

Aus dem Charité Centrum 5 für Diagnostische und Präventive Labormedizin
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
Direktor: Professor Dr. med. Rudolf Tauber

HABILITATIONSSCHRIFT

Neue dynamische Fluoreszenz-Flowzytometrie Parameter des erweiterten Blutbildes

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Labormedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Dipl. biochem. Andreas Weimann, MHBA

Eingereicht am: 22.09.2011

Dekanin: Professorin Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter 1. Professor Dr. Harald Renz
 2. Professor Dr. Christoph Wagener

Für meine Frau Karin

Inhaltsverzeichnis mit Zusammenstellung ausgewählter Publikationen

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung

- 1.1 Automatisierte Blutbildanalyse mittels Fluoreszenz-Flowzytometrie
- 1.2 Die unreife Plättchenfraktion (IPF) zur Differenzierung von Thrombozytopenien
- 1.3 Delta-Hämoglobin und die unreife Retikulozytenfraktion (IRF)
- 1.4 Der Granulationsindex (GI-Index)

2 Relevante Originalarbeiten

2.1 Die unreife Plättchenfraktion (IPF) zur Differenzierung von Thrombozytopenien

Publikation 1

Cremer M., Paetzold J., Schmalisch G., Hammer H., Loui A, Dame C., **Weimann A.** (2009) "Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia", Br J Haematol, **144**, 619-621

Publikation 2

Cremer M.*, **Weimann A.***, Schmalisch G., Hammer H., Bühner C., Dame C. (2010) "Immature platelet fraction reflects megakaryopoietic activity in neonatal early-onset thrombocytopenia", ***co-first authors**, Thrombosis Haemostasis, **103**, 1016-1021

Publikation 3

Strauß G., Vollert C., von Stackelberg A., Schütz B., **Weimann A.**, Gaedicke G., Schulze H. (2010) "Immature platelet count: A simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia", Pediatric Blood & Cancer, **57**, 641-647

2.2 Delta-Hämoglobin (delta-Hb) und die unreife Retikulozytenfraktion (IRF)

Publikation 4

Weimann A., Lun S., Müller C., Pratschke J., Reinke P., Lun A. (2007) "Reticulocytes and their immature fraction do not detect acute rejection after kidney transplantation", Transplantation Proceedings, **39**, 514-17

Publikation 5

Weimann A., Lun A., Lun S., Zimmermann M., Borges AC., Ziebig R., Gonzalez JB., Gilka S., Saravia M., Knebel F., Schroeckh S., Schimke I. (2010) "Leukocyte, neutrophil, immature granulocyte counts and interleukin-6 are superior to procalcitonin, C-reactive protein and delta-He for detection of mild inflammation: data from marathon runners producing mild systemic inflammation visible immediately after the run", J Lab Med, **34**, 53-59

2.3 Der Granulationsindex (GI-Index) zur Quantifizierung der toxischen Granulation von neutrophilen Granulozyten

Publikation 6

Zimmermann M., Cremer M., Hoffmann C., Weimann K., **Weimann A.** (2011) "Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases", CCLM, **49**, 1193-1198

3 Diskussion und Ausblick

3.1 Differentialdiagnostik mittels IPF

3.2 Therapiemonitoring und Prognoseabschätzung mittels IPF

3.3 Differentialdiagnostik und Monitoring mittels IRF und delta-Hb

3.4 Ersatz eines manuellen mikroskopischen Parameters durch einen automatisierten: der GI-Index

4 Zusammenfassung

5 Literaturverzeichnis

6 Erklärung

7 Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

aCML	atypische chronische myeloische Leukämie
aITP	akute Immunthrombozytopenie
cITP	chronische Immunthrombozytopenie
ACD	anemia of chronic disease
ALL	akute lymphatische Leukämie
ATG	Antithymozytenglobulin
AUC	area under curve
CD	cluster of differentiation
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
d	day
delta-Hb	delta-Hämoglobin
delta-He	delta-Hämoglobinäquivalent
DIC	disseminated intravascular coagulation
DIG	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELBW	extreme low birth weight
EOBI	early onset of bacterial infection
EPO	Erythropoetin
GI-Index	Granulationsindex
HELLP	hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
IG	immature granulocytes
IL	Interleukin
IPF%	relative immature platelet fraction
IPF#	absolute number of immature platelets
IRF	immature reticulocyte fraction
ITP	Immunthrombozytopenie
ISLH	International Society for Laboratory Hematology
LPS	Lipopolysaccharid
MCH	mittleres korpuskuläres Volumen
MDS	myelodysplastisches Syndrom

MPV	mittleres Plättchenvolumen
NEUT-X	Seitwärts-Streulicht der neutrophilen Granulozyten
NEUT-Y	Seitwärts-Fluoreszenz Streulicht der neutrophilen Granulozyten
NICU	neonatalogical intensive care unit
nl	Nanoliter
NPV	negativ prädiktiver Wert
nm	Nanometer
NRBC	nucleated red blood cell
NTX	Nierentransplantation
p	probability
PCT	Plättchenkrit
PCT	Procalcitonin
PDW	Plättchenverteilungsbreite
P-LCR	platelet large cell ratio
P-MFV	platelet mean-frequent volume
Ret-Hb	Retikulozyten-Hämoglobin
Ret-He	Retikulozyten-Hämoglobinäquivalent
RNA	ribonucleic acid
ROC	receiver operator characteristics
NTX	Nierentransplantation
SGA	small for gestational age
TGN	toxisch granulierende Neutrophile
TPO	Thrombopoetin
TTP	thrombotisch-thrombozytopenie Purpura
WAM	workarea manager
XE2100	Blutbild-Analysegerät der Firma SYSMEX, Kobe, Japan
XE5000	Blutbild-Analysegerät der Firma SYSMEX, Kobe, Japan

1 EINLEITUNG

1.1 Automatisierte Blutbildanalyse mittels Fluoreszenz-Flowzytometrie

In der Zytometrie werden Zellen quantitativ gezählt und vermessen. Neben der reinen Anzahl und Größe kann z.B. der Zelltyp, DNA-Gehalt oder die innere Struktur einer Zelle bestimmt werden. Das quantitative Gegenstück zur Fluoreszenz-Mikroskopie von Einzelzellen stellt die Fluoreszenz-Flowzytometrie dar. Durch die Anwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen zur Anfärbung von zellulären Bestandteilen können intrazelluläre Spezifika mit grosser Geschwindigkeit von lebenden Zellen analysiert werden. Die Ergebnisse werden in Form von Scattergrammen und Histogrammen dargestellt, um in übersichtlicher Weise Menge und Art unterschiedlicher Zellpopulationen darzustellen (Fujimoto, 1999).

In automatisierten Hämatologieautomaten der neuesten Generation werden die Blutproben aliquotiert, mit unterschiedlichen Reagenzien und Fluoreszenzfarbstoffen versetzt und in verschiedenen Messkanälen gleichzeitig analysiert. Die interne Zellstruktur und das Zellvolumen werden über den elektrischen Widerstand im Gleichstrom und im niederfrequenten und hochfrequenten Wechselfeld, sowie optische Parameter als Absorption, Streulicht und Fluoreszenz parallel gemessen. So erhält man über 70 verschiedene Messgrößen pro Patientenprobe, die eine sichere Differenzierung der Zellen auch in nahezu allen pathologischen Proben ermöglicht (Tanaka et al., 2007). Je nach Flagging-Einstellungen am Hämatologieautomaten selbst, bzw. gesteuert durch das Regelwerk einer Middleware (WAM, work area manager), kann bei abnormalen Proben durch einen automatischen Ausstreicher ein Präparat angefertigt und nachfolgend im (automatischen) Mikroskop analysiert werden.

Mittels Halbleiterlaser-Technologie, können Fluoreszenzsignale in der Flowzytometrie erfasst und aufgezeichnet werden (Abb.1).

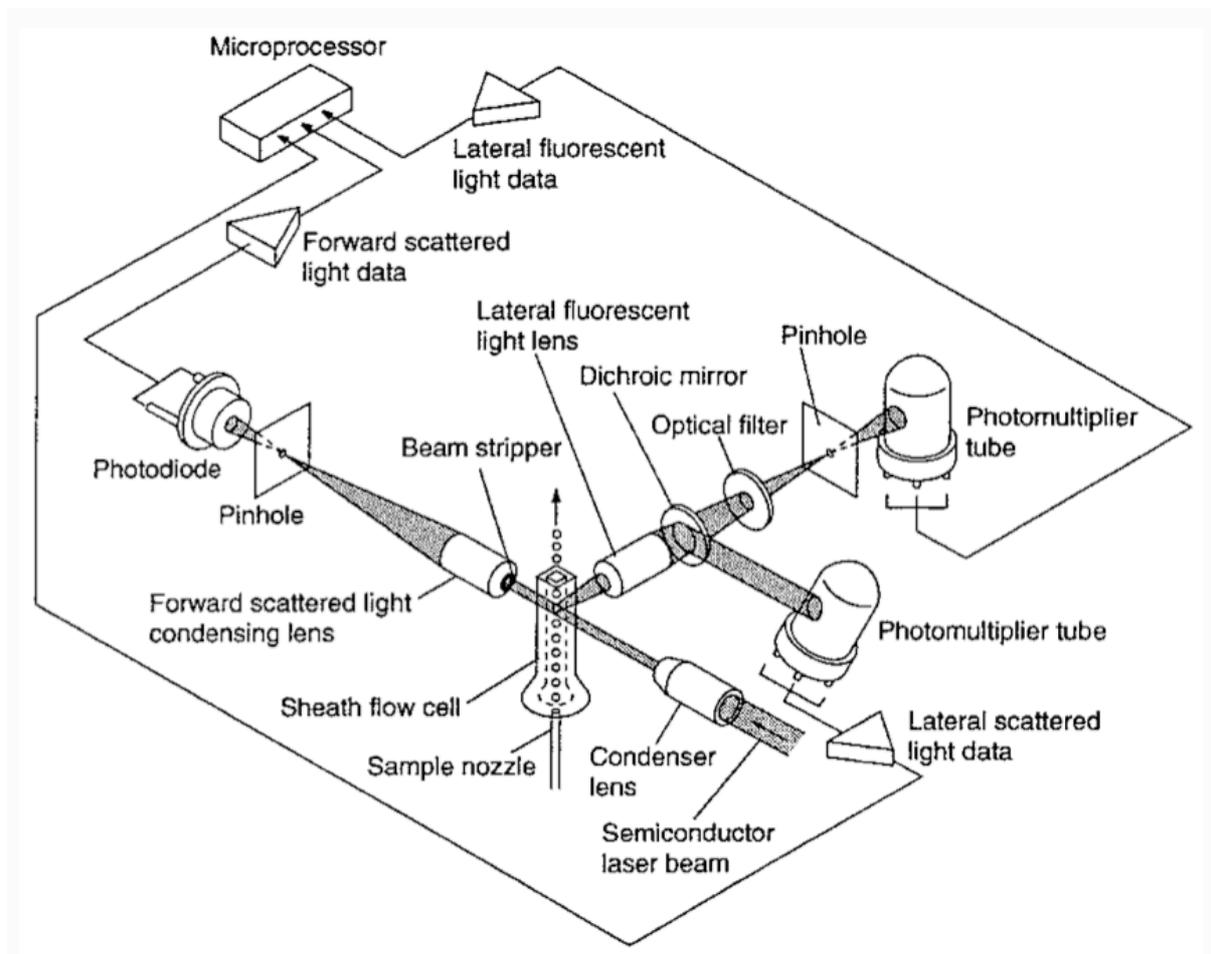


Abbildung 1: Prinzip der automatisierten flowzytometrischen Messung mittels Halbleiter-Laser Technologie (Tanaka 1999). Durch hydrodynamische Fokussierung (Sheath flow cell) werden die Zellen vereinzelt durch den Laserstrahl des Halbleiterlasers geleitet und sowohl das Vorwärtsstreulichtsignal (Forward scattered light data), als auch das Seitwärtsfluoreszenz-Streulichtsignal (Lateral fluorescent light data) über eine Photodiode bzw. einen Photomultiplier detektiert. Die verschiedenen Signale jeder einzelnen Zelle werden im Rechner (Microprocessor) zusammengeführt und numerisch, sowie graphisch in Zellscattergramm-Informationen umgesetzt.

