

LDH-Isoenzymaktivität der peripheren T- und B-Zellen bei Neugeborenen mit unterschiedlichem Gestationsalter

Von

L. KARMAZSIN, Hedvig CSERNYÁSZKY, Anikó MAKAY und Margit SZÖVETES

Kinderklinik und Pathophysiologisches Institut der Medizinischen
Universität Debrecen, Ungarn

Eingegangen am 27. Januar 1977

Die Separierung der T- und B-Lymphozyten gesunder, reifer Neugeborenen und Frühgeborenen (Gestationsalter: zwischen der 23. und 33. Woche) erfolgte anhand der LDH-Isoenzymaktivität der Zellen. Die Erfahrungen zeigten, daß sich die Methode zur Ergänzung bzw. zum Ersatz der auf Oberflächenmarker beruhenden Techniken eignet. Zwischen reifen Neugeborenen und Frühgeborenen konnten gewisse Unterschiede erkannt werden: Bei den Frühgeborenen war die Aktivität der LDH-1 Fraktion der B-Zellen und der LDH-5 Fraktion beider Zelltypen insbesondere aber der B-Zellen höher als bei den reifen Neugeborenen. Die Methode hat sich zur Erschließung der sich in der fötalen Periode differenzierenden Zellen als brauchbar erwiesen.

Bekanntlich können zwei Populationen der peripheren Lymphozyten separiert werden, namentlich die T- oder Thymus dependenten Zellen sowie die B- oder Thymus independenten Zellen. Der Identifizierung der beiden Zellpopulationen liegt der Charakter der Oberflächen-Immunglobuline zugrunde. Auf der Oberfläche der B-Zellen befinden sich mindestens drei Oberflächen-Rezeptoren: der modifizierte komplementbindende Rezeptor, der aggregierte IgG-bindende Rezeptor und der Immunglobuline bindende Rezeptor.

Zum Nachweis der komplementbindenden Rezeptoren eignen sich zahlreiche Methoden [1, 13, 11, 5]. Die Oberflächen-Immunglobuline bindenden Rezeptoren werden mit Fluoreszeinkonjugierten Antiimmunglobulinen nachgewiesen; neuestens bot sich auch zur Anwendung der Anti-

körper gegen die Schwer- und Leichtketten der Immunglobuline eine Möglichkeit [5, 2, 3]. Die zum Nachweis der mit den aggregierten Immunglobulinen reagierenden Rezeptoren dienende neue Methode wurde von DICKLER und Mitarb. [4] ausgearbeitet.

Zur Separierung der T-Zellen eignet sich der von WYBRAN und Mitarb. [16] sowie JONDAL und Mitarb. [5] ausgearbeitete E-Rosettentest.

Laut der an menschlichen Föten durchgeführten Untersuchungen erscheinen die die B-Lymphozyten charakterisierenden Marker in den hämopoetischen Zellen und Lymphoidgeweben zwischen der 9,5. und 22. Woche. Unter diesen Merkmalen können die die IgM- und IgG-bindenden Rezeptoren tragenden B-Zellen in der Leber und auch die ausschließlich IgM positiven B-Zellen in der Leber

und in anderen Zellen in der 9. Woche nachgewiesen werden. Die IgA-positiven Zellen lassen sich zuerst im 11,5-wöchigen Fötus nachweisen. Unter Anwendung der direkten Fluoreszenz-Antikörpertechnik wurde bewiesen, daß die die Immunglobuline sezernierenden Zellen in der Mitte der 14. Woche erscheinen, wenn die Konzentration der B-Zellen bereits für den erwachsenen Zustand charakteristisch ist. Diese Untersuchungen wiesen ferner darauf hin, daß die T- und B-Zellen zum selben Zeitpunkt erscheinen.

Angesichts dieser Daten erhob sich die Frage, ob uns in der fötalen Lebensperiode, wenn die Entwicklung der Oberflächenmarker der T- und B-Zellen noch nicht beendet ist bzw. in anderen Zuständen, in denen der Nachweis dieser Gebilde wichtig wäre, irgendwelche entsprechende Methoden zur Verfügung stehen, die ohne Ermittlung der Oberflächenrezeptoren zur Selektion der zweierlei Zellpopulationen eine Hilfe bieten würden.

