

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin,
Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleich von etablierten und neuen
laboratoriumsdiagnostischen Methoden
zum Nachweis inflammatorischer Prozesse

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dipl.-Biochem. Christina Hoffmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.09.2015

Inhaltsverzeichnis

Kurzdarstellung	3
1. Einleitung	5
2. Zielstellung	7
3. Methodik	8
3.1. Laboratoriumsmedizinische Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.	8
3.2. Automatisierte Bestimmung der toxischen Granulierung in neutrophilen Granulozyten.	8
3.3. Dynamik laboratoriumsmedizinischer Parameter bei akuten entzündlichen Prozessen.	9
4. Ergebnisse	11
4.1. Laboratoriumsmedizinische Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.	11
4.2. Automatisierte Bestimmung der toxischen Granulierung in neutrophilen Granulozyten.	12
4.3. Dynamik laboratoriumsmedizinischer Parameter bei akuten entzündlichen Prozessen.	12
5. Diskussion	14
6. Abkürzungsverzeichnis	17
7. Literaturverzeichnis	18
8. Eidesstattliche Versicherung einschließlich Anteilserklärung	20
9. Ausgewählte Publikationen	22
9.1. Is there a role for mannan-binding lectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease?	22
9.2. Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases.	27
9.3. Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers.	33
10. Lebenslauf	40
11. Publikationsliste	41
12. Danksagung	44

Kurzdarstellung

Einleitung: Der frühzeitige Nachweis inflammatorischer Erkrankungen, wie z.B. einer Sepsis, ist von großer klinischer Bedeutung. Eine zügige und zuverlässige laboratoriumsmedizinische Diagnostik hilft, den Patienten schnellstmöglich angemessen zu therapieren. Die komplexen molekularen und zellulären Prozesse bei Entzündungen bieten noch viele ungenutzte Möglichkeiten, akute und chronische Erkrankungen, an deren Pathogenese entzündliche Reaktionen beteiligt sind, nachzuweisen und zu differenzieren. In dieser Forschungsarbeit wurden neue Biomarker aus dem Komplementsystem, der zellulären Immunantwort und der Erythropoese mit etablierten laboratoriumsdiagnostischen Methoden zum Nachweis inflammatorischer Prozesse verglichen.

Methodik: Es wurde untersucht, ob die Konzentration von Mannose-bindendem Lektin (MBL) im Serum oder der *MBL2*-Genotyp für die Diagnose von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen herangezogen werden können. Des Weiteren wurde die Eignung des vom SYSMEX XE-5000 Hämatologieautomaten bestimmten Granulations-Index überprüft, die manuelle Mikroskopie bei der Diagnose von toxischer Granulierung in neutrophilen Leukozyten zu ersetzen. Abschließend wurde die Dynamik der Parameter Procalcitonin, Granulations-Index, Delta-Hämoglobin, Leukozyten- und Thrombozytenzahl während der Entstehung und des Abklingens einer akuten entzündlichen Reaktion analysiert.

Ergebnisse: Weder bei MBL-Konzentrationen im Serum ($P = 0,367$), noch bei *MBL2*-Genotypen ($P = 0,341$) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa erkrankten Patienten und den Kontrollpersonen festgestellt werden. Der Granulations-Index zeigte eine starke Korrelation mit der bei bakteriellen Infektionen unter dem Mikroskop beobachteten toxischen Granulierung ($r_s = 0,839$). Die Parameterdynamik während einer hochgradig entzündlichen Reaktion konnte in stundengenauen Verlaufskurven über einen Zeitraum von 168 Stunden dargestellt werden.

Schlussfolgerungen: Die Analyse von MBL bietet keinen Nutzen für die Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Der Granulations-Index kann als Ersatz für die manuelle Mikroskopie empfohlen werden. Bei der Beurteilung hochgradig entzündlicher Prozesse können der Granulations-Index und Delta-Hämoglobin nützliche Zusatzinformationen liefern.

Abstract

Background: The timely detection of inflammatory conditions, for example a sepsis, is of great clinical importance. Rapid and reliable laboratory medical diagnostics help to initiate the appropriate therapy as early as possible. The complex molecular and cellular processes involved in inflammation offer many unused opportunities to detect and differentiate acute and chronic diseases, whose pathogenesis includes inflammatory reactions. This study compared new biomarkers of the complement system, cellular immune response, and erythropoiesis with established laboratory diagnostic methods for the detection of inflammatory processes.

Methods: It was analyzed if the serum concentration of mannan-binding lectin (MBL) or the *MBL2* genotype could be used for chronic inflammatory bowel disease diagnostics. Furthermore, we evaluated the suitability of the granularity index, which was determined by a SYSMEX XE-5000 hematology analyzer, to replace manual microscopy as a method to diagnose toxic granulation in neutrophil granulocytes. In addition, the parameter dynamics of procalcitonin, granularity index, delta hemoglobin, leukocyte and thrombocyte count were investigated during the onset and resolution of a high grade inflammation.

Results: Neither the MBL serum concentration ($P = 0.367$) nor the *MBL2* genotype distribution ($P = 0.341$) differed significantly between patients suffering from Crohn's disease or ulcerative colitis and control groups. The granularity index correlated well with the microscopic rating of toxic granulation occurring during bacterial infections ($r_s = 0.839$). Trajectories for the parameters' dynamics during a high grade inflammation were calculated with time coordinates rounded to the nearest hour and a follow up of 168 hours.