Klassische Flowzytometriegeräte arbeiten mit dem Impedanzverfahren nach Coulter und können dadurch lediglich Informationen über Anzahl und Volumen von Zellen ermitteln (Coulter 1953). Dieses sogenannte "Coulter-Prinzip" stellt ein Basis-Messprinzip in jedem modernen Hämatologieautomaten dar, das durch weitere optische Messverfahren ergänzt wird. Probleme ergeben sich beim Impedanzverfahren unter anderem beim gleichzeitigen Durchtritt mehrerer Zellen in der Detektionskammer (Koinzidenz), so dass statt zweier kleiner Zellen das Signal einer einzelnen sehr großen Zelle vorgetäuscht wird. Des Weiteren ergibt sich ein unterschiedliches Signal, wenn völlig identische Zellen mittig oder am Rand die

Messzelle durchströmen, basierend auf der Inhomogenität des elektrischen Feldes in der Detektionskammer (Thom 1969). Der Einsatz der hydrodynamischen Fokussierung in der Flowzytometrie durch den Berliner Wissenschaftler Prof. Dr. med. Reinhard Thom (Klinikum Westend, FU Berlin, Thom 1970) löste das Problem der Orientierung der Zellen beim Durchtritt durch die Messzelle und minimierte so das Artefakt der Koinzidenz.

Das erste Flowzytometer auf optischer Basis konnte die Absorption von zellulärer DNA bei 253,7 nm durch Blitzlichtimpulse mit einer Dauer von 40 Nanosekunden nachweisen und dadurch eine meßtechnische Trennung von kernhaltigen und kernlosen Zellen vornehmen (Kamentsky 1965). Die Vorstellung eines Flowzytometriegerätes zur Sortierung von Zellen erfolgte ebenfalls 1965 durch Fulwyler (Fulwyler 1965).

Die Einführung der Fluoreszenz als Messparameter in der Flowzytometrie durch Göhde 1968 führte zum Einsatz vieler verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und ermöglichte zum ersten Mal die Differenzierung verschiedener physiologischer Zustände von Zellen (Dittrich 1969).

Um in der Routineanalytik zur Anfertigung eines erweiterten Differentialblutbildes den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern zu vermeiden, deren Einsatz viel zu kostenintensiv und durch lange Präinkubationszeiten zu aufwendig wäre, kommen bei den Hämatologieautomaten der Firma SYSMEX (SYSMEX, Kobe, Japan) Polymethin-Farbstoffe zum Einsatz. In standardisierten vollautomatisierten Protokollen werden exakt definierte Mengen dieser Fluoreszenzfarbstoffe zur Patientenprobe hinzupipettiert und nach einer festen Inkubationszeit in der Messzelle analysiert. Genau diese Standardisierung macht überhaupt erst den Einsatz der Fluoreszenz-Flowzytometrie als Hochdurchsatz- Screening-Werkzeug möglich. Die Polymethine markieren die Nukleinsäuren (RNA und DNA) im Zellkern und durch sterische Hinderung des Moleküls nach Bindung erfolgt eine Amplifikation des Fluoreszenzsignals. Durch die Färbung aller zellulären RNA- oder DNA-haltigen Komponenten wird der Signal-Rausch-Abstand vergrößert und dadurch die Interferenz vermindert, so dass die Trennung der einzelnen Zellpopulationen deutlich verbessert werden kann (Giles 2006).

1.2 Die unreife Plättchenfraktion (IPF) zur Differenzierung von Thrombozytopenien

Die Rolle von Thrombozyten bei der Thrombose und Hämostase wurde erstmals 1882 beschrieben (Bizzozero 1882). Es handelt sich um kernlose Zellfragmente von Megakaryozyten aus dem Knochenmark, welche sich ein bis zwei Tage im unreifen Vorstadium im Blut befunden und intensiv Proteinbiosynthese betreiben. Die Lebenszeit von Thrombozyten im peripheren Blut beträgt insgesamt ca. 9 bis 10 Tage und der Referenzwert liegt bei 150 bis $400 \times 10^9 /L$ (Patel 2005).

Im Tierversuch konnte Ingram 1969 nach akutem Blutverlust bei Beagle-Hunden eine Thrombozytopenie induzieren und anschliessend große RNA-haltige Plättchen im peripheren Blutausschlag nachweisen, sogenannte "retikulierte Plättchen" (Ingram 1969).

Mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Thiazol Orange können bei thrombozytopenischen Patienten mit normalen oder erhöhten Mengen an Megakaryozyten im Knochenmark gesteigerte Konzentrationen an RNA-haltigen Thrombozyten im peripheren Blut angefärbt und mittels Fluoreszenz-Flowzytometrie quantifiziert werden (Kienast 1990).

Durch die Gabe von humanem Megakaryozyten-Wachstumsfaktor kommt es zu einem massiven Anstieg an unreifen Thrombozyten im peripheren Blut (O'Malley 1996).

Demnach korreliert der RNA-Gehalt von Thrombozyten mit der Aktivität von Megakaryozyten im Knochenmark, so dass eine Differentialdiagnose von Thrombozytopenien möglich wird: eine Thrombozytopenie aufgrund eines Knochenmarkversagens geht mit einer verminderten Bildung neuer Blutplättchen und wenigen unreifen Thrombozyten einher, während eine Thrombozytopenie aufgrund eines erhöhten Verbrauchs oder Zerstörung von Plättchen mit einer hohen Anzahl an unreifen Plättchen im peripheren Blut korreliert. Eine Quantifizierung der unreifen Thrombozyten ermöglicht somit das Monitoring von thrombozytopenen Zuständen (Briggs 2006).

Ein grosser Nachteil der elektrischen Impedanz-Zellmessung besteht in der Schwierigkeit, grosse Plättchen von Mikrozyten oder Fragmentozyten zu unterscheiden. Optische Streulichtmethoden können dies wesentlich besser,

wenngleich die reine Volumenbestimmung durch die Impedanzmethode Vorteile bietet (Fujimoto 1999, Giles 2006).

Die International Society for Laboratory Hematology (ISLH) hat 2001 eine Empfehlung zur Zählung von Plättchen herausgegeben (Harrison 2001). Basierend darauf sollte eine Taskforce zur Bestimmung von retikulierten Plättchen eine analoge Referenzmethode etablieren. Dabei diene Thiazol-Orange als RNA-Farbstoff und Fluoreszenz-markierte Antikörper gegen CD41 und CD61 zur spezifischen Markierung von Thrombozyten. Die Messung von Normalproben in sieben Referenzlaboratorien ergab eine Streuung der Mittelwerte der unreifen Thrombozyten von 1,5 bis 16,8%, in anderen Studien gar von <3% bis 20% (Rinder 1993, Matic 1998) so dass eine Standardisierung mittels Antikörper-basierter Flowzytometrie als bisher nicht erfolgreich angesehen werden muss.

Die Geräte der XE-Klasse von SYSMEX kombinieren die Impedanzmessung von Thrombozyten mit der optischen Fluoreszenz-flowzytometrischen Messung (Tanaka 2001). Aus EDTA-Vollblut können ohne Vorverdünnung unreife Thrombozyten, die sogenannte IPF (immature platelet fraction), im Retikulozytenkanal bestimmt werden. Die x-Achse gibt im Scattergramm die Seitwärts-Fluoreszenzintensität wieder, die y-Achse stellt die Vorwärtsstreuung dar (Abb. 2).

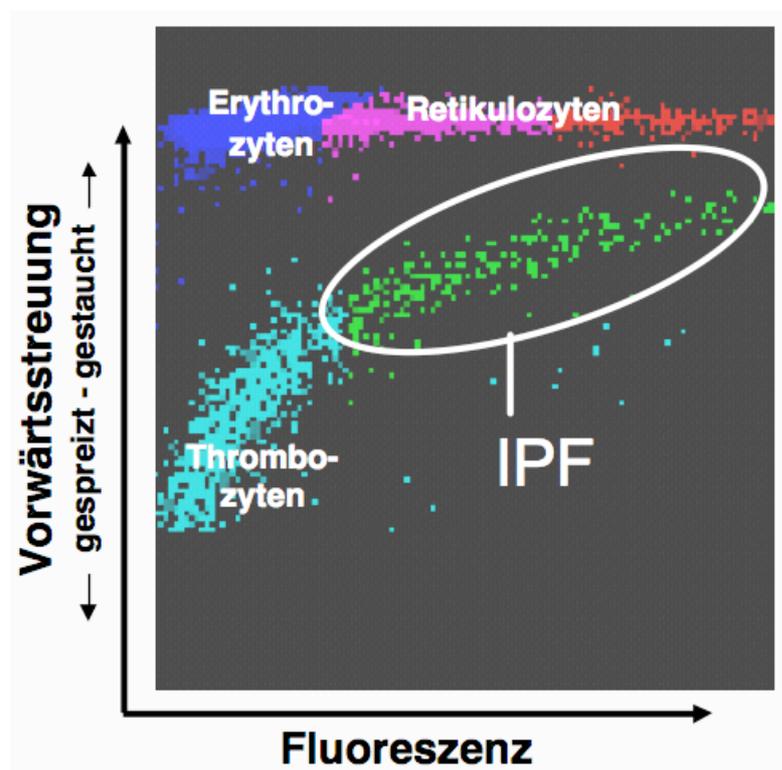


Abbildung 2: *Darstellung der unreifen und reifen Thrombozyten im Retikulozytenkanal der Hämatologieautomaten der XE-Klasse von SYSMEX.* Das Vorwärtstreulichtsignal kombiniert mit dem Seitwärtsfluoreszenz-Streulichtsignal ermöglicht die optische Erfassung der reifen und unreifen Fraktion (IPF) der Thrombozyten. Ein Computeralgorithmus berechnet die Trennung der reifen von der unreifen Fraktion der Thrombozyten, welche höhere mRNA-Anteile enthält und daher ein stärkeres Fluoreszenzsignal nach Polymehtin-Färbung aufweist (Briggs 2000).

Daraus resultiert die Darstellung der Zellgröße gegen die Fluoreszenz. Es kann sowohl die absolute (IPF#) als auch die relative IPF (IPF%) bestimmt werden. In mehreren Studien konnte für Erwachsene ein Referenzwert zwischen 1 - 8% für die IPF% ermittelt werden (Briggs 2004, Chaoui 2005, Abe 2006).

Aus klinischer Sicht ist eine genaue Messung von Thrombozyten und unreifen Thrombozyten für die möglichst exakte Bestimmung des Blutungsrisikos wünschenswert. Aus der Information läßt sich individuell vorhersagen, wieviele Plättchentransfusionen der Patient benötigt. In einer umfassenderen Sichtweise läßt sich damit Produktion und Bevorratung von Plättchenkonzentraten optimieren (Norfolk 1998).

Kann die Zählung der Plättchen und unreifen Plättchen insbesondere im niedrigen Bereich mit einer hohen Präzision und standardisiert vorgenommen werden, ist sowohl die Reduktion von Plättchentransfusionen, als auch die individuelle Vorhersage des Plättchenverlaufs möglich. Eine Differentialdiagnose zwischen Knochenmarkversagen (Hypoplasie, Apalasia, zytotoxische Chemotherapie) und einem erhöhten peripheren Verbrauch (DIC, HELLP, ITP, TTP) wird bei der Abklärung einer Thrombozytopenie ermöglicht (Briggs 2004, Kickler 2006).

Die Eigenschaften von unreifen Thrombozyten können wie folgt zusammengefasst werden:

- sie wurden erst vor kurzem aus dem Knochenmark in die Peripherie freigesetzt
- sie sind größer als reife Plättchen
- sie können als das Pendant zu Retikulozyten in der roten Reihe angesehen werden
- sie sind RNA-haltig
- ihre RNA kann mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Polymethinen) angefärbt werden
- sie lassen sich mittels Durchflußzytometrie quantifizieren

1.3 Delta-Hämoglobin und die unreife Retikulozytenfraktion (IRF)

Delta-Hämoglobin

Das Retikulozyten-Hämoglobin (Ret-Hb) ist ein direktes Maß der aktuellen Eisenverfügbarkeit. Es ist vermindert bei einer akuten oder chronischen Entzündung und gilt als Schnellmarker zur Therapiekontrolle einer Eisentherapie, mit einem Anstieg bereits nach weniger als 48 Stunden (Butarello 2004). Durch direkte Messung des mittleren Hämoglobingehalts (in pg) von Retikulozyten können Frühstadien des Eisenmangels bereits zu einem Zeitpunkt erkannt werden, zu dem herkömmliche biochemische Parameter nicht aussagekräftig sind (Canals 2005).

Zum Monitoring von Dialysepatienten unter EPO-Substitution oder zur Unterscheidung des latenten Eisenmangels (Ret-Hb normal) von einer manifesten Eisenmangelanämie (Ret-Hb vermindert) gilt das Ret-Hb heutzutage ebenfalls als einer der verlässlichsten Parameter (Ullrich 2005, Brugnara 2006).

