

# Der Fall des Halbjahres - Erythroblasten im peripheren Blut als Zeichen eines gesteigerten Mortalitätsrisikos

Im Zeitalter der DRG wird die Analytik »neuer« Parameter, die gezielte Hinweise auf Diagnose, Therapie und Verlauf von Erkrankungen liefern können, immer wichtiger.

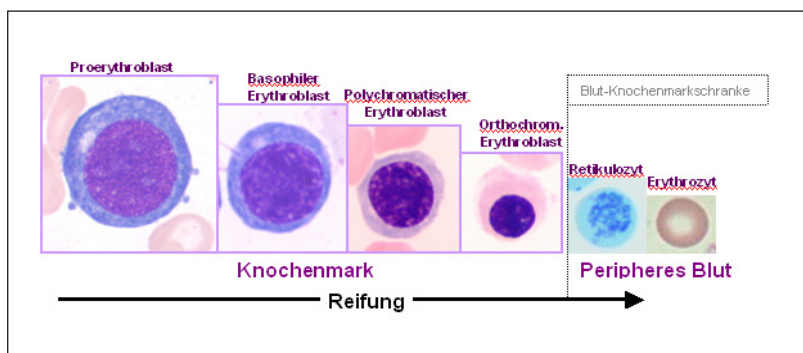
Die Erythroblastenzahl (alternative Bezeichnung: Normoblasten) im peripheren Blut gehört zu dieser Gruppe von Parametern. Seither dient deren Bestimmung lediglich als Hinweis auf eine extrem gesteigerte oder gestörte Erythropoese (durch z. B. Markverdrängung bzw. extramedulläre Blutbildung im Rahmen hämatologischer Systemerkrankungen) und außerdem zur Korrektur der Leukozytenzahl.

Allerdings zeigen eine laufende<sup>2</sup> und eine bereits publizierte Studie<sup>1</sup>, dass mehr Informationen aus diesem Zählwert abzuleiten sind. Voraussetzung ist eine genaue, automatisierte Quantifikation mit der xE-Serie. Die Präsenz von Erythroblasten im peripheren Blut bei Patienten mit schweren Erkrankungen ohne hämatologischen Hintergrund steht in enger Verbindung mit deren Überlebenswahrscheinlichkeit. Der Fall des Halbjahres zeigt dies anhand des Beispiels eines Patienten mit nekrotischer Pankreatitis.

## Einleitung:

Erythroblasten sind die morphologisch erkennbaren Vorstufen der Erythropoese.

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich diese ausnahmslos im Knochenmark. Folgende Stufen werden unterteilt:



Funktionen der Erythroblasten sind:

- Teilung und Proliferation  
(Die Teilungsfähigkeit geht in der Stufe Polychromatischer Erythroblast verloren).
- Reifung zur nächsten Stufe (Die Reifung geht vom Proerythroblasten als erste morphologisch erkennbare Stufe über den basophilen, polychromatischen und orthochromatischen Erythroblasten bis hin zum Retikulozyt und Erythrozyt).
- Zentrale Funktion ist die Hämoglobinsynthese innerhalb der Zellen, so dass am Ende der Reifung und nach Ausstoßung des Kerns ein maximal hämoglobinisierter Erythrozyt als reifes Endprodukt vorhanden ist.

Der zunehmende Hämoglobingehalt der Zelle ist morphologisch an der Veränderung der Zytoplasmafarbe (von basophil = wenig HB-Gehalt bis orthochromatisch = viel HB-Gehalt bzw. gleiche Farbe wie die reifen Erythrozyten) zu erkennen.

### Ursache und Bedeutung von Erythroblasten im peripheren Blut:

Ursache:

- Gesteigerte Produktion im Knochenmark durch erhöhten Verbrauch bei hämolytischen Anämien oder durch hohen Zellumsatz genetisch kranker Produkte bei myelodysplastischen Syndromen
- Verdrängte Produktion im Knochenmark durch Markfibrosierung, akute Leukämien, Knochenmarkskarzinomen und daraus resultierende extramedulläre Blutbildung in Leber und Milz
- Störung der Blut-Knochenmarkschranke
- Insuffizienz der Milz durch Organschädigung
- Hämatopoetischer Stress durch z.B. schwere Infektion, Hypoxie oder starke Blutung

Bedeutung:

Ein Vorkommen von Erythroblasten im peripheren Blut ist mit Ausnahme der ersten Lebensstage generell als pathologisch zu bewerten. Liegt keine hämatologische Systemerkrankung zugrunde, kommt dieser Zellpopulation eine besondere Bedeutung zu. So wird in einer bereits veröffentlichten Studie der Ruhruniversität Bochum<sup>1</sup> ein enger Zusammenhang zwischen der Präsenz, der Präsenzdauer und der Konzentration von Erythroblasten (NRBC = Nucleated Red Blood Cell) im peripheren Blut mit einem gesteigerten Mortalitätsrisiko der Patienten hergestellt.