Conclusions: The analysis of MBL offers no benefit for inflammatory bowel disease diagnostics. The granularity index is a suitable replacement for manual microscopy. Delta hemoglobin and the granularity index could provide additional information for the monitoring of high grade inflammatory processes.

1. Einleitung

Bei inflammatorischen Prozessen, wie z.B. einer Sepsis, ist eine frühzeitige Diagnose von entscheidender Bedeutung: Mit jeder verstrichenen Stunde ohne adäquate Therapie steigt die Mortalität von Sepsis-Patienten um 5 – 10% an [1]. Ohne verlässlichen diagnostischen Nachweis sollte jedoch nicht präventiv mit einer Breitband-Antibiotika-Therapie begonnen werden, da der übermäßige Einsatz von Antibiotika zur Entwicklung von Resistenzen führen kann. Der Goldstandard für den Nachweis einer Sepsis ist die zeitaufwändige Blutkultur. Weitere, seit langem etablierte laboratoriumsmedizinische Methoden zur Erkennung inflammatorischer Prozesse, umfassen das manuelle Mikroskopieren von Blutaussstrichen oder die Konzentrationsbestimmung von Proteinen der akuten Phase, wie z.B. des C-reaktiven Proteins (CRP) [2]. Die vielschichtige Immunantwort auf Entzündungsauslöser bietet noch viele ungenutzte Möglichkeiten, akute und chronische Inflammationen nachzuweisen und zu differenzieren. Bauer und Reinhart resümieren Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass Kombinationen neuer Biomarker ein detaillierteres Bild der individuellen Immunantwort wiedergeben können und dem Nachweis einzelner Proteine überlegen sind [1]. Es stellt sich daher die Frage, ob etablierte laboratoriumsmedizinische Methoden ersetzt werden müssen und in welchen Fällen eine Ergänzung mit neuen Nachweisverfahren sinnvoll ist.

Für die Diagnostik der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn wird routinemäßig untersucht, ob eine Mutation im Gen des Nucleotide-Binding Oligomerisation Domain Proteins 2 (*NOD2*) vorliegt. Mutationen dieses Mustererkennungsrezeptors des angeborenen Immunsystems sind mit einem erhöhten Risiko assoziiert, an Morbus Crohn zu erkranken [3]. *NOD2*-Polymorphismen stellen jedoch nur einen kleinen Teil der genetischen Prädisposition für Morbus Crohn dar. Es sind bereits über 30 Gene bekannt, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert werden [4]. Eines der für den Nachweis chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nutzbaren Gene könnte das *MBL2*-Gen sein. Mannan-bindendes Lektin (MBL) ist ein Akute-Phase-Protein, das an die Oberfläche von Mikroorganismen bindet, wodurch das Komplement-System aktiviert wird. Dies löst unter anderem eine Entzündungsreaktion des Körpers aus. Einige Polymorphismen im *MBL2*-Gen führen zu einer gestörten Multimerisation des MBL-Proteins, deren Folgen eine verringerte Serumkonzentration, Liganden-Bindung und Komplement-Aktivierung sind. Eine Studie von Rector *et al.* [5] lieferte Hinweise auf ein vermindertes

Auftreten von Polymorphismen im *MBL2*-Gen bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Es wurde jedoch keine Bestimmung der MBL-Konzentration im Blut durchgeführt. Des Weiteren wurden nur gesunde Kontrollpatienten untersucht, eine Kontroll-Kohorte mit anderen entzündlichen Erkrankungen wurde nicht berücksichtigt. In Zusammenarbeit mit mehreren Instituten der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurde daher eine Studie durchgeführt, in der die Konzentrationsbestimmung von MBL im Serum und die Genotypisierung des *MBL2*-Gens als Möglichkeiten zur Diagnose und Einstufung von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn untersucht wurden. Die Ergebnisse wurden mit der etablierten *NOD2*-Genotypisierung verglichen.

Neben dem Komplement-System spielt auch die zelluläre Immunantwort eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen. Bei schweren bakteriellen Infektionen bilden sich im Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten große, unregelmäßig geformte, basophile Granula, die als „toxische Granulierung“ bezeichnet werden [6]. Die toxische Granulierung wird durch manuelle Mikroskopie von Blutaussstrichen nachgewiesen und liefert den behandelnden Ärzten wertvolle Hinweise auf das mögliche Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion im Körper. Die manuelle Analyse ist jedoch zeitaufwändig und nicht vollständig objektiv. Der Hämatologie-Automat SYSMEX XE-5000 ermöglicht die maschinelle Messung der Granulierung in den neutrophilen Granulozyten und berechnet einen Granulations-Index (GI) [7, 8]. Diese neue Methode sollte evaluiert und mit der manuellen Mikroskopie verglichen werden.

Mit dem Hämatologie-Automaten SYSMEX XE-5000 können noch weitere neue zelluläre Parameter gemessen werden. Einer davon ist der Delta-Hämoglobinwert, die Differenz zwischen dem Hämoglobingehalt der Retikulozyten und dem Hämoglobingehalt der Erythrozyten. Die Beladung der Retikulozyten mit Hämoglobin wird durch Eisenmangelzustände beeinflusst, die auch bei entzündlichen Erkrankungen auftreten. Während einer Inflammation steigt die Expression des Peptid-Hormons Hepsidin, das die Endozytose des Eisentransporters Ferroportin fördert. Ohne Ferroportin wird weder Eisen über den Darm aufgenommen, noch aus körpereigenen Eisenspeichern in das Blut abgegeben. Der dadurch entstehende Eisenmangel kann zu einer „anemia of chronic disease“ (ACD) führen, die auch als „anemia of inflammation“ bezeichnet wird [9]. Das Delta-Hämoglobin kann zur Erkennung einer durch Eisenmangel gestörten Erythropoese herangezogen werden [10]. Es wurde bisher noch nicht untersucht, ob sich Delta-Hämoglobin besser zur frühzeitigen Erkennung eines akuten inflammatorischen

Prozesses eignet als etablierte Entzündungsmarker. Dazu wurden die Delta-Hämoglobin-Werte während der Entstehung und des Abklingens der akuten entzündlichen Reaktion bestimmt.

2. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, etablierte und neue laboratoriumsdiagnostische Methoden zum Nachweis inflammatorischer Prozesse zu vergleichen.

Eine Studie an Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sollte zeigen, ob die Analyse der MBL-Serumkonzentration oder des *MBL2*-Genotyps für die Diagnostik entzündlicher Darmerkrankungen genutzt werden kann. Dazu wurden die in den verschiedenen Kohorten gemessenen MBL-Konzentrationen auf einen statistisch signifikanten Unterschied getestet und die Verteilung der Genotypen untersucht. Zum Vergleich wurden die *NOD2*-Genotypen bestimmt, für die eine Assoziation mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko bekannt ist.

Es sollte untersucht werden, ob die automatisierte Bestimmung des Granulations-Index geeignet ist, die manuelle Mikroskopie bei der Diagnose von toxischer Granulierung in neutrophilen Leukozyten abzulösen. Dazu wurde die Korrelation von GI und mikroskopischer Beurteilung ermittelt, sowie die Korrelation von GI und CRP-Konzentration. Zur Bestimmung der Präzision wurde der Variationskoeffizient der GI-Messung berechnet. Für die manuelle Mikroskopie und den GI wurden Receiver Operating Characteristic (ROC) Graphen erstellt.

Der zeitliche Verlauf der Parameter Delta-Hämoglobin, GI, Procalcitonin, Leukozyten- und Thrombozytenzahl sollte während der Entstehung und des Abklingens einer hochgradig entzündlichen Reaktion bestimmt und verglichen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können durch die Erweiterung der zur Verfügung stehenden laboratoriumsdiagnostischen Methoden zu einer Verbesserung der Erkennung entzündlicher Krankheiten beitragen.

3. Methodik

3.1. Laboratoriumsmedizinische Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

In der Studie wurden Blutproben von 189 gesunden Blutspendern, 98 Morbus Crohn Patienten, 83 Patienten mit Colitis ulcerosa und 82 Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (z.B. systemischer Lupus erythematoses oder Polymyositis) untersucht. Die MBL-Serumkonzentration wurde mit einem kommerziell erhältlichen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (AntibodyShop, Kopenhagen, Dänemark) analysiert.

Nach Extraktion der genomischen DNA mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurde diese genotypisiert. Für die Detektion der *MBL2*-Mutationen R52C, G54D und G57E wurde der entsprechende DNA-Abschnitt mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert, mit dem illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) gereinigt und unter Verwendung des GenomeLab DTCS Quick Start Kits (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) mit einem CEQ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) sequenziert.

Die Untersuchung der genomischen DNA auf das Vorliegen der *NOD2*-Mutationen R702W, G908R und L1007fsinsC erfolgte mit einem LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durch PCR und Schmelzkurvenanalyse. Dabei wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte im ersten Schritt per PCR vervielfältigt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der PCR-Produkte mit sequenzspezifischen Fluorophor-markierten Sonden. Durch Erhitzen bei kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz wurde die Schmelztemperatur ermittelt. Die Schmelztemperatur gab Aufschluss darüber, wie passgenau eine Sonde mit dem PCR-Produkt hybridisieren konnte und somit über das Vorhandensein einer Mutation. Lag eine Mutation vor, so trennten sich Sonde und PCR-Produkt bereits bei einer niedrigeren Temperatur. In der statistischen Auswertung der Studie wurden die MBL-Konzentrationen der verschiedenen Kohorten mit dem parameterfreien Kruskal-Wallis-Test verglichen. Die Verteilung der *MBL2*- und *NOD2*-Genotypen wurde mittels Chi-Quadrat-Test analysiert.

3.2. Automatisierte Bestimmung der toxischen Granulierung in neutrophilen Granulozyten

Für den Vergleich von manueller und automatisierter Bestimmung der toxischen Granulierung wurden Blutproben von 100 Patienten der Intensivstation und von 158 zufällig ausgewählten Patienten, denen Blut für eine hämatologische Untersuchung entnommen worden war, analysiert.

May-Grünwald-Giemsa gefärbte Blutausstriche wurden unter einem Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet und die toxische Granulierung semiquantitativ durch eine in der hämatologisch-mikroskopischen Diagnostik erfahrene medizinisch-technische Assistentin eingestuft in die Kategorien normal, +, ++ oder +++. Die automatische Bestimmung der Granularität erfolgte mit einem XE-5000 Hämatologie-Automaten (SYSMEX Corporation, Kobe, Japan). Dieser Hämatologie-Automat arbeitet nach dem Prinzip der Fluoreszenz-Flow-Zytometrie. Mit Fluoreszenz-Farbstoffen wurden Zellbestandteile wie Nukleinsäuren und zytosolische Proteine der Leukozyten angefärbt; diese wurden durch die Messung der Fluoreszenz analysiert. Das Seitwärtsstreulicht gab Aufschluß über die Granularität der Zellen. Das Messergebnis des seitwärts gestreuten Lichts wurde durch die Software des XE-5000 mit den Messergebnissen einer Referenzgruppe verglichen und daraus der GI berechnet. Ein GI von 0 entsprach einem Ergebnis innerhalb einer Standardabweichung vom Mittelwert der Referenzkohorte. Lag der Messwert bis zu zwei Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt, ergab dies einen GI von 1 und so weiter. Positive GI-Werte deuten auf eine Hypergranulation der Neutrophilen hin, negative GI-Werte repräsentieren eine Hypogranulation.