Subtrahiert man von Ret-Hb das MCH der reifen, roten Erythrozyten, so erhält man den delta-Hämoglobinwert (delta-Hb, Thomas 2005).

Beim Gesunden ist dieser Wert immer positiv, da die Retikulozyten mehr Hämoglobin enthalten als die reifen Erythrozyten. Bei der Anämie bedingt durch eine chronische Erkrankung (z.B. entzündliche Darmerkrankungen, Tumore, systemischer Lupus, rheumatoide Arthritis) ist der Wert negativ, da aufgrund der Hepcidinfreisetzung aus der Leber, die Eisenerfreisetzung und -aufnahme durch Blockade von Ferroportin inhibiert ist und weniger Eisen für den Einbau in das Hämoglobinmolekül in den Retikulozyten zur Verfügung steht (Andrews 2008). So kann mit dem delta-Hämoglobin eine Anämie bei chronischer Entzündung von einer Eisenmangelanämie unterschieden werden (Weimann 2009).

Das delta-Hb wird auch negativ bei einer systemischen akuten Infektion. Die durch IL-6 induzierte Hepcidinausschüttung der Leber führt zur "Downregulation" von Ferroportin und dadurch zur Retention von Eisen, vor allem in Makrophagen (Ganz 2003, Nemeth 2008, Nemeth 2010). Dadurch kommt es zu einem funktionellen Eisenmangel wenige Stunden nach Beginn einer Infektion, mit einem sofortigen Abfall der Hämoglobinsynthese und Beladung von Retikulozyten. Der delta-Hb - Wert

fällt innerhalb weniger Stunden bei einer bakteriellen Sepsis (Spies C., Weimann K., Weimann A., unpublizierte Daten) und kann damit indirekt als Indikator für eine Aktivierung des Monozyten/Makrophagen-Systems dienen (Franck 2004).

Retikulozyten und IRF

Bereits 1931 schlug Heilmeyer eine Klassifikation der Retikulozyten anhand ihrer Menge an retikulozytären Filamenten vor, die im Blutausstrich durch Brilliantkresyl Blau dargestellt werden konnten (Heilmeyer 1931). Obwohl die Idee richtig war, scheiterte sie an der damals unzulänglichen Methode.

Durch die Bestimmung der unreifen Retikulozytenfraktion (IRF) mittels RNA-Färbung in der Fluoreszenz-Flowzytometrie, kann eine Aussage zur Erythropoese im Knochenmark getroffen werden, insbesondere kann sehr früh eine Rekonstitution des Knochenmarks nach Chemotherapie oder Stammzelltransplantation verfolgt werden (Davis 1996). Die IRF ist ein Parameter zur differentialdiagnostischen Unterscheidung von Anämien, die mit einer verstärkten Aktivität des Knochenmarks einhergehen (wie akutem Blutverlust oder erworbenen hämolytischen Anämien) und chronischen renalen Erkrankungen, die mit Anämien aufgrund einer verminderten Knochenmarksaktivität auffällig werden (Abb. 3). Bei akuten Infektionen, einer Myelodysplasie oder chronischen Urämie ist durch Suppression der Erythropoese nicht nur die IRF vermindert, sondern auch die Retikulozytenzahl (Butarello 2002).

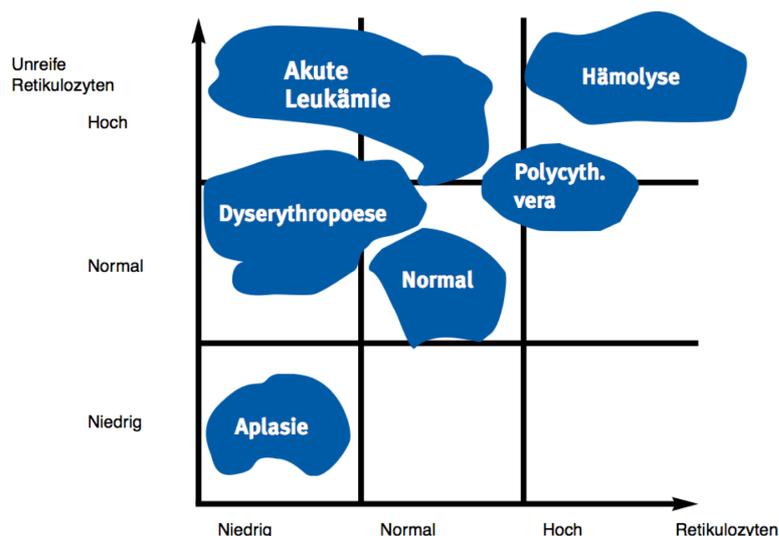


Abbildung 3: Darstellung der unreifen Retikulozyten (IRF) gegen die Anzahl an Retikulozyten bei verschiedenen hämatologischen Krankheitsbildern (nach d'Onofrio 1996).

1.4 Der Granulationsindex (GI-Index)

Eine Linksverschiebung der Granulozyten im peripheren Blut (Stabkernige, Myelozyten, Metamyelozyten und Promyelozyten) kann von automatisierten Fluoreszenz-Flowzytometern als Gruppe der unreifen Granulozyten (IG) quantifiziert werden (Briggs 2003, Field 2006).

Unreife Granulozyten kommen physiologischerweise nicht im peripheren Blut vor, sondern geben Hinweise auf bakterielle Infektionen, akute Inflammationen, Tumorerkrankungen (insbesondere bei Knochenmarksmetastasen), Gewebnekrosen, akute Transplantatabstoßungen, chirurgische oder orthopädische Traumata, myeloproliferative Erkrankungen, bei Einsatz von Steroiden und in der Schwangerschaft (vor allem im dritten Trimenon, Butarello 2008). Ansari-Lari beschrieb 2003 die unreifen Granulozyten als einen Prädiktor von Infektion und Sepsis bei Erwachsenen mit einer signifikanten Assoziation von positiven Blutkulturen (Ansari-Lari 2003). Zwei Jahre später konnte diese Beobachtung auch für die neonatale Sepsis gezeigt werden (Nigro 2005).

Die manuelle mikroskopische Bestimmung einer Linksverschiebung im Blutaussstrich, insbesondere von Stabkernigen, ist hingegen mit einer hohen interindividuellen Varianz (Variationskoeffizienten um 36%) und stark divergierenden Referenzbereichen verschiedener Labore assoziiert (Fernandes 2007). Ein Ersatz des manuellen Differentialblutbildes zur Quantifizierung einer Linksverschiebung sollte daher durch standardisierte und automatisierte Methoden erfolgen (Cornbleet 1995, van der Meer 2006).

Zusätzlich zur quantitativen Erfassung der unreifen Granulozyten bringt die Hochdurchsatz-Messung des Aktivierungszustandes von Neutrophilen mittels Fluoreszenz-Flowzytometrie Hinweise auf eine bakterielle Sepsis. So gibt der Wert des Seitwärts-Fluoreszenz-Streulichts (NEUT-Y) Aufschluss über den DNA/RNA-Gehalt der Neutrophilen und damit über deren Aktivitätszustand (Linssen 2008). Durch die Messung der Granularität der neutrophilen Granulozyten im Streulicht eines Fluoreszenz-Flowzytometers, kann der Granulierungsgrad (GI-Index) quantifiziert werden und dient als Screeningmethode für ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS, Furundarena 2010).

Neutrophile und Eosinophile Granulozyten zeigen die höchsten Seitwärtsstreulicht-Signale aller peripheren Blutzellpopulationen. Hypogranuläre Neutrophile besitzen niedrigere NEUT-X Werte, während hohe NEUT-X Messwerte auf eine Hypergranularität der Neutrophilen hindeuten (Furundarena 2010).

Bezieht man den NEUT-X Wert auf eine gesunde Population, so entspricht ein GI-Index von 1 einer Standardabweichung. Negative Werte korrelieren mit einer Hypogranulierung, deutlich positive Werte mit einer Hypergranulierung (toxischen Granulierung) der neutrophilen Granulozyten. Bei Verdacht auf ein Myelodysplastisches Syndrom, dem Vorliegen einer isolierten Anämie und einem GI-Index < -1 liegt der NPV (negativ prädiktiver Wert) bei 97% für das tatsächliche Vorliegen einer Myelodysplasie (Le Roux 2010). So kann ein wichtiger Indikator für eine Knochenmarksuntersuchung bereits durch die schnelle Hochdurchsatz-Screeningmethode der Fluoreszenz-Flowzytometrie gewonnen werden.

Normozytäre oder makrozytäre Anämien sind oft die einzigen Anzeichen bei einem Myelodysplastischen Syndrom, nur ein Drittel aller Patienten weist eine Thrombozytopenie auf, ca. 40% der Patienten sind bei Erstdiagnose neutrozytopenisch, die Dysplasiezeichen im Blutaussstrich sind bloss semiquantitativ beurteilbar (Le Roux 2010). Myeloproliferative Erkrankungen mit Dysplasiezeichen, darunter Chronische Myelomonozytäre Leukämie (CMML) und atypische Chronische Myeloische Leukämie (aCML) können durch das relative Überwiegen von Monozyten zu Neutrophilen, sowie den Anteil an unreifen Granulozyten unterschieden werden (Furundarena 2010).

Umgekehrt ist eine Hypergranulation von Neutrophilen, eine sogenannte toxische Granulierung, assoziiert mit schweren Infekten oder gar Sepsis (Schofield 1983, Kugel 1932).

Relevante Originalarbeiten

2.1 Die unreife Plättchenfraktion (IPF) zur Differenzierung von Thrombozytopenien

Publikation 1

Cremer M., Paetzold J., Schmalisch G., Hammer H., Loui A., Dame C., **Weimann A.** (2009) "Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia", Br J Haematol, **144**, 619-621

Publikation 2

Cremer M.*, **Weimann A.***, Schmalisch G., Hammer H., Bühner C., Dame C. (2010) "Immature platelet fraction reflects megakaryopoietic activity in neonatal early-onset thrombocytopenia", *co-first authors, Thrombosis Haemostasis, **103**, 1016-1021

Publikation 3

Strauß G., Vollert C., von Stackelberg A., Schütz B., **Weimann A.**, Gaedicke G., Schulze H. (2010) "Immature platelet count: A simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia", Pediatric Blood & Cancer, **57**, 641-647

2.2 Delta-Hämoglobin und unreife Retikulozytenfraktion (IRF)

Publikation 4

Weimann A., Lun S., Müller C., Pratschke J., Reinke P., Lun A. (2007) "Reticulocytes and their immature fraction do not detect acute rejection after kidney transplantation", Transplantation Proceedings, **39**, 514-17

Publikation 5

Weimann A., Lun A., Lun S., Zimmermann M., Borges AC., Ziebig R., Gonzalez JB., Gilka S., Saravia M., Knebel F., Schroeckh S., Schimke I. (2010) "Leukocyte, neutrophil, immature granulocyte counts and interleukin-6 are superior to procalcitonin, C-reactive protein and delta-He for detection of mild inflammation: data from marathon runners producing mild systemic inflammation visible immediately after the run", J Lab Med, **34**, 53-59

2.3 Der Granulationsindex (GI-Index) zur Quantifizierung der toxischen Granulation von neutrophilen Granulozyten

Publikation 6

Zimmermann M., Cremer M., Hoffmann C., Weimann K., **Weimann A.** (2011) "Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases", CCLM, **49**, 1193-1198

2.1 Die unreife Plättchenfraktion (IPF) zur Differenzierung von Thrombozytopenien

Publikation 1

Cremer M., Paetzold J., Schmalisch G., Hammer H., Loui A, Dame C., **Weimann A.** (2009) "Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia", Br J Haematol, 144, 619-621

Eine der häufigsten hämatologischen Komplikationen bei unreifen und reifen Neugeborenen ist die Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl $<150/\text{nl}$). Sie betrifft 18 bis 35% aller Patienten auf neonatologischen Intensivstationen (NICU).

Eine Thrombozytopenie tritt doppelt so häufig bei Neugeborenen mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (ELBW; $<1000\text{g}$) im Vergleich zum Durchschnitt aller Patienten einer NICU auf. Das Blutungsrisiko geht in mehr als 15% aller Fälle mit akuten lebensgefährdenden Komplikationen und/oder lebenslangen Behinderungen einher und ist schwierig einzuschätzen, da es sowohl eng mit dem Gestations- und postnatalem Alter des Neugeborenen, als auch mit der Ursache der Thrombozytopenie und dem Schweregrad der gleichzeitigen Begleitrisiken assoziiert ist.