Es wurden 421 Patienten verschiedener Intensivstationen untersucht.

Die Mortalität aller NRBC-positiven Patienten (n=81) lag bei 42% und war damit signifikant höher als die Mortalität bei NRBC-negativen Patienten (5,9%). Die Mortalitätsrate stieg (auf 67%) bei initial erhöhten NRBC-Konzentrationen über  $0.1 \times 10^3/\mu\text{l}$  und sogar auf 100% über  $0.5 \times 10^3/\mu\text{l}$  an.

Außerdem stieg die Mortalität bei Patienten, bei denen NRBC an mehr als 5 Tagen nachgewiesen werden konnte, auf 67%. Bei mehr als 10 Tagen NRBC-Präsenz im peripheren Blut verstarben bereits 8 von 10 Patienten, es überlebte kein Patient bei mehr als 15 Tagen.

Patienten mit einer NRBC-Konzentration  $> 0.3 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut zeigten ein 20-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko im Vergleich zu NRBC-negativen Patienten. Somit bekommt dieser Parameter eine bedeutende prognostische Funktion in der Bewertung von Hochrisikopatienten bezüglich deren Sterblichkeitsrisiko. Dieser Umstand wird in einer laufenden Studie im Universitätsklinikum Eppendorf<sup>2</sup> u.a. auch untersucht. Der Fall des Halbjahres beschreibt den Verlauf der Erkrankung eines Patienten mit nekrotischer Pankreatitis, der verstarb, gegen den Verlauf eines Patienten, der an einer Peritonitis erkrankte und überlebte.

### Fall des Halbjahres:

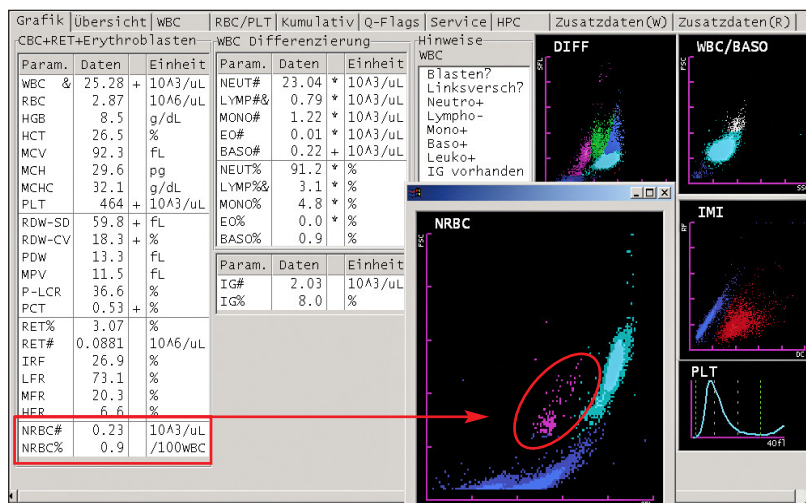


Abb. 1: Blutbild des Patienten mit nekrotischer Pankreatitis (gemessen am XE-2100).

Abbildung 1 zeigt das initiale Blutbild eines 42-jährigen Mannes, der Ende Januar mit der Diagnose nekrotische Pankreatitis auf die Intensivstation verlegt wird und dort Mitte März ver stirbt. Die Pankreatitis verursacht hier eine systemische Entzündungsreaktion (SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome). Dies drückt sich durch eine Erhöhung der Temperatur

(38.4 °C), der Herzfrequenz (140/min), der Leukozytenzahl ( $25.3 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) und der unreifen Granulozyten ( $2.03 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) aus. Ein gleichzeitiger Erregernachweis (hier: Enterokokken im Pankreasabstrich) bestätigt die Verdachtsdiagnose Sepsis. Ab Tag 3 zeigt sich außerdem eine systemische, kompensatorische anti-entzündliche Reaktion durch eine erniedrigte HLA-DR - Expression der Monozyten und eine verminderte TNF- $\alpha$ - Ausschüttung nach LPS (LipoPoly Sacharid)-Stimulation ex vivo (siehe Abbildung 6 und 7). Die gleich- zeitige Präsenz von Erythroblasten (Abbildung 1 - Population im roten Kreis) in dieser Höhe (NRBC =  $0.23 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) weist hier bereits auf eine ungünstige Prognose hin.

