

Immunhistochemische Bestimmung von mütterlicher und kindlicher Blutgruppe (AB0) an reifem Placentagewebe

I. Pedal¹, K. Kuhn² und J. Hülle¹

¹Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen, Nägelestraße 5,
D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

²Universitäts-Frauenklinik, Schleichstraße 4, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Immunohistochemical Demonstration of Maternal and Infantile Blood Groups (AB0) in Mature Placental Tissue

Summary. Using the indirect immunoperoxidase technique (PAP method), AB0 characteristics of mother and child were correctly identified in tissue specimens from 10 mature human placentas. In one case, a weak infantile A reaction was overlooked in the agglutination test but correctly identified by immunohistochemistry. In accordance with the weak expression of AB0 characteristics in cord blood, immunohistochemical labeling of infantile erythrocytes with monoclonal and human antibodies, as well as *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA I), was less pronounced than that of mature erythrocytes. Labeling of the chorionic vessel endothelium, in contrast to that of adult endothelial tissue, was negative with anti-A or anti-B but, regardless of the infantile blood group, pronounced with UEA I. Regular identification of the blood groups was possible in decomposed placental tissue stored at room temperature for 1 week, but not in tissue stored for 2 or more weeks.

Key words: Immunohistochemistry (PAP method), demonstration of maternal and infantile blood groups – Blood groups (AB0), immunohistochemical demonstration

Zusammenfassung. An Gewebeproben von 10 reifen menschlichen Placenten wurden mit indirekter Immunperoxidasetechnik (PAP-Methode) die AB0-Eigenschaften von Mutter und Kind fehlerfrei bestimmt. In einem Falle wurde ein schwach reagierendes kindliches A im Agglutinationstest übersehen, immunhistochemisch jedoch zutreffend erkannt. Entsprechend den schwach ausgeprägten AB0-Eigenschaften des Nabelschnurblutes zeigen kindliche Erythrocyten immunhistochemisch mit monoklonalen und humanen Antikörpern ebenso wie mit *Ulex europaeus*-Agglutinin I (UEA I) eine schwächere Markierung als reife Erythrocyten. Das Endothel der Zottengefäße wird durch Anti-A bzw. Anti-B im Gegensatz zu den Endothelien adulter Gewebe nicht markiert, zeigt jedoch unabhängig von

der kindlichen Blutgruppe eine starke Markierung mit UEA I. In bei Zimmertemperatur faulendem Placentagewebe ließen sich die Blutgruppen nach einer Woche immer, nach zwei Wochen jedoch nicht mehr regelmäßig bestimmen.

Schlüsselwörter: Immunhistochemie (PAP-Methode), Blutgruppen (AB0)-Bestimmung – Blutgruppen, AB0-Nachweis an Placentagewebe

An frischem und fäulnisverändertem Nierengewebe läßt sich mit der von Sternberger et al. (1970) entwickelten Peroxidase-Antiperoxidase-Technik die Blutgruppenzugehörigkeit im AB0-System zuverlässig bestimmen (Pedal und Hülle 1984; Pedal und Baedeker 1985; Literaturübersicht siehe dort). Unter zwei Gesichtspunkten erschien es sinnvoll, entsprechende Untersuchungen an menschlichem Placentagewebe durchzuführen:

Zum einen ist die Placenta das einzige Organ, das aus zwei Gewebekomponenten unterschiedlicher Individualität zusammengesetzt ist. Mit einer ausreichend differenzierenden Methode könnte es also gelingen, den beiden morphologisch unterscheidbaren Komponenten jeweils ihre individuelle Blutgruppe zuzuordnen und so in einem Arbeitsgang kindliche und mütterliche Blutgruppe zu bestimmen. Nichtmorphologische Verfahren wie Absorptionstest oder Absorption-Elution können hier nicht zum Erfolg führen, da sie keine Zuordnung der nachgewiesenen Antikörperfixierung zu mütterlichen oder kindlichen Gewebeanteilen gestatten.

Zum anderen ist das Problem, an einer Placenta die Blutgruppenmerkmale von Mutter und Kind zu bestimmen, von praktischer rechtsmedizinischer Bedeutung.

