-Expression war während höhergradiger Abstoßung signifikant stärker. SPL-F-Positivität war bei IZ und KM während leichtgradiger Rejektion signifikant höher, ferner signifikant häufiger in QE B als in QE A. Bei IZ ergab sich eine signifikante, geringe positive Korrelationen zwischen Proliferation (Ki 67) und TUNEL-Positivität und eine geringe negative Korrelation zwischen Bcl-2 und SPL-F. Bei QE B zeigte sich eine signifikante, geringe positive Korrelation zwischen Bcl-2 und Bax und Fas und SPL-F. Kardiomyozytär fand sich eine signifikante, geringe positive Korrelation von Bax und SPL-F. Zwischen den pro- und anti-apoptotischen Faktoren und TUNEL-Positivität nach der Fluoreszenz-Methode waren keine statistisch signifikanten Korrelationen zu verzeichnen. Eine Korrelation zwischen Proliferation und Schwere der Abstoßungsreaktion konnte nicht nachvollzogen werden. Für eine Interferenz zwischen TUNEL-Färbung nach der Fluoreszenz-Methode und Transkription/Splicing ergab sich bei tendenziell geringgradiger negativer Korrelation zwischen SPL-F- und TUNEL-Positivität bei KM und IZ kein Anhalt.

Die vorliegende Arbeit belegt die Notwendigkeit der Kombination mehrerer Methoden für den Nachweis apoptotischer Zellen. Dies beinhaltet an in der klinischen Routine zur Diagnostik verwendeten Gewebsschnitten mit weitgehender Erhaltung gewebstypischer Strukturen zum einen den Einsatz der TUNEL-Methode zum anderen die histomorphologische Identifizierung apoptotischer Zellen. Die TUNEL-Methode sollte mittels Fluoreszenz ohne spezielle Vorbehandlungen angewandt werden, da solche zu eingeschränkter Reproduzierbarkeit und falsch positiver Anfärbung führen. Unter diesen Prämissen stellt die TUNEL-Färbung mit gleichzeitiger histopathologischer Beurteilung ein verlässliches Instrumentarium bei der Untersuchung des apoptotischen Zelltodes dar. Es konnte gezeigt werden, daß Apoptose in humanem Myokard während akuter Abstoßungsepisoden nach Herztransplantation auftritt. Es wurden in insgesamt geringer Anzahl vorwiegend TUNEL-positive interstitielle Zellen, signifikant häufiger während höhergradiger Abstoßung beobachtet. Lediglich ein einziger Kardiomyozyt wies eine positive TUNEL-Anfärbung bei Apoptose-typischer Morphologie auf.