

Znaczenie kliniczne NRBC

Termin „NRBC” (ang. nucleated red blood cells - czyli jądrzaste krwinki czerwone) opisuje komórki prekursorowe linii krwinek czerwonych; znane również jako erytroblasty lub dawniej normoblasty. U zdrowych, dorosłych osób lub u starszych dzieci, NRBC podczas dojrzewania znajdują się w krwiotwórczym szpiku kostnym. Ich obecność we krwi obwodowej wskazuje na erytropoezę pozaszpikową lub uszkodzenie bariery krew – szpik. Obie te przyczyny są możliwe jedynie w czasie poważnych schorzeń. Fizjologicznie NRBC mogą pojawiać się we krwi wcześniaków lub noworodków.

Jakie znaczenie ma liczba NRBC u noworodków?

Konieczność określenia liczby NRBC w próbkach noworodków jest oczywista, ponieważ pozwala na otrzymanie właściwej liczby krwinek białych (WBC). Poza tym, zliczenie NRBC we krwi obwodowej noworodków może dać dodatkowe, ważne informacje. W roku 1924 zostały opublikowane zakresy referencyjne liczby NRBC u jednodniowych noworodkówⁱ. W tym badaniu 41 z 42 noworodków posiadało NRBC we krwi obwodowej; średnio 500 NRBC/ μ l lub 0,1% krążących krwinek czerwonych. W kolejnych dekadach różni autorzy wykazywali podobne wyniki dla noworodków w czasie ich pierwszych dni życia. Niektóre z tych źródeł są wymienione w tabeli 1, która zawiera również zakresy referencyjne. U zdrowych noworodków erytroblasty znikają z krwi obwodowej w ciągu pierwszego tygodnia życia.

Nawet u wcześniaków i noworodków, znając dokładną liczbę NRBC można wysnuć wnioski na temat stanu ich zdrowia. Liczba NRBC powyżej wskazanych zakresów referencyjnych może wskazywać na przewlekłą lub pourodzeniową hipoksję, anemię, cukrzycę u matki lub ostry stres. Wartości NRBC zwiększone do 500 NRBC/100 WBC mogą także wskazywać na choroby zakaźne, takie jak wrodzony syfilis^{vi}. Choć w 1 - 2 % przypadków duże zwiększenie stężenia NRBC

może być idiopatyczne^{vii}, wymaga to szybkiego sprawdzenia przyczyny w celu rozpoczęcia możliwie najszybszego i koniecznego leczenia.

Jakie znaczenie ma liczba NRBC u starszych dzieci i dorosłych?

U dorosłych i starszych dzieci obecność NRBC we krwi krążącej zawsze wskazuje na poważną chorobę. NRBC może praktycznie towarzyszyć prawie wszystkim ciężkim anemiom. Dodatkowo są one często obecne w anemii hemolitycznej, talasemiach, hematologicznych chorobach układowych, takich jak zespoły mielodysplastyczne lub białaczkach oraz ciężkich krwawieniach, ale mogą również pojawiać się w stanach krytycznych dla zdrowia np. u pacjentów po urazach na oddziałach intensywnej terapii. W punkcie *Badania dotyczące znaczenia klinicznego liczby NRBC* pokazano, że obecność NRBC we krwi obwodowej osób dorosłych koreluje także ze śmiertelnością. Ponieważ zwiększa się on – poza innymi czynnikami - wraz z liczbą NRBC, pomocna jest znajomość ich dokładnej liczby w celu lepszego oszacowania ryzyka. Ponadto stężenie NRBC może wskazywać w jakim stopniu uszkodzony jest szpik kostny.

