

Laser erkennen kranke Zellen

Günter Valet

Der Einsatz von Lasern in der Zytometrie erlaubt grundlegend neue Einblicke in biochemische Funktionsabläufe komplexer Zellsysteme. Selbstlernende Analyseprogramme erkennen Krankheiten in einem frühen Stadium.

Biologische Zellen sind als mikroskopisch kleine Grundbausteine lebender Organismen in Körperorganen zusammengefaßt. Dort sind sie zu einer Vielzahl biochemischer Stoffwechsellvorgänge befähigt, deren systematische Abweichung zu Krankheiten führen kann.

Körperorgane bestehen aus einem von Organ zu Organ unterschiedlichen Gewebe zahlreicher Zellarten. Ihre Vielfalt läßt sich durch Fixierung und Anfärbung der kontrastarmen Biomolekülstrukturen mit geeigneten Chemikalien mikroskopisch darstellen. Für die Erhebung biochemischer Daten müssen die Gewebe allerdings meist homogenisiert, das heißt zellzerstörend aufgearbeitet werden. Dies kann zu einer Vermischung der Inhalte unterschiedlicher Zellarten sowie zur Veränderung der Mikroumgebung von Biomolekülen führen.

Die Mikroskopie bietet den Vorteil, morphologische Zellstrukturen detailliert zu erfassen. Nachteile ergeben sich bei der vergleichsweise schwierigen Quantifizierung biochemischer Eigenschaften und beim hohen Zeitaufwand. Biochemische Untersuchungen sind dagegen meist schneller und mit hoher Genauigkeit durchführbar. Allerdings können Schwierigkeiten bei der Interpretation der Resultate auftreten, da bei Veränderungen biochemischer Eigenschaften beispielsweise nicht ohne weiteres entscheidbar ist, ob sich alle Zellen geringfügig oder ein bestimmter Zelltyp sehr deutlich verändert hat.

Krankheiten entstehen durch die Veränderung biochemischer Vorgänge in Zellsystemen und Organen. Die genaue Erfassung

biochemischer Prozesse in komplexen Zellsystemen ist deshalb von erheblicher praktischer Bedeutung. Würde man die jeweils relevanten Veränderungen kennen, so sollte sich sowohl die Diagnose als auch die Prognose, das heißt die zukünftige Entwicklung von Krankheitsvorgängen beim Einzelpatienten, viel besser erheben lassen, als dies mit den heute üblichen biochemischen Messungen in Blutplasma, Blutserum oder Urin möglich ist. Deren Resultate stellen nur ein indirektes Abbild der Vorgänge dar. Einmal manifestieren sich nicht alle zellulären Veränderungen in diesen Körperkompartimenten, zum anderen werden die Zellinhaltsstoffe im Verlauf von Krankheiten in etwa 6 Liter Blutvolumen bzw. in über 10 Liter Extrazellulärflüssigkeit freigesetzt. Sie liegen also hoch verdünnt und

möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze biochemischer Methoden vor. Weiterhin können sie schnell über Niere oder Galle ausgeschieden oder sekundär metabolisch verändert werden.

Prinzip der Laserdurchfluß-Zytometrie

Die Laserdurchfluß-Zytometrie als moderne Untersuchungstechnik vereint in hohem Maße die Vorteile mikroskopischer und biochemischer Methoden. Sie wird deshalb zunehmend zum unentbehrlichen Werkzeug für die Vermessung biochemischer Vorgänge in Einzelzellen im Rahmen der Erkennung und Behandlungsüberwachung von Krankheiten. Sie ist darüber hinaus aber auch für die biochemische Charakterisierung von Zellsystemen im Forschungsbereich von erheblichem Interesse [1].

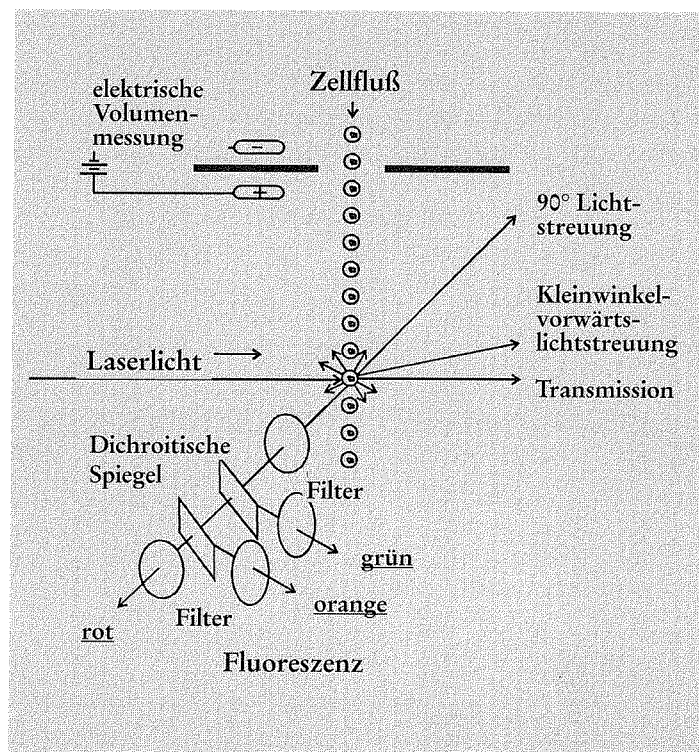


Abb. 1. Schematische Darstellung eines Durchflußzytometers.