Um die Präzision der GI-Bestimmung beurteilen zu können, wurde Probenmaterial von sechs Patienten in achtfacher Wiederholung analysiert. Die CRP-Konzentration im Blut wurde mit einem Modular System P (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) bestimmt, wobei ein turbidimetrisches Messprinzip verwendet wurde. Blutproben von 40 gesunden Testpersonen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, um die Entwicklung des GI *in vitro* über 180 Minuten verfolgen zu können.

Für die Korrelation zwischen GI und mikroskopisch bestimmter toxischer Granulierung, sowie zwischen GI und CRP Konzentration wurden Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. Es wurden ROC Kurven für GI und manuelle Mikroskopie erstellt. Zur Ermittlung der Präzision wurden Variationskoeffizienten errechnet.

3.3. Dynamik laboratoriumsmedizinischer Parameter bei akuten entzündlichen Prozessen

Die hämatologischen und klinisch-chemischen Daten von 53.968 Patienten wurden retrospektiv analysiert. Das Ausmaß eines systemischen Entzündungsgeschehens wurde anhand der CRP-Konzentration im Blut bewertet. Wenn die CRP-Konzentration von Werten unter 40 mg/L auf Werte über 100 mg/L anstieg, wurde der Patient in die Kohorte "Entstehung einer hochgradigen Entzündung" aufgenommen. Das Einschlusskriterium für die Kohorte "Abklingen einer hochgradigen Entzündung" war das Absinken der CRP-Konzentration von Werten über

100 mg/L auf Werte unter 40 mg/L. Die CRP-Konzentration wurde mit einem cobas 6000 (Roche Deutschland Holding GmbH) unter Verwendung eines turbidimetrischen Messprinzips bestimmt. Die Procalcitonin-Konzentration wurde mit einem BRAHMS KRYPTOR (BRAHMS GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) ermittelt. Dieses Gerät arbeitet mit zeitaufgelöster verstärkter Kryptat-Emissions-Technologie. Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, GI und Delta Hämoglobin wurden mit einem XE-5000 (SYSMEX Corporation) gemessen. Dabei wurden Impedanz-Messungen und Fluoreszenz-Flow-Zytometrie eingesetzt.

Mit der locally weighted scatter plot smoothing (LOWESS) Methode wurden Verlaufskurven für die Parameter erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Laboratoriumsmedizinische Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Es wurde kein Unterschied in der MBL-Serumkonzentration von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatischen Erkrankungen oder gesunden Probanden gefunden ($P = 0,367$). Die Verteilung der *MBL2*-Genotypen in den Kohorten differierte nicht ($P = 0,341$). Die *NOD2*-Genotypen waren signifikant unterschiedlich verteilt ($P < 0,001$). Patienten mit Morbus Crohn waren häufiger Träger von Mutationen im *NOD2*-Gen als Patienten mit Colitis ulcerosa, rheumatischen Erkrankungen oder gesunde Kontrollen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Verteilung der *MBL2*- und *NOD2*-Genotypen

Genotyp	Erkrankung			
	Gesund	Rheuma	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
<i>MBL2</i>				
A/A	104 (55%)	51 (62%)	60 (61%)	53 (64%)
A/O	74 (39%)	30 (37%)	35 (36%)	29 (35%)
O/O	11 (6%)	1 (1%)	3 (3%)	1 (1%)
<i>NOD2</i>				
Keine Mutation	144 (76%)	64 (80%)	53 (54%)	65 (78%)
Einfach heterozygot	42 (22%)	16 (20%)	29 (30%)	17 (21%)
Mehrfach heterozygot	3 (2%)	0 (0%)	6 (6%)	0 (0%)
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)	10 (10%)	1 (1%)

Angegeben ist die Anzahl der Studienteilnehmer mit dem entsprechenden Genotyp, sowie in Klammern der prozentuale Anteil an der Kohorte. A: *MBL2* Wildtyp-Allel; O: Allel mit der *MBL2*-Mutation R52C, G54D oder G57E; Einfach heterozygot: Träger eines Allels mit der *NOD2*-Mutation R702W, G908R oder L1007fsinsC; Mehrfach heterozygot: Träger war heterozygot für zwei oder mehr *NOD2*-Mutationen

4.2. Automatisierte Bestimmung der toxischen Granulierung in neutrophilen Granulozyten

Mit zunehmender toxischer Granulierung, die mittels Mikroskop im Blutausstrich beobachtet wurde, stieg auch der gemessene GI an (siehe Abbildung 1). Die mikroskopische Beurteilung der toxischen Granulierung und der GI korrelierten mit $r_s = 0,839$.