Die Abnahme der Aktivität der in den Lymphozyten von an chronischer lymphatischer Leukämie leidenden Patienten vorhandenen LDH-1-Fraktion der in Richtung der Unreife zeigenden Dedifferenzierung der malignen Zellen verläuft parallel [9, 14]. PLUM und RINGOIR [8, 10] versuchten, die Eigentümlichkeiten der T- und B-Zellen der Lymphozyten von fünf gesunden Erwachsenen anhand ihrer Isoenzymaktivität zu charakterisieren; die Separierung der Zellpopulation haben sie auch aufgrund der Oberflächenmarker durchgeführt (E- und

EAC-Rosettentechnik). Die LDH-Isoenzyme können bekanntlich in sämtlichen Zellen des Organismus vorgefunden werden. Mittels Elektrophorese können — unter Anwendung der das LDH-Molekül aufbauenden zweierlei Untereinheiten, d. h. die Kombination von H—M — fünf Fraktionen der LDH-Isoenzyme separiert werden. Im Laufe der von den Autoren angewandten Zellseparierungsmethode konnten fünferlei Zellpopulationen separiert werden. Aus den separierten Zellen wurde mittels Elektrophorese und spezieller Färbung ein Zymogramm verfertigt; anlässlich der Darstellung dieses Zymogramms mit einem Quick-Scanner-Gerät (Helena Laboratories) wurde das prozentuale Vorkommen von fünf Fraktionen der LDH-Isoenzyme demonstriert. Diese Untersuchungen führten zur Feststellung, daß die T-Lymphozyten auf dem Gebiet der LDH-1-Fraktion, im Vergleich mit den B-Zellen eine signifikante Aktivität zeigen, was gleichzeitig auch soviel bedeutet, daß die Bestimmung der LDH-Isoenzyme die zur Erschließung der Oberflächenmarker gebräuchlichen Methoden ergänzt oder nötigenfalls auch ersetzt.

MATERIAL UND METHODIK

Unser Material bestand aus 10 reifen, gesunden Neugeborenen und 10 Frühgeborenen (zwischen der 28. und 33. Gestationswoche), von denen zur Untersuchung im Laufe der ersten 3 Lebensmonate Blutproben entnommen wurden. Die Zellseparation erfolgte mit der in Abb. 1 schematisch dargestellten Me-

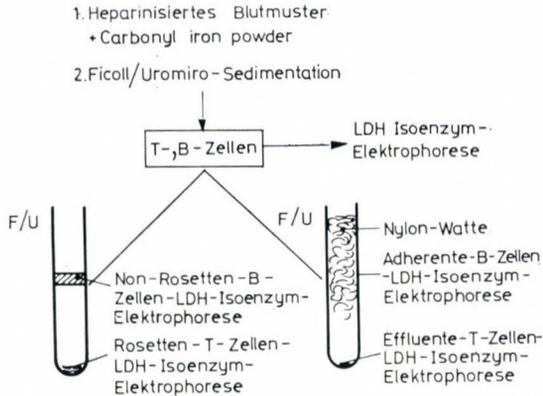


Abb. 1. Schematisch dargestellte Zellseparierungstechnik für fünf Fraktionen

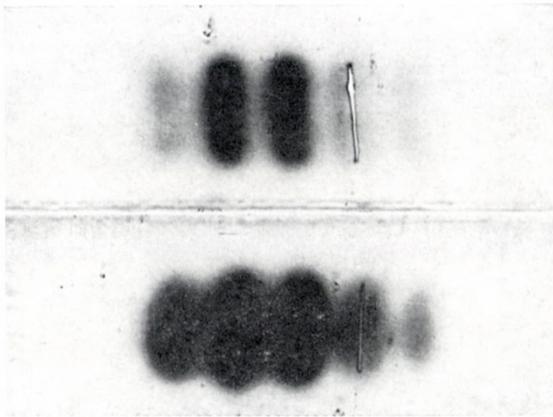


Abb. 2. LDH-Zymogramme unseparierter Lymphozyten: oben: B-Zellen, unten: T-Zellen

thode [8]. In allen fünf Lymphozytensuspensionen wurde die Zahl der E- und EAC-Rosetten bestimmt und auf einem Objektträger auch die Agarose-Gelelektrophorese (30 min, 150 V) durchgeführt; zur Färbung kam das Verfahren von Van der Helm zur Anwendung: Im Laufe der sich in Richtung der Brenztraubensäure abspielenden Reaktion wird der farblose Tetrazolium-Farbstoff durch Phenazinmetosulfat zu farbige, unlösbare Formasankörnchen reduziert und an der Aktivitätsstelle ausgefällt. Das elektrophoretische Bild der Zellpopulationen B und T veranschaulicht Abb. 2 Zur Auswertung des gewon-

nenen Zymogramms diente das Quick-Scan-Gerät (Abb. 3). Die angewandte Zellsuspension jeder einzelnen Fraktion enthielt $2 \times 10^6/\text{ml}$ Lymphozyten; zur Elektrophorese kamen je 5 Mikroliter dieser Suspension zur Anwendung.

ERGEBNISSE UND KONKLUSION

1. Die von PLUM und RINGOIR [8] beschriebene Methode läßt sich leicht reproduzieren; die mit der Separierung gewonnenen Zellen verfügen über eine befriedigende Vitalität.

