

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Durchflußzytofluorometer CYTORON ABSOLUTE[®] der Firma ORTHO-Diagnostics GmbH vergleichende Untersuchungen der erythrozytären Bindung von humanem monoklonalem IgG1-anti-D₄ und eluiertem humanem polyklonalem IgG-anti-A an fetalen und adulten Rh(D)- und A-Erythrozyten durchgeführt.

Die durchflußzytofluorometrische Phänotypisierung der Rh(D)- bzw. A-Eigenschaft führt zu methodischen Problemen, insbesondere durch die störende Hämagglutination mit der dadurch bedingten Verfälschung der Meßergebnisse.

Um die störende Hämagglutination zu umgehen, wurden Methoden zur Verhinderung der Hämagglutination durch chemische Fixierung von Erythrozyten mit Paraformaldehyd und Dimethylsuberimidate untersucht.

Durch die Fixierung humaner Erythrozyten konnte einerseits die Hämagglutination wirksam verhindert werden. Andererseits kam es durch diese Behandlung der Erythrozyten zu Bindungen, die nicht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen. Dabei konnten wir eine Abnahme der Meßempfindlichkeit feststellen.

In Anbetracht dieser Untersuchungen wurde auf die Fixierung verzichtet.

Das Problem der Hämagglutination läßt sich durch folgendes Vorgehen auch ohne Fixierung der Erythrozyten minimieren:

Zum Vergleich der humanen Rh(D)-Eigenschaft adulter und fetaler Erythrozyten wurde als primärer Antikörper ein monoklonales IgG1-anti-D benutzt, der spezifisch mit dem Epitop 4 des Rh(D)-Antigens reagiert.

Für die Untersuchungen der A-Eigenschaft wurde als primärer Antikörper ein eluiertes polyklonales IgG-anti-A benutzt, da ein monoklonaler humaner IgG-anti-A-Antikörper nicht zur Verfügung stand.

Die Erythrozyten wurden mit IgG1-anti-D₄ bzw. IgG-anti-A und anschließend mit einem FITC-markierten Anti-Human-IgG-F(ab)₂-Fragement gleicher Charge als sekundärer Antikörper inkubiert.

Im Vordergrund stand vor allem eine verbesserte Auswertungsmethode der Meßdaten, mit der die Inhalte der 256 Kanäle des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms differenziert analysiert werden können.

Es wurden zwei Computerprogramme entwickelt, mit denen die Inhalte der Kanäle des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms ohne Informationsverlust mathematisch ausgewertet und graphisch dargestellt werden können.

Mit dem ersten Computerprogramm werden aus den sehr großen '*.fcs-Dateien' die Kanalinhalt des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms ausgelesen und als '*.txt-Dateien' gespeichert.

Nach Speicherung der Daten (*.txt-Dateien) stehen diese Kanalinhalt für vergleichende Untersuchungen und Verlaufskontrollen zur Verfügung. Ein wesentlicher Vorteil besteht darin, daß die Meßwerte nun in einer auf jedem Computer spei-

cher- und abrufbaren Form vorliegen. Hierbei können die Werte von etwa 1000 Messungen auf einer einzigen 1,4 MB Diskette gespeichert werden.

Mit einem zweiten Computerprogramm kann aus dem Inhalt der 256 Kanäle (256 Befunde pro Messung !) eine exakte statistische Auswertung mit vergleichender graphischer Darstellung vieler Einzelbefunde in einem Diagramm (Summationskurven) vorgenommen werden.

Mit diesen Methoden wurden daraufhin durchflußzytometrische vergleichende Untersuchungen der erythrozytären Bindung von IgG1-anti-D₄ bzw. IgG-anti-A an fetalen und adulten Erythrozyten durchgeführt. Hierbei ging es um die unterschiedliche Ausprägung der Rh(D)- bzw. A-Eigenschaft der verschiedenen Rhesus- bzw. A-Unterguppen.

Diese Untersuchungen sind im Hinblick auf die Pathogenese der Anti-D- bzw. AB0-Erythroblastose mit den unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen dieser Erkrankungen von Interesse.

Diese Methode wurde weiterhin benutzt, um kleine Populationen Rh(D)-positiver fetaler Erythrozyten bei der feto-maternalen Transfusion nachzuweisen.

Die in der Einleitung gestellten Fragen lassen sich danach folgendermaßen beantworten:

1. Bei chemischer Fixierung mit **Paraformaldehyd (PFA)** kommt es zu einer teilweise hochgradigen, unspezifischen Verstärkung der FITC-Grün-Fluoreszenz im Vergleich zu unbehandelten Erythrozyten. Sowohl Rh(D)-negative als auch Rh(D)-positive Erythrozyten zeigen unspezifische Reaktionen mit IgG1-anti-D₄ und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')₂-Fragment.

Mit **Dimethylsuberimidate (DMS)** fixierte Rh(D)-negative und auch Rh(D)-positive Erythrozyten zeigen gegenüber den unbehandelten Erythrozyten ebenfalls, wenn auch weitaus geringere, unspezifische Reaktionen mit IgG1-anti-D₄ und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')₂-Fragment.

Durch die Fixierung mit PFA und DMS wird die Hämagglutination wirksam verhindert, dies geht jedoch zu Lasten von Bindungen die nicht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen. Die Fixierung führt zu einer Abnahme der Meßempfindlichkeit.