Wir gingen davon aus, daß mit der bezüglich Sensitivität, Spezifität und morphologischer Aussage bis heute unübertroffenen Peroxidase-Antiperoxidase-Technik eine Erkennung und richtige Zuordnung der Antigene des AB0-Systems auch in der Placenta möglich sein müßte. Darüber hinaus sollte der Einfluß von Fäulnisprozessen auf die Darstellbarkeit der Blutgruppenantigene untersucht werden.

Material und Präparation

Bei 10 normal verlaufenden Geburten reifer Kinder wurden Placentagewebe und Eihautanteile gewonnen. Einziges Auswahlkriterium waren differente AB0-Eigenschaften von Mutter und Kind. Die Blutgruppenbestimmung im mütterlichen Blut und im Nabelschnurblut erfolgte unter klinischen Routinebedingungen nach der Agglutinationsmethode. Folgende Kombinationen kamen vor (Tabelle 1):

Mutter 0 / Kind A	2 Fälle
Mutter 0 / Kind B	1 Fall
Mutter A / Kind 0	3 Fälle
Mutter A / Kind AB	2 Fälle
Mutter B / Kind 0	2 Fälle
Summe	10 Fälle

Tabelle 1. Kombinationen der mütterlichen und kindlichen Blutgruppen

Jeweils eine Gewebeprobe wurde unmittelbar nach der Geburt in phosphatgepuffertem Formalin (4%) fixiert. Von dem bei Zimmertemperatur gelagerten Restmaterial wurden nach einer, zwei und drei Wochen weitere Proben zur immunhistochemischen Untersuchung entnommen und in Formalin fixiert.

An 4µ-Paraffinschnitten wurden nach einer modifizierten Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Dreischritt-Technik die Antigene des AB0-Systems dargestellt. Über die Methodik wurde kürzlich in dieser Zeitschrift ausführlicher berichtet (Pedal und Hülle 1984). Zur Darstellung der Antigene A und B wurden jeweils sowohl humane Seren der Fa. Molter, Heidelberg, als auch monoklonale Antikörper (Seraclone® der Fa. Biotest, Offenbach) eingesetzt. Die Darstellung des H-Antigens erfolgte mit dem Ulex europaeus-Agglutinin I (UEA I) der Fa. Medac, Hamburg.

Auswertungskriterien

Mütterliche und kindliche Placentaanteile sind histologisch problemlos zu unterscheiden: Zum kindlichen Anteil gehören die Chorionzotten mit den Zottengefäßen; sowohl die Erythrocyten, als auch die Endothelien der Zottengefäße tragen demnach kindliche AB0-Merkmale. Dagegen gehören die Gefäße der Decidua und der (nicht endothel ausgekleidete) intervillöse Raum zum mütterlichen Gefäßsystem. Die hier vorkommenden Erythrocyten besitzen also – vernachlässigt man die Möglichkeit einer feto-maternalen Transfusion – die Blutgruppenmerkmale der Mutter; das gleiche gilt für das Endothel der decidualen Gefäße.