TABELLE I
LDH-Isoenzymaktivität der T- und B-Lymphozyten bei reifen Säuglingen

Zellen	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5	Rosetten-Prozent (%)	
						T	B
Nicht separierte Zellen	8,5 ± 3,37 (10-5)	29,75 ± 3,3 (35-29)	38,5 ± 4,43 (44-30)	18,25 ± 1,8 (23-19)	3 ± 1,35 (7-2)	53	42
T-Fraktion, Rosetten-Sedimentation	20,92 ± 3,6 (25-17)	27,79 ± 2,1 (35-26)	30,8 ± 2,29 (36-29)	15,03 ± 1,14 (19-14)	6,27 ± 1,1 (8-4)	68	34
B-Fraktion, Rosetten-Sedimentation	6,93 ± 1,5 (8,7-2)	30,91 ± 2,1 (30-26)	36,06 ± 2,0 (40-35)	21,3 ± 1,36 (24-19)	3,5 ± 0,59 (7-2)	30	60
T-Fraktion, Nylon effluens	15,1 ± 1,7 (20-13)	34,7 ± 2,35 (37-26,2)	33,08 ± 1,9 (36-29)	21,73 ± 1,73 (23-17)	2,76 ± 0,2 (4-1,5)	59	28
B-Fraktion, Nylon adherens	1,45 ± 1,07 (3-0,5)	29,29 ± 2,2 (35-25)	43,3 ± 1,25 (48-40)	22,0 ± 2,34 (25-20,2)	3,71 ± 0,72 (7-3)	30	47

Durchschnitt %
Streuung des Durchschnitts ±
() = Grenzwerte

TABELLE II

LDH-Isoenzymaktivität der T- und B-Lymphozyten bei Frühgeborenen

Zellen	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5	Rosetten-Prozent (%)	
						T	B
Nicht separierte Zellen	13,1 ± 4	27,6 ± 3,35	24,5 ± 1,9	21 ± 2,2	12 ± 2,42	61	22
	(14-9) + 4,5	(36-25) + 2,15	(25-19) - 14	(26-19) - 2,75	(16-10) + 9,0	42	20
T-Fraktion, Rosetten-Sedimentation	13,8 ± 1,25	30,9 ± 1,98	32,4 ± 2,17	17,2 ± 1,85	7,3 ± 1,28	51	15
	(20-11,3) - 7,12	(39-29) + 2,11	(38-30) + 1,6	(22-12) + 1,9	(10-3) + 1,03	35	14
B-Fraktion, Rosetten-Sedimentation	11,1 ± 1,33	32,4 ± 2,21	29,4 ± 2,41	17,7 ± 1,43	9,6 ± 1,55	10	23
	(17 ± 10) + 4,17	(34-26) + 1,49	(36-27) - 6,6	(23-16) - 3,6	(12-6) + 6,1	31	18
T-Fraktion, Nylon effluens	17,92 ± -	31,2 ± 1,30	28,93 ± 2,15	17,0 ± 1,33	3,62 ± 0,87	46	7
	(23-15) + 2,82	(37-28) + 0,5	(37,6-26) - 4,15	(23-12) - 2,73	(7-4) + 0,86	38	12
B-Fraktion, Nylon adherens	10,4 ± 1,86	30,26 ± 1,36	35,55 ± 1,85	16,56 ± 1,01	6,78 ± 1,36	20	14
	(11-6,8) + 8,95	(34-28,1) + 3,91	(43-30) - 7,8	(20-15) - 5,44	(10,8-2) + 3,07	7	33
						28.	Gestationswoche
						32.	

Durchschnitt %

Streuung des Durchschnitts ±

() = Grenzwerte

Abweichung: in Vergleich mit den Kontrollmustern (absolute Zahlen)

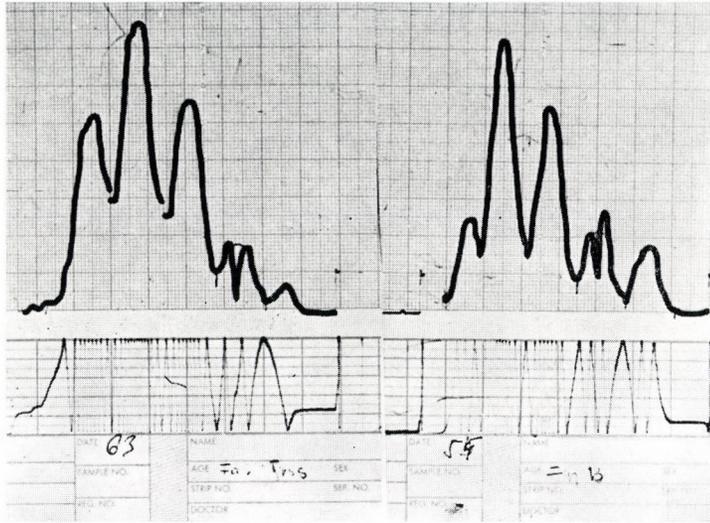


ABB. 3. Links: T-Zellen, rechts: B-Zellen

2. Da die LDH-1 Isoenzymaktivität der T-Zellen gesunder, reifer Neugeborenen im Vergleich zu den entsprechenden Werten der B-Zellen signifikant höher ist, kann die Separierung wahrscheinlich auch auf diese Weise durchgeführt werden.