Metody zliczania NRBC

Zliczanie manualne

W manualnym zliczaniu krwinek, każdy obecny erytroblast może być znaleziony przypadkowo. Powszechne w metodzie mikroskopowej jest podanie liczby NRBC na 100 obejrzanych WBC. Zazwyczaj 100 – 200 WBC (rzadko do 400 WBC) są oceniane pod mikroskopem. Problem w zliczaniu manualnym, polega jednak na tym, że NRBC bardzo przypominają małe limfocyty; nawet doświadczony personel może błędnie zaklasyfikować je jako limfocyty. To skutkuje fałszywie wysoką liczbą WBC, która może być szczególnie ważna u pacjentów leukopenicznych, np. w czasie chemioterapii. Z tego powodu i dużego nakładu pracy, zliczanie manualne nie jest dla NRBC odpowiednią metodą przesiewową. Jeśli

Źródło (pierwszy autor)	Liczba próbek	NRBC/ μ L [$\bar{x} \pm 1$ SD]	Czas po urodzeniu	Wiek ciążowy
Naeye ⁱⁱ	84	919 \pm 1425 560 \pm 771	1 h 6 h	terminowy terminowy
Green ⁱⁱⁱ	102	400 \pm 1300	12 – 24 h	37–41 tydzień
Green ^{iv}	26 37 86	2900 \pm 3600 1200 \pm 1800 1000 \pm 900	\leq 24 h	23–26 tydzień 27–29 tydzień 30–32 tydzień
Buonocore ^v	47 185 105	8521 \pm 1620 4548 \pm 473 1689 \pm 290	narodzenie (krew pępowinowa)	24–27 tydzień 28–36 tydzień 37–41 tydzień

Tabela 1. Zakresy referencyjne u zdrowych noworodków w odniesieniu do czasu po urodzeniu i wieku ciążowego

laboratorium korzysta z analizatora hematologicznego, który jest w stanie przynajmniej generować flagę dla NRBC, zliczanie manualne może być bardziej ukierunkowane. Niemniej jednak, zliczanie manualne należy traktować jako ważne w ujęciu statystycznym ze średnim współczynnikiem zmienności 40% (20 – 110%)^{viii}.

Zliczanie w cytometrii przepływowej



















Istnieje wiele różnych możliwości określenia liczby NRBC za pomocą cytometrii przepływowej wykorzystującej przeciwciała. Wszystkie te metody mają pewną cechą wspólną – przeciwciała są czułe wobec antygenów różnicowanie komórkowego (CD, ang. cluster of differentiation). Zazwyczaj wykorzystywane jest przeciwciało przeciw CD71, które jest obecne tylko na powierzchni zarówno dojrzałych jak i niedojrzałych krwinek czerwonych (RBC). W celu upewnienia się, że dojrzałe bezjądrzaste krwinki czerwone, można odróżnić od niedojrzałych jądrzastych krwinek czerwonych, jądro i DNA są dodatkowo barwione. Alternatywnie, zamiast CD71 można wykorzystać CD45, który jest obecny tylko na powierzchni krwinek białych i zapewnia ujemną selekcję krwinek czerwonych. Chociaż ta metoda jest bardzo dokładna, przeważają w niej wady: wykorzystanie przeciwciał jest dość drogie, jest to metoda czasochłonna i wymaga wyszkolonego personelu, co czyni ją

nieodpowiednią dla rutynowych badań.