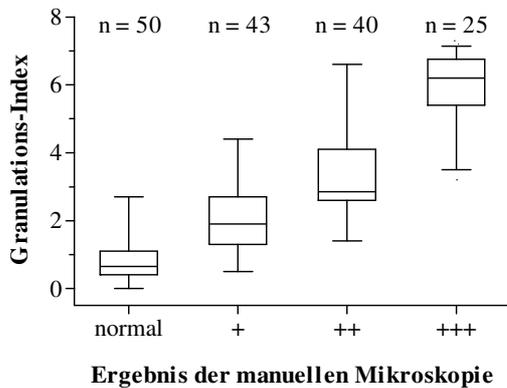


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen manueller Mikroskopie und GI

Tabelle 2: Präzision der GI-Messung

Gemessener Granulations-Index ^a	Variationskoeffizient [%]
-11,83 – -11,43 (-11,62)	1,36
-7,00 – -6,00 (-6,46)	5,92
-0,07 – 0,20 (0,06)	179,66
3,47 – 3,73 (3,59)	2,31
5,03 – 5,77 (5,41)	4,75
7,50 – 8,90 (8,10)	4,88

^aMinimum – Maximum (Mittelwert)

Die ROC-Analyse ergab eine Fläche unter der Kurve (AUC) von 0,91 für die Einstufung der toxischen Granulierung per manueller Mikroskopie und eine AUC von 0,94 für die automatische GI-Messung. Bei Patienten der Intensivstation korrelierten GI und CRP-Konzentration mit $r = 0,177$. Für das zufällig ausgewählte Patientenkollektiv lag die Korrelation bei $r_s = 0,836$.

Nach Stimulation mit bakteriellem LPS *in vitro* trat nach 30 Minuten eine Degranulierung der neutrophilen Granulozyten auf, gefolgt von einer Hypergranulation nach 180 Minuten. Die Daten zur Untersuchung der Präzision der GI-Messung wurden in Tabelle 2 zusammengefasst.

4.3. Dynamik laboratoriumsmedizinischer Parameter bei akuten entzündlichen Prozessen

Anhand der Einschlusskriterien wurden die Daten von 1084 Patienten ausgewählt, um für die Parameter GI, Delta-Hämoglobin, Procalcitonin, Leukozyten- und Thrombozytenzahl LOWESS-Verlaufskurven zu erstellen. Während der Entstehung einer systemischen hochgradigen Entzündungsreaktion hatten die Verlaufskurven für Procalcitonin und GI den oberen Referenzbereich zum Zeitpunkt der Erstmessung bereits überschritten. Abbildung 2A zeigt die Parameterdynamik des GI im Vergleich zur CRP-Konzentration. Die Thrombozytenzahlen sanken nach 24 Stunden unter den Referenzbereich ab. Änderungen in der Hämoglobinisierung

der Retikulozyten, ausgedrückt als Delta-Hämoglobin, wurden nach sechs Tagen sichtbar. Die Verlaufskurve der Leukozytenzahl blieb innerhalb des Referenzbereichs.

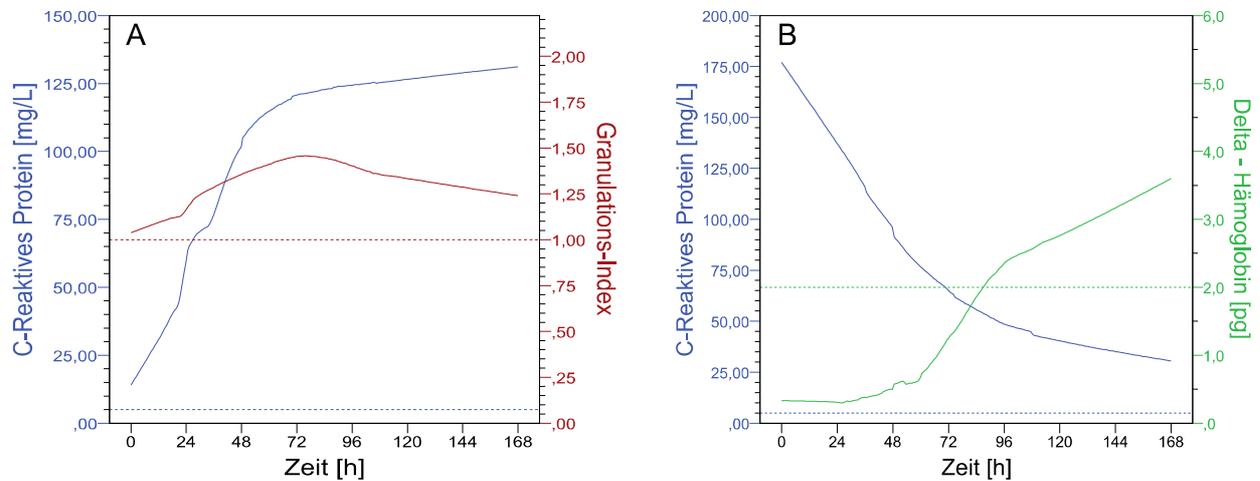


Abbildung 2: LOWESS-Kurven zur Parameterdynamik

2A: Verlauf der CRP-Konzentration (blaue Linie) und des GI (rote Linie) bei der Entstehung einer hochgradigen Entzündung. Die oberen Grenzen der Referenzbereiche sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. 2B: Verlauf der CRP-Konzentration (blaue Linie) und des Delta-Hämoglobins (grüne Linie) während des Abklingens einer hochgradigen Entzündung. Gestrichelte Linien markieren die untere Grenze des Delta-Hämoglobin-Referenzbereiches (grün) und die obere Grenze des Referenzbereiches für CRP (blau).