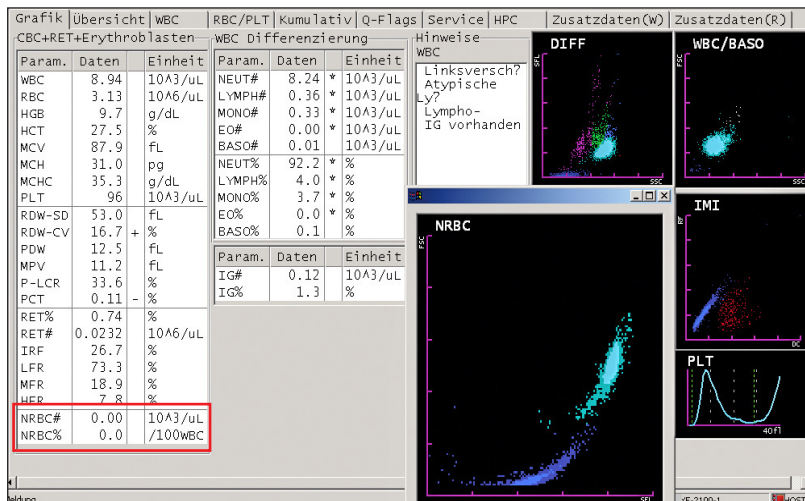


Abb. 2: Blutbild des Patienten mit Peritonitis (gemessen am XE-2100).

Abbildung 2 zeigt das initiale Blutbild eines 53-jährigen Mannes, der Anfang Februar mit der Diagnose Peritonitis auf die Intensivstation verlegt wird und Anfang März diese wieder verlassen kann. Eine Erniedrigung der Temperatur (34 °C) und eine Erhöhung der Herzfrequenz (99/min) bestätigt in Verbindung mit einem positiven E-coli Nachweis im Bauchraum ebenfalls

die sekundäre Verdachtsdiagnose Sepsis. Der Patient steht auch unter antibiotischer Behandlung. Erythroblasten (siehe rote Markierung in Abbildung 2) sind hier nicht vorhanden.

Neben der Diagnose ist die Verlaufskontrolle solcher Patienten unerlässlich. Engmaschige Informationen über den Zustand und mögliche Entwicklungen des Patienten werden benötigt. Nur so ist eine ständige Einteilung des Schweregrades der Erkrankung und die Einschätzung des Sterberisikos möglich. Dies wiederum liefert die Möglichkeit:

- Therapeutische Maßnahmen frühzeitig festzulegen und rechtzeitig einzuleiten
- Neu veranlasste Therapien bezüglich des Erfolges zu bewerten

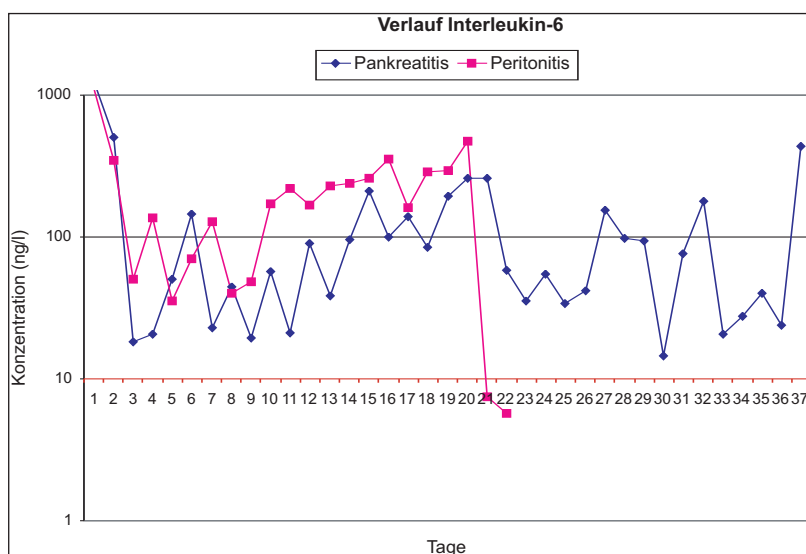
Bei Sepsis-Patienten ist hier die konkrete Fragestellung: Bessert sich der Zustand des Patienten oder entwickelt sich eine schwere Sepsis oder gar ein septischer Schock bis hin zum MOF (Multiple Organ Failure).

