

Immunhistochemische C5b-9-Komplement-Komplex-Darstellung in Frühstadien der Herzmuskelnekrosen am Paraffinschnitt

H. Thomsen¹, A. Schulz² und S. Bhakdi³

¹Abteilung Rechtsmedizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Arnold-Heller-Strasse 12, D-2300 Kiel, Bundesrepublik Deutschland

²Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Langhansstrasse 10,
D-6300 Gießen, Bundesrepublik Deutschland

³Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Schubertstrasse 1, D-6300 Gießen, Bundesrepublik Deutschland

Eingegangen am 3. April 1989

Immunohistochemical detection of C5b-9 complement complex in early stages of myocardial necrosis in paraffin sections

Summary. With conventional staining techniques it was nearly impossible to differentiate with certainty between early ischemic myocardial lesions, autolytic changes and intact myocardium without a nuclear section. In 1986 it was introduced an immunohistochemical method, which presented C5b-9 Complement Complex as a necrosis marker in cryostat sections. Our further development of this process has resulted in a technique for application on routine paraffin sections: C5b-9 Complement Complex is particularly well-suited for the exact and autolytically insensitive presentation of disseminated necroses of fiber bundles and single fibers of myocardium. The application of the technique on paraffin sections will lead to the use of the same in forensic medicine routine diagnostics of early ischemic myocardial lesions, even in cases of "sudden" cardiac death.

Key words: Early myocardial necroses – C5b-9 complement complex, a necrosis marker – Sudden cardiac death, morphological detection

Zusammenfassung. Mit den bisher üblichen Färbemethoden war es kaum möglich, sicher zwischen frühen ischämischen Herzmuskelschäden, autolytischen Veränderungen und auch intaktem Myocard ohne Kernanschnitt zu unterscheiden. 1986 wurde erstmals eine immunhistochemische Methode vorgestellt, mit der C5b-9-Komplement-Komplex als Nekrosemarker am Kryostatschnitt dargestellt wurde. In Fortentwicklung dieses Verfahrens wird eine Technik zur Anwendung am Routine-Paraffinschnitt beschrieben: Mit

dem C5b-9-Komplement-Komplex gelingt es insbesondere, disseminierte Einzel- und Gruppenfasernekrosen des Myocards exakt und autolyseunempfindlich darzustellen. Die Anwendung dieser Methode am Paraffinschnitt eröffnet den Weg zur Routinediagnostik sehr früher ischämischer Herzmuskelschädigungen selbst in Fällen von „Sekundenherztod“.

Schlüsselwörter: Frühe Herzmuskelnekrose – C5b-9-Komplement-Komplex, Nekrosemarker – „Sekundenherztod“, morphologischer Nachweis

Einleitung

Die bislang einzigen sicheren Nachweise des irreversiblen Zelluntergangs: Kernpyknose, Karyolyse und Karyorrhexis sind mit konventioneller histologischer Technik am Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitt frühestens nach 5 bis 8 Stunden Überlebenszeit sichtbar (Remmele 1984).

Bei kürzeren Überlebenszeiten können intravitale trübe Schwellung, hydro-pische und vakuoläre Degeneration der Herzmuskelzellen durch Wassereinstrom infolge Versagens der Natriumpumpe Hinweise auf sehr frühe Zellschädigung geben. Sie sind allerdings morphologisch nicht abgrenzbar von Autolysephänomenen. Ihr diagnostischer Wert ist daher relativ gering (Remmele 1984).

Wellige Deformität der Herzmuskelfasern in der Randzone eines sich „anbahnenden“ Infarktes (Bouchardy und Majno 1974) wie auch Ausbildung von Kontraktionsbändern sind nicht infarktumgebungsspezifisch (Remmele 1984).