Das Meßgut für die Laserdurchfluß-Zytometrie sind Einzelzellsuspensionen, wie sie im Blut bereits vorliegen oder sich durch mechanische bzw. enzymatische Vereinzelung aus Geweben gewinnen lassen. Die Zellen werden mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen zur Erfassung bestimmter Biomoleküle oder Zellfunktionszustände spezifisch angefärbt und zur Messung in ein Durchfluß-Zytometer eingesaugt. Nach hydrodynamischer Fokussierung des Probenstrahls auf 3 bis 6 μm Durchmesser passieren sie einzeln die Meßzone der Durchfluß-Zytometerkammer (Abbildung 1). Hier beträgt die Flußgeschwindigkeit der Zellen je nach Instrument zwischen 1 und 10 m/s.

In der Meßzone kann zum einen das Zellvo-

lumen aus der Widerstandsänderung beim Durchtritt der nichtleitenden Zellen durch eine enge zylindrische Meßöffnung auf elektrischem Wege bestimmt werden. Zum anderen entstehen zellbedingte Lichtsignale beim Passieren der 20 µm langen Beleuchtungsstrecke eines quer zur Flußrichtung auf den Probenstrahl fokussierten Laserstrahls. Dieser ca. 20 x 100 µm große elliptische Fokusbereich wird durch Verkleinerung des ursprünglich etwa 1,5 mm im Durchmesser betragenden Laserstrahl mit gekreuzten Zylinderlinsen erzeugt.

Die Kurzachsenbeleuchtung (lange Achse des Fokus senkrecht zur Flußrichtung) wird häufig gewählt, um bei geringen Bahnschwankungen des Probenstrahls möglichst gleichbleibende Lichtintensität zu gewährleisten. Allerdings wird hierbei nicht die höchstmögliche Empfindlichkeit erreicht, da die Verweildauer der Zellen im Licht im Vergleich zur Langachsenbeleuchtung nur ein Fünftel der maximal möglichen Zeit beträgt. Bei guter Bahnstabilisierung in der Meßkammer und Einstellung eines dünnen Meßstrahls ist deshalb die Langachsenbestrahlung vorzuziehen.

Die Verweildauer der fluoreszenzgefärbten Zellen im Laserstrahl ist für die je Farbstoffmolekül ausgesandte Photonenanzahl sehr wesentlich. Bei einer Zellflußgeschwindigkeit von 1 m/s und einer mittleren Fluoreszenzanregungs- und Emissionsdauer von etwa 6 ns pro Molekül befinden sich die gefärbten Zellen bei 20 µm Beleuchtungsweg für etwa 20 µs im Laserlicht. Das heißt, es können je Molekül maximal etwa 3300 Fluoreszenzphotonen ausgesandt werden, bei 100 µm Beleuchtungsweg dagegen bereits 16500 Photonen.

Obwohl die Fokussierung des Laserlichtes (5 bis 50 mW) von einem runden Strahl mit ca. 1500 µm Durchmesser zu einem elliptischen Fleck von 100 x 20 µm² mit einer erheblichen Zunahme der Photonendichte des Anregungslichtes im Meßbereich verbunden ist, kommt es noch nicht zur Fluoreszenz sättigung, also zur simultanen Anregung aller Farbstoffmoleküle in einer Zelle. Die Zerstörungsgrenze typischer Farbstoffmoleküle, die in der Größenordnung von ca. 150 000 Anregungsvorgängen liegt, wird wegen der kurzen Beleuchtungszeit nicht erreicht. Auch die Zellen werden beim Meßvorgang nicht nachweislich geschädigt.

Typische Fluoreszenzanregungs-Wellenlängen für die Durchflußzytometrie sind 488 nm

sowie 351 nm und 364 nm aus Argon-Ionenlasern, 633 nm aus HeNe-Lasern und 325 nm bzw. 442 nm aus HeCd-Lasern. Die beim Zelldurchtritt durch den Laserstrahl ausgesandten Lichtsignale betreffen die Kleinwinkel (1 bis 5°) und 90° Lichtstreuung. Sie sind ein Maß für Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit einer Zelle sowie für deren innere Strukturiertheit.

Zusätzlich wird das gesamte emittierte Fluoreszenzlicht jeder Zelle über metallbedampfte, farbdiskriminierende (dichroitische) Interferenzspiegel sowie optische Bandpaßfilter simultan in einzelne Fluoreszenzfarbreiche zerlegt und deren jeweilige Lichtintensität von Fotoröhren ausgemessen. Das Licht jeden Farbbereiches entspricht hierbei einer eigenen biochemischen Eigenschaft. Die Signale des elektrischen Volumens sowie von Lichtstreuung und Fluoreszenz werden sodann verstärkt. Der maximale Impulshöhenwert oder der integrierte Impulsflächenwert wird mittels schneller Analog-Digital-Wandler mit einer Auflösung von 4096 Meßstufen (12 bit) in eine digitale Maßzahl verwandelt. Die mit einer Meßfrequenz von etwa 1000 bis 2000 Zellen/s anfallenden Maßzahlen der Zelleigenschaften (Parameter) können entweder sofort interaktiv auf einem Bildschirm als Ein-, Zwei- und Dreiparameterverteilungen dargestellt oder in Form einer Listendatei in einen Auswertecomputer übertragen bzw. auf einem Datenträger abgespeichert werden.

Auswertung durchflußzytometrischer Messungen

Für die Auswertung werden die gemessenen Zelleigenschaften aus der Listendatei meist als Zweiparameterverteilungen in beliebiger Eigenschaftskombination dargestellt und ausgezeichnet. Interessierende Bereiche umgibt man mit Auswertefenstern, deren Ordinaten- und Abszissenmittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten (= Standardabweichung x 100/Mittelwert (%)) und prozentualen Anteile an der gemessenen Gesamtzellzahl sich zur Beurteilung ausdrücken oder besser in einer Datenbank abspeichern lassen.