Unter normalen Umständen ist das Immunsystem des Körpers in der Lage, eingedrungene Erreger durch verschiedene Mechanismen in Schach zu halten. Die daraus entstehenden Infektionen werden als lokal bezeichnet, da sie auf den Eintrittsort und die umgebenden Strukturen begrenzt sind. Molekulare Ursache der Sepsis ist das bakterielle LPS (**L**ipopolysaccharid), auf dessen Anwesenheit hin u.a. der Entzündungsfaktor TNF- $\alpha$  ausgeschüttet wird. Selbst aus zunächst harmlosen infektiösen Entzündungen kann sich eine Sepsis entwickeln, wenn eine oder mehrere von vier Bedingungen vorliegen:

- eingeschränkte Immunabwehr
- massive Infektion mit vielen oder aggressiven Erregern
- Eindringen der Erreger in strukturell schlecht geschützte Körperregionen (beispielsweise Bauchhöhle, Gehirn, Lunge)
- fehlende Behandlung und schrittweises Überwinden der Immunabwehr

In der Folge kommt es, meist über den Blutkreislauf, zu einer Ausbreitung der Infektion auf den gesamten Körper. Die im Falle einer Lokalinfektion sinnvolle Entzündungsreaktion entwickelt sich nun zum eigentlichen Motor der Sepsis. In einer überschießenden Reaktion freigesetzte große Mengen an Überträgerstoffen (z. B. Interleukin 6, TNF- $\alpha$ ) führen zu einer Entzündung des gesamten Körpers, u.a. mit Schwellungen, Durchblutungsstörungen und Sauerstoffmangel, ohne dass sie der Erregerbekämpfung nützen. Sind einmal lebenswichtige Organe davon betroffen, kann der daraus folgende Verlust ihrer Funktionsfähigkeit (MOF- Multiple Organ Failure) schnell zum eigentlich begrenzenden Faktor für das Überleben der Patienten werden. Die extreme inflammatorische Reaktion sorgt gleichzeitig für einen antiinflammatorischen Mechanismus, um die Entzündungsreaktion zu kontrollieren. Wenn beides außer Kontrolle gerät, können antiinflammatorische Faktoren (z.B. Interleukin-10) letztlich zu einer massiven Einschränkung des Immunsystems führen (Immunparalyse). Die Persistenz dieser verminderten Immunkompetenz ist assoziiert mit einem erhöhtem Risiko zur Sepsis und Mortalität. Somit rücken Parameter, die solche ungünstigen Entwicklungen des Patienten frühzeitig voraussagen können, in den diagnostischen Fokus.

Die Abbildungen 3–8 zeigen jeweils den Verlauf der genutzten Parameter beider Patienten im Vergleich. Die rote waagrechte Linie symbolisiert den Cut-Off.



Proinflammatorische Marker:  
**Interleukin 6:** körpereigener Botenstoff, stimuliert die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen, B-Zellen-Reifungsfaktor, fördert die Differenzierung der B-Zellen zu Ig-produzierenden Zellen, stimuliert die CRP-Produktion in der Leber

**Abb. 3:** Die Konzentration ist wegen der großen Kinetik der Werte logarithmisch aufgetragen. Der Cut-Off (11,3 ng/l) wird mit Ausnahme der letzten beiden Tage vor Verlegung des Patienten mit der Peritonitis nie unterschritten. Die initial extrem hohe Konzentration von über 1000 ng/l bei beiden Patienten ist bezeichnend für die Schwere der Infektion.