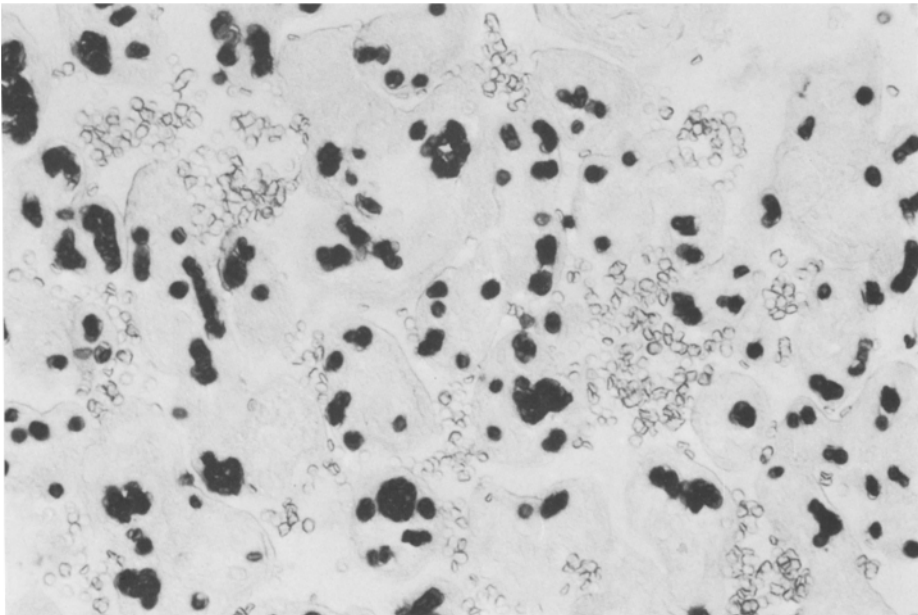


Abb. 1. Markierung der kindlichen Erythrocyten in Gefäßen der Chorionzotten; fehlende Markierung der mütterlichen Erythrocyten im intervillösen Raum. 1214/84, frisch eingebettetes Gewebe, Kind A / Mutter 0, indirekte Immunperoxidasetechnik mit monoklonalem Anti-A, ohne Gegenfärbung. $\times 260$

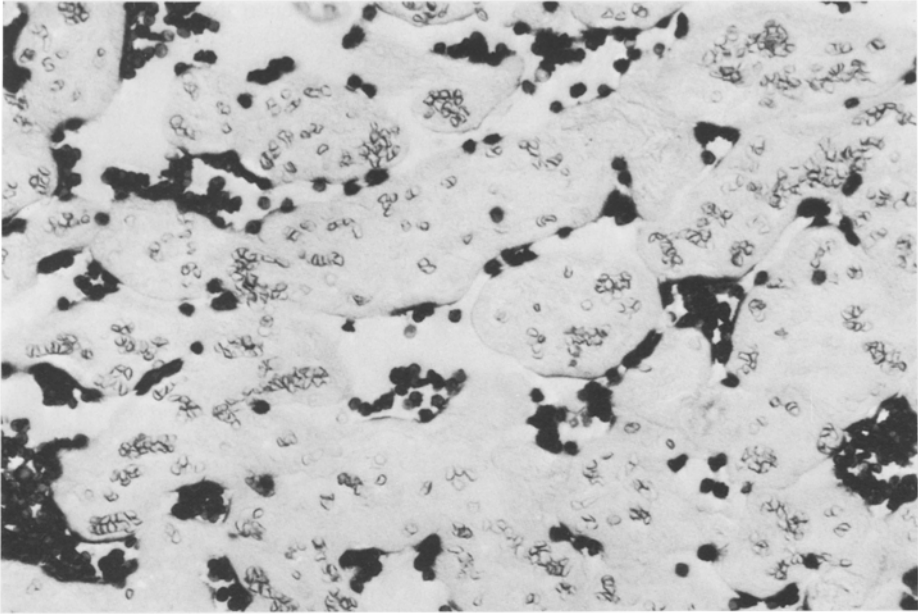


Abb. 2. Markierung der mütterlichen Erythrocyten im intervillösen Raum; fehlende Markierung der kindlichen Erythrocyten in den Gefäßen der Chorionzotten. 1215/84, frisch eingebettetes Gewebe, Kind 0 / Mutter A, Technik und Vergrößerungsmaßstab wie in Abb. 1