Zliczanie NRBC na analizatorach Sysmex serii XN

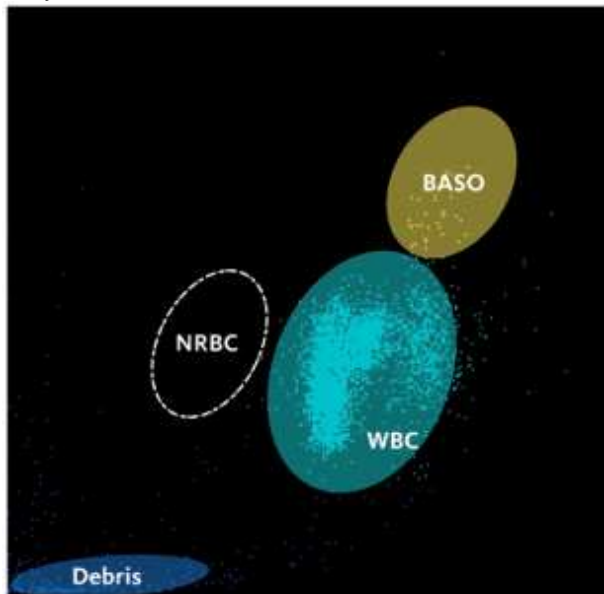
Zliczanie NRBC na analizatorach jest możliwe od ponad 10 lat, ale tylko dzięki analizatorom serii XN możliwe stało się dokładne i rutynowe oznaczenie NRBC bez zwiększenia czasu pomiaru. Ponieważ teraz NRBC jest włączone do podstawowej morfologii XN-CBC – czas oczekiwania, który był potrzebny w badaniu potwierdzającym i zliczaniu manualnym, nie jest już konieczny i ominięte są potencjalne błędy związane z tymi badaniami. Wynik WBC w próbkach zawierających erytroblasty jest automatycznie korygowany. Pod pewnymi względami monitorowanie pacjenta jest ułatwione, co jest szczególnie korzystne np. dla pacjentów z oddziałów chirurgicznych, gdzie często wymagana jest jedynie podstawowa morfologia.

W jaki sposób zliczane są erytroblasty w analizatorach XN? Specjalne odczynnik o niskim pH stabilizuje komórki zasadochłonne, które są zliczane w tym samym kanale. Podczas gdy inne krwinki białe się obkurczają, odczynnik lizuje błonę krwinek czerwonych i specyficznie znakuje jądra obecnych erytroblastów. W ten sposób niweluje się interferencję ze strony lipidów lub erytrocytów opornych na lizę. Dokładny mechanizm jest

	Liza Znakowanie				Fluorescencja	Światło rozproszone bocznie	
Bazofile		→		→		Silne	Silne
Limfocyty		→		→		Średnie	Średnie
Monocyty		→		→			
Granulocyty		→		→			
NRBC		→		→		Słabe	Średnie
RBC		→		→		Bardzo słabe	Bardzo słabe

Ryc. 1. Mechanizm znakowania w kanale WNR

pokazany na rycinie 1. Ze względu na różnice w świetle fluorescencyjnym i świetle rozproszonym, komórki mogą być rozdzielone, tak jak to pokazano na rycinie 2.



Ryc. 2 Skatergram WNR

Z pomocą analizatora XN, erythroblasty mogą być dokładnie zliczane zarówno w niskich jak i wysokich zakresach, a wynik może być przedstawiony w wartościach bezwzględnych (NRBC#) i względnych (NRBC%, /100 WBC) (ryc. 3). Określenie i wyświetlenie wartości bezwzględnej chroni przez sytuacją kiedy np. względnie niska liczba NRBC pojawia się w przypadku wysokiego stężenia NRBC i znacznej leukocytozy. To samo dotyczy sytuacji odwrotnej.