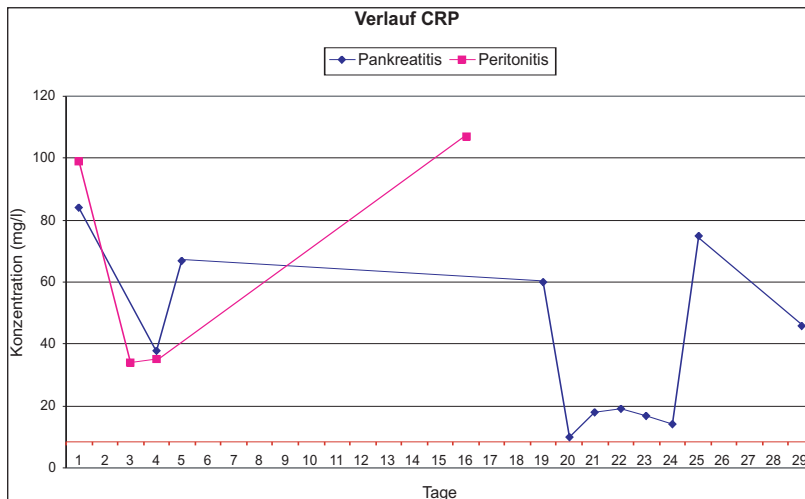


Abb. 4: Der Cut-Off (8.5 mg/l) wird von beiden Patienten während des Verlaufs nie unterschritten.

**CRP:** ein Akute-Phase-Protein, fördert die Verknüpfung zwischen Phagozyten und Bakterienzellen oder anderen Mikroorganismen (Komplementsystem)

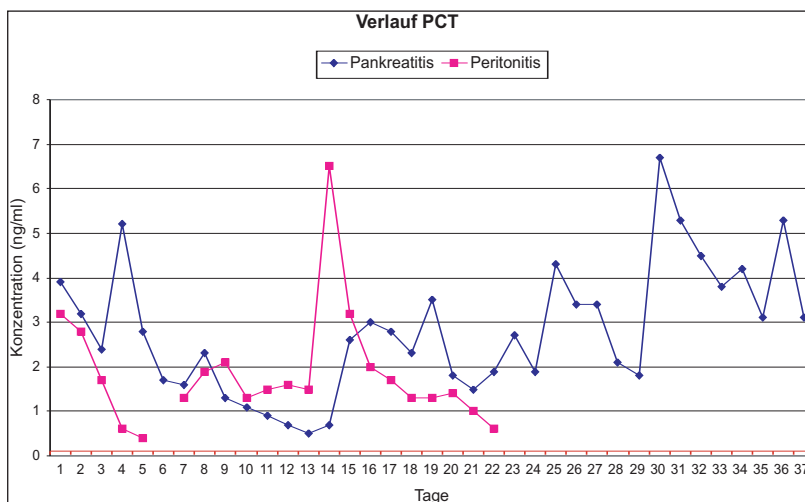
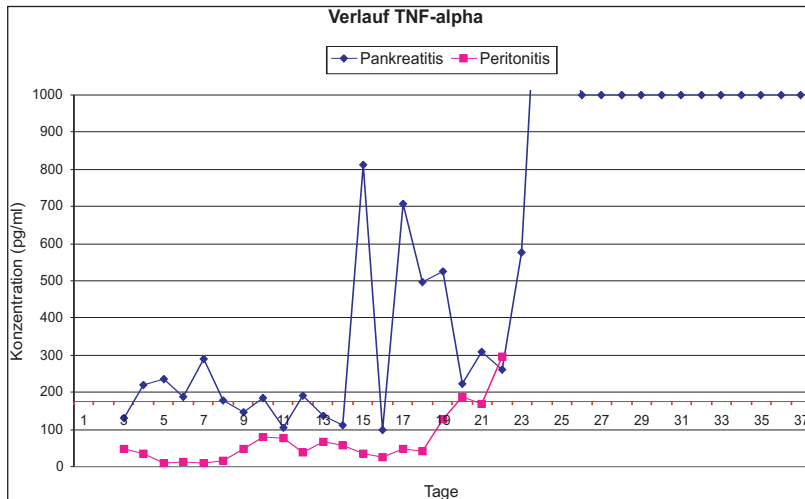