Bei jeder Messung werden heute bis zu acht Eigenschaften pro Zelle ermittelt. Diese Information übersteigt bei der üblichen Aufteilung der Zellproben in mehrere Unterproben, die zudem mit verschiedenen Farbstoffkombinationen angefärbt werden, sehr schnell

die Fassungs- und Interpretationskraft des menschlichen Gehirns. Dies gilt vor allem bei heterogenen Zellsuspensionen wie im Immun- oder blutbildenden System bzw. bei Untersuchungen zur Krebszellenentstehung oder für den Krebszellennachweis.

Der Versuch einer deduktiven Meßdateninterpretation mit etablierten selbstlernenden Verfahren, wie Clusteranalyse [2, 3], neuronale Netzwerke [4], Expertensysteme und Hauptkomponentenanalyse, führte bisher nicht zu einer für Routinezwecke brauchbaren Lösung.

Selbstlernende Datenklassifizierung

Das nachstehend beschriebene, selbstlernende Klassifizierungsverfahren wurde induktiv aus der Meßpraxis heraus entwickelt [5]. In einer Lernphase werden die Meßdaten (Tabelle 1) von normalen und bekanntermaßen abnormen Proben kolonnenweise in einer oder mehreren Datenbanken abgespeichert. Zu diesen Parametern zählen zum Beispiel Zellvolumen, intrazellulärer pH-Wert, Transmembranpotential, die Expression einer bestimmten Antigeneigenschaft oder die Zahl der gemessenen Zellen. Aus allen Meßwerten der Normalproben jeder Datenkolonne werden sodann zum Beispiel die 10 % und 90 % Perzentilwerte der Normalproben bestimmt. Die beiden Perzentile stellen diejenigen Meßwerte dar, bei denen von der unteren Seite der Verteilung her kommend 10 % bzw. 90 % der Anzahl aller Meßwerte der Normalproben eingeschlossen sind (Abbildung 2).

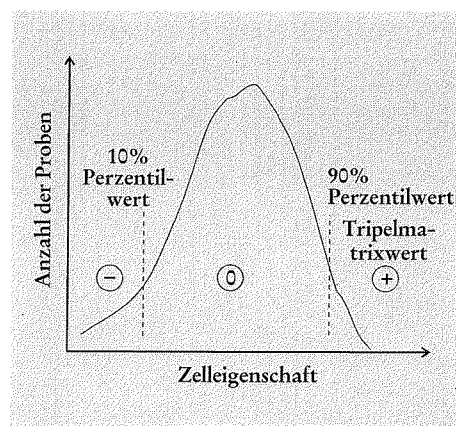


Abb. 2. Lage der Perzentilwerte und der Zuordnung der Tripelmatrixparameter -, 0 und + zu den drei durch die Perzentilwerte erzeugten Bereichen einer Werteverteilung.

Die Bestimmung der optimal trennscharfen Perzentilwert-Kombinationen, wie 5 bis 95 %, 10 bis 90 %, 15 bis 85 % oder 20 bis 80 %, kann durch programmgesteuerte Iteration erfolgen. Das Optimum bei allen bisher untersuchten Klassifizierungsproblemen war bei Perzentilkombinationen zwischen 10 bis 90 % oder 15 bis 85 % erreicht. Höhere oder niedrigere Kombinationen führten zu einem Abfall der Klassifizierungseffizienz. Nachdem der optimale untere und obere Perzentilwert bestimmt ist, wird die gesamte Datenkolonne in eine Tripelmatrix umgewandelt. Dabei bezeichnet man alle Zahlenwerte jeder Datenkolonne innerhalb der beiden optimalen Perzentilwerte mit 0, solche unterhalb des unteren Perzentilwertes mit - und solche oberhalb des oberen Perzentilwertes mit +. Nach dieser Wertetransformation optimiert das Computerprogramm, unter Verwendung der bekannten klinischen Klassifizierung jeder Lernsatzprobe, die Konfusionsmatrix für die angestrebten Klassifizierungszustände gerade so, daß es in deren Diagonalfeldern möglichst hohe Erkennungswerte erzielt. Wenn bei allen Diagonalfeldwerten 100 % erreicht wird, hat das selbstlernende Klassifizierungsprogramm alle normalen und abnormen Proben richtig klassifiziert.

Um das optimale Klassifizierungsergebnis zu erreichen, werden bei der iterativen Optimierung auf genau festgelegte Weise jeweils einzelne oder Kombinationen mehrerer Datenbankkolonnen vorübergehend weggelassen. Verbessert sich das Klassifizierungsergebnis mit den verbliebenen Datenkolonnen, betrachtet das Programm die weggelassenen Datenkolonnen endgültig nicht mehr weiter. Im

Verlauf der Optimierung lassen sich auf diese Weise alle Datenkolonnen eliminieren, die nicht zur Verbesserung des Klassifizierungsergebnisses beitragen.

Nach erfolgter Optimierung wird für jeden Klassifizierungszustand des Lerndatensatzes eine Referenzklassifizierungsmaske (Referenzmaske) bestimmt. Sie enthält für jede verbliebene Datenkolonne den bei den Lernproben am häufigsten angetroffenen Tripelmatrixwert. Die Referenzmasken weisen für jeden Klassifizierungszustand eine unterschiedliche Folge von Null-, Plus- und Minuszeichen auf. Jetzt läßt sich also genau ermitteln, welche Meßparameter für jede Klassifizierung in welcher Richtung vom Normalzustand abweichen.

Dies ist für die Erklärung abnormer Zellzustände von großem Interesse. In der Referenzmaske steckt nämlich im übertragenen Sinn die verpackte Information über die Nadel im Heuhaufen, das heißt über das krankheitsrelevante Muster der biochemischen Veränderungen, dessen Entstehung letztendlich durch einen hypothetischen Mechanismus erklärt werden muß.