Bei 612 NICU-Patienten wurden bei Routineblutbildmessungen zusätzlich zu den Thrombozytenkonzentrationen auch die IPF bestimmt. 456 Patienten fielen während des Beobachtungszeitraums mit ihren Thrombozytenkonzentrationen nicht unter $150/\text{nl}$, während bei 156 Patienten die Plättchenkonzentration mindestens einmal während ihres NICU-Aufenthalts darunter fiel. Als IPF-Referenzbereich konnte für die nicht-thrombozytopenische Gruppe Werte zwischen 0.7 bis 7.9% bestimmt werden (Mittelwert 4.3%), ein etwas höherer Wert im Vergleich zu Erwachsenen-Referenzbereich (1.1 bis 6.1 %, Mittelwert 3.4%, Briggs 2004). Ein Zusammenhang zwischen Gestationsalter und IPF-Konzentration bestand nicht. IPF-Konzentration und Thrombozytenkonzentration war signifikant negativ miteinander korreliert. Das relative Risiko, mit der Thrombozytenkonzentration von Tag 1 zu Tag 2 um $>50/\text{nl}$ zu fallen war 4.7 mal höher, wenn die IPF unter 8% lag.

Die Daten der Studie ermöglichen es, auf Basis individueller IPF und Thrombozytenwerte die Plättchenkonzentrationen des nächsten Tages vorherzusagen und den tatsächlichen Transfusionsbedarf abzuschätzen. Dadurch kann gleichzeitig das Risiko von allogenen Immunisierungsreaktionen, sowie durch Blut übertragbare Krankheiten minimiert werden.

Publikation 2

Cremer M.*, **Weimann A.***, Schmalisch G., Hammer H., Bühner C., Dame C. (2010) "Immature platelet fraction reflects megakaryopoietic activity in neonatal early-onset thrombocytopenia", ***co-first authors**, Thrombosis Haemostasis, 103, 1016-1021

Frisch aus dem Knochenmark freigesetzte Plättchen, sogenannte unreife Plättchen, können aufgrund ihres RNA-Gehaltes durch Fluoreszenz-Flowzytometrie in automatisierten Hämatologiegeräten bestimmt werden. Die absolute Anzahl an unreifen Thrombozyten (IPF#) und die unreife Plättchenfraktion (IPF%) spiegeln die Aktivität der Megakaryozyten wieder. Im Rahmen dieser Studie sollte die Rolle dieser Parameter bei der Untersuchung des Pathomechanismus der early-onset Thrombozytopenie geklärt werden.

Thrombozytenzahlen und IPF wurden am Tag 1 bis 3 (d1 bis d3) bei 857 Neugeborenen auf einer Intensivstation bestimmt. Bei thrombozytopenen Patienten (Thrombozytenkonzentrationen $<150 \times 10^9/l$, $n=129$), war die IPF# signifikant niedriger ($8.5 \pm 2.7 \times 10^9/l$), als bei nicht-thrombozytopenen Neugeborenen ($9.5 \pm 3.6 \times 10^9/l$, $n=682$, $p<0.05$). IPF% war signifikant höher in thrombozytopenen ($9.3 \pm 7.9\%$) vs. nicht-thrombozytopenen Neugeborenen ($4.1 \pm 1.8\%$, $p<0.001$). Während Neugeborene mit early-onset Infektion ($n=134$) im Vergleich zu Kontrollpatienten ($230 \pm 68 \times 10^9/l$, $n=574$, $p<0.01$) niedrigere Plättchenkonzentrationen aufwiesen ($199 \pm 75 \times 10^9/l$), zeigten sich hier keine Unterschiede bei IPF# oder IPF%. Ebenso besaßen "small for gestational age" Neugeborene (SGA, $n=149$) niedrigere Plättchenkonzentrationen am Zeitpunkt d1 ($199 \pm 75 \times 10^9/l$, $p<0.001$) als die Kontrollpatienten, es gab aber keinen Unterschied bei der IPF. Ein Trend in Richtung niedrigerer IPF# zeigte sich bei SGA-Neugeborenen mit Thrombozytenkonzentrationen $<100 \times 10^9/l$ ($5.4 \pm 3.9 \times 10^9/l$, $n=11$) und thrombozytopenen Neugeborenen mit einer Infektion ($9.9 \pm 7.3 \times 10^9/l$, $n=10$, $p=0.11$).

Die Evaluation der IPF# deutet daraufhin, dass Thrombozytopenie bei Neugeborenen wahrscheinlich auf eine Kombination eines gesteigerten Plättchenverbrauchs und einer inadäquaten Megakaryopoese des Neugeborenenknochenmarks zurückzuführen ist. Außerdem scheinen SGA- Neugeborene mit moderaten und schweren Thrombozytopenien eine ausgesprochene Suppression der Megakaryopoese zu haben im Vergleich zu Neugeborenen mit einer Infektion.

Publikation 3

Strauß G., Vollert C., von Stackelberg A., Schütz B., **Weimann A.**, Gaedicke G., Schulze H. (2010) "Immature platelet count: A simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia", *Pediatric Blood & Cancer*, 57, 641-647

Thrombozytenkonzentrationen unterhalb des Referenzbereichs sind als Thrombozytopenie definiert. Allerdings erklären reine Thrombozytenzahl-Bestimmungen nicht den zugrunde liegenden Pathomechanismus. Neue automatisierte Blutbildanalysegeräte liefern zusätzliche Informationen über Thrombozyten, wie die Größe oder das Plättchenvolumen und ermöglichen die Unterscheidung von Subpopulationen.

In dieser Pilotstudie sollte evaluiert werden, ob einer dieser zusätzlichen Thrombozytenmarker nützlich für die Diagnose einer isolierten Thrombozytopenie im Kindesalter wäre.

Studiendesign: es wurden Referenzwerte für das mittlere Plättchenvolumen (MPV), Plättchenverteilungsbreite (PDW), Plättchenkrit (PCT), Plättchen "large cell ratio" (P-LCR), Plättchen "mean-frequent volume" (P-MFV), relative Fraktion der unreifen Plättchen (IPF%), und absolute Fraktion der unreifen Plättchen (IPF#) bei 100 gesunden Kindern erhoben. Des Weiteren wurden 87 Kinder mit Thrombozytopenie untersucht.

Ergebnisse: bei Kindern mit Störungen der Plättchenproduktion, war die IPF% niedrig, wohingegen bei akuter Immunthrombozytopenie (ITP) IPF% deutlich erhöht war (Median 25.2%, $p < 0.01$), begründet durch den gesteigerten Thrombozytenumsatz. Interessanterweise hatten Kinder mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ebenfalls erhöhte relative IPF% Werte (Median 10%, $p < 0.01$), was daraufhin deutet, dass die Thrombopoese stimuliert ist, obgleich faktisch Progenitorzellen im Knochenmark fehlen. Niedrige absolute IPF# Werte waren ausschließlich bei Patienten mit einer akuten Immunthrombozytopenie zu finden.

Zusammenfassung: die relative Fraktion der unreifen Thrombozyten, IPF%, ist ein Marker für die Thrombozytopenie aufgrund einer gestörten Plättchenproduktion, wohingegen die absolute Fraktion der unreifen Plättchen, IPF#, welche die unreife Thrombozytenkonzentration widerspiegelt, sich als hilfreich zur Unterscheidung von akuter ITP und Thrombozytopenie mit neu diagnostizierter ALL ($p < 0.01$) erweisen könnte.

2.2 Delta-Hämoglobin und unreife Retikulozytenfraktion (IRF)

Publikation 4

Weimann A., Lun S., Müller C., Pratschke J., Reinke P., Lun A. (2007) "Reticulocytes and their immature fraction do not detect acute rejection after kidney transplantation", *Transplantation Proceedings*, 39, 514-17

Die frühe Detektion einer akuten Abstoßung stellt ein wichtiges Problem beim Monitoring von transplantierten Patienten dar. Die Erythropoietin (EPO) Produktion ist vermindert bei Patienten mit einer chronischen oder einer akuten Rejektion. Daher könnte ein Abfall der Retikulozytenzahl und der unreifen Retikulozyten (IRF) eine akute Abstoßungsreaktion anzeigen. In dieser Pilotstudie wird der diagnostische Nutzen von Retikulozytenparametern zur Diagnose einer akuten Abstoßungsreaktion analysiert.

Studiendesign: Retikulozyten-Parameter wurden von 25 Patienten nach einer Nierentransplantation (NTX) bestimmt. Die initiale immunsuppressive Therapie basierte auf einer Kombination von Urbason, Cellcept, Cyclosporin A und ATG (Antithymozytenglobulin) oder Simulect. Während der ersten drei Wochen nach NTX wurden Blutproben dreimal pro Woche analysiert. Blutbildanalysen wurden an XE-2100 (Sysmex) Analysegeräten durchgeführt. Beim Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion wurde eine Punktionsbiopsie des transplantierten Organs durchgeführt und histologisch evaluiert.

Ergebnisse: Akute Abstoßungsreaktionen gingen nicht mit signifikant geänderten Retikulozytenparametern einher. Während der ersten Woche nach NTX unterschieden sich weder die Retikulozytenzahl, noch ihre unreife Fraktion zwischen Patienten mit verzögerter und unmittelbar einsetzender Nierenfunktion (Retikulozytenzahl $1.70 + 1.06 \%$ vs. $1.58 + 1.10 \%$ und IRF (unreife Retikulozytenfraktion) $22.8 + 7.9 \%$ vs. $17.6 + 9.4 \%$).

Zusammenfassung: Retikulozytenzahlen, sowie die Bestimmung der unreifen Retikulozytenfraktion sind nicht signifikant verändert bei einer akuten Abstoßungsreaktion. Viele verschiedene Einflüsse modulieren die Freisetzung von EPO und die Reaktion der Erythropoese nach einem EPO-Stimulus und könnten die postulierten Beziehungen zwischen Retikulozyten-Markern und der akuten Abstoßungsreaktion überlagern.

Publikation 5

Weimann A., Lun A., Lun S., Zimmermann M., Borges AC., Ziebig R., Gonzalez JB., Gilka S., Saravia M., Knebel F., Schroeckh S., Schimke I. (2010) "Leukocyte, neutrophil, immature granulocyte counts and interleukin-6 are superior to procalcitonin, C-reactive protein and delta-He for detection of mild inflammation: data from marathon runners producing mild systemic inflammation visible immediately after the run", J Lab Med, 34, 53-59

Unreife Granulozyten (IG) und das delta-Hämoglobin (delta-Hb bzw. delta-He) können von modernen Hämatologieautomaten bestimmt und zur Diagnostik von systemischen Entzündungen eingesetzt werden. Zur Klärung der Frage, ob diese Marker zum Nachweis einer geringgradigen Entzündung besser geeignet sind, als die traditionellen Parameter Leukozytenzahl, C-reaktives Protein (CRP), Procalcitonin (PCT), Interleukin-6 (IL-6) und einige Leukozytenoberflächenmoleküle, wählten wir als Modell den Marathonlauf.

Nach der Beendigung eines solchen Langlaufs, lassen sich typische Entzündungszeichen im Blut der Läufer nachweisen. Ein erweitertes Differentialblutbild mit Leukozytendifferenzierung und Retikulozytenanalyse, CRP, PCT, IL-6, und die Expression von Leukozytenoberflächenmolekülen wurden unmittelbar nach dem Lauf gemessen und mit den Werten verglichen, die unter Ruhebedingungen (vor dem Lauf, bzw. 10 Tage nach dem Marathon) bestimmt wurden.

Im Vergleich zum Ruhezustand ließen sich unmittelbar nach dem Marathonlauf (Entzündungsphase) Anstiege von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, sowie eine Zunahme der Konzentration von IL-6 nachweisen. Die diagnostische Sensitivität und Spezifität betrug für diese Marker nahezu 100%. In dem gewählten Modell wurde keine CRP-Erhöhung beobachtet. Das delta-He fiel in der Entzündungsphase unmittelbar nach dem Lauf nicht in den negativen Bereich ab, wie es für systemische inflammatorische Prozesse charakteristisch ist. Die Leukozytenoberflächenmoleküle zeigten zwar eine Entzündungsreaktion an, waren jedoch in Sensitivität und Spezifität den traditionellen Parametern unterlegen.

Leukozyten- und Neutrophilenzahl, IGs und IL-6 stellten sich als beste Indikatoren für eine geringgradige Entzündung dar, die in der durchgeführten Studie am Modell des Marathonlaufs untersucht wurde.