Die nach Holczabek (1970) gerade dem Rechtsmediziner häufig begegnenden Mikroinfarkte mit disseminierten Einzel- und Gruppenfasernekrosen sind im HE-Präparat bei nur diskreter Eosinophilie und fehlender granulozytärer Reaktion kaum zu differenzieren von autolytischen Zellen oder intaktem Myocard ohne Kernanschnitt.

Es hat daher nicht an Bemühungen gefehlt, die frühe ischämische Myocard-schädigung mit anderen Methoden zu erfassen (Übersicht bei Janssen 1984). Die meisten dieser Methoden leiden an hoher Autolyseempfindlichkeit oder sind am Routine-Paraffinschnitt nicht anwendbar.

Schäfer et al. 1986 berichten über den C5b-9-Komplement-Komplex-Nachweis als Marker-Reaktion beim akuten Myocardinfarkt nach der Avidin-Biotin-Komplexmethode an Kryostatschnitten. Dabei gelang mit der ABC-Peroxidase-Methode eine positive C5b-9-Darstellung nach Pronaseandauung auch am Paraffinmaterial. Die Markierung erwies sich aber nur am Gefriermaterial als konstant und zuverlässig. Wir stellen eine Technik vor, mit der am Routine-Paraffinschnitt sehr frühe ischämische Herzmuskelschäden exakt durch den C5b-9-Komplement-Komplex-Nachweis hintergrundfrei und autolyseunempfindlich dargestellt werden.

Material und Methoden

Untersucht wurde autoptisch gewonnenes Myocard von insgesamt 18 Fällen, davon 11 Fälle mit der klinischen Diagnose: „Verdacht auf akutes Myocardinfarktrezidiv“, 2 Fälle mit „Ver-

dacht auf akuten Myocardinfarkt“ und 5 Fälle von „Sekundenherztod“. Bei den Fällen mit „Verdacht auf Myocardinfarkt(-rezidiv)“ lag die Überlebenszeit deutlich unter 4 Std., bei den Fällen von „Sekundenherztod“ waren die Betroffenen auf der Straße, im Zug oder sonst in der Öffentlichkeit zusammengebrochen, der Notarzt konnte nur noch den Tod feststellen.

Als Kontrolle diente sicher infarktfreies Myocard bzw. histologisch bei HE-Färbung gesichert infarziertes Myocard. Zusätzlich wurden frische Proben des Kontrollmyocards bis zu 7 Tagen bei Zimmertemperatur der Autolyse ausgesetzt.

Verglichen wurden:

1. die von Schäfer et al. 1986 verwandte und oft gebrauchte Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode (Fa. Amersham) in verschiedenen Verdünnungs- und Inkubationsvarianten mit und ohne Protease (Sigma P 8038)-Andauung, die hier als bekannt vorausgesetzt werden kann.

2. die von uns modifizierte APAAP-(Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) Methode (Dakopatts GmbH, Hamburg; Cordell et al. 1984): 4 Mikrometer dicke Schnitte von routinemäßig formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Myocard wurden auf mit Poly-L-Lysine beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 Grad Celsius getrocknet (Huan und Gibson 1983). Nach Entparaffinieren Inkubation mit primärem polyclonalen Antikörper gegen Neoantigen des humanen C5b-9-Komplement-Komplexes (Bhakdi und Muhly 1983; Bhakdi und Tranum-Jensen 1987), Verdünnung 1:100 mit Ansatz des RPMI 1640 Mediums (Handelsname, Sigma R 6504) bei 4 Grad Celsius über Nacht.

RPMI-Ansatz: Zu 450 ml Aqua-bidest. 50 ml RPMI, 50 ml inaktiviertes Rindernormalserum und 0,5 g Acid (Natriumacid Merck 6686) geben; pH-Wert auf 7,4 bis 7,6 einstellen.

30minütige Inkubation mit Maus-anti-Kaninchen-IgG (Dako M 737), verdünnt 1:20 mit RPMI-Ansatz und inaktiviertem Humanserum (8:1) bei Raumtemperatur. Inkubation mit Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulinen als Brückenantikörper (Dako Z 259) verdünnt 1:20 mit RPMI und inaktiviertem Humanserum (8:1) für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

30minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit APAAP-Komplex (Dako D 651) verdünnt 1:50 mit RPMI-Ansatz.