Neue, unbekannte Proben klassifiziert man nach der Lernphase auf eine Weise, daß für jede in den Referenzmasken enthaltene Datenkolonne der Proben-Tripelmatrix (Probenmaske) die positionelle Übereinstimmung mit allen Referenzmasken des Lernsatzes geprüft wird. Die unbekannte Probe wird als der Zustand klassifiziert, mit dessen Referenzmaske sich die höchste positionelle Koinzidenz der Probenmaske erzielen läßt.

Die Praxis zeigt, daß das beschriebene Verfahren fehlertolerant ist und auch bei vergleichsweise geringer Übereinstimmung der Probenmaske mit der Referenzmaske meist immer noch eindeutige Klassifizierungsergebnisse liefert. Besteht eine gleich hohe Übereinstimmung der Probenmaske mit mehreren Referenzmasken, so werden mehrere Klassifizierungen ausgegeben. Mehrfachklassifizierungen können Anzeichen für Übergangszustände, für zu kleine Lerndatensätze oder für nur gering diskriminante Datensätze darstellen.

Praktische Anwendungen

DNS-Zytometrie

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Zellkern ist Träger der Erbinformation. Die DNS menschlicher Zellen ist in 46 einzelnen Chromosomen verpackt. Beim Eintritt der Zelle aus der G0/G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase beginnt die Verdoppelung der zellulären DNS und der Chromosomen. Nach Passieren der G2-Phase verteilen sich die verdoppelten Chromosomen während der Mitosephase durch Auseinanderziehen der Mitosespindel auf zwei Zellen.

Die Anteile der Zellzyklusphasen einer Zellpopulation kann nach Anfärbung der zellulären DNS mit einem spezifischen Farbstoff auf schnelle Weise mit einer durchflußzytometrischen Messung (Abbildung 3a) abgeschätzt werden. Bei krankhafter, maligner Entartung weisen die Tumoren häufig genetische Instabilitäten auf. Diese wirken sich in Chromosomenbrüchen, Versetzung von Chromosomenstücken auf andere Chromosomen sowie in einer falschen Verteilung der Chromosomen bei der Zellteilung auf die Tochterzellen aus. Bei Zellen mit falscher Chromosomenzahl entspricht die gesamte DNS-Menge nicht dem erwarteten Normalwert. Die Zellen sind DNS-aneuploid, was sich mit Hilfe durchflußzytometrischer Messung am Auftreten von Kurvengipfeln an unerwarteten Stellen der DNS-Verteilung auf einfache Weise feststellen läßt [6] (Abbildung 3b).

Die zunehmende Sensitivität von Instrumentation und Färbung erlaubt über die Vermessung der Gesamt-DNS hinaus auch die Erfassung einzelner Chromosomen. Die Chromosomen werden nach Blockierung der Zellteilung, zum Beispiel durch das Mitosespindelgift Colchizin der Herbstzeitlosen,

Tabelle 1. Zellbiochemie mit Hilfe der Durchflußzytometrie.

Zellstruktur	Zellfunktion	Meßwert
DNS/RNS	Stoffwechsel	intrazellulärer pH-Wert
Proteine	Anregung	Calcium
Kohlenhydrate	Energie	Transmembran- und Mitochondrien-Potential
Lipide		
Antigene	Oxidation	O_2^- , H_2O_2 , freie Radikale
Hormonrezeptoren	Reduktion	Glutathione, freie Protein-SH-Gruppen
Fluoreszente In-situ-Hybridisierung	Enzyme	Esterasen, Peroxidasen, Proteasen, Glucosidasen, Phosphatasen etc.

zunächst angereichert. Nach osmotischer Zerstörung der Zellmembran mitotischer Zellen durch Einbringung in eine hypotone Pufferlösung läßt sich die entstehende Chromosomensuspension mit einem DNS-Farbstoff anfärben und durchflußzytometrisch vermessen (Abbildung 4).

Funktionszytometrie

Patienten kommen nach Operationen häufig zur sorgfältigen Überwachung der Körperfunktionen auf die Intensivstation. Vor allem nach schweren Verletzungen oder langdauernden Operationen ist der Organismus geschwächt und in besonderem Maße infektions- und schockgefährdet. Lokale Infektionen breiten sich dann teilweise sehr schnell aus. Sie überschwemmen den gesamten Organismus. Hierbei kann es zu einer Überforderung der Granulozyten, einer Untergruppe der weißen Blutkörperchen, kommen. Granulozyten tragen normalerweise durch Phagozytose, das heißt Auffressen und Verdauen von Mikroorganismen, in erheblichem Maße zur Infektabwehr bei. In solchen Fällen nimmt die Phagozytose- und Verdauungsrate der Granulozyten für Mikroorganismen plötzlich ab, außerdem schütten die Granulozyten große Mengen proteolytischer und oxidativ wirkender Enzyme sowie freie Radikalmoleküle aus, die zu erheblichen Gewebeschädigungen in der Lunge oder anderen Organen führen können. Wird in diesem Zustand nichts unternommen, stirbt der Patient an den Schäden durch die Bakterienvermehrung (Sepsis). Tötet man die Bakterien durch wirksame Antibiotika schnellstmöglich ab, so setzen sie beim Absterben im Körper große Mengen toxischer Substanzen frei. Diese können entweder den Herzmuskel oder die glatten Muskelzellen zur Regulation des Strömungsquerschnittes der Blutkapillaren in der Peripherie irreversibel lähmen. Zwischen 10 bis 30 % der erkrankten Patienten versterben an der Folge solcher Komplikationen.