2.3 Der Granulationsindex (GI-Index) zur Quantifizierung der toxischen Granulation von neutrophilen Granulozyten

Publikation 6

Zimmermann M., Cremer M., Hoffmann C., Weimann K., **Weimann A.** (2011) "Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases", CCLM, 49, 1193-1198

Einführung: Bei bestimmten inflammatorischen Prozessen erscheinen toxisch granuliert Neutrophile (TGNs) mit prominenten zytoplasmatischen Granula im peripheren Blutaussstrich. Heutzutage wird die toxische Granulation von neutrophilen Granulozyten durch manuelle Mikroskopie von Blutaussstrichen bestimmt. Der SYSMEX XE-5000 ist ein vollautomatisiertes Blutbildanalysegerät, das die toxische Granulierung durch die Berechnung des Granularitätsindex (GI) quantifizieren kann. In dieser Studie wurde die Einsatzmöglichkeit des GI-Index als Parameter der TGN Granularität bei entzündlichen Erkrankungen untersucht.

Methoden: Die Evaluation der TGN-Granularität fand durch manuelle Mikroskopie, den automatisierten GI-Index und die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) von 158 Patienten statt. Blutproben von 40 gesunden Individuen wurden mit Lipopolysacchariden (LPS) versetzt und für kinetische in vitro Messungen des GI-Index verwandt. Außerdem wurden Verlaufsmessungen des GI-Index und von CRP Konzentrationen von 100 Intensivpatienten durchgeführt.

Ergebnisse: Der GI-Index korrelierte mit der mikroskopischen Einschätzung von TGNs ($n=158$; $r_s=0.839$; $p<0.0001$). Bei den LPS-Inkubationsversuchen mit Vollblut zeigten die neutrophilen Granulozyten nach Inkubationsbeginn eine initiale Hypogranulierung nach 30 Minuten und eine Hypergranulation nach 90 Minuten. In vivo war der GI-Index in der Lage, Änderungen des Status einer bakteriellen Infektion einen Tag vor einer CRP-Konzentrationsänderung anzuzeigen. Die Korrelation von CRP und dem GI-Index variierte zwischen den Patientenkohorten ($n=158$; $r_s=0.836$) ($n=100$; $r=0.177$), abhängig von Ursache und Ausmass der Inflammation.

Zusammenfassung: Der GI-Index ist für die Quantifizierung der Granularität von TGN geeignet. Er ist ein automatisierter und standardisierter Parameter, der rund um die Uhr ohne jeglichen Aufwand bestimmt werden kann. Wir empfehlen daher, dass der GI-Index die zeitaufwendige, subjektive und bloß semiquantitative mikroskopische Beurteilung von TGN ersetzt.

3 Diskussion und Ausblick

Die Bestimmung eines Blutbildes zählt in der täglichen Routinediagnostik zu der am häufigsten angeforderten Analytik und ist eine entscheidende Komponente bei der Beantwortung von Fragen bezüglich Anämien, Thrombozytopenien, Myelodysplasien, leukämischen Erkrankungen oder dem Nachweis inflammatorischer und septischer Zustände (Weimann 2009). In der Vergangenheit stand dabei die bloße Quantifizierung einzelner Zellpopulationen (Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten) im Vordergrund, da die ersten Blutbildautomaten in den 1950er bis 1970er Jahren noch nicht die Möglichkeit zu einer weitergehenden Differenzierung der Zellreihen boten (Butarello 2008). Die modernen vollautomatisierten Blutbildautomaten, deren Messtechnik auf flowzytometrischen Methoden mit hydrodynamischer Fokussierung basiert, können aus 150 Mikrolitern einer EDTA-Blutprobe über 70 verschiedene Parameter innerhalb von 60 Sekunden bestimmen. Durch das automatisierte "Flagging" pathologischer Werte und dem Einsatz von Regel-basierten Middleware-Computersystemen, die zwischen den Analyseautomaten und das Laborinformationssystem geschaltet sind, wird die zeitnahe Abarbeitung grosser Probenmengen und damit auch der anfallenden enormen Datenmengen überhaupt erst möglich (Jäckel 2009, Weimann 2009).

Durch das Fehlen jeglicher präanalytischer Probenvorbereitungsschritte, der kurzen Messzeiten und der hohen Stabilität der Parameter über 48 bis 72 Stunden (Imeri 2008), wird die Bestimmung des erweiterten Blutbildes zu einer rund um die Uhr verfügbaren Technik mit wertvollen Hinweisen zur Diagnose und Therapiesteuerung (Weimann 2009).

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Flowzytometrie können durch die automatisierte Probenaliquotierung, Inkubation mit verschiedenen Reagenzien und Fluoreszenzfarbstoffen in parallelen Messkanälen verschiedene (Sub-) Zellpopulationen im erweiterten Differentialblutbild bestimmt werden: unreife Plättchenfraktion (IPF), unreife Granulozyten (IG), Granularitätsindex neutrophiler Granulozyten (GI-Index), Erythroblasten (NRBC), Fragmentozyten (FRC), unreife Retikulozyten (IRF), Retikulozytenhämoglobin (Ret-Hb), delta-Hämoglobin (delta-Hb), hochfluoreszierende Lymphozyten (HFL) und die Neutrophilenfluoreszenz (NEUT-Y; Briggs 2004, Butarello 2002, Butarello 2004, Davis 1996, Schaefer 2001, Stachon 2004, Stachon 2006, Takami 2007, Torres 2001, Ullrich 2005, Zimmermann 2011a).

Die vorliegende Habilitationsschrift umfasst mögliche Einsatzfelder einiger dieser neuen dynamischen Blutzellparameter für die drei Haupt-Zellgruppen im peripheren Blut, den roten und weißen Zellen, sowie den Thrombozyten und eruiert deren diagnostische Limitationen.

3.1 Differentialdiagnostik mittels IPF

Im Kapitel 2.1 wurde der diagnostische Nutzen der unreifen Plättchenfraktion (IPF) zur Therapieüberwachung und Prognose der Neugeborenen-Thrombozytopenie und zur Differentialdiagnostik von thrombozytopenischen Zuständen bei Immunthrombozytopenien und akuter lymphatischer Leukämie betrachtet (Cremer 2009, Cremer 2010, Strauß 2011).

Bei der Messung einer Thrombozytenkonzentration unterhalb des Referenzwertes stellt sich automatisch die Frage nach der Ursache, die entweder in einem erhöhten peripheren Plättchenverbrauch und/oder einer verminderten Produktion des Knochenmarks liegen muss (Briggs 2004, Briggs 2006). Die routinemäßige Bestimmung der reinen Thrombozytenzahl kann hier keinen weiteren Aufschluß über die Ursache geben. Auch können bei sehr niedrigen Thrombozytenkonzentrationen <50/nl die zusätzlichen Thrombozytenmarker MPV (mittleres Plättchenvolumen) oder PDW (Plättchenverteilungsbreite) im Impedanzkanal oft nicht mehr bestimmt werden. Der dynamische Blutzellparameter der unreifen Plättchenfraktion, quantifizierbar anhand einer Färbung der RNA-Reste mit Fluoreszenzfarbstoffen in den frisch produzierten Plättchen, gemessen im optischen Plättchenkanal der XE-Klasse Geräte von SYSMEX, bot erstmals die Möglichkeit einer Standardisierung dieser Subfraktion der Thrombozyten (Tanaka 2001).

Ein erhöhter peripherer Verbrauch von Plättchen durch Blutung, ITP, TTP (trombotisch-thrombozytopenische Purpura), HUS (hämolytisch-urämisches Syndrom), HELLP-Syndrom oder DIG (disseminierte intravasale Gerinnung) geht mit einer erhöhten IPF% einher (Briggs 2004, Abe 2006).

Ziel der 3. Publikation (Kapitel 2.1) war die mögliche Differenzierung der Thrombozytopenien von pädiatrischen aITP, cITP und ALL Patienten.

Bei den ALL-Patienten fanden sich zwar signifikant höhere Thrombozytenkonzentrationen, als bei den Patienten mit aITP, doch war die relative IPF Fraktion (IPF%) bei den aITP-Patienten wiederum signifikant höher. Dies weist bei den aITP-Patienten auf einen erhöhten peripheren Thrombozytenumsatz und eine deutlich

gesteigerte Nachproduktion im Knochenmark hin, wohingegen die im Vergleich niedrigere IPF% bei ALL-Patienten die Verdrängung der Megakaryozyten im Knochenmark durch die leukämischen Blasten widerspiegelt. Durch die Messung von IPF%, IPF# und der Thrombozytenzahl war eine Differenzierung von aITP und cITP möglich. Zeigten die Patienten mit aITP niedrigere Plättchenkonzentrationen und IPF# Werte, so war die IPF% jedoch gegenüber den cITP Patienten signifikant erhöht. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass unterschiedliche Pathomechanismen der aITP bzw. cITP zugrunde liegen könnten. So könnten Mechanismen der Megakaryozytenapoptose und die immunologische Destruktion der Plättchen bei beiden Krankheitszuständen unterschiedlich gewichtet sein (Chang 2003, Houwerzijl 2004).

Publikation 3 zeigte, dass eine IPF#-Konzentration $>4/nl$ die Diagnose einer aITP unwahrscheinlich macht und so zur Differentialdiagnose zwischen aITP und cITP beitragen könnte.

Die zweite Publikation des Kapitels 2.1 charakterisierte thrombozytopenische Patientensubgruppen bei Neugeborenen (Cremer 2010). Auch hier fanden sich mit sinkender Thrombozytenkonzentration höhere IPF% Raten und niedrigere absolute IPF# Konzentrationen. Das Risiko einer Thrombozytopenie war mit dem Gestationsalter korreliert. Das Gestationsalter war weder mit IPF% noch mit IPF# assoziiert. Ein niedriges Geburtsgewicht (SGA) war mit einem erhöhten Risiko für eine Thrombozytopenie assoziiert. Neugeborene mit niedrigem Geburtsgewicht und/oder einer Infektion (EOBI) zeigten eine Tendenz zu niedrigeren IPF# Konzentrationen, aber deutlich höheren relativen IPF% Werten. Demnach kann gefolgert werden, dass die neonatale early-onset Thrombozytopenie, unabhängig von ihrer Ätiologie, durch einen peripheren Thrombozytenverbrauch begründet ist, der bei schweren Formen (Thrombozyten $<50/nl$) zwar mit einer erhöhten IPF%, aber auch mit einer reduzierten IPF# einhergeht. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer passageren Reduktion der megakaryopoetischen Aktivität (Murray 1996, Sola 1999).

3.2 Therapiemonitoring und Prognoseabschätzung mittels IPF

Die Vorhersage der Plättchenregeneration durch den Anstieg der retikulierten Plättchen ein bis drei Tage vor dem Anstieg der Thrombozytenkonzentration, ermöglicht eine Reduktion von prophylaktischen Plättchentransfusionen nach Stammzelltransplantation oder Chemotherapie (Briggs 2006, Chaoui 2005, Stohlawetz 1999, Zucker 2006).

Die ersten beiden Publikationen des Kapitels 2.1 (Publikation 1 und 2) evaluierten den Nutzen und diagnostische Vorhersagekraft der IPF bei Neugeborenen.

Bei neonatologischen Intensivpatienten stellt sich bei einer Thrombozytopenie die Frage nach den Ursachen, z. B. nach Infektionen (nekrotisierende Enterokolitis), immunologische Ursachen (Alloantikörper), seltene genetische Formen, oder auch Verluste durch die Herz-Lungen-Maschine (Weimann 2009). Eine schnelle und sichere Diagnostik ist notwendig, um aus den unmittelbaren postnatalen Thrombozytenmesswerten den weiteren Verlauf vorherzusagen, sofortige therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können und Blutungen zu vermeiden, zumal bis zu einem Drittel der Neugeborenen auf Intensivstationen thrombozytopenisch sind (Castle 1986, Cremer 2009, Mehta 1980).

In der Publikation 1 konnte der Referenzbereich der IPF% für Neugeborene mit 0.7 bis 7.9% bestimmt werden, was einem etwas weiteren Referenzbereich als bei Erwachsenen entspricht (1.1 - 6.1%, Briggs 2004, Joseph 1996, Saxonhouse 2004). Zudem lag der Median der IPF% ebenfalls ein wenig höher (4.3% bei Neugeborenen versus 3.4% bei Erwachsenen), was auf eine erhöhte megakaryopoetische Aktivität des Knochenmarks des Neugeborenen hindeuten könnte (Dame 2002). Die höheren IPF-Werte können durch erhöhte TPO-Konzentrationen beim Fötus und Neonaten gegenüber Erwachsenen erklärt werden (Sola 1999, Dame 2002).

Für Neugeborene mit IPF% Werten <8 % lag das relative Risiko bei 4.7 einen Thrombozytenabfall von >50/nl innerhalb der ersten 24h nach der Geburt zu erleiden (Cremer 2009). Einem Thrombozytenanstieg ging immer ein IPF-Anstieg voraus und es bestand eine negative Korrelation zwischen IPF% und Thrombozytenzahl.