Inkubation mit Brückenantikörper und APAAP-Komplex für je 10 Min. wiederholen. Nach den einzelnen Schritten jeweils mit Spülpuffer waschen.

Ansatz des Spülpuffers: Zu 5000 ml Aqua-bidest. 4,5 g Tris-Base (Sigma T 1053), 34,25 g Tris-HCl (Sigma T 3253) und 43,90 g NaCl (Merck 6404) geben. Mit Tris-Base/Tris-HCl auf pH-Wert 7,4 bis 7,6 einstellen.

Inkubation mit frisch angesetztem Phosphatase-Substrat (Neufuchsin-Methode) für 6 Min.

Einige Schnitte wurden mit Hämalun gegengefärbt (30 s.).

Kontrollschnitte mit gesichertem Myocardinfarkt wurden als Negativkontrolle mit Kaninchennormalserum statt des Primärantikörpers inkubiert bzw. als Positivkontrollen mit dem Primärantikörper behandelt. Eindecken mit Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck 9242).

Ergebnisse

Die Anwendung der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode führte am Paraffinschnitt selbst bei variierten Verdünnungen und Inkubationsmodalitäten mit und ohne Proteaseandauung nicht zu brauchbaren Ergebnissen.

Dagegen zeigten die mit polyclonalem Antikörper gegen Neoantigen des C5b-9-Komplement-Komplexes nach der modifizierten APAAP-Methode behandelten Paraffinschnitte selektive, intensiv rote Markierung geschädigter Herzmuskelzellen (Abb. 1a).