Mit der neuen Möglichkeit, verschiedene Funktionseigenschaften lebender Zellen kurz nach der Zellentnahme aus dem Organismus noch nahe am In-vivo-Zustand zu bestimmen, wurden die Freß- und Verdauungsfähigkeit der Granulozyten für lebende Bakterien untersucht (Abbildung 5a, b). Zusätzlich wurde die Regulation des Zellvolumens und des intrazellulären pH-Wertes menschlicher Granulozyten von Risikopatienten der Intensivstation während der Freßvorgänge erfaßt (Abbildung 5c, d). Mit dem beschriebenen

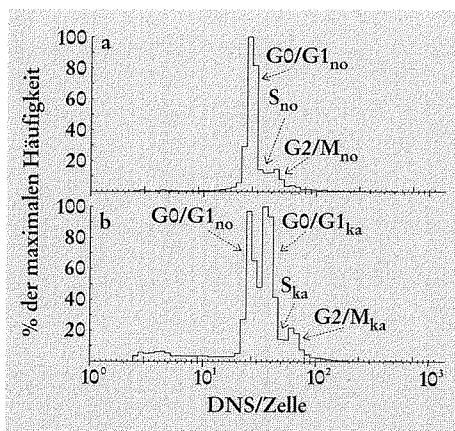


Abb. 3. DNS-Verteilung toter Zellen aus a) gesundem (no) Lungengewebe und b) einem Lungenkarzinom (ka) desselben Patienten nach Anfärbung der DNS. In der DNS-Verteilung der Karzinomprobe lassen sich deutlich Zellen mit zuviel DNS in der Ruhephase (G0/G1_{ka}) der DNS-Synthesephase (S_{ka}) und in der Vorbereitungs- und Teilungsphase (G2/M_{ka}) der Zellen feststellen.

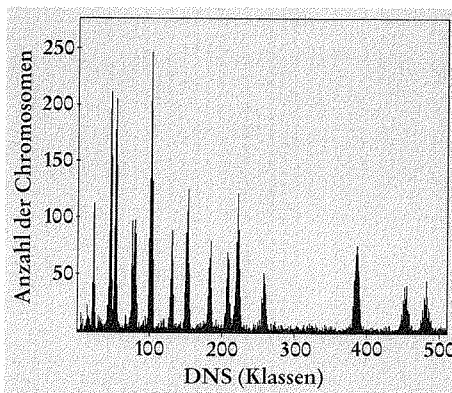


Abb. 4. DNS-Verteilung von Chromosomen aus Eierstockzellen des chinesischen Hamsters.

selbstlernenden Verfahren zeigte sich, daß es aus der Kenntnis der Reaktionslage der Granulozyten möglich ist, die Gefahr von Komplikationen bereits zwei bis drei Tage vor ihrem Auftreten zu erkennen (Tabelle 2). Dies ist von hohem praktischem Interesse, da bisher klinische oder biochemische Möglichkeiten zur Früherkennung solcher Gefahrenzustände fehlten [7].

Immunphänotypisierung

Die gegenwärtig am häufigsten durchgeführten flußzytometrischen Messungen in Kliniken betreffen die Immunphänotypisierung von Blutlymphozyten. Diese gehören, wie die Granulozyten, zur Gruppe der weißen Blutkörperchen und sind für die humorale Immunität mittels Antikörperbildung und die Ausprägung zellulärer Immunität u. a. durch Bildung zytotoxischer Zellen verantwortlich. Verschiedene Lymphozyten-Subpopulationen unterscheiden sich in der Ausbildung spezifischer Zellmembraneigenschaften, den sogenannten CD-Antigenen, von denen bis heute etwa 100 verschiedene bekannt sind. Antigene sind Biomoleküle, wie manche Proteine oder hochmolekulare Zuckerstrukturen, sowie vielfach auch Medikamente, Tierhaare, Pollen u. a., die in einem fremden Organismus zur Antikörperbildung oder zur Ausbildung einer zellulären Immunabwehr führen. Antigene auf der Zellmembran lassen sich mittels Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern an die Zellen quantitativ erfassen.

So erschien es beispielsweise interessant, Lymphozytenmembran-Antigene bei trainierten Radrennfahrern zu messen [8, 9]. Es

Tabelle 2. Dreitageprognose des Krankheitszustandes von Intensivpatienten aus Granulozyten-Funktionseigenschaften mittels selbstlernender Datenauswertung.

Klinische Diagnose 3 Tage später (Patientenzahl in Klammern)	Voraussage der automatischen Auswertung			
	Posttraumatischer Schock	Sepsis	Übergangszustand	Stabiler Zustand
Posttraum. Schock (8)	100	0	0	0 %
Sepsis (12)	0	92	8	0 %
Übergangszustand (94)	4	7	87	1 %
Stabiler Befund (23)	0	4	0	96 %