Durch die Bestimmung der individuellen IPF- und Thrombozytenwerte kann so die Änderung der Plättchenkonzentration des nächsten Tages prognostiziert und der tatsächliche Transfusionsbedarf genauer abgeschätzt werden. Dadurch kann gleichzeitig das Risiko von allogenen Immunisierungsreaktionen, sowie durch Blut übertragbare Krankheiten minimiert werden (Weimann 2009).

Ausblick

Nicht nur bei der Thrombozytopenie, sondern auch bei der Thrombozytose könnte die Bestimmung der IPF sich als hilfreich erweisen. Frisch aus dem Knochenmark freigesetzte Plättchen sind nicht nur größer als reife Thrombozyten, sondern scheinen auch hämostaseologisch aktiver zu sein und könnten damit ein Thrombophilierisiko bei Thrombozytose darstellen (Rinder 1998).

Gerade bei Fragen nach der Wahl einer antikoagulatorischen bridging-Therapie nach einer ersten Operation vergesellschaftet mit einer Thrombozytose, könnte die Bestimmung der IPF Hinweise bei der Einschätzung der adäquaten Thromboseprophylaxe vor notwendigen Zweiteingriffen geben (Weimann 2009).

3.3 Differentialdiagnostik und Monitoring mittels IRF und delta-Hb

Die unreife Fraktion der Retikulozyten (IRF) ist ein Frühmarker nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation und weist auf den Erfolg des Anwachsens des Knochenmarks (Engraftment) hin, deutlich vor einem Anstieg der Neutrophilenzahl oder Anstieg der Retikulozyten (Noronha 2003, Torres Gomez 2001). Um eine akute Rejektion nach Nierentransplantation mit einer nicht-invasiven Methode vorherzusagen, wurde in Publikation 4 (Kapitel 2.2) unter anderem die IRF bei 25 NTX-Patienten im Verlauf bestimmt, basierend auf der Beobachtung, dass unmittelbar nach der Transplantation die EPO-Produktion des Organes einsetzt, bzw. bei einer akuten Abstoßungsreaktion die EPO-Produktion deutlich verzögert ist (Moulin 1995, Muihead 1999). Obwohl die Nierenbiopsie als Goldstandard zur Diagnose einer akuten Rejektion gilt, ist sie doch gerade in der frühen Abstoßungsphase des Organs nicht sensitiv genug, aufwendig in der Durchführung und risikobehaftet. Auch der Verlauf der EPO-Konzentration post NTX ist viel zu volatil, als dass durch ihre Bestimmung eine dezidierte Prognose für eine akute Rejektion abgegeben werden könnte (Shapiro 2001). Bei einer akuten Abstoßung geht die einsetzende Immunantwort initial mit einer Ausschüttung von Zytokinen und Interleukinen und nachfolgend mit einer Suppression der Erythropoese einher (Broxmeyer 1986, Gunnell 1999). Weder war zwischen der Patientengruppe mit sofortiger und verzögerter Exkretionsfunktion der Niere ein signifikanter Unterschied bei den Retikulozytenkonzentrationen und der IRF feststellbar, noch bei den Subgruppen mit akuter Rejektion, nephrotoxischer Nierenschädigung durch

Immunsuppressiva oder bei Patienten mit einem Transplantat mit Konservierungsschäden. Lediglich die Plasmakreatininkonzentration war in der Lage, zumindest die Gruppe mit verspäteter Exkretionsfunktion von der mit spontan einsetzender Dialyse zu unterscheiden (Weimann 2007). Ein Erklärungsansatz für das Versagen der IRF zur Detektion einer akuten Transplantatabstoßung der Niere könnte sein, dass zwar bei einer solchen Episode extrem hohe EPO-Konzentrationen aufgrund der Gewebehypoxie des Transplantats auftreten (Moulin 1995), diese jedoch durch die ebenfalls deutlich gesteigerte ZytokinKonzentrationen antagonisiert werden. Des Weiteren führt ein funktioneller Eisenmangel und ein sekundärer Hyperparathyreoidismus mit konsekutiver Knochenmarksfibrose bei chronisch niereninsuffizienten Patienten zu einer deutlichen Resistenz gegenüber EPO (Rao 1993), so dass auch deshalb keine signifikanten IRF-Unterschiede detektiert wurden.

Die fünfte Publikation (Kapitel 2.2) versuchte anhand des milden Inflammationsmodells eines Marathonlaufs die Sensitivität verschiedener Inflammationsmarker miteinander zu vergleichen. Die Blutentnahmen der Läufer erfolgte vor dem Rennen und unmittelbar danach, sowie zehn Tage nach dem Rennen (Weimann 2010). Bei Patienten mit SIRS bzw. Sepsis wird aufgrund der Hcpidinausschüttung der Leber der Eisentransport durch Ferroportin inhibiert (Nemeth 2008, Nemeth 2010), so dass es bei fortlaufender Erythropoese zu einem funktionellen Eisenmangel kommt und bereits nach wenigen Stunden kleinere Retikulozyten gebildet werden und nachfolgend der delta-Hämoglobin-Wert abfällt und negativ werden kann. Nur die Leukozytenzahl, die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und die IL-6 Konzentration waren in der Lage, die milde Inflammation nach dem Marathonlauf mit einer diagnostischen Sensitivität und Spezifität mit nahezu 100% zu detektieren. Wahrscheinlich stammt der Anstieg der Leukozyten und Neutrophilen aus dem marginalen Pool und nicht aus dem Knochenmark, hervorgerufen durch die Stimulation beta-adrenerger Rezeptoren (Boxer 1980).

CRP und delta-Hämoglobin waren nicht in der Lage, die milde Inflammation nach dem Lauf zu detektieren. Der ausbleibende CRP-Anstieg ist nicht verwunderlich, da CRP als Akut-Phase-Protein frühestens nach zwölf Stunden ansteigt und alle Läufer dieser Studie den Marathonlauf in maximal sechs Stunden absolviert hatten (Hoffmann-Goetz 1994). Ein signifikanter Anstieg der IRF nach dem Lauf korreliert mit dem Anstieg an Retikulozyten nach dem Lauf. Deren Gehalt an Hämoglobin war

allerdings nahezu unverändert, so dass keinerlei signifikante Änderung des delta-Hämoglobinwertes resultierte. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass ein zu schwacher Inflammationsreiz und/oder eine zu kurze Reizdauer nicht ausreichend ist, um über eine Hepcidinausschüttung und einer Eisensequestrierung zu einer Verminderung des Retikulozytenhämoglobins und damit zu einem Abfall des delta-Hämoglobinwertes zu führen.

Ausblick

In Analogie zum Thomasplot (Thomas 2005) kann ein sog. 9-feldriger Hämaplot konstruiert werden, der anstelle des Ferritinindex auf der x-Achse das delta-Hämoglobin wiedergibt (Abb. 4, Weimann A., Linssen J., unpublizierte Daten). Auf einen Blick lässt sich so die Dynamik der Eisenstoffwechselfparameter erfassen.

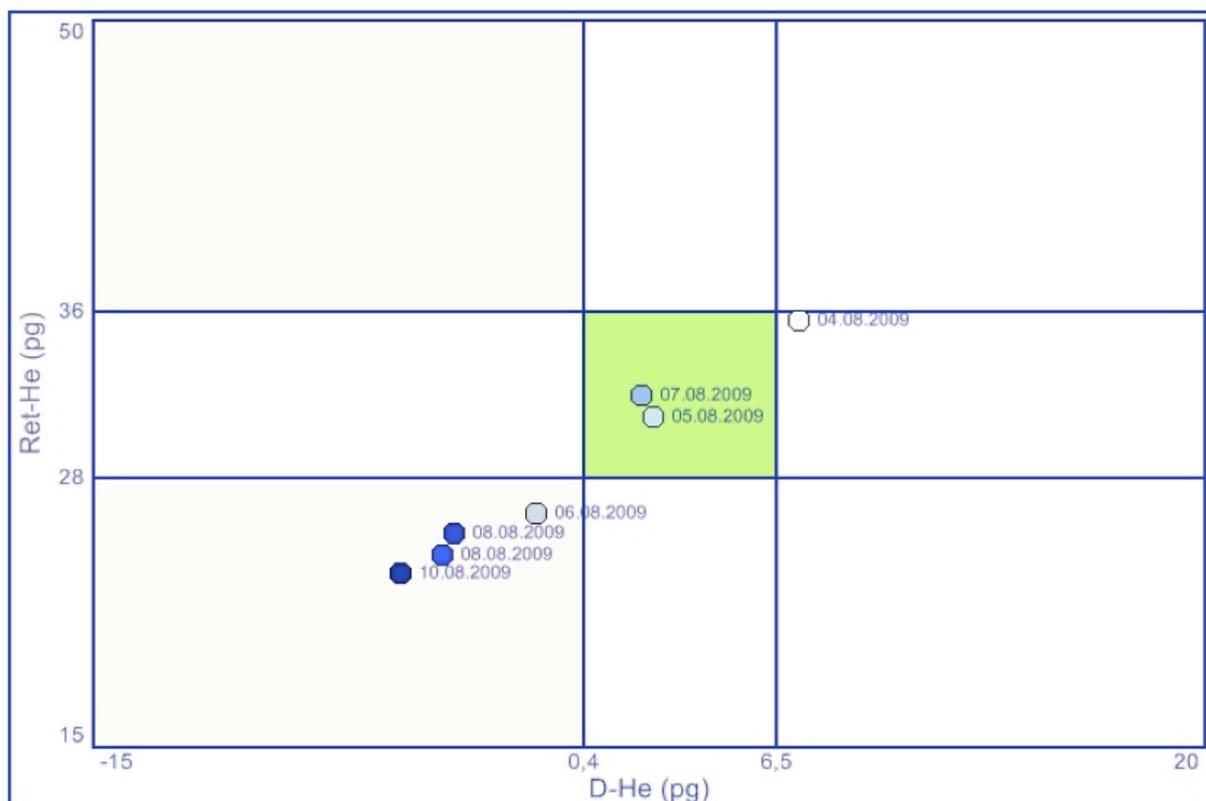


Abbildung 4: Darstellung des Hämaplots mit delta-Hämoglobin auf der x-Achse und Retikulozyten-Hämoglobin auf der y-Achse. Zu sehen ist die Entwicklung der Parameter bei einer schweren Sepsis mit negativen delta-Hämoglobin und abnehmenden Retikulozyten-Hämoglobin Werten.

3.4 Ersatz eines manuellen mikroskopischen Parameters durch einen automatisierten: der GI-Index

Die Messergebnisse eines Automatenblutbildes basieren auf der Auswertung von mehreren zehntausend Zellen. Im Durchschnitt werden pro Probe 10.000 bis 30.000 Zellen, in Abhängigkeit von der Konzentration der Leukozyten der Probe, analysiert (Weimann 2009, Butarello 2008). Die Präzision von Automatenblutbildern liegt weitaus höher, als die von mikroskopisch erhobenen Befunden, deren Standarddifferenzierung auf zumeist bloß 100 Zellen basiert. Das herkömmliche mikroskopische Blutbild besitzt somit drei Arten an Fehlern:

Zum ersten den Verteilungsfehler aufgrund der ungleichen Verteilung von Zellen im Ausstrich, des Weiteren den Fehler der subjektiven Interpretation durch den Untersucher und am schwerwiegendsten ist der statistische Fehler aufgrund der geringen Anzahl differenzierter Zellen (Weimann 2009).

1985 zeigte Rumke, dass eine Probe mit 1% basophilen Granulozyten bei der mikroskopischen Zählung ein Vertrauensintervall von 0 bis 4% aufweist, während das Vertrauensintervall bei der automatischen Zählung der gleichen Probe mit dem Hämatologieautomaten mit 0,8 bis 1,2 % deutlich kleiner ist (Rumke 1985).

In Publikation 6 (Kapitel 2.2) wurde der Versuch unternommen, eine Verbesserung bei der zweiten Art von Fehlern, der subjektiven Interpretation durch den Untersucher, zu erzielen. Der manuelle Parameter der toxischen Granulierung von Granulozyten im mikroskopischen Blutbild wurde durch den automatisierten Parameter des Seitwärtsstreulicht-Signals von Neutrophilen ersetzt.