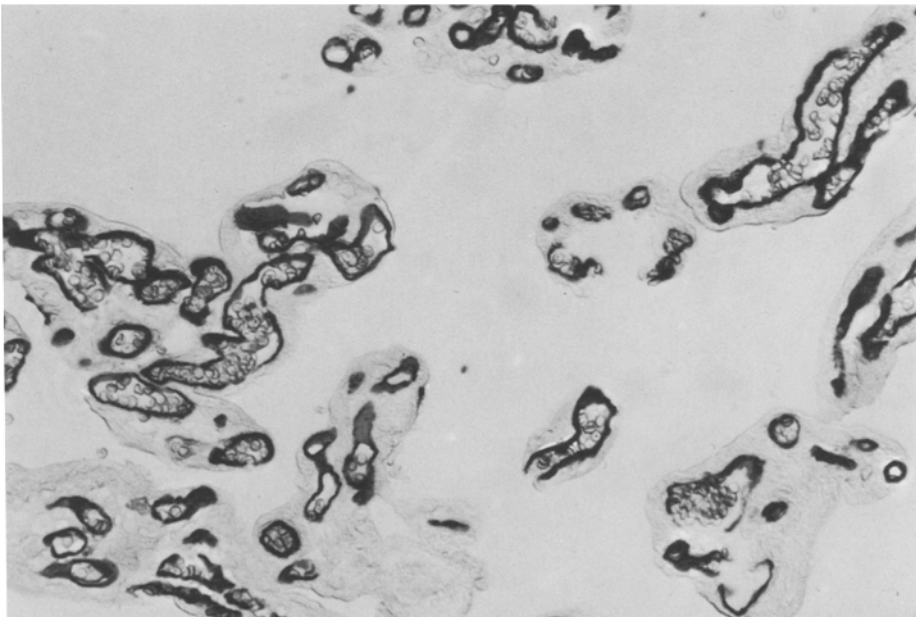


Abb. 3. Starke Markierung des Zottengefäßendothels bei fehlender Markierung der kindlichen Erythrocyten mit UEA I. 1203/84, frisch eingebettetes Gewebe, Kind AB / Mutter A, indirekte Immunperoxidasetechnik mit UEA I, ohne Gegenfärbung. $\times 260$

Die Bewertung des Reaktionsausfalles erfolgte semiquantitativ, getrennt nach mütterlichen und kindlichen Placentaanteilen. Danach ergaben sich Befundkombinationen nach folgendem Muster (Tabelle 2):

Tabelle 2. Befundkombinationen des Reaktionsausfalls

	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	UEA I	
				Endoth.	Erythr.
Kind	++	+	++	+++	—
Mutter	+++	—	+++	++	+

In dem dargestellten Beispiel hat das Kind die Eigenschaft AB, die Mutter die Eigenschaft A. Mit UEA I stellten sich kindliche Erythrocyten und Endothelien unterschiedlich stark dar (s.u.), so daß eine getrennte Bewertung notwendig war. Die immunhistochemischen Präparate wurden ohne Kenntnis der serologischen Befunde ausgewertet.

Ergebnisse

In neun der zehn Fälle stimmte das Ergebnis der immunhistochemischen Blutgruppenbestimmung mit dem serologischen Befund überein. In einem Falle bestand für die mütterliche Blutgruppe A Übereinstimmung; für die Nabelschnurerythrocyten wurde bei der routinemäßigen serologischen Untersuchung die Eigenschaft 0 festgestellt, während immunhistochemisch ein (schwaches) A nachgewiesen werden konnte. An einer vier Wochen nach dem Geburtstermin entnommenen Blutprobe des Kindes ließ sich die immunhistochemisch bestimmte Eigenschaft A serologisch bestätigen.

Die Auswertung der Präparate bereitete bei Verwendung monoklonaler Antikörper keine Schwierigkeiten, obwohl fast regelmäßig zwischen den mütterlichen Erythrocyten im intervillösen Raum vereinzelt Erythrocyten mit kindlichen Blutgruppenmerkmalen vorkamen¹. Auch humane Seren führten zu einer zuverlässigen Darstellung der Blutgruppenantigene; die Farbreaktion an Erythrocyten und Endothel war jedoch häufig von einer intensiven Markierung des mütterlichen und/oder kindlichen Blutplasmas überdeckt. Die Ablesung wurde hierdurch teilweise erheblich erschwert. Dieses Phänomen war auch bei Auslassung des ersten Inkubationsschrittes (humanes Serum) zu beobachten und beruhte demnach auf einer Darstellung der Plasma-Immunglobuline durch Verwendung eines Coombs-Serums im zweiten Inkubationsschritt (vgl. Pedal und Hülle 1984).