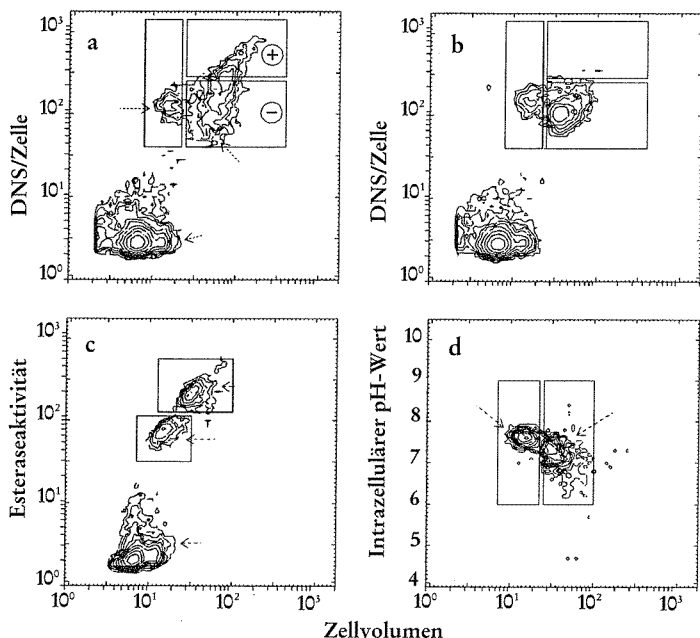


Abb. 5. Bakterienfressversuch (Phagozytose) a) und Kontrollversuch b) menschlicher Granulozyten nach Anfärbung mit einem DNS-Farbstoff, der die DNS der lebenden menschlichen aber auch der aufgefressenen Bakterien erfasst. c) Esteraseaktivität und d) intrazellulärer Säuregrad (pH-Wert) in menschlichen Lympho- und Granulozyten des peripheren Blutes nach Anfärbung mit einem Enzymaktivitäts- und pH-Indikatorfarbstoff. Die Konturlinien verbinden Stellen gleicher Zellhäufigkeit.

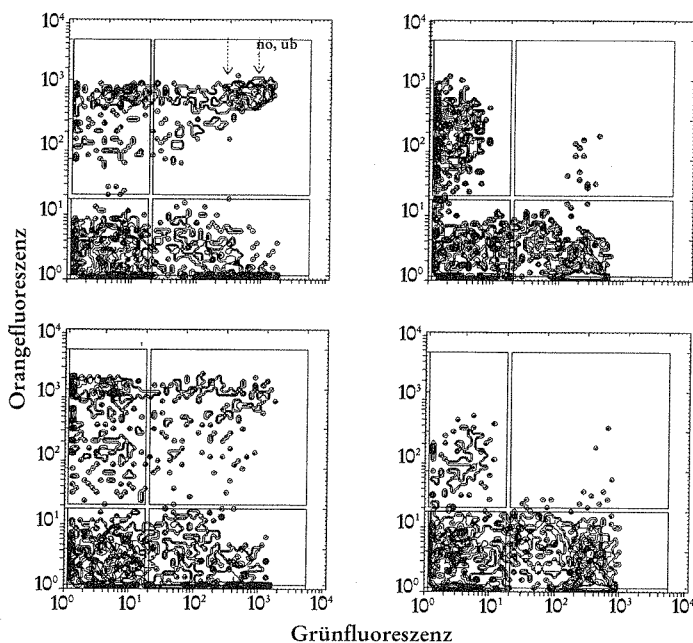


Abb. 6. Nachweis verschiedener Zelloberflächen-Antigene bei Lymphozyten des Menschen (Immunphänotypisierung) mit vier Antikörpern unterschiedlicher Antigenerkennung und Fluoreszenzemission. Trotz zahlreicher kleiner Änderungen in der Expression zellulärer Antigene bei verschiedenen Menschen erkennt das Programm die erhöhte Ausprägung (üb) der CD45RO-Eigenschaft bei der überwiegenden Mehrzahl der Radrennfahrer im Vergleich zur Normalausprägung (no) als wesentlichste Eigenschaft.

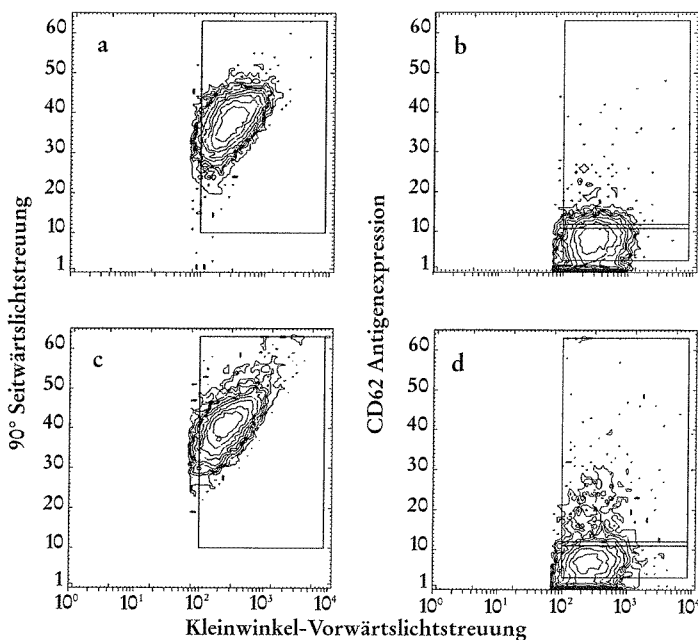


Abb. 7. Vorwärts- gegen Seitwärtslichtstreuung sowie Vorwärtslichtstreuung aufgetragen gegen die Ausprägung des CD62-Aktivierungs-Antigens auf menschlichen Blutplättchen einer Normalperson a, b) und eines Herzinfarkt-Risikopatienten c, d). Bei Risikopatienten können sich zwischen 2 und 10 % aller Blutplättchen im Aktivierungszustand befinden.

ben die in Abbildung 6 beispielhaft gezeigten Phänotypisierungs-Verteilungen (mit Hilfe der üblicherweise durchgeführten Auswertung der Prozentsätze von Zellen in den jeweils vier Auswertefenstern) praktisch keine Korrelation mit dem Auftreten des Übertrainingszustandes.