Der Nachweis unreifer Granulozyten besitzt eine hohe Spezifität zum Infektionsnachweis (83% to 97%), allerdings bei einer recht niedrigen Sensitivität von 35% bis 40% (Briggs 2003, Ansari-Lari 2003). Die niedrige Sensitivität deutet daraufhin, dass die unreifen Granulozyten nicht zum Einsatz als Screeningmethode für eine Infektion taugen, trotz ihrer signifikanten Assoziation mit positiven Blutkulturen. Die toxische Granulierung von Neutrophilen als primär qualitatives Merkmal ist ein Zeichen der schwereren Infektion und tritt bei leichten und milden Infektionen kaum auf (Kugel 1932, Schofield 1983). In Publikation 6 wurde die semiquantitative mikroskopische Beurteilung von toxisch granulierten Präparaten mit dem als GI-Index normierten Seitwärtsstreulicht-Signal der Neutrophilen verglichen. Es ergab sich eine gute Korrelation ($r=0.839$) zwischen den beiden Methoden, mit AUC-Werten bei der ROC-Analyse von 0.94 für den GI-Index und 0.91 für das

mikroskopische Verfahren. Ebenso zeigte sich eine gute Korrelation zwischen CRP-Konzentration und dem GI-Index ($r=0.836$) beim Vergleich von zufällig ausgewählten Laborproben. Allerdings wies die manuelle mikroskopische Methode, die semiquantitativ von "normal", +, ++ bis +++ unterscheidet, eine asymmetrische Verteilung zwischen den Gruppen mit ++ und +++ auf, was auf Probleme bei der subjektiven, erfahrungsbasierten Einordnung zu den Subgruppen beim Mikroskopierenden hindeutet.

Bei dem longitudinalen in vivo Vergleich von CRP und GI-Index bei 100 Intensivpatienten war die Korrelation zwischen GI-Index und CRP schwach. Ein Anstieg des GI-Indexes ging einer Veränderung des CRP-Wertes im Schnitt einen Tag voraus (Meisner 2006). In vitro konnte diese Beobachtung untermauert werden, durch die fortgesetzte Bestimmung des GI-Index bei Vollblutproben nach Stimulation mit LPS. Nach einer anfänglichen schnellen Degranulation nach 30 Minuten mit negativen GI-Index Werten, erfolgte eine Hypergranulationsreaktion kontinuierlich zunehmend über den folgenden Beobachtungszeitraum von drei Stunden. Zusammenfassend kann der GI-Index daher als ein recht schneller dynamischer Parameter angesehen werden, der bei Patienten mit SIRS im Gegensatz zu CRP nicht ansteigt (z.B. nach großen Operationen), bei Patienten mit Infektionskrankungen dann aber wiederum mit CRP gut korreliert.

Ausblick

Der Granulationsindex ist mittlerweile fester Bestandteil des Differentialblutbildes des Labor Berlin (Parameterbeschreibung in der Referenzdatenbank: <http://www.charite.de/zlp/routine/referenzdb/00Start.htm>) und hat die arbeitsintensive, subjektive und erfahrungsbasierte semiquantitative Einteilung der toxischen Granulierung als quantitativer Parameter im Befundbericht ersetzt.

4 Zusammenfassung

Die automatisierte Blutbildanalytik durch den Einsatz der Flowzytometrie hat über die letzten Jahrzehnte das manuelle Differentialblutbild abgelöst, wenn auch noch nicht in allen Bereichen vollständig ersetzt. Die Entwicklungsfortschritte, insbesondere in der Fluoreszenz-Flowzytometrie, erlauben die Quantifizierung von Zell-Subgruppen sämtlicher Zellreihen bzw. der Erfassung ihrer physiologischen (Aktivierungs-) Zustände aus geringsten Probenmengen.

Der neue dynamische Parameter IPF zur Quantifizierung der unreifen Plättchenpopulation zeigt Potential zur Differenzierung der Pathophysiologie (Publikation 2) einer Thrombozytopenie, ermöglicht die Differentialdiagnose von Erkrankungen, die sonst bloß durch die invasive Maßnahme einer Knochenmarkspunktion möglich gewesen wäre (Publikation 3) und erlaubt ein verbessertes Therapiemonitoring bei Thrombozytentransfusionen (Publikation 1).

Unreife Vorstufen von Retikulozyten (IRF) und deren Hämoglobingehalt (Ret-Hb) im Vergleich zu reifen Erythrozyten (delta-Hb) sind nicht nur Marker zur Differentialdiagnose von Anämien, sondern können zum Therapiemonitoring von Intensivpatienten (Spies und Weimann, Manuskript in Vorbereitung) herangezogen werden. Ein diagnostischer Mehrwert bei der Untersuchung einer sehr milden inflammatorischen Situation am Beispiel eines Marathonlaufs (Publikation 5) oder bei dem äußerst komplexen pathobiochemischen Zustand nach Nierentransplantation (Publikation 4) konnte allerdings nicht gezeigt werden.

Durch eine Automatisierung von analytischen Prozessen kann eine Beschleunigung, Objektivierung und Standardisierung von Methoden implementiert werden. Publikation 6 zeigte den erfolgreichen Ersatz der manuellen mikroskopischen Methode der semiquantitativen Beschreibung der toxischen Granulation von neutrophilen Granulozyten durch den vollautomatisierten GI-Index mittels Fluoreszenz-Flowzytometrie, einem Parameter, der bereits Eingang in die Routineanalytik des Differentialblutbildes gefunden hat.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe Y., Wada H., Tomatsu H., Sakaguchi A., Nishioka J., Yabu Y., Onishi K., Nakatani K., Morishita Y., Oguni S., Nobori T., (2006) "A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF)", *Thromb Res*, **118**, 463-469
- Andrews NC., (2008) "Forging a field: the golden age of iron biology", *Blood*, **112**, 219-230
- Ansari-Lari MA., Kickler TS., Borowitz MJ. (2003) "Immature Granulocyte Measurement Using the Sysmex XE-2100. Relationship to Infection and Sepsis", *Am J Clin Pathol*, **120**, 795-799
- Bizzozero G. (1882), "Über einer neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung" *Virchows Archiv für Pathol. Anatomie und Physiologie*, **90**, 261–232
- Boxer LA., Allen JM., Baehner RL. (1980) "Diminished polymorphnuclear leukocyte adherence. Function dependent on release of cyclic AMP by endothelial cells after stimulation of beta-receptors by epinephrine", *J Clin Invest*, **66**, 268-274
- Briggs C., Harrison P., Grant D., Staves J., Machin SJ. (2000) "New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter - the XE 2100", *Clin Lab Haematol*, **22**, 345-50
- Briggs C., Kunka S., Fujimoto H., Hamaguchi Y., Davis BH., Machin SJ. (2003) "Evaluation of immature granulocyte counts by the XE-IG Master: upgraded software for the XE-2100 automated hematology analyzer", *Laboratory Hematology*, **9**, 117-124
- Briggs C., Kunka S., Hart D., Oguni S., Machin SJ. (2004) "Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia", *Br J Haematol*, **126**, 93-99
- Briggs C., Hart D., Kunka S. , Oguni S., Machin SJ. (2006) "Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation", *Transfus Med*, **16**, 101-109
- Broxmeyer HE., Williams DE., Lu L., Cooper S., Anderson SL., Beyer GS., Hoffman R., Rubin BY. (1986) "The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon-gamma", *J Immunol*, **136**, 4487-4495
- Brugnara C., Schiller B., Moran J. (2006) "Reticulocyte hemoglobin equivalent (RET-He) and assessment of iron-deficient states", *Clin Lab Haematol*, **28**, 303-308

- Buttarelo M, Bulian P, Farina G., Petris MG., Temporin V., Toffolo L. (2002) "Five fully automated methods for performing immature reticulocyte fraction: comparison in diagnosis of bone marrow aplasia", *Am J Clin Pathol*, **117**, 871-879
- Buttarelo M., Temporin V., Ceravolo R., Farina G., Bulian P. (2004) "The new reticulocyte parameter (Ret-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of posttreatment sideropenic anemia", *Am J Clin Pathol*, **121**, 489-495
- Buttarelo M., Plebani M. (2008) "Automated Blood Cell Counts", *Am J Clin Pathol*, **130**, 104-116
- Canals C., Remacha AF., Sardá P., Piazuolo J.M., Royo MT., Romero MA. (2005) "Clinical utility of the new Sysmex XE-2100 parameter – reticulocyte hemoglobin equivalent – in the diagnosis of anemia", *Haematologica*, **90**, 1133-1134
- Castle V., Andrew M., Kelton J., Giron D., Johnston M., Carter C. (1986) "Frequency and mechanism of neonatal thrombocytopenia", *J Pediatr*, **108**, 749-755
- Chang M., Nakagawa PA., Williams SA., Schwartz MR., Imfeld KL., Buzby JS., Nugent DJ. (2003) "Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro", *Blood*, **102**, 887-895
- Chaoui D., Chakroun T., Robert F., Rio B., Belhocine R., Legrand O., Salanoubat C., Lecrubier C., Casadevall N., Marie JP., Elalamy I., (2005) "Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy", *Transfusion*, **45**, 766-772
- Cornbleet PJ, Novak RW. (1995) "Lack of reproducibility of band neutrophils identification despite the use of uniform identification criteria" *Lab Hematol*, **1**, 89-96
- Coulter WH. (1953), "Means for counting particles suspended in a fluid", U.S.P. Office No. 2656506
- Cremer M., Paetzold J., Schmalisch G., Hammer H., Loui A, Dame C., Weimann A. (2009) "Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia", *Br J Haematol*, **144**, 619-621
- Cremer M.*, Weimann A.*, Schmalisch G., Hammer H., Bühner C., Dame C. (2010) "Immature platelet fraction reflects megakaryopoietic activity in neonatal early-onset thrombocytopenia", *co-first authors, *Thrombosis Haemostasis*, **103**, 1016-1021
- Dame C. (2002) "Developmental biology of thrombopoietin in the human fetus and neonate", *Acta Paediatr Suppl.*, **91**, 54-65
- Davis BH. (1996), "Immature reticulocyte fraction (IRF): by any name, a useful clinical parameter of erythropoietic activity", *Lab Hematol*, **2**, 2-8
- Dittrich W., Göhde W. (1969) "Impulsfluorimetrie bei Einzelzellen in Suspensionen", *Z. Naturf.*, **24**, 360-361

- d'Onofrio G., Kuse R., Foures C., Jou JM., Pradella M., Zini G. (1996) "Reticulocytes in haematological disorders", *Clin Lab Haematol*, **18**, Supplement 1, 29-34
- Fernandes B., Hamaguchi Y. (2007) "Automated enumeration of immature granulocytes", *Am J Clin Pathol*, **128**, 454-63
- Field D., Taube E. and Heumann S. (2006) "Performance evaluation of the immature granulocyte parameter on the Sysmex XE-2100 automated hematology analyzer", *Laboratory Hematology*, **12**, 11-14
- Franck S, Linssen J, Messinger M, Thomas L. (2004) "Potential utility of Ret-Y in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis", *Clin Chem*, **50**, 1240-1242
- Fujimoto K. (1999), "Principles of Measurement in Hematology Analyzers Manufactured by Sysmex Corporation", *Sysmex J Int*, **9**, 31-44
- Fulwyler MJ. (1965), "Electronic separation of biological cells by volume", *Science*, **150**, 910-911
- Furundarena JR., Araiz M., Uranga M., Sainz MR., Agirre A., Trassorras M., Uresandi N., Montes MC., Argoitia N. (2010) "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*, **32**, 360-366.
- Ganz T. (2003) "Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation", *Blood*, **102**, 783-788
- Giles I. (2006), "The thing about fluorescence technology", *Sysmex J Int*, **16**, 17-18
- Gunnell J., Yeun JY., Depner TA., Kaysen GA. (1999) "Acute-phase response predicts erythropoietin resistance in hemodialysis and peritoneal dialysis patients", *Am J Kidney Dis*, **33**, 63-72
- Harrison P., Ault KA., Chapman S., Charie L., Davis B., Fujimoto K., Houwen B., Kunicka J., Lacombe F., Machin S., Raynor R., van Hove L., van Assendelft OW. (2001), "An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting.", *Amer J Clin Pathol*, **115**, 448-459
- Heilmeyer L. (1931) "Blutfarbstoffwechselstudien", *Dtsch Arch Klin Med*, **171**, 123-153
- Hoffman-Goetz L., Pedersen BK. (1994) "Exercise and the immune system: a model of the stress response?", *Immunol Today*, **15**, 382-387
- Houwerzijl EJ., Blom NR., van der Want JJ., Esselink MT., Koornstra JJ., Smit JW., Louwes H., Vellenga E., de Wolf JT. (2003) "Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura", *Blood*, **103**, 500-506
- Imeri F., Herklotz R., Risch L., Arbetsleitner C., Zerlauth M., Risch GM., Huber AR. (2008) "Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100", *Clin Chim Acta*, **397**, 68-71