Die antigentragenden Strukturen der mütterlichen und kindlichen Placentaanteile zeigten mit Antikörpern und UEA I charakteristische Unterschiede hinsichtlich der Markierungsintensität:

1 Wir werten diesen Befund nicht ohne weiteres als Ausdruck einer fetomaternalen Transfusion. Wahrscheinlicher ist eine Verschleppung kindlicher Erythrocyten beim Schneiden des noch unfixierten Gewebes, also ein präparatorisches Artefakt

Die mütterlichen Erythrocyten wiesen in den Blutgruppen A und B mit den entsprechenden Antikörpern stets eine deutliche bis starke Markierung auf. Vergleichbar intensiv war die Endothelmarkierung der – nur in einem Teil der Schnitte erfaßten – deciduellen Gefäße. UEA I ergab an den mütterlichen Erythrocyten eine wechselnd intensive, im allgemeinen deutliche Markierung; das Endothel der Deciduagefäße war mit UEA I tendenziell stärker markiert, als die Erythrocytenoberfläche. Insgesamt entsprach demnach das Verhalten der mütterlichen Erythrocyten und Endothelien den Befunden, die wir an adultem Nierengewebe erheben konnten (Pedal und Hülle 1984).

Kindliche Erythrocyten der Blutgruppen A, B und AB reagierten mit den korrespondierenden Antikörpern stets schwächer als Erwachsenen-Erythrocyten. Auch UEA I ergab meist nur eine schwache Markierung, teilweise erfolgte überhaupt keine Darstellung der Erythrocytenmembran. Dabei bestand eine deutliche Abhängigkeit von der kindlichen Blutgruppe: Die Erythrocyten beider Kinder mit der Blutgruppeneigenschaft AB blieben mit UEA I unmarkiert, während in den vier Fällen der Blutgruppe 0 die Erythrocyten stets schwach bis deutlich reagierten. Eine deutliche Markierung mit UEA I ergaben auch die Erythrocyten des Kindes, dessen Zugehörigkeit zu Blutgruppe A erst nachträglich serologisch bestätigt wurde.

Die Endothelien der Zottengefäße stellten sich in den Gruppen A, B und AB – im Gegensatz zu Endothelien adulter Gewebe – mit den entsprechenden Antikörpern nicht oder praktisch nicht dar. Dagegen ergab UEA I unabhängig von der kindlichen Blutgruppe regelmäßig eine starke Markierung der Zottengefäß-Endothelien (Abb. 3).

Schematisch dargestellt, ergaben sich also für kindliche und mütterliche Placentaanteile mit korrespondierenden Antikörpern und UEA I folgende Markierungsintensitäten (Tabelle 3):

	Anti-A, Anti-B, Anti-AB	UEA I
Kindliche Erythr.	+ / ++	- / ++
Kindliche Endoth.	- / (+)	+++
Mütterliche Erythr.	++ / ++++	+ / ++++
Mütterliche Endoth.	++ / ++++	++ / ++++

Tabelle 3. Markierungsintensitäten für kindliche und mütterliche Placentaanteile mit korrespondierenden Antikörpern und UEA I

Außerhalb der Erythrocyten und Endothelien ließen sich in der Placenta keine Blutgruppenantigene darstellen. An den Eihäuten zeigte das nur in einem Teil der Fälle beurteilbare Amnionepithel teilweise eine der kindlichen Blutgruppe entsprechende Prägung. Durch orientierende Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern gegen Le^a und Le^b (Seraclone® der Fa. Biotest, Offenbach, Kat. Nr. 808400 und 808405) nach der modifizierten PAP-Dreischnitt-Technik ließ sich in Zellen des selben Epithelverbandes teilweise das Antigen Le^a nachweisen. Diese Beobachtungen, die offenbar zu der Nachweisbarkeit kindlicher Blutgruppensubstanzen im Fruchtwasser (Putkonen 1930, zit. nach

Prokop und Göhler 1976; Arcilla und Sturgeon 1974) in Beziehung stehen, wurden im Rahmen dieser Studie nicht weiter verfolgt.