3. Interessanterweise lag die LDH-1 Isoenzymaktivität der B-Zellen der Frühgeborenen höher als die der reifen Neugeborenen

4. In den Lymphozyten der Frühgeborenen war die Aktivität beider Zellpopulationen, vor allem aber die der LDH-5 Fraktion der B-Zellen erhöht.

Die ausführliche Darstellung unserer Daten ist in Tabellen I und II ersichtlich.

Unsere Untersuchungen erlauben die Feststellung, daß die Bestimmung der LDH-Isoenzyme zur Separierung der T- und B-Lymphozyten mit den Rosettenmethoden brauchbare ergän-

zende Daten liefert und auch über die Anwesenheit der T- und B-Zellen in jenen Reifep perioden, in denen die Entwicklung der Oberflächenmarker noch nicht beendet ist, eine Aufklärung bietet. Die Methode eignet sich zum weiteren Nachweis der sich in der fötalen Periode differenzierenden Zellen.

LITERATUR

1. BIANCO, C., PATRICK, R., NUSSENZWEIG, V.: A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. *J. exp. Med.* **132**, 702 (1970).
2. BROWN, G., GREAVES, M. F.: Cell surface markers for human T and B lymphocytes. *Europ. J. Immunol.* **4**, 302 (1974).
3. COOPER, M. D., KEIGHTLY, R. G., WU, L. F., LAWTON, A. R.: Developmental defects of T and B cell lines in humans. *Transplant. Rev.* **16**, 51 (1973).
4. DICKLER, H. B., KUNKEL, H. G.: Interaction of aggregated gamma-globulin with B-lymphocytes. *J. exp. Med.* **136**, 191 (1972).

5. JONDAL, M., HOLM, G., WIEGZELL, H.: Surface markers on human T- and B-lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J. exp. Med.* **136**, 207 (1972).
6. JULIUS, M. H., SIMPSON, E., HERZENBERG, L. A.: A rapid method for isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Europ. J. Immunol.* **3**, 645 (1973).
7. LAWTON, A. R., SELF, K. S., ROYAL, S. A., COOPER, M. D.: Ontogeny of B-lymphocytes in human fetus. *Clin. Immunol. Immunopath.* **1**, 84 (1972).
8. PLUM, J., RINGOIR, S.: A characterisation of human B- and T-lymphocytes by their lactate dehydrogenase isoenzyme pattern. *Europ. J. Immunol.* **5**, 871 (1975).
9. RABINOWITZ, Y., DIETZ, A. A.: Malic and lactic dehydrogenase isoenzymes of normal and leukemic leukocytes separated on glass bead columns. *Blood* **29**, 182 (1967).
10. RINGOIR, S., PLUM, J.: LDH isoenzymes of human T- and B-lymphocytes. *Clin. chim. Acta* **60**, 379 (1975).
11. ROSS, G. D., RABELLINO, E. M., POLLEY, M. J., GREY, H. M.: Combined studies of complement receptor and immunoglobulin-bearing cells and sheep erythrocyte rosette-forming cells in normal and leukemic human lymphocytes. *J. clin. Invest.* **52**, 377 (1973).
12. ROSS, G. D., POLLEY, M., RABELLINO, E. M., GREY, H. M.: Two different complement receptors on human lymphocytes. *J. exp. Med.* **138**, 798 (1973).
13. SHEVACH, E. M., HEBERMAN, R., FRANK, M. M., GREEN, I.: Receptors for complement and immunoglobulin on human leukemic cells and human lymphoblastoid cell lines. *J. clin. Invest.* **51**, 1933 (1972).
14. STARKWEATHER, W. H., SPENCER, H. P., SCHOCK, H. K.: The lactate dehydrogenases of hemopoietic cells. *Blood* **28**, 860 (1966).
15. STORCH, H.: Immunenzymtechnik. *Z. ges. inn. Med.* **27**, 589 (1972).
16. WYBRAN, J., FUDENBERG, H. H.: How clinically useful is T and B cell quantitation? *Ann. intern. Med.* **80**, 765 (1974).

Prof. Dr. L. KARMAZSIN

Pf. 32

H-4012 Debrecen, Hungary