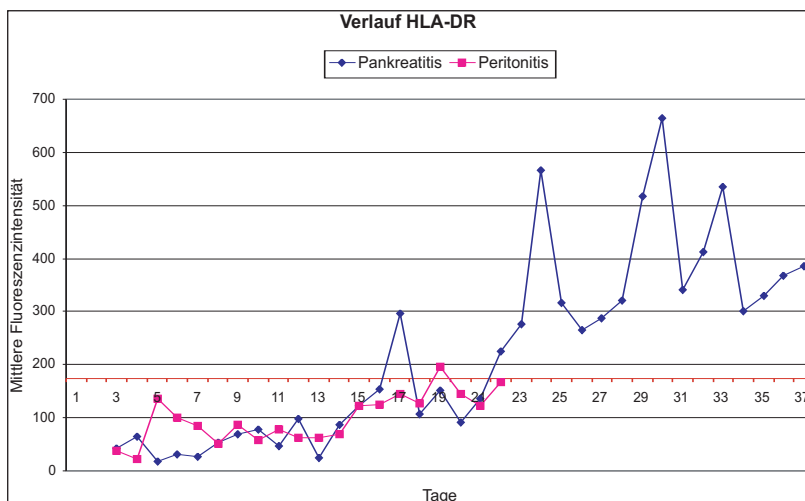
Abb. 5: Der Cut-Off (0.1ng/l) wird von beiden Patienten während des Verlaufes nie unterschritten. Allerdings ist auch hier beim Patienten mit der Peritonitis gegen Ende eine deutliche Tendenz nach unten zu erkennen, während der Trend bei dem Patienten mit der Pankreatitis in der zweiten Hälfte des Verlaufes stabil nach oben geht.

**Procalcitonin:** Vorstufe des Hormons Calcitonin, eignet sich zur Erkennung bakterieller Infektionen. Durch seine kurze Halbwertszeit (24h) ist dieser Parameter sehr gut als Verlaufparameter nutzbar.



**Abb. 6:** Ein Wert über 175pg/ml Ausschüttung ex vivo weist eine ausreichende Immunantwort aus. Die initial niedrigen Werte beider Patienten sind durch eine überschüssige antiinflammatorische Reaktion (IL-10) zu erklären. Außerdem zeigt der Patient mit der Peritonitis bis auf die letzten Tage vor Verlegung niedrige Monozytenwerte. Dieser Umstand sollte bei der Bewertung mit berücksichtigt werden. Der extreme Anstieg beim Patienten mit der Pankreatitis ab Tag 16 belegt eine intakte Immunantwort.

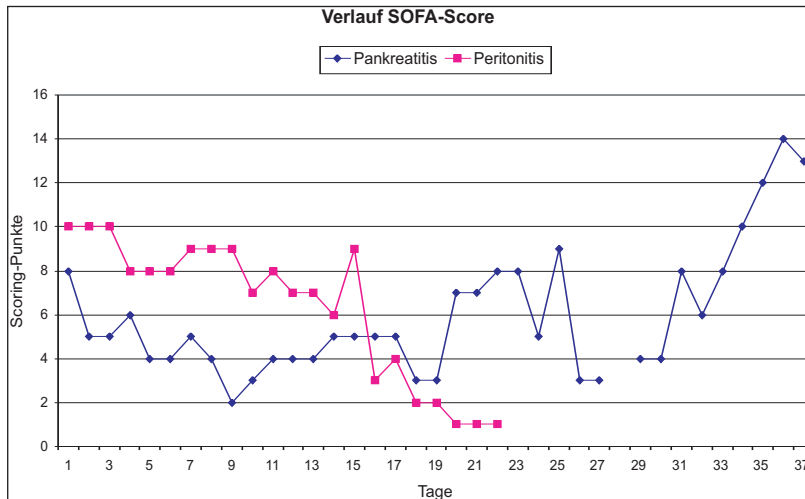
Überprüfung der Immunkompetenz durch Messung der TNF- $\alpha$  Ausschüttung nach LPS Stimulation ex vivo und der HLA-DR-Bestimmung. **TNF- $\alpha$**  wird hauptsächlich von Makrophagen bei Entzündungsreaktionen ausgeschüttet – löst eine Fieberreaktion aus, setzt in der Leber synthetisiertes CRP frei.



**Abb. 7:** Ein Wert über 175 MFI weist eine ausreichende Immunkompetenz aus. Die initial niedrigen Werte beider Patienten sind durch eine überschüssige antiinflammatorische Reaktion (IL-10) zu erklären. Außerdem zeigt der Patient mit der Peritonitis bis auf die letzten Tage vor Verlegung niedrige Monozytenwerte. Dieser Umstand sollte bei der Bewertung mit berücksichtigt werden. Der Anstieg beim Patienten mit der Pankreatitis schließt eine Immunparalyse in der zweiten Hälfte des Verlaufes aus.