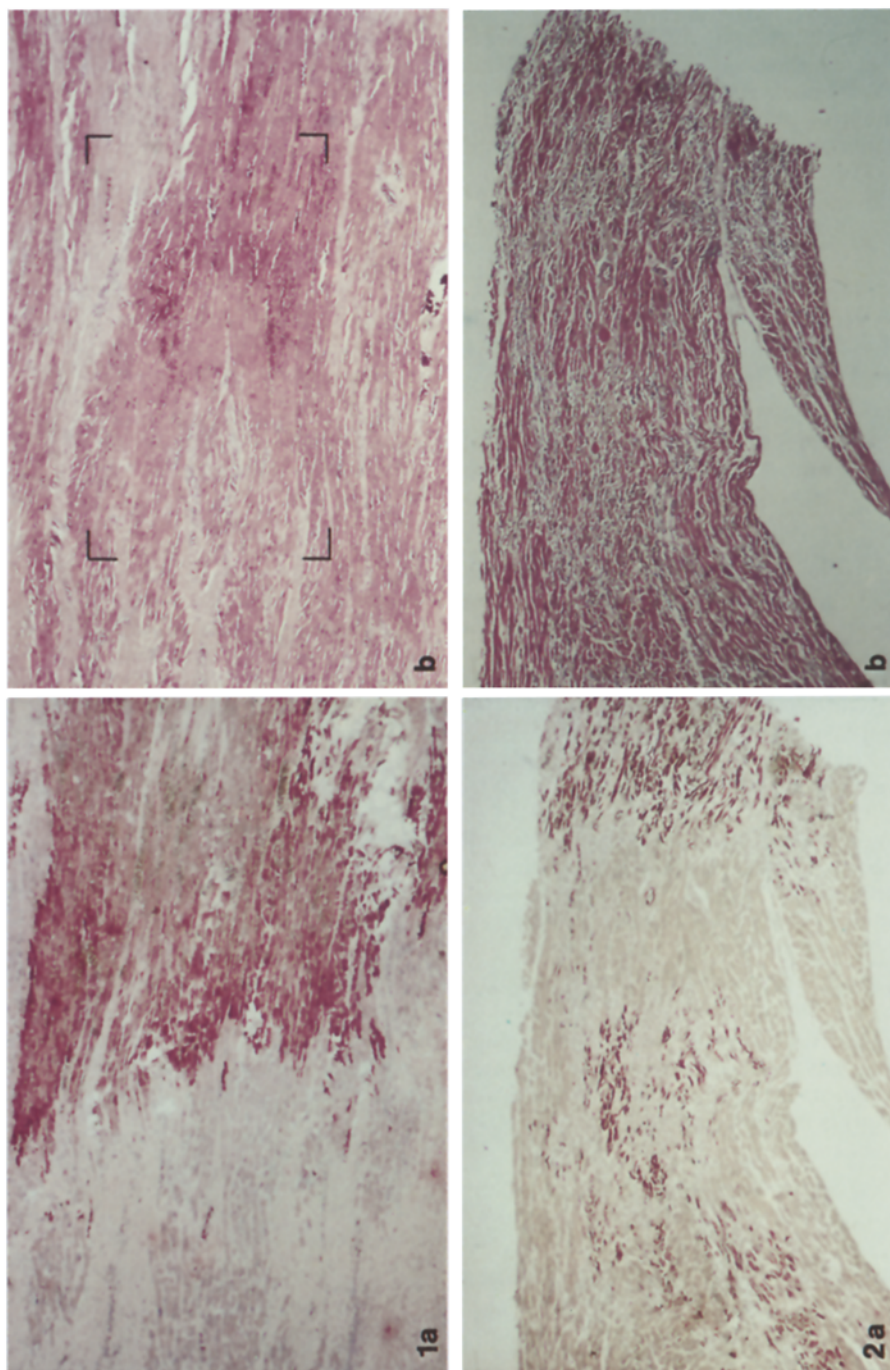


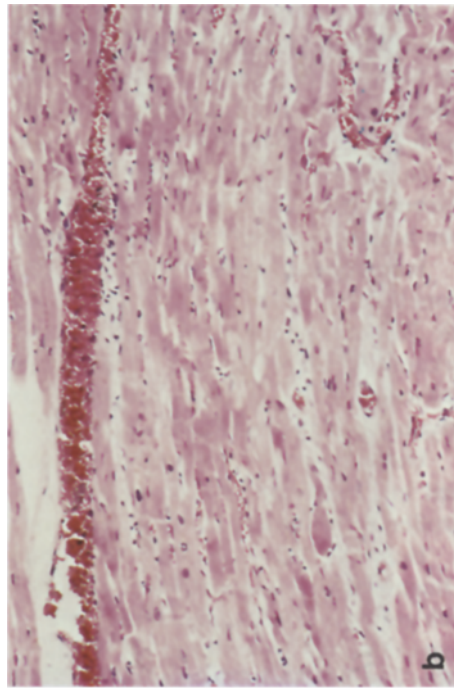
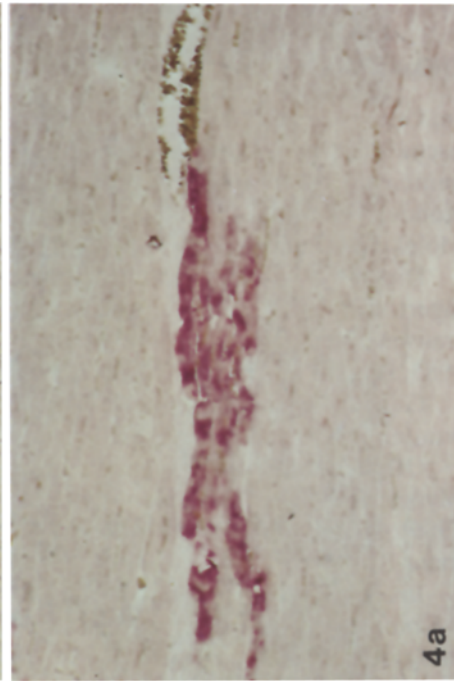
Abb. 1a, b. Vergleich: frische Herzgruppennekrose, immunhistochemische Darstellung (Abb. 1a, $\times 75$) und HE-Färbung (Abb. 1b, $\times 55$), gleiches Areal (Serienschnitte). Ausschnitt in Abb. 1a ist in Abb. 1b durch Klammern markiert. In Abb. 1a allein die Muskelfasernekrosen angefärbt, in Abb. 1b dagegen homogen erscheinendes, mäßig eosinophiles Herzmuskelgewebe mit kräftiger Einblutung ohne granulozytäre Demarkation