Die Neuauswertung derselben Daten mit dem selbstlernenden Programm, bei dem zusätzlich die Intensitäten der Antigenexpression ausgewertet wurden, zeigte dagegen erstaunlicherweise nach der Lernphase eine fast 100 %ige Identifizierungsrate (Tabelle 3). Sie beruht, wie in der Lernliste des Programms festzustellen ist, auf einer einzigen, konsistent bei allen übertrainierten Rennfahrern erhöhten Antigenexpression (CD45RO). Neben diesem eindeutigen Resultat im Einzelfall bedeutet dies in Zukunft auch, daß vier der fünf bisherigen Messungen für diese Problemstellung nicht mehr durchgeführt werden müssen bzw. sich durch informativere Messungen ersetzen lassen.

hatte sich nämlich gezeigt, daß diese Sportler bei zu hohen Trainingslasten in einen Übertrainingszustand kommen können, der mit physischem Leistungsabbruch und erhöhter

Infektionsneigung infolge mangelnder Immunabwehr einhergeht. Nach ausgedehnten Messungen der Antigenexpression bei einer größeren Gruppe von Radrennfahrern erga-

Die vielparametrische Auswertung ist auch für

die Erkennung von Herzinfarkt-risikopatienten auf Grund von Antigenmessungen bei Blutplättchen von erheblichem Interesse. Blutplättchen sind 2 bis 3 µm große Zellfragmente der Megakaryozyten des Knochenmarks. Sie verschließen bei Gefäßverletzung, zusammen mit Proteinfaktoren des Blutplasmas vermittels Blutgerinnung, das Blutgefäßsystem.

Die eigentliche Ursache für einen Herzinfarkt liegt zunächst bei der Verengung der den Herzmuskel mit Sauerstoff und Nahrungsstoffen versorgenden Herzkranzarterien. Die allgemeinen Risikofaktoren, wie Übergewicht, Rauchen, hohe Cholesterinwerte und hoher Blutdruck, weisen bei betroffenen Personen auf ein statistisch gesehen höheres Risiko hin. Sie erlauben aber keine individuelle Risikoabschätzung, weil die Risikoparameter zu weit vom eigentlichen Infarktmechanismus entfernt sind.

Die Auslöser des Herzinfarktes sind nämlich in den meisten Fällen die Blutplättchen, welche durch die lokale Beschleunigung des Blutflusses in verengten Herzkranzarterien zunächst in einen biochemischen Alarmzustand geraten. Bei anhaltendem Alarm kommt es eines Tages zum Auslösungszu-

stand und damit zur Ausbildung eines das Gefäß verschließenden Blutplättchenthrombus, welcher den eigentlichen Herzinfarkt bewirkt.

Der Beginn des Alarmzustandes kann am Erscheinen bestimmter Membranantigene (z. B. CD62, CD63) und Thrombospondin abgelesen werden. Systematische Messungen der Antigenexpression von Blutplättchen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ergaben bei konventioneller Datenauswertung statistisch signifikante Unterschiede der mittleren Antigenexpression zwischen Normalpersonen sowie nachgewiesenen Herzinfarkt-risiko- und Diabetespatienten. Diese reichten aber bei separater Auswertung jedes Antigens nicht zur individuellen Erkennung der abnormen Patienten aus [10, 11].

Läßt man das oben beschriebene Programm gleichzeitig aus allen Antigenen lernen, so wird eine hohe Einzelfall-Identifizierungsrate erreicht (Tabelle 4). In die Referenzmasken gehen dabei zelluläre Antigenexpressionen aus allen durchgeführten Messungen in etwa gleicher Weise ein. Die Reklassifizierungsliste eines Teils des Lernsatzes zeigt dabei die bereits erwähnte Fehlertoleranz des Programms. Trotz der nur teilweisen Überein-

stimmung der Probenmasken mit den Referenzmasken ergibt sich eine einheitliche Klassifizierung der Zellproben (Tabelle 5). Die Erkennung von Herzinfarkt-Risikopatienten ohne invasive Maßnahmen, wie eine Herzkatheteruntersuchung und vor allem im häufig symptomlosen Vorzustand, sind von erheblichem allgemeinem Interesse.

Sehr wichtig ist, daß die durchflußzytometrischen Klassifizierungsmasken unter bestimmten Voraussetzungen auch apparat- und laborunabhängig, das heißt konsensusfähig sind.

Ausblick

Die Entwicklung moderner Laserdurchfluß-Zytometer hat durch den raschen Fortschritt im optischen, elektronischen und informatischen Bereich, sowie unter Einsatz der hochintensiven Lichtfelder der modernen Lasertechnik, ganz neue Voraussetzungen für die Untersuchung biochemischer Prozesse in komplexen Zellsystemen geschaffen.

Die durchflußzytometrische Apparateentwicklung und Forschung hat darüber hinaus in ihrer vergleichsweise kurzen Entstehungsgeschichte weltweit zur Herausbildung bemerkenswert multidisziplinär zusammengesetzter Forschungsgruppen geführt. Das gemeinsame Interesse an der Aufklärung zellulärer Wirkmechanismen hat dabei zu einer Teilsynchronisierung der Anstrengungen in der zell- und molekularbiologisch, immunologisch, biochemisch, pathologisch, apparativ und klinisch orientierten Forschung auf diesem Gebiet geführt. Die dabei erzielten Fortschritte sind für die Gewinnung des biochemischen Verständnisses grundlegender zellulärer Prozesse, wie Zellteilung, Zellwachstum, Ausdifferenzierung zu funktionell spezialisierten Zellen sowie Zelltod für verschiedenste Forschungsbereiche, von wesentlicher Bedeutung.

Der zellulären Untersuchung menschlicher Proben wird in Zukunft angesichts der Komplexität biochemischer Vorgänge eine immer größere Bedeutung zukommen. Die Gründe hierfür liegen darin, daß der Aufbau naturadäquater molekularer Modellsysteme in Zellkulturen oder in zellfreien biochemischen Versuchssystemen in vielen Fällen nicht möglich ist, beziehungsweise daß ähnlich wie bei Tierversuchen häufig das Problem der Übertragbarkeit der Resultate auf die Situation beim Menschen besteht.