Im Verlaufe der zunehmenden autolytischen und heterolytischen Zersetzung des Placentagewebes zeigte der immunhistochemische Befund folgende Veränderungen: Nach einer Woche waren bei guter Erhaltung sowohl der Antigenität als auch der Morphologie die mütterlichen und kindlichen Blutgruppeneigenschaften in allen Fällen unverändert gut nachweisbar. Nach zwei Wochen waren die histologischen Strukturen noch schattenhaft zu erkennen; die Blutgruppenmerkmale der mütterlichen und kindlichen Erythrocyten ließen sich in einem Teil der Fälle noch zuverlässig bestimmen, in anderen Fällen waren sie nicht mehr zu erfassen. Deciduaanteile waren im allgemeinen nicht vorhanden, so daß auf die möglicherweise erhaltenen Blutgruppenmerkmale des mütterlichen Endothels nicht zurückgegriffen werden konnte. Entsprechend dem Befund am frischen Gewebe war das Zottengefäß-Endothel auch unter fortschreitender Dekomposition mit monoklonalen und humanen Antikörpern nicht darstellbar. Hingegen war mit UEA I nach zwei und selbst nach drei Wochen noch eine intensive Endothelmarkierung in den Chorionzotten zu erzielen.

Diskussion

Die indirekte Immunperoxidasetechnik (PAP-Methode) ist ein geeignetes Verfahren, um in reifem Placentagewebe die Blutgruppenzugehörigkeit der Mutter und des Kindes nachzuweisen. Die Interpretation der Befunde bereitet keine Schwierigkeiten; Fehlbestimmungen kamen in unseren zehn Fällen nicht vor. Eine zuverlässige Blutgruppenbestimmung gelang sowohl an frischen Gewebeproben, als auch an eine Woche lang bei Zimmertemperatur gelagertem Gewebe.

Regelmäßig waren die kindlichen Erythrocyten mit den korrespondierenden (monoklonalen und humanen) Antikörpern schwächer markiert als Erwachsenen-Erythrocyten. Dieser immunhistochemische Befund entspricht der bekannten, schwächeren Agglutinabilität der Nabelschnurerythrocyten und ist wohl ebenso wie diese durch eine zum Geburtstermin noch unvollständige Ausreifung der AB0-Merkmale zu erklären (Boorman und Dodd 1964; Rittner und Wehner 1975). In einem unserer Fälle war eine schwach ausgeprägte kindliche A-Eigenschaft beim Agglutinationstest übersehen worden, dem immunhistochemischen Nachweis aber nicht entgangen. Diese Einzelbeobachtung belegt die hohe Sensitivität der immunhistochemischen Methode.

Bemerkenswerterweise zeigten nicht nur die kindlichen Erythrocyten, sondern auch die Endothelien der Choriongefäße bezüglich der Markierung mit (monoklonalen und humanen) Antikörpern und UEA I konstante Unterschiede zum Verhalten adulter Gewebe: Kindliche Erythrocyten reagieren mit den korrespondierenden Antikörpern und mit UEA I schwächer als Erwachsenen-Erythrocyten; die Endothelien der Zottengefäße sind mit UEA I regelmäßig stark markiert (tendenziell stärker als Endothelien adulter Gewebe), reagieren jedoch im Gegensatz zu Endothelien adulter Gewebe praktisch nicht mit Anti-A bzw. Anti-B. Wenn diese Befunde allein durch eine mangelhafte

Ausreifung an der Synthese von Blutgruppensubstanzen beteiligter Enzymsysteme (Schenkel-Brunner 1980; Watkins 1980) erklärt werden sollen, ist folgende Deutung naheliegend:

Die Membran des Neugeborenen-Erythrocyten unterscheidet sich von der des ausgereiften Erythrocyten durch einen Mangel an Praecursorsubstanz und/oder an H-Enzym (α -(1-2)-Fucosyltransferase). Ein Mangel an A-Enzym (α -(1-3)-N-Acetylgalactosaminyltransferase) bzw. B-Enzym (α -(1-3)-Galactosyltransferase) ist dagegen unwahrscheinlich, da beispielsweise in unseren AB-Fällen eine so weitgehende Umsetzung von H-Substanz in A und B erfolgt war, daß eine Markierung der Erythrocyten mit UEA I ausblieb. Für die Endothelien der Zottengefäße ist dagegen ein hochgradiger Mangel an A- bzw. B-Enzymaktivität zu postulieren, während Praecursorsubstanz und H-Enzym offenbar reichlich vorhanden sind. Die divergenten immunhistochemischen Eigenschaften unreifer Erythrocyten und des Choriongefäß-Endothels können demnach durch eine mangelhafte Enzymaktivität auf unterschiedlichen Stufen der Blutgruppensubstanz-Biosynthese erklärt werden.