**HLA-DR:** wird von Antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten) membranständig exprimiert und ermöglicht die Interaktion mit Strukturen von Bakterienmembranen. Eine niedrige HLA-DR Expression korreliert dabei mit geringer Immunkompetenz.



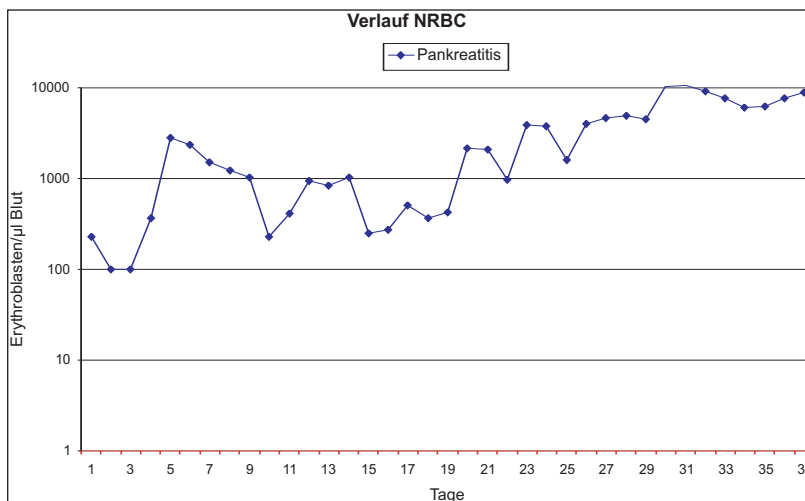


**Abb. 8:** Beide Patienten zeigen initial hohe Werte – dies belegt den hohen Schweregrad der Erkrankung. Die Entwicklung der Punktezahl nach unten ist ein Indiz für die Verbesserung des Allgemeinzustandes beim Patienten mit der Peritonitis, während der Anstieg beim Patienten mit der Pankreatitis die zunehmende Dysfunktion der Organe belegt.

Jede Funktion wird anhand verschiedener Parameter von 0-4 skaliert, wobei 0 eine gute und 4 eine schlechte Funktion ausweist. Die Einzelwerte werden aufaddiert, so dass am Ende ein Zahlenwert von 0-24 steht, der eine Gesamtbewertung der erwähnten Organfunktionen erlaubt.

Überwachung der Organfunktion bzw.- dysfunktion:  
**SOFA-Score:** (Sepsis-related Organ Failure Assessment)  
 Mit diesem Score bewertet man die Funktion von 6 Organ-systemen:

- Herz-Kreislaufsystem
- Nierenfunktion
- Zentrales Nervensystem
- Leberfunktion
- Atemfunktion
- Gerinnung



**Abb. 9:** Die Konzentration ist wegen der großen Kinetik der Werte logarithmisch aufgetragen. Die Konzentration der Erythroblasten fällt zu keinem Zeitpunkt unter  $0.1 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Das laut Stachon et al.<sup>1</sup> kritische Level von  $0.3 \times 10^3/\mu\text{l}$  wird ab Tag 4 überschritten und bleibt ab Tag 16 konstant darüber. Außerdem zeigt die Konzentration gegen Ende einen exponentiellen Anstieg. Somit zeigt der Parameter von Anfang an die ungünstige Prognose des Patienten.

**Zählung der Erythroblasten (NRBC) mit dem XE-2100:**  
 Der Verlauf der Erythroblastenkonzentration beider Patienten ist in Abbildung 9 und 10 dargestellt. Aufgrund der extrem unterschiedlichen Konzentrationen im Verlauf beider Patienten ist die Darstellung auf 2 Grafiken verteilt.