- Ingram M., Coopersmith A. (1969), "Reticulated platelets following acute blood loss", *Br J Haematol*, **17**, 225-229
- Jäckel A, Hrsg. Telemedizinführer Deutschland 2009. Weimann A, Autor (2009) "Implementation eines Kosten-effektiven, konsolidierten und verbesserten telehämatologischen Services der drei Universitätskrankenhäuser der Charité Universitätsmedizin Berlin", Bad Nauheim: Medizin Forum AG; 112–116
- Joseph MA., Adams D., Maragos J., Saving KL. (1996) "Flow cytometry of neonatal platelet RNA", *J Pediat Hematol Onc*, **18**, 277-281
- Kamentsky LA., Derman H., Melamed MR. (1965), "Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis", *Science*, **150**, 630-631
- Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ., (2006), "A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia", *Am J Clin Pathol*, **125**, 282-287
- Kienast J., Schmitz G. (1990), " Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders", *Blood*, **75**, 116-121
- Kugel MA., Rosenthal N. (1932) "Pathologic changes occurring in polymorphonuclear leukocytes during the progress of infections", *Am J Med Sci*, **183**, 657-667
- 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. (2010) "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*, **32**, 237-243
- Linssen J., Aderhold S., Nierhaus A. Frings D., Kaltschmidt C., Zänker K. (2008) "Automation and validation of a rapid method to assess neutrophil and monocyte activation by routine fluorescence flow cytometry in vitro", *Cytometry B Clin Cytom*, **74**, 295-309
- Matic GB., Chapman SE., Zaiss M., Rothe G, Schmitz G. (1998) "Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability", *Cytometry*, **34**, 229-234
- Mehta P., Vasa R., Neumann L., Karpatkin M. (1980) "Thrombocytopenia in the high-risk infant", *J Pediatr*, **97**, 791-794
- Meisner M., Adina H., Schmidt J. (2006) "Correlation of procalcitonin and C-reactive protein to inflammation, complications, and outcome during the intensive care unit course of multiple-trauma patients", *Crit Care*, **10**, R1
- Moulin B., Ollier J., George F., Purgus R., Roux F., Sampol J., Olmer M. (1995) "Serum erythropoietin and reticulocyte maturity index after renal transplantation: a prospective longitudinal study", *Nephron*, **69**, 259-266
- Muirhead N. (1999) "Erythropoietin and renal transplantation", *Kidney Int Suppl*, **69**, S86-92

- Murray NA., Roberts IA. (1996) "Circulating megakaryocytes and their progenitors in early thrombocytopenia in preterm neonates", *Pediatr Res*, **40**, 112-119
- Nemeth E. (2008) "Iron regulation and erythropoiesis", *Curr Opin Hematol*, **15**, 169-175
- Nemeth E., (2010) "Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias", *Adv Hematol.*, 2010:750643, Epub 2009
- Nigro KG., O'Riordan M., Molloy EJ., Walsh MC., Sandhaus LM. (2005) "Performance of an Automated Immature Granulocyte Count as a Predictor of Neonatal Sepsis" *Am J Clin Pathol*, **123**, 618-624
- Norfolk DR., Ancliffe PJ., Contreras M., Hunt BJ., Machin SJ., Murphy WG., Williamson LM. (1998) "Consensus Statement on Platelet Transfusion Therapy. Royal College of Physicians Consensus Conference", *Brit J Haemat* **101**, 609–617
- Noronha JFA., De Souza CA., Vigorito AC., Aranha FJ., Zulli R., Miranda EC., Grotto HZ. (2003) "Immature reticulocytes as an early predictor of engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation", *Clin Lab Haematol*, **25**, 47-54
- O'Malley CJ., Rasko JE., Basser RL., McGrath KM., Cebon J., Grigg AP., Hopkins W., Cohen B., O'Byrne J., Green MD., Fox RM., Berndt MC., Begley CG. (1996), "Administration of pegylated recombinant human megacaryocyte growth factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of in vivo activation", *Blood*, **88**, 3288-3298
- Patel SR. (2005), "The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets", *J Clin Invest*, **115**, 3348-3354
- Rao DS., Shih MS., Mohini R. (1993) "Effect of serum parathyroid hormone and bone marrow fibrosis on the response to erythropoietin in uremia", *N Engl J Med*, **328**, 171-175
- Rinder HM., Munz VJ., Ault KA., Bonan JL., Smith BR. (1993) "Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders", *Arch Pathol Lab Med*, **117**, 606-610
- Rinder HM., Tracey JB., Recht M., De Castro L., Rinder CS., McHugh C., Smith BR. (1998) "Differences in platelet alpha-granule release between normals and immune thrombocytopenic patients and between young and old platelets", *Thromb Haemost*, **80**, 457-462
- Rumke CL. (1985) "Statistical reflections on finding atypical cells", *Blood Cells*, **11**, 141-144
- Saigo K., Sakota Y., Masuda Y., Matsunaga K., Takenokuchi M., Nishimura K., Sugimoto T., Sakurai K., Hashimoto M., Yanai T., Hayakawa A., Takeshima Y., Nomura T., Kubota Y., Kumagai S. (2008) "Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients", *Transfus Apher Sci.*, **38**, 127-32

- Saxonhouse MA., Sola MC., Pastos KM., Ignatz ME., Hutson AD., Christensen RD., Rimsza LM. (2004) "Reticulated platelet percentages in term and preterm neonates", *J Pediatr Hematol Oncol*, **26**, 797-802
- Schaefer M., Rowan RM. (2001) "The clinical relevance of nucleated red blood cell counts", *Sysmex J Int.*, **10**, 59-63
- Schofield KP., Stone PC., Beddall AC., Stuart J. (1983) "Quantitative cytochemistry of the toxic granulation blood neutrophil", *British J Hematol*, **53**, 15-22
- Shapiro R., Randhawa P., Jordan ML., Scantlebury VP., Vivas C., Jain A., Corry RJ., McCauley J., Johnston J., Donaldson J., Gray EA., Dvorchik I., Hakala TR., Fung JJ., Starzl TE (2001) "An analysis of early renal transplant protocol biopsies - the high incidence of subclinical tubulitis", *Am J Transplant* **1**, 47-50
- Sola MC., Calhoun DA., Hutson AD., Christensen RD. (1999) "Plasma thrombopoietin concentrations in thrombocytopenic and non-thrombocytopenic patients in a neonatal intensive care unit", *Brit J Haematol*, **104**, 90-92
- Stachon A., Holland-Letz T., Krieg M. (2004) "High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood", *Clin Chem Lab Med.*, **48**, 933-938
- Stachon A., Kempf R., Holland-Letz T., Friese J., Becker A., Krieg M. (2006) "Daily monitoring of nucleated red blood cells in the blood of surgical intensive care patients", *Clin Chim Acta*, **366**, 329–335
- Stohlawetz P., Stiegler G., Knobl P., Höcker P., Panzer S. (1999) "The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusion", *Ann Hematol.*, **78**, 271-273
- Strauß G., Vollert C., von Stackelberg A., Schütz B., Weimann A., Gaedicke G., Schulze H. (2010) "Immature platelet count: A simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia", *Pediatric Blood & Cancer*, **57**, 641-647
- Takami A., Shibayama M., Orito M., Omote M., Okumura H., Yamashita T., Shimadoi S., Yoshida T., Nakao S., Asakura H. (2007) "Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation", *Bone Marrow Transplant.*, **39**, 501-507
- Tanaka C., Fujimoto K. (2001), "Reference Method for Platelet Enumeration", *Sysmex J Int*, **11**, 33-39
- Tanaka C., Nagai T., Nakamura M, Yamauchi Y., Noguchi K., Takimoto Y., Shigeta H., Murayama T. (2007), "Automated Hematology Analyzer XE-5000 - Overview and Basic Performance", *Sysmex J Int*, **17**, Supplement 3
- Thom R., Hampe A., Sauerbrey G. (1969), "Die elektronische Volumenbestimmung von Blutkörperchen und ihre Fehlerquellen" *Z. Gesamte Exp. Med.*, **151**, 331-349
- Thom R., Kachel V. (1970), "Fortschritte für die elektronische Größenbestimmung von Blutkörperchen", *Blut*, **21**, 48-50

- Thomas C., Thomas L. (2005) "Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis", *Lab Hematol.*, **11**, 14-23
- Thomas L., Franck S., Messinger M., Linssen J., Thomé M., Thomas C. (2005) "Reticulocyte hemoglobin measurement: comparison of two methods in the diagnosis of iron restricted erythropoiesis", *Clin Chem Lab Med* 2005; **43**, 1193-1202
- Torres Gomez A., Sánchez J., Lakomsky D., Serrano J., Alvarez MA., Martín C., Valls C., Nevado L., Rodriguez A., Casaño J., Martínez F., Gómez P. (2001) "Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation", *Haematologica*, **86**, 24-29
- Ullrich C, Wu A, Armsby C., Rieber S., Wingerter S., Brugnara C., Shapiro D., Bernstein H. (2005) "Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content", *JAMA*, **294**, 924-930
- van der Meer W., van Gelder W., de Keijzer R., Willems H. (2006) "Does the band cell survive the 21st century?", *Eur J Haematol*, **76**, 251-254
- Weimann A., Lun S., Müller C., Pratschke J., Reinke P., Lun A. (2007) "Reticulocytes and their immature fraction do not detect acute rejection after kidney transplantation", *Transplantation Proceedings*, **39**, 514-17
- Weimann A., Weimann K., Lun A. (2009) "Hämatologische Veränderungen in der Intensivmedizin – Das erweiterte Blutbild", *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, **3**, 164-170
- Weimann A., Lun A., Lun S., Zimmermann M., Borges AC., Ziebig R., Gonzalez JB., Gilka S., Saravia M., Knebel F., Schroeckh S., Schimke I. (2010) "Leukocyte, neutrophil, immature granulocyte counts and interleukin-6 are superior to procalcitonin, C-reactive protein and delta-He for detection of mild inflammation: data from marathon runners producing mild systemic inflammation visible immediately after the run", *J Lab Med*, **34**, 53-59
- Zimmermann M., Cremer M., Hoffmann C., Weimann K., Weimann A. (2011a) "Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases", *CCLM*, **49**, 1193-1198
- Zimmermann M., Ruprecht K., Kainzinger F., Heppner FL, Weimann A. (2011b) "Automated versus manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber", *IJLH*, [Epub ahead of print]
- Zucker ML., Murphy CA., Rachel JM., Martinez GA., Abhyankar S., McGuirk JP., Reid KJ., Plapp FV. (2006) "Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation", *Lab Hematol.*, **12**, 125-130

6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. Rudolf Tauber und Herrn Prof. Dr. med. Eckart Köttgen meinen Dank aussprechen, für die großzügige Bereitstellung des kompetenten wissenschaftlichen Umfeldes und für die vorbehaltlose Unterstützung meiner Tätigkeit auf dem Gebiete der automatisierten flowzytometrischen hämatologischen Analytik.

Mein Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, vor allem Herrn PD Dr. Andreas Lun und Dr. Mathias Zimmermann, die mir kontinuierlich mit unermüdlicher und kompetenter Unterstützung und Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin bedanken für die exzellente Zusammenarbeit möchte ich mich bei meinen klinischen Kooperationspartnern, insbesondere bei Dr. med. Malte Cremer, Dr. rer. nat. Harald Schulze, Professor Dr. med. Hortense Slevogt, Professor Dr. med. Claudia Spies, Professor Dr. med. Frank Heppner und Professor Dr. med. Gerhard Gaedicke.

Mein ganz besonderer Dank gilt den hämatologischen MTLA der Labormedizin im Institut, die routiniert und standardisiert zahllose Einzelmessungen durchgeführt haben und ohne deren Sorgfalt und Sachkenntnis eine reibungslose Durchführung der Studien nicht möglich gewesen wären.

Ebenso gilt mein Dank Dr. rer. nat. Michael Schäfer und Dr. rer. nat. Joachim Linssen, die mir mit vielen innovativen Ideen und wertvollen Hinweisen Einblicke in die ganz besondere Welt der Fluoreszenz-Flowzytometrie ermöglichten.

Schließlich gilt ganz besonderer Dank meinen Eltern, für ihre lebenslange Unterstützung und Ermöglichung meiner Ausbildung und letztlich auch dem Weg zur Habilitation. Mein größter Dank gebührt meiner Frau Dr. med. Karin Weimann für die umfangreiche Unterstützung meiner Arbeit, für ihr Verständnis und unerschütterlichen Beistand, den sie mir in jeder Lebenslage auf dem Weg zur Habilitation gegeben hat.

7 Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst wurde, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 22.09.2011

Andreas Weimann