Abb. 2a, b. Fasergruppennekrosen, gleiches Areal, Serienschnitte. **a** immunhistochemische Färbung ($\times 55$). **b** HE-Färbung ($\times 55$). Abb. 2a zeigt exakt abgegrenzt die geschädigten Myocardfasern in intakter Muskulatur und Narbengewebe; in Abb. 2b dagegen ist keine eindeutige Differenzierung möglich

Abb. 3. Disseminierte Einzel- und Gruppenfasernekrosen in der immunhistochemischen Färbung deutlich abgegrenzt gegen intaktes Myocard ($\times 30$)



Abb. 4a, b. Vergrößerung einer Gruppenfasernekrose aus Abb. 3: In Abb. 4a ($\times 135$) ist die immunhistochemische Färbung streng begrenzt auf die geschädigten Muskelfasern; im HE-Präparat gleiches Areal (Serienschnitt; das in Abb. 4a rechts angeschnittene Gefäß ist in Abb. 4b ($\times 135$) in größerer Ausdehnung getroffen). Nekrosen hier nicht deutlich erkennbar; allenfalls geben die wandständigen Granulozyten im Gefäß einen Hinweis auf eine mögliche Schädigung gefäßnaher Areale



Kontrollschnitte nicht infarzierten Myocards blieben immer – auch nach einwöchiger Autolyse – ungefärbt. Im Gegensatz dazu wurde sicher infarziertes Myocard der Positiv-Kontrollen immer reproduzierbar und autolyseunempfindlich kräftig rot gefärbt. Arterieninnenwandschichten wurden allerdings auch in nicht geschädigten Arealen markiert (Abb. 2a, 3).

In großen Infarktgebieten war die Randfärbung im Verhältnis zur zentralen Färbung jeweils intensiver. Nicht geschädigte Zellen und Narbengewebe blieben hintergrundfrei völlig ungefärbt (Abb. 1a, 2a, 3, 4a).

Insbesondere konnten Einzel- und Gruppenfasernekrosen, die bei konventioneller HE-Färbung leicht hätten übersehen werden können – exakt durch die Rotmarkierung der C5b-9-Komplement-Komplexe abgegrenzt – mühelos erkannt werden (Abb. 2a, 3). Die Vergrößerung einer solchen Fasergruppennekrose (Abb. 4a) zeigt die Anfärbung mit hoher Genauigkeit auf einzelne Myocardzellen beschränkt.

Diese Form der disseminierten Mikronekrosen fanden wir fast ausschließlich in Fällen von „Sekundenherztod“ und – im Zusammenhang mit älteren großen Infarktarealen – in Fällen von „Verdacht auf Reinfarkt“.

Bei der entsprechenden HE-Färbung (Abb. 4b) wäre dagegen keine sichere Diagnose, insbesondere keine sichere Identifizierung geschädigter Zellen möglich gewesen. Hier sind erst bei genauer Inspektion immigrationsbereite Granulozyten an der Innenwand eines infarktnahen Gefäßes als frühes diskretes Zeichen einer Gewebsschädigung zu erkennen (Abb. 4b).