Badania dotyczące klinicznego znaczenia wartości NRBC

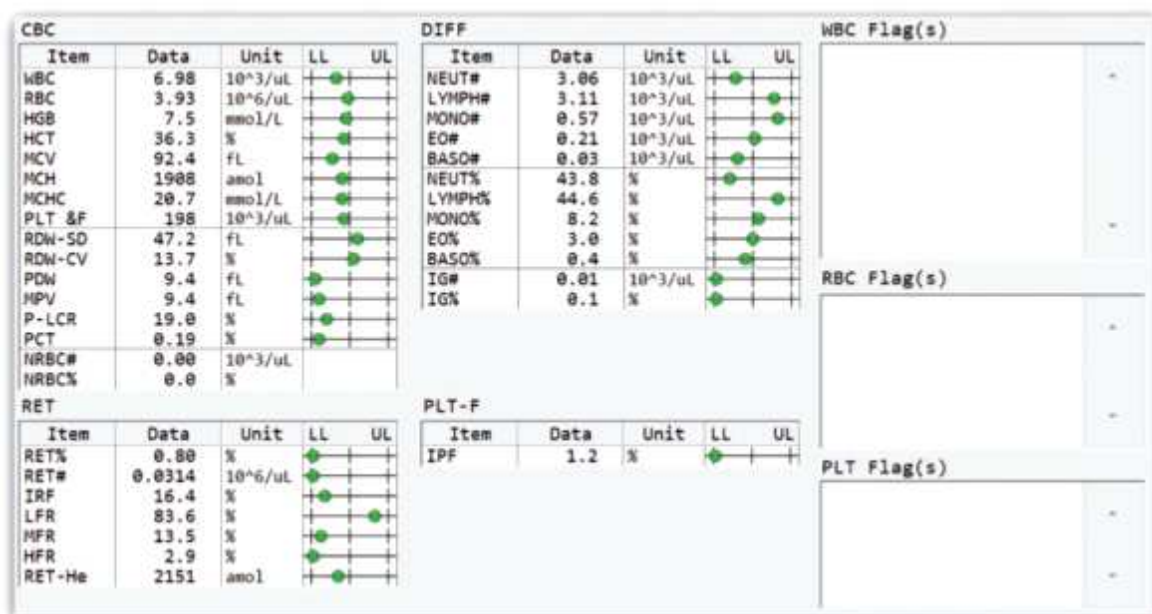
Badania z lat 2002 - 2011 (wymienione poniżej) zostały wykonane na analizatorze XE-2100. Niemniej jednak, wnioski mogą być odniesione również do serii XN.

1. Badanie obejmujące pacjentów po przeszczepiekomórek macierzystych przeprowadzone przez Jikei University Tokyo w Japonii, opublikowane w 2005 r.^{ix}:

- Porównano stopień wykrycia NRBC we krwi obwodowej 44 pacjentów z różnymi, złośliwymi zmianami hematologicznymi, rozpoczynając od jednego miesiąca przed przeszczepem komórek macierzystych do momentu przyjęcia przeszczepu.
- Ilość NRBC bezpośrednio po transplantacji bezwzględnie wzrosła zarówno u osób, które przeżyły i które zmarły. Wykrywalność NRBC po zanieżdzezeniu komórek macierzystych spadała do 17%. w grupie osób, które przeżyły. W grupie chorych, którzy zmarli wykrywalność NRBC wzrosła nawet do 100% po zanieżdzezeniu komórek macierzystych.
- Monitorowanie liczby NRBC po przeszczepie komórek macierzystych może dostarczyć wartościowych informacji dotyczących ciężkości choroby i jej progresji.

2. Badanie pacjentów cierpiących na talasemię, przeprowadzone w dwóch szpitalach we Włoszech, opublikowane w 2009 r.^x:

- W badaniu oceniono stężenie NRBC we krwi obwodowej 152 pacjentów i porównano je z 26 wynikami pacjentów z dziedziczną



Ryc. 3. Wygląd ekranu głównego w przypadku prawidłowych wyników

sferocytozą.

- Liczba NRBC odzwierciedla nieefektywność erytropoezy: najwyższe ilości były obecne w zespołach talasemii z prawie całkowicie nieefektywną erytropoezą.
- U pacjentów z dziedziczną sferocytozą (efektywna erytropoeza) nie było erytroblastów.
- Liczba NRBC może być pomocna w określeniu i dokładnej ocenie nieefektywności erytropoezy i potencjalnie może pomóc w doborze odpowiedniej terapii w pacjentów z ciężką talasemią.

3. Różne badania pacjentów z oddziałów intensywnej terapii, przeprowadzone przez Ruhr University Bochum w Niemczech, opublikowane w latach 2002 i 2011^{xi, xii, xiii, xiv}.