Mit Abklingen der Entzündung verringerten sich die Konzentration von Procalcitonin und der GI. Innerhalb von sieben Tagen normalisierten sich die Werte jedoch nicht bis in den Referenzbereich. Die LOWESS-Kurven für Thrombozyten- und Leukozyten-Zahl verliefen innerhalb der Referenzbereiche und näherten sich dem Mittelwert einer gesunden Population an. Die Verlaufskurve von Delta-Hämoglobin trat nach vier Tagen wieder in den Referenzbereich ein (siehe Abbildung 2B).

5. Diskussion

Die durchgeführte Studie zur MBL-Serumkonzentration und der *MBL2*-Genotypenverteilung bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen konnte die Ergebnisse von Rector *et al.* nicht bestätigen, dass Patienten mit Colitis ulcerosa signifikant weniger häufig Träger von *MBL2*-Mutationen wären [5]. Ein Grund dafür könnte die geringere Fallzahl der Charité-Studie sein. In der Kontrollgruppe mit rheumatischen Erkrankungen zeigte sich der gleiche Anteil an Patienten mit dem *MBL2* O/O Genotyp (1%) wie bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Eine Kontrollgruppe mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist von Rector und Kollegen nicht untersucht worden. Eine möglicherweise abweichende Verteilung der *MBL2*-Genotypen scheint daher nicht spezifisch für eine Kohorte von Colitis ulcerosa Patienten zu sein. Im Gegensatz dazu konnte bestätigt werden, dass Patienten mit Morbus Crohn signifikant häufiger Träger von *NOD2*-Mutationen sind, wie von Hugot *et al.* berichtet [3]. Die Ergebnisse der MBL-Konzentrationsmessungen entsprechen den Resultaten von Zimmermann-Nielsen und Kollegen, die ebenfalls keinen Unterschied in der MBL-Serumkonzentration von Patienten mit Morbus Crohn, systemischem Lupus erythematodes oder gesunden Kontrollpersonen gefunden haben [11]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass auch die MBL-Konzentration bei Patienten mit Colitis ulcerosa keinen Unterschied aufwies. Weder die Bestimmung des *MBL2*-Genotyps, noch die Messung der MBL-Konzentration im Serum bieten Potenzial für die Diagnostik von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

Die Beurteilung der toxischen Granulierung in neutrophilen Leukozyten durch manuelle Mikroskopie hat eine subjektive Komponente, die zum Beispiel von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers abhängt. Insbesondere die Unterscheidung der Kategorien ++ und +++ schien problematisch zu sein, wie die mangelnde Normalverteilung in Abbildung 1 zeigt. Es scheint, dass bei Proben mit einem hohen Grad an toxischer Granulierung im Zytoplasma bevorzugt eine Einstufung in die Kategorie ++ vorgenommen wurde, anstelle einer Zuordnung in die Kategorie +++. Der automatisiert bestimmte GI hat den Vorteil einer besseren Objektivität. Wie von Kugel und Rosenthal berichtet, tritt eine toxische Granulierung nur bei schweren bakteriellen Infektionen auf [6]. Zu einem Anstieg des Akute-Phase-Proteins CRP kommt es hingegen auch bei nicht bakteriell verursachten Entzündungsreaktionen. Es entspricht daher durchaus den Erwartungen, dass CRP und GI je nach Zusammensetzung der untersuchten Kohorte unterschiedlich gut korrelierten. So ergab sich für das zufällig ausgewählte

Patientenkollektiv mit einem hohen Anteil an bakteriellen Infektionen eine Korrelation von $r_s = 0,836$, während CRP und GI bei Patienten der Intensivstation mit postoperativem Status und verschiedensten entzündlichen Reaktionen nur wenig korrelierten ($r = 0,177$).

Für die Präzision von bioanalytischen Methoden empfiehlt die Food and Drug Administration der Vereinigten Staaten von Amerika Variationskoeffizienten von 15% oder niedriger [12]. Die Variationskoeffizienten der GI-Bestimmung lagen mit Ausnahme eines Wertes bei 1% bis 6% und somit innerhalb dieser Vorgabe (siehe Tabelle 2). Bei sehr kleinen GI-Werten von -0,07 bis 0,20 ergab sich ein Variationskoeffizient von 180%. Der Grund für diesen hohen Wert ist die Berechnung der Variationskoeffizienten durch Division von Standardabweichung und Mittelwert. Bei kleinen Mittelwerten, wie in dieser Messreihe von 0,06, ergeben sich dadurch hohe Werte für den Variationskoeffizienten.

Die Eignung des GI für die Erkennung schwerer bakterieller Infektionen wurde inzwischen für Tumorpatienten belegt, wobei Luo *et al.* die hier präsentierten Ergebnisse bestätigen konnten [13]. Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass der GI geeignet ist, die manuelle Mikroskopie bei der Bestimmung der toxischen Granulierung in neutrophilen Leukozyten zu ersetzen.

Als laboratoriumsdiagnostischer Parameter ist der GI nicht nur wegen der automatisierten Bestimmbarkeit interessant, sondern auch wegen der kurzen Zeitspanne zwischen inflammatorischem Stimulus und Veränderung des Parameters. *In vitro* zeigte sich bereits nach 30 Minuten eine Degranulation der neutrophilen Leukozyten, sowie eine Hypergranulation nach drei Stunden. Die *in vivo* Daten der retrospektiven Parameteranalyse untermauern diese Beobachtung. Der Referenzbereich des GI wurde bereits in den ersten Stunden der Entstehung einer hochgradigen Entzündungsreaktion überschritten (siehe Abbildung 2A).