Diskussion

Im Gegensatz zu den Komplement-Komponenten C1 bis C5, die durch enzymatische Vorgänge aktiviert werden, erfolgt die Aktivierung der späteren Komponenten C6 bis C9 durch Komplexbildung. Dazu wird aktiviertes C5 (C5b) als Kondensationskern benötigt, an den sich je ein Molekül C6, C7, C8 und sechs Moleküle C9 anlagern (Vorlaender 1983).

Dieser C5b-9-Komplement-Komplex hat stark lipophile Eigenschaften und lagert sich als Ringstruktur in die zelluläre Membran ein (Abb. 5). Er bildet transmembranöse Poren und schädigt dadurch die Zelle (Bhakdi und Muhly 1983; Bhakdi und Tranum-Jensen 1987).

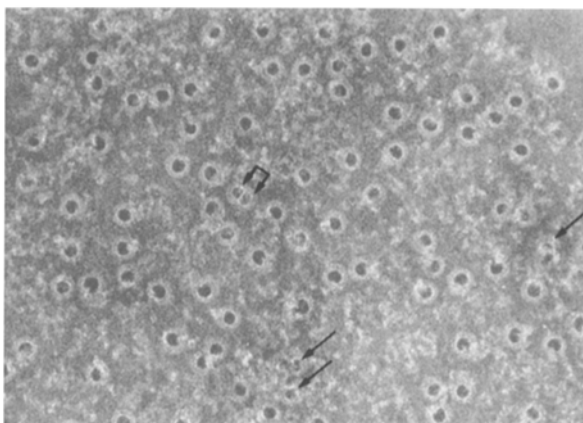
Gegen die spezifischen Neoantigene des C5b-9-Komplement-Komplexes wurden Antikörper erzeugt (Bhakdi und Muhly 1983).

Offenbar stellt die Komplementaktivierung in ischämisch vorgeschädigten Myocardzellen ein zusätzliches, frühes Schädigungsprinzip dar (Schäfer et al. 1986), so daß durch entsprechende Antikörpermarkierung des C5b-9-Komplement-Komplexes Myocardinfarktareale früh erkannt werden können.

In allen Fällen der Verdachtsdiagnose „akuter Myocardinfarkt“ wurde C5b-9-Komplement-Komplex teils zusammenhängend in Arealen größerer Ausdehnung, teils in Mikroinfarkten dargestellt, dabei in einem Fall nach klinisch initialem Anstieg der Kreatininkinase.

Insbesondere wertvoll ist die Methode für die Darstellung disseminierter Einzel- und Gruppenfasernekrosen: So fanden wir bei den akuten Todesfällen wenige Tage nach Erstinfarkt (klinische Diagnose: „Verdacht auf Reinfarkt“)

Fig. 5. C5b-9-Komplement-Komplexe auf lysierten Erythrozyten-Membranen. Die Ringstrukturen stellen einzelne Komplexe dar. Einige C5b-9-Aggregate (Pfeile) sind sichtbar. (Na-Silicotungstate negative stain)



neben den älteren Infarktarealen frische disseminierte Mikroinfarkte im Sinne einer „Ausbreitung des Infarktes“ (Becker und Anderson 1985).

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Holczabek (1970) fanden wir fast ausschließlich Mikroinfarkte in den Fällen von „Sekundenherztod“. Diese Form der Nekrose wäre bei der Routinefärbung mangels Eosinophilie, fehlender granulozytärer Infiltration etc. nicht sicher diagnostizierbar gewesen.

Wir haben keine Erklärung dafür, daß C5b-9-Komplement-Komplex mit dem polyclonalen Antikörper am Paraffinschnitt mit der modifizierten APAAP-Methode hervorragend darstellbar ist, dagegen mit der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode nur unzuverlässig. Es bleibt aber das Faktum.