- W jednym z pierwszych badań A. Stachon et al.^{xii} oceniono wartości NRBC u 4173 pacjentów z kliniki w Bochum (z oddziałów chirurgii ogólnej i urazowej, oddziałów neurologii i chorób wewnętrznych oraz u pacjentów po operacji serca). Czas badania wynosił 12 tygodni. Zauważalne było, że NRBC były obecne najczęściej u pacjentów z oddziałów chirurgii ogólnej i urazowej (20%) i wzrastały wraz z wiekiem. Poza tym, śmiertelność pacjentów, u których wykryto NRBC była większa (21,1%) niż pacjentów, u których nie wykryto NRBC (2,1%). Współczynnik śmiertelności zwiększał się wraz z liczbą NRBC i okresem ich obecności.
- W kolejnych badaniach^{xiii-xv} badacze pogłębili swe badania i potwierdzili rezultaty. Widoczne stało się, że śmiertelność jest wyższa u pacjentów, u których występują NRBC we krwi obwodowej (około 10-krotnie, zależnie od badanej populacji). Największa była śmiertelność pacjentów z oddziałów intensywnej terapii chirurgicznej.
- Monitorowanie liczby NRBC po transplantacji komórek macierzystych może dostarczyć pomocnych informacji na temat ciężkości i progresji choroby.
- Skrining NRBC może być pomocny w szybkiej identyfikacji pacjentów z dużym ryzykiem, ponieważ obecność NRBC we krwi obwodowej jest objawem obecnym w okresie względnie bliskim przed śmiercią. Dodatkowo pacjenci z NRBC powinni otrzymywać dłuższe leczenie, ponieważ śmiertelność pacjentów z NRBC, przeniesionych na zwykły oddział była wyższa niż u pacjentów, u których w dniu przeniesienia nie wykryto NRBC.

Źródła

- ⁱ Lippman HS. (1924): *Morphologic and quantitative study of blood corpuscles in the newborn period.* *Am J Dis Child* 27: 473–515.
- ⁱⁱ Naye RL, Localio AR. (1995): *Determining the time before birth when ischemia and hypoxemia initiated cerebral palsy.* *Obstet Gynecol* 86: 713–19.
- ⁱⁱⁱ Green DW. (1990): *Mimouni G. Nucleated erythrocytes in healthy infants and in infants of diabetic mothers.* *J Pediatr* 166: 129–31.
- ^{iv} Green DW, Hendon B, Mimouni FB. (1995): *Nucleated erythrocytes and intraventricular hemorrhage in preterm neonates.* *Pediatrics* 96: 475–8.
- ^v Buonocore G, Perrone S, Gioia D, Gatti MG, Massafra C, Agosta R, Bracci R. (1999): *Nucleated red blood cell count at birth as an index of perinatal brain damage.* *Am J Obstet Gynecol* 181: 1500–5.
- ^{vi} Hanlon-Lundberg KM, Kirby RS, Gandhi S, Broekhuizen FF. (1997): *Nucleated red blood cells in cord blood of singleton term neonates.* *Am J Obstet Gynecol* 176: 1149–56.
- ^{vii} Constantino BT, Cogionis B. (2000): *Nucleated RBCs – Significance in the peripheral blood film.* *Lab Med* 31 : 223–229.
- ^{viii} Otsubo H, Kaito K, Asai O, Usui N, Kobayashi M, Hoshi Y. (2005): *Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation.* *Clin Lab Haem* 27: 242–
- ^{ix} Danise P, Amendola G, Di Concilio R, Cillari E, Gioia M, Di Palma A, Avino D, Rigano P, Maggio A. (2009): *Nucleated red blood cells and soluble transferrin receptor in thalassemia syndromes: relationship with global and ineffective erythropoiesis.* *Clin Chem Lab Med* 47: 1539–42.
- ^x Stachon A, Sondermann N, Imohl M, Krieg M. (2002): *Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality.* *J Lab Clin Med* 140: 407–12.
- ^{xi} 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.
- ^{xii} Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M. (2007): *Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study.* *Critical Care* 11: R62.
- ^{xiii} Kuert S, Holland-Letz T, Friese J, Stachon A. (2011): *Association of nucleated red blood cells in the blood and arterial oxygen partial tension.* *Clin Chem Lab Med* 49: 257–263.
- ^{xiv} Hermansen MC. (2001): *Nucleated red blood cells in the fetus and newborn.* *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 84: F211–F215.