Die in Abbildung 2 dargestellten LOWESS-Kurven für CRP können nicht zur Analyse der CRP-Parameterdynamik herangezogen werden, da die Patienten nach ihren CRP-Werten für diese Studie ausgewählt wurden. Somit waren Anfangs- und Endpunkte der CRP-Kurven vorgegeben. Gordeuk und Kollegen konnten zeigen, dass bakterielles Wachstum in humanen Serumproben durch Eisenüberladung gefördert wird [14]. Bei der systemischen Entzündungsreaktionen führt der durch Hecpidin-Expression hervorgerufene Eisenmangel in Körperflüssigkeiten zu einer Hemmung des Bakterienwachstums [15]. Die Ergebnisse zur Delta-Hämoglobin-Dynamik zeigen, dass es mehrere Tage dauert, bis die gehemmte Eisenaufnahme und Abgabe die Hämoglobin-Synthese beeinflusst. Erst sechs Tage nach Einsetzen der hochgradigen Entzündungsreaktion war eine verminderte Hämoglobinisierung der Retikulozyten im Vergleich

zum Hämoglobingehalt der Erythrozyten messbar. Zur frühzeitigen Erkennung einer systemischen Inflammation ist der Parameter Delta-Hämoglobin somit ungeeignet. Das Abklingen einer Entzündung spiegelte sich hingegen schneller in den Delta-Hämoglobin-Werten wider (siehe Abbildung 2B). Delta-Hämoglobin war der einzige analysierte Parameter, der bei Abklingen der systemischen Entzündung innerhalb der ersten vier Tage eine Normalisierung der pathologischen Werte auf Messwerte im Referenzbereich zeigte. Schoorl *et al.* beobachteten bei Patienten mit Lungenentzündung ebenfalls eine vorübergehende Beeinträchtigung der Hämoglobin-Synthese [16]. Vier Tage nach Antibiotikagabe zeigte sich eine beginnende Normalisierung des Verhältnisses von Retikulozyten-Hämoglobin zu Erythrozyten-Hämoglobin. In der Studie von Schoorl und Kollegen wurden allerdings nur Blutproben von Tag 1, 2, 3, 4 und 14 nach Beginn der Antibiotikatherapie analysiert. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse geben die Dynamik der Parameter wesentlich detaillierter wieder.

Für die Beurteilung entzündlicher Prozesse wird häufig die Leukozytenzahl bestimmt. Jekarl *et al.* konnten jedoch in einer ROC-Analyse zeigen, dass die Leukozytenzahl bei Verwendung zur Diagnose einer bakteriellen Infektion lediglich eine AUC von 0,62 aufwies. Für die Erkennung einer schweren Sepsis lag die AUC sogar nur bei 0,54 [17]. Die Analyse der Patientendaten mittels LOWESS-Kurven bestätigte die limitierte Aussagekraft der Leukozytenzahl: Bei vielen Patienten wurden trotz Vorliegens einer hochgradigen Entzündung Leukozytenzahlen innerhalb des Referenzbereichs gemessen. Möglicherweise bietet hier der GI als Parameter der Leukozytenaktivierung mehr Informationen als eine Zählung der Leukozyten. Da Hämatologie-Automaten wie der SYSMEX XE-5000 neben der Erstellung eines konventionellen Blutbildes auch in der Lage sind, die neuen Parameter GI und Delta-Hämoglobin zu bestimmen, könnten diese Parameter problemlos gemeinsam analysiert und zusammen mit den etablierten Messgrößen an die anfordernden Ärzte übermittelt werden.

Die hier vorgeschlagenen Erweiterungen der hämatologischen Analyseparameter und die Ersetzung der manuellen Mikroskopie bei der Bestimmung der toxischen Granulierung können zu einer Verbesserung der Erkennung inflammatorischer Prozesse beitragen. Die Analyse zellulärer Veränderungen in der Folge der Entzündungsreaktion - eine verminderte Hämoglobinsynthese im Rahmen der Erythropoese und die Ausbildung von zytoplasmatischen Granula in neutrophilen Granulozyten bei Entzündungen - erweitert somit das Spektrum diagnostischer Möglichkeiten zur Erkennung entzündlicher Krankheiten.

6. Abkürzungsverzeichnis

MBL	Mannose-bindendes Lektin
CRP	C-reaktives Protein
NOD2	Nucleotide-Binding Oligomerisation Domain Protein 2
GI	Granulations-Index
ACD	anemia of chronic disease
ROC	receiver operating characteristic
P	probability value
r_s	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
DNA	Desoxyribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
LPS	Lipopolysaccharid
LOWESS	locally weighted scatter plot smoothing
AUC	area under the curve
r	Pearson'scher Korrelationskoeffizient

7. Literaturverzeichnis

- 1 Bauer M, Reinhart K. Molecular diagnostics of sepsis - where are we today? *Int J Med Microbiol* 2010;300:411-3.
- 2 Stuart J, Whicher JT. Tests for detecting and monitoring the acute phase response. *Arch Dis Child* 1988;63:115-7.
- 3 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
- 4 Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barnada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ, Consortium NIG, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Belgian-French IBDC, Wellcome Trust Case Control C, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghorji J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008;40:955-62.
- 5 Rector A, Lemey P, Laffut W, Keyaerts E, Struyf F, Wollants E, Vermeire S, Rutgeerts P, Van Ranst M. Mannan-binding lectin (mbl) gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Genes Immun* 2001;2:323-8.
- 6 Kugel MA, Rosenthal N. Pathologic changes occurring in polymorphonuclear leukocytes during the progress of infections. *Am J Med Sci* 1932;183:657-67.
- 7 Furundarena JR, Araiz M, Uranga M, Sainz MR, Agirre A, Trassorras M, Uresandi N, Montes MC, Argoitia N. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's neut-x and neut-y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol* 2010;32:360-6.
- 8 Le Roux G, Vlad A, Eclache V, Malanquin C, Collon JF, Gantier M, Schillinger F, Peltier JY, Savin B, Letestu R, Baran-Marszak F, Fenaux P, Ajchenbaum-Cymbalista F.

Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: Value of a structural blood cell parameter (neut-x) determined by the Sysmex XE-2100. *Int J Lab Hematol* 2010;32:e237-43.

9 Andrews NC. Forging a field: The golden age of iron biology. *Blood* 2008;112:219-30.

10 Thomas L, Franck S, Messinger M, Linssen J, Thome M, Thomas C. Reticulocyte hemoglobin measurement - comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1193-202.

11 Zimmermann-Nielsen E, Baatrup G, Thorlacius-Ussing O, Agnholt J, Svehag SE. Complement activation mediated by mannan-binding lectin in plasma from healthy individuals and from patients with sle, Crohn's disease and colorectal cancer. Suppressed activation by sle plasma. *Scand J Immunol* 2002;55:105-10.

12 Guidance for industry - bioanalytical method validation. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2013. (Accessed August 13, 2014, at <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>.)

13 Luo Y, Lin J, Chen H, Zhang J, Peng S, Kuang M. Utility of neut-x, neut-y and neut-z parameters for rapidly assessing sepsis in tumor patients. *Clin Chim Acta* 2013;422:5-9.

14 Gordeuk VR, Brittenham GM, McLaren GD, Spagnuolo PJ. Hyperferremia in immunosuppressed patients with acute nonlymphocytic leukemia and the risk of infection. *J Lab Clin Med* 1986;108:466-72.

15 Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1434-43.

16 Schoorl M, Snijders D, Schoorl M, Boersma WG, Bartels PC. Transient impairment of reticulocyte hemoglobin content and hepcidin-25 induction in patients with community-acquired pneumonia. *Scand J Clin Lab Invest* 2013;73:54-60.

17 Jekarl DW, Lee SY, Lee J, Park YJ, Kim Y, Park JH, Wee JH, Choi SP. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:342-7.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christina Hoffmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleich von etablierten und neuen laboratoriumsdiagnostischen Methoden zum Nachweis inflammatorischer Prozesse“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Christina Hoffmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Hoffmann C, Hoffmann P, Lun A, Büning C, Hiepe F, Scherer HU, Steinhagen-Thiessen E, Weimann A. Is there a role for mannan-binding lectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease? Immunogenetics 2010;62:231-5.

Beitrag im Einzelnen:

Literaturrecherche, Etablierung der Genotypisierungsmethoden, statistische Datenanalyse und Interpretation der Ergebnisse, Verfassen des Manuskripts, Korrespondenzautor

Publikation 2:

Zimmermann M, Cremer M, Hoffmann C, Weimann K, Weimann A. Granularity index of the Sysmex XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases. Clin Chem Lab Med 2011;49:1193-8.

Beitrag im Einzelnen:

Mitwirkung bei der Erarbeitung des Studienkonzepts, statistische Datenanalyse und Interpretation der Ergebnisse, Erstellung von Abbildungen, anteiliges Verfassen des Manuskripts und kritische Überarbeitung des Textes

Publikation 3:

Hoffmann C, Hoffmann P, Zimmermann M. Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers. Clin Chem Lab Med 2014; DOI 10.1515/cclm-2014-0482 (epub ahead of print).

Beitrag im Einzelnen:

Erstellung des Studienkonzepts, statistische Datenanalyse und Interpretation der Ergebnisse, Erstellung von Abbildungen, Verfassen des Manuskripts, Korrespondenzautor

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Prof. Dr. R. Tauber

Unterschrift der Doktorandin

Dipl.-Biochem. C. Hoffmann

Hoffmann C, Hoffmann P, Lun A, Büning C, Hiepe F, Scherer HU, Steinhagen-Thiessen E, Weimann A. Is there a role for mannan-binding lectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease? *Immunogenetics* 2010;62:231-5.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00251-010-0429-0>

Zimmermann M, Cremer M, Hoffmann C, Weimann K, Weimann A. Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases. Clin Chem Lab Med 2011;49:1193-8.

<http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.188>

Hoffmann C, Hoffmann P, Zimmermann M. Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers. Clin Chem Lab Med 2015;53:541-7.

<http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2014-0482>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst bei meinem Doktorvater und Mentor Prof. Dr. Rudolf Tauber bedanken, der mir die Anfertigung dieser Arbeit im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie ermöglicht hat. Viele Mitarbeiter des Instituts sind über die Jahre mehr als nur Kollegen für mich gewesen - besondere Vorbilder für Menschlichkeit und Engagement waren Dr. Andreas Lun und Dr. Sabine Ziemer. Dr. Andreas Weimann danke ich dafür, dass er mein Interesse für die Laboratoriumsmedizin geweckt hat. Während meiner Arbeit sind zahlreiche neue Freundschaften entstanden: Vor allem gilt ein herzliches Dankeschön Dr. Mathias Zimmermann, der mich mit Fachwissen und stets guter Laune unterstützt hat. Mein Dank gebührt des Weiteren den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Glykoanalytik, die immer freundlich und hilfsbereit waren. Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, für die mein beruflicher Erfolg nie in Frage stand.