Tabelle 3. Erkennung des Übertrainingszustandes von Radrennfahrern durch Datenauswertung mit dem beschriebenen Programm. N = normal, O = Übertraining, 10 bis 90 % Perzentile der Normalproben.

Konfusionsmatrix		
Klinische Diagnose (Patientenzahl in Klammern)	Durchflußzytom. Klassifizierung	
	N	O
N (51)	94,1	5,9
O (21)	0	100,0

Tabelle 4. Automatische Erkennung abnormer Blutplättchen bei Herzinfarkt-risiko- und Diabetespatienten durch selbstlernende Datenauswertung. N = normale Thrombozyten, R = Infarkt-risiko-Thrombozyten, D = Diabetiker-Thrombozyten, 10 bis 90 % Perzentile der Normalproben.

Konfusionsmatrix			
Klinische Diagnose (Patientenzahl in Klammern)	Durchflußzytometrische Klassifizierung		
	N	R	D
N (17)	100,0	0	0
R (97)	1,0	95,9	3,1
D (14)	50,0	7,1	57,1

Demgegenüber können biochemische Veränderungen mit den modernen Methoden der Durchflußzytometrie direkt an den Zellen erkrankter Menschen nahe am In-vivo-Zustand in repräsentativer Weise beobachtet werden. Für die Patienten entstehen daraus in Anbetracht der äußerst geringen erforderlichen Zellmengen keine Mehrbelastungen.

Die Chromosomen-DNS-Verteilung der Abbildung 4 verdanke ich Herrn Dr. F. Otto, Fachklinik Hornheide, Münster. Der Lymphozytendatensatz wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. H. Gabriel, Sportmedizinisches Institut der Universität Saarbrücken

und der Thrombozytendatensatz von Herrn PD Dr. D. Tschöpe, Diabetesforschungsinstitut der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

Literatur

[1] M. R. Melamed, T. Lindmo, L. Mendelsohn (Hrsg.) Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss, New York 1990.
 [2] R. F. Murphy, Cytometry 6, 302 (1985).
 [3] S. Demers, J. Kim, P. Legendre, L. Legendre, Cytometry 13, (1992).

[4] D. S. Frankel, R. J. Olson, S. L. Frankel, S. W. Chisholm, Cytometry 10, 540 (1989).
 [5] G. Valet, M. Valet, D. Tschöpe, H. Gabriel, G. Rothe, W. Kellermann, H. Kahle, Ann. NY. Acad. Sci. 677, 233 (1993).
 [6] F. Liewald, F. Demmel, R. Wirsching, H. Kahle, G. Valet: Cytometry 11, 341 (1990).
 [7] G. Rothe, W. Kellermann, G. Valet, J. Lab. Clin. Med. 115, 52 (1990).
 [8] H. Gabriel, L. Schwarz, W. Steffens, W. Kindermann, Int. J. Sports Med. 13, 359 (1992).
 [9] H. Gabriel, A. Urhausen, W. Kindermann, Eur. J. Appl. Physiol. 65, 164 (1992).
 [10] D. Tschöpe, J. Esser, B. Schwippert, P. Rösen, B. Kehrel, H. K. Nieuwenhuis, F. A. Gries, Sem. Thromb. Hemostas. 17, 433 (1991).
 [11] D. Tschöpe, P. Spangenberg, J. Esser, B. Schwippert, B. Kehrel, R. Rösen, F. A. Gries, Cytometry 11, 652 (1989).

Tabelle 5. Reklassifizierung des Thrombozytenlernsatzes.

Klinische Diagnose	Abkürzung	Klassische Koinzidenz	Referenzmaske
Normale Thrombozyten	N	1,0	00000000
Infarktrisiko-Thrombozyten	R	1,0	++0++++
Diabetiker-Thrombozyten	D	1,0	00-00-0

Klinische Diagnose Patienten-Nr.	Durchflußzytom. Klassifizierung	Klassische Koinzidenz	Probenmaske
N...00101.....	N	0,88	000000-0
N...00102.....	N	1,00	00000000
N...00103.....	N	0,63	+00+000
N...00104.....	N	0,63	000+0-0
N...00105.....	N	0,88	000000+0
N...00106.....	N	0,63	0++000+0
N...00107.....	N	0,88	00000+00
N...00108.....	N	0,88	+0000000
N...00109.....	N	0,50	0-0-00-
N...00110.....	N	0,88	0000000+
N...00111.....	N	0,75	00+0000+
N...00112.....	N	1,00	00000000
N...00113.....	N	1,00	00000000
N...00114.....	N	1,00	00000000
N...00115.....	N	0,88	00000-00
N...00116.....	N	0,75	-00-0000
N...00117.....	N	0,63	++000+00
R...00136.....	R	0,63	++0+000
R...00137.....	R	0,88	++0+++0+
R...00138.....	R	0,63	+0-+0-+
R...00139.....	R	0,75	++-+0-+
R...00140.....	R	0,75	+++++0+



Der Autor:
 Günter Valet, geb. 1941 in München. Studium der Physik und Medizin an der TU beziehungsweise LMU in München; zahlreiche Auslandsaufenthalte, seit 1981 außerplanmäßiger Professor an der LMU, seit 1989 Leiter der Arbeitsgruppe Zellbiochemie am MPI für Biochemie in Martinsried.

Anschrift:
 Prof. Dr. Günter Valet, Max-Planck-Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Zellbiochemie, 82152 Martinsried.