2. Durch die Verwendung von monoklonalen bzw. monospezifischen primären humanen Antikörpern (IgG1-anti-D₄ bzw. eluiertes IgG-anti-A) sowie Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')₂-Fragment als sekundärer Antikörper wurde die Hämagglutination wirksam minimiert.

Die Hämagglutinate ließen sich durch leichtes Schütteln der Probe auflösen.

3. Die unterschiedliche Ausprägung der Rh(D)-Eigenschaft verschiedener Rh-Untergruppen stimmen im Prinzip mit vorhergehenden Untersuchungen der Literatur überein und lassen sich im Durchflußfluorozytometer mit hoher Auflösung bestätigen.

Die unterschiedlich starke Ausprägung der Rh(D)-Eigenschaft der Rhesusuntergruppen CcD.ee bzw. ccD.Ee unterstützt die Beobachtung eines meist leichteren klinischen Verlaufs einer Anti-D-Erythroblastose bei Neugeborenen mit der Rh-Formel CcD.ee im Vergleich zu Neugeborenen mit der Rhesus-Formel ccD.Ee.

Die bisherige Vorstellung, daß der Rh(D)-Rezeptor auf allen Nabelerythrozyten nahezu vollständig ausgereift ist, ließ sich erweitern.

Die Werte der Rh(D)-Eigenschaft fetaler Erythrozyten der Rhesusuntergruppen CcD.Ee, cc.D.Ee und ccD.EE zeigen eine unterschiedlich starke Rh(D)-Ausprägung, liegen aber im Vergleich mit adulten Erythrozyten der gleichen Rhesusuntergruppe eng beieinander. Erwartungsgemäß findet man die stärkste Rh(D)-Ausprägung fetaler und adulter Erythrozyten bei der Rhesusuntergruppe ccD.EE. Im Gegensatz hierzu liegen die Werte der Rh(D)-Eigenschaft von reifen Neugeborenen mit den Rh-Formeln CcD.ee, CCD.ee und ccD.ee, von Überschneidungen abgesehen, niedriger als adulte Erythrozyten (s. Abb. 6).

Mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik ist es möglich, auch schwache Rh(D)-Varianten (D^{weak}) nachzuweisen. Diese unterscheiden sich in ihrer Fluoreszenz quantitativ, nicht jedoch qualitativ von normalen Rh(D)-Erythrozyten.

Leider standen hier nur Erwachsenen-Erythrozyten zur Verfügung.

Die Untersuchungen der A-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten zeigen, daß nur adulte A_1 -Erythrozyten ein nahezu normalverteiltes Kollektiv einer einzelnen Population aufweisen, wogegen adulte A_2 -Erythrozyten und fetale A_1 - und A_2 -Erythrozyten eine deutlich geringere Ausprägung der A-Eigenschaft und eine heterogene Verteilung der Populationen zeigen. Im Verlauf der Summationskurven fetaler A_1 -Erythrozyten zeigt sich, daß die geringere Ausprägung der A-Eigenschaft nicht auf einer gleichmäßigen Reduzierung der A-Rezeptoren beruht. Bei fetalen A_1 -Erythrozyten und adulten A_2 -Erythrozyten können grob zwei Kollektive unterschieden werden.

Das Nebeneinander von Erythrozytenpopulationen mit unterschiedlicher A-Rezeptorzahl hat Auswirkungen bei der ABO-Erythroblastose Neugeborener. Hier bleiben nach einem partiellen Abbau der Erythrozyten mit starker IgG-anti-A-Bindung die Erythrozyten mit geringer IgG-anti-A-Bindung zurück, worauf der direkte Coombstest nur schwach positiv oder gar negativ ausfällt.

4. Fetale A₁-Erythrozyten einer Mutter/Kind Konstellation O/A₁ weisen eine deutlich geringere Ausprägung der A-Eigenschaft auf als fetale A₁-Erythrozyten einer Mutter/Kind Konstellation A/A₁.

Die Befunde sind mit der Annahme einer unterschiedlichen partiellen Hämolyse auch ohne auffallende klinische Symptome vereinbar.

5. Die Quantifizierung fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten zeigen nach Messung im Durchflußzytofluorometer (Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft) und nach HbF-Zellfärbung deutlich unterschiedliche Ergebnisse.

Bei durchflußzytofluorometrischer Analyse der Proben ist neben der exakteren Quantifizierung fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten auch eine weitaus geringere Streuung der Meßergebnisse festzustellen.

Gerade im Vergleich dieser Methoden zeigt sich der Vorteil der Auswertung einer großen Zellzahl bei den durchflußzytofluorometrischen Untersuchungen.

Als Verbesserung der Methode erweist sich insbesondere die Darstellung der Ergebnisse als Summationskurven, bei der die Verlaufswerte direkt auf der y-Achse (Promille-Einteilung) beurteilt werden können (s. Abb. 11).

Mit dieser Auswertung liegt das Minimum der quantitativ erfaßbaren fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten bei etwa 1 ‰.

Wegen der zwar empfindlichen und zuverlässigen, jedoch bisher aufwendigen durchflußzytofluorometrischen Verfahren wird ein Schnelltest zum Nachweis Rh(D)-positiver fetaler Erythrozyten gefordert, den man parallel und in Kontrolle mit der Durchflußzytofluorometrie entwickeln könnte.