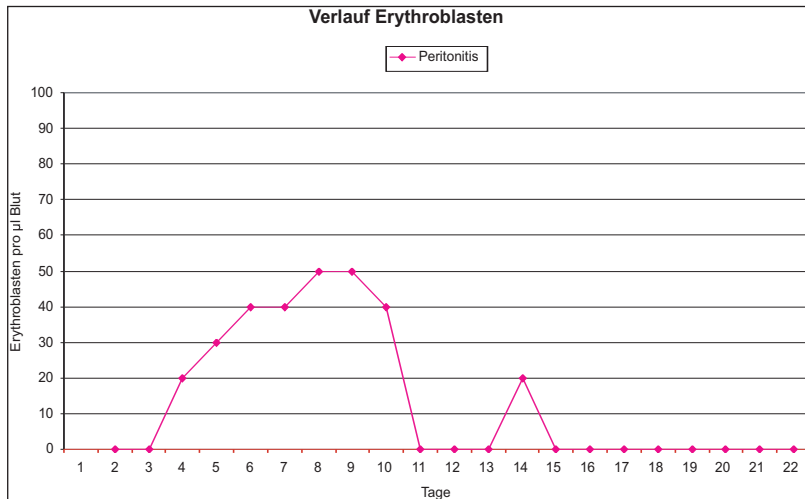


Abb. 10: Die Konzentration der Erythroblasten steigt zu keinem Zeitpunkt über  $0,05 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies korreliert gut mit der günstigen Prognose des Patienten.

Parameter		Patient mit Pankreatitis	Patient mit Peritonitis
NRBC Zellen ( $\mu\text{L}$ )	Mean	3.099	14
	Range	100 – 10.490	0 – 50

### Zusammenfassung und Ausblick:

Die Studie der Ruhruniversität in Bochum belegt die Bedeutung des Parameters Erythroblasten in der Diagnostik und dem Monitoring intensivmedizinisch betreuter Patienten. Diese Ergebnisse finden sich in den o.g. Beispielen wieder. Im Fall des Halbjahres zeigt keiner der genannten Parameter zu einem früheren Stadium des Verlaufes die Prognostik der Patienten so gut wie die Anzahl der Erythroblasten im peripheren Blut.

Die laufende Studie im Universitätsklinikum Eppendorf beobachtet diesbezüglich neben den Erythroblasten noch weitere Parameter des xE-2100 – einer davon ist:

- Unreife Granulozyten (IG=Immature Granulocytes)

Dieser zeigt einen ähnlichen Verlauf bezüglich der Prognostik beider Patienten:

Eine genaue, reproduzierbare und routinetaugliche (24h verfügbare, vollautomatisierte) Methode zur Quantifikation dieser Populationen ist dabei essentielle Voraussetzung. Dass dies mit der xE-Serie mittels Fluoreszenzdurchflußzytometrie möglich ist, wurde bereits in mehreren Studien<sup>3,4,5,6</sup> gezeigt.

Parameter		Patient mit Pankreatitis	Patient mit Peritonitis
IG Zellen ( $\mu\text{L}$ )	Mean	3.968	227
	Range	670 – 8.400	70 – 450

## Quellenangaben

- 1: A. Stachon, T. Holland , M. Krieg – Ruhruniversität Bochum:  
*High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood.*  
*Clin Chem Lab Med* 2004; 42(8):993-938
- 2: D. P. Frings, A. Nierhaus – Center for Anesthesiology and Critical Care Universitätsklinikum Eppendorf:  
*IG, IMI and NRBC as parameters in diagnosis of Sepsis and SIRS –*  
*vorläufige Daten aus laufender Studie (vorgestellt beim SYSMEX Symposium 2005 St. Wolfgang)*
- 3: Fernandes-B, Bergeron-N, Hamaguchi-Y:  
*Automated nucleated red blood cell counting in the perinatal period.*  
*Lab Hematology* 8-2002; 179-188
- 4: Fernandes-B:  
*Identification and enumeration of nucleated red blood cells in peripheral blood*  
*SYSMEX Journal International* 12-2002, 56-62
- 5: Wang-F, Itose-Y, Tsuji-T, Hamaguchi-Y, Hirai-K, Sakata-T:  
*Development and clinical application of nucleated red blood cell counting and staging on the automated haematology analyser XE-2100*  
*Clin Lab Haematology* 25-2003, 17-23 (republished in *SJI* 13-2003, 24-30)
- 6: C. Briggs, S. Kunka, H. Fujimoto, Y. Hamaguchi, B.H. Davis, S.J. Machin:  
*Evaluation of Immature Granulocytes by the XE-IG Master: upgraded software for the XE-2100 automated hematology analyzer*  
*Lab Hematology* 9-2003, 117-124