Die Anfärbung von Gefäßinnenwandschichten der Arterien auch in intaktem Myocard kann mit dem Grad der Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht werden, da C5b-9-Komplement-Komplex qualitativ und quantitativ in arteriosklerotischen Arterien nachgewiesen wurde (Niculescu 1987). Bei eigenen nicht veröffentlichten Untersuchungen an menschlicher Haut wurde nach dem hier dargestellten Verfahren ein reproduzierbares Färbemuster gesehen, daß genau der Elastica-Komponente der Elastica-von-Gieson-Färbung entsprach. Die positive Reaktion der elastischen Fasern in den immunhistochemischen Untersuchungen läßt zweierlei Interpretationen zu:

Zum einen könnte es sich um eine Kreuzreaktion der polyclonalen Antikörper mit Epitopen auf diesen Strukturen handeln, zum anderen besteht durchaus die Möglichkeit, daß der terminale Komplement-Komplex hier abgelagert ist. Diese Frage läßt sich nur durch weitere biochemische Untersuchungen klären (dazu: Bhakdi 1988).

Da in den Arterien des Herzens starke Verdickung und Aufsplitterung der Elastica interna mit zunehmendem Alter und steigender Belastung vorkommt (Bucher 1980), könnte die Anfärbung der Arterieninnenwandschichten neben der Atherosklerose auch in der Anfärbung elastischer Fasern eine weitere Begründung finden.

Die dargestellten Befunde unterstreichen die speziell forensische Bedeutung der immunhistochemischen Darstellung des C5b-9-Komplement-Komplexes beim akuten Herztod.

Die autolyseunempfindliche exakte C5b-9-Komplement-Komplex-Darstellung ist nach der modifizierten APAAP-Methode hervorragend am formalinfizierten und in Paraffin geblockten Myocard anwendbar. Damit bietet sich ein Weg zur breiten Nutzung in der rechtsmedizinischen Routinediagnostik sehr früher ischämischer Herzmuskelschädigungen.

Literatur

- Becker AE, Anderson RH (1985) Pathologie des Herzens. Georg Thieme, Stuttgart
- Bhakdi S, Trandum-Jensen J (1983) Membrane damage by complement. *Biochem Biophys Acta* 939:343–372
- Bhakdi S, Muhly M (1983) A simple immunoradiometric assay for the terminal C5b-9 complex of human complement. *J Immunol Meth* 57:283–289
- Bhakdi S, Trandum-Jensen J (1987) Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 107:147–223
- Bhakdi S, Käflein R, Halstensen TS, Hugo F, Preissner KT, Mollnes TE (1988) Complement S-protein (vitronectin) is associated with cytolytic membrane-bound C5b-9 complexes. *Clin Exp Immunol* 74:459–464
- Bouchardy B, Majno G (1974) Histopathology of early myocardial infarcts: new approach. *Am J Pathol* 71:301–330
- Bucher O (1980) Cytology, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 10. Auflage. Verlag Hans Huber, Bern Stuttgart Wien
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) complexes. *J Histochem Cytochem* 32:219–229
- Holczabek W (1970) Über das histologische Bild der ischämischen Schädigung des Herzfleisches bei Anwendung der Weinstein säure-Kresylecht-violett-Einschlußfärbung. *Beitr Gerichtl Med* 27:275–283
- Huan WM, Gibson SJ, et al (1983) Improved section adhesion for immuno cytochemistry using high molecular weight polymers of L-Lysine as a slide coating. *Histochemistry* 77:275–279
- Janssen W (1984) Forensic Histopathology. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Niculescu F, Hugo F, Rus HG, Vlaicu R, Bhakdi S (1987) Quantitative evaluation of the terminal C5b-9 complement complex by ELISA in human atherosclerotic arteries. *Clin Exp Immunol* 69:477
- Remmele W (1984) Pathology, Band I, Springer, Berlin Heidelberg New York
- Schaefer HJ, Mathey D, Bhakdi S (1986) Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J Immunol* 137:1945–1949
- Vorlaender KO (1983) Immunologie: Grundlagen-Klinik-Praxis. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart Heidelberg New York