Das Fehlen der Merkmale A und B am Endothel der Choriongefäße hat eine praktische Konsequenz. Mit der auch in der vorliegenden Studie angewandten immunhistochemischen Methode konnte gezeigt werden, daß die monatelange Nachweisbarkeit von Blutgruppenmerkmalen in faulendem Nierengewebe auf der Fäulnisresistenz endothelialer und epithelialer Antigene beruht, während die Erythrocytenmembran schon nach einigen Tagen ihre Antigenität verliert (Pedal und Baedeker 1985). Im Gegensatz zum Nierengewebe erlaubt Placentagewebe schon nach zwei Wochen oft keine zuverlässige immunhistochemische Bestimmung der mütterlichen und kindlichen Blutgruppe mehr. Dies ist verständlich, da die Blutgruppendiagnose am Placentagewebe nahezu ausschließlich auf der Feststellung erythrocytärer Merkmale beruht: Der intervillöse Raum besitzt keine Endothelauskleidung; gefäßführende Decidua ist in fäulnisverändertem Gewebe meist nicht anzutreffen; das Endothel der Zottengefäße besitzt unabhängig von der kindlichen Blutgruppe praktisch nur die Eigenschaft H; epitheliale Blutgruppenantigene sind ausschließlich in dem bei Fäulnis bald verlorengehenden Amnionepithel vorhanden. Damit wird die Möglichkeit der Blutgruppenbestimmung durch die hohe Fäulnisempfindlichkeit der erythrocytären Antigene zeitlich limitiert.

In fäulnisverändertem Nierengewebe kann der Nachweis erhaltener H-Substanz bei fehlender Markierung mit Anti-A und Anti-B als starkes Indiz für das Vorliegen der Eigenschaft 0 gelten (Pedal und Baedeker 1985). Diese Aussage darf keinesfalls auf die Placenta übertragen werden: Die mit UEA I stark reagierende H-Substanz der Choriongefäß-Endothelien ist nämlich den erythrocytären Blutgruppenmerkmalen an Fäulnisresistenz deutlich überlegen, so daß sich – unabhängig von der kindlichen Blutgruppenzugehörigkeit – in einem entsprechenden Fäulnisstadium die Zottengefäße mit UEA I noch gut darstellen, während ein Nachweis von A oder B nicht (mehr) gelingt.

Literatur

- Arcilla MB, Sturgeon Ph (1974) Le^x, the spurned antigen of the Lewis blood group system. *Vox Sang* 26: 425–438

- Boorman KE, Dodd BE (1964) Blutgruppen-Serologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Pedal I, Baedeker Ch (1985) Immunenzymatische Darstellung der Isoantigene A, B und H in fäulnisverändertem Nierengewebe. *Z Rechtsmed* 94:9–20
- Pedal I, Hülle J (1984) Immunenzymatische Bestimmung des AB0- und Sekretorstatus an paraffineingebettetem Autopsiematerial. *Z Rechtsmed* 93:289–300
- Prokop O, Göhler W (1976) Die menschlichen Blutgruppen, 4. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York
- Rittner Ch, Wehner HD (1975) Forensische Serologie. In: Mueller B (Hrsg) Gerichtliche Medizin, 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Schenkel-Brunner H (1980) Struktur und Biochemie der Blutgruppenantigene. *Infusions-therapie* 4:176–178
- Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315–333
- Watkins WM (1980) Biochemistry and genetics of the AB0, Lewis and P blood group system. *Adv Hum Genet* 10:1–136

Eingegangen am 20. Dezember 1984