

Kliniczne znaczenie NRBC



Parametr NRBC

„NRBC” (ang. nucleated red blood cells - czyli jądrzaste krwinki czerwone) opisuje komórki prekursorowe linii krwinek czerwonych; znane również jako erytoblasty 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 występują jedynie w przypadku poważnych schorzeń. Fizjologicznie NRBC mogą pojawiać się we krwi wcześniaków lub noworodków.

Znaczenie liczby NRBC u noworodków

Określenie liczby NRBC w próbkach noworodków pozwala na otrzymanie właściwej, skorygowanej 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 noworodków [1]. 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

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

Źródło (pierwszy autor)	Liczba próbek	NRBC	Czas po urodzeniu	Wiek ciążowy
Naeye [2]	84	919 \pm 1425 560 \pm 771	1 h 6 h	terminowy terminowy
Green [3]	102	400 \pm 1300	12 – 24 h	37–41 tydzień
Green [4]	26	2900 \pm 3600	\leq 24 h	23–26 tydzień
	37	1200 \pm 1800		27–29 tydzień
	86	1000 \pm 900		30–32 tydzień
Buonocore [5]	47	8521 \pm 1620	narodzenie (krew pępowinowa)	24–27 tydzień
	185	4548 \pm 473		28–36 tydzień
	105	1689 \pm 290		37–41 tydzień

wymienione w tabeli 1, która zawiera również zakresy referencyjne. U zdrowych noworodków erytroblasty znikają z krwi obwodowej w ciągu pierwszego tygodnia życia.

Poznanie dokładnej liczby NRBC pozwala wysnuć wnioski na temat stanu zdrowia, nawet u wcześniaków i noworodków. Liczba NRBC powyżej wskazanych zakresów referencyjnych może wskazywać na przewlekłą lub pourodzeniową hipoksję, anemię, cukrzycę u matki lub ostry stres. Znaczne zwiększenie wartości NRBC może także wskazywać na choroby zakaźne, takie jak wrodzony syfilis [6]. Chociaż w 1 – 2% przypadków znaczne zwiększenie stężenia NRBC może być idiopatyczne [7], wymaga to szybkiego ustalenia przyczyny w celu rozpoczęcia możliwie najszybszego i koniecznego leczenia.

Znaczenie liczby NRBC u starszych dzieci i dorosłych

U dorosłych i starszych dzieci obecność NRBC we krwi krążącej zawsze wskazuje na poważną chorobę. NRBC może towarzyszyć prawie wszystkim ciężkim anemiom. Dodatkowo często są obecne w anemii hemolitycznej, talasemii, hematologicznych chorobach układowych, takich jak zespoły mielodysplastyczne lub białaczki oraz ciężkie krwawienia, 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 z ryzykiem śmiertelności. Ponieważ zwiększa się ono — poza innymi czynnikami — wraz z liczbą NRBC, pomocna jest znajomość ich dokładnej liczby w celu lepszego oszacowania ryzyka. Ponadto liczba 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. Liczba oglądanych pod mikroskopem komórek zazwyczaj wynosi 100 – 200 WBC (rzadko 400 WBC). Problem w zliczaniu manualny polega jednak na tym, że NRBC bardzo przypominają małe limfocyty; nawet doświadczony personel może nieprawidłowo zaklasyfikować je jako limfocyty. Powoduje to fałszywe zawyżenie liczby WBC, której poprawne oznaczenie może być szczególnie ważne u pacjentów leukopenicznych, np. w czasie chemioterapii. Z tego powodu, a także dużego nakładu pracy, zliczanie

Tabela 2 Mechanizm znakowania w kanale WNR

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

manualne nie jest dla NRBC odpowiednią metodą przesiewową. Jeśli laboratorium korzysta z analizatora hematologicznego, który jest w stanie przynajmniej generować flagę w przypadku obecności NRBC, zliczanie manualne może być bardziej ukierunkowane. Niemniej jednak, zliczanie manualne należy traktować w ujęciu statystycznym należy traktować zachowawczo względu na średni współczynnik zmienności wynoszący 40% (20 – 110%) [8].

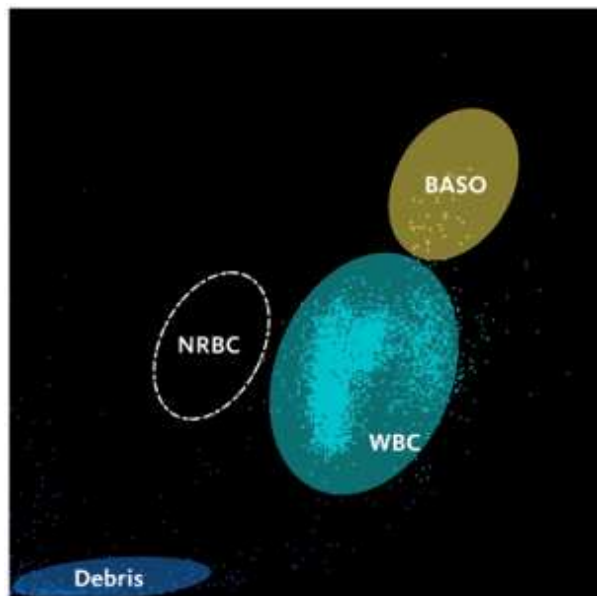
Zliczanie z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

Istnieje wiele różnych możliwości określenia liczby NRBC za pomocą cytometrii przepływowej wykorzystującej przeciwciała. Wszystkie one mają pewną cechę wspólną – przeciwciała są czułe wobec antygenów różnicowania komórkowego (CD, ang. cluster of differentiation). Zazwyczaj wykorzystywane jest przeciwciało przeciw CD71, które jest obecne tylko na powierzchni dojrzałych 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, posiada także wiele wad: 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 hematologicznych jest możliwe od wielu lat, ale tylko dzięki analizatorom serii XN możliwe stało się dokładne i rutynowe oznaczenie NRBC bez zwiększenia czasu pomiaru. W związku z tym, że teraz NRBC jest włączone do podstawowej morfologii XN-CBC przynosi to kilka korzyści. Czas oczekiwania, który był potrzebny w badaniu potwierdzającym i zliczaniu manualnym, nie jest już konieczny, a dodatkowo wyeliminowane są potencjalne błędy pojawiające się w trakcie wykonywania tych badań. Wynik WBC w próbkach gdzie obecne są także erytroblasty jest automatycznie korygowany. Dzięki temu monitorowanie pacjenta może być ułatwione, co jest szczególnie korzystne np. na oddziałach chirurgicznych, gdzie często wymagana jest jedynie podstawowa morfologia.

Specjalny odczynnik o niskim pH stabilizuje komórki zasadochłonne, które są zliczane w tym samym kanale. Podczas gdy inne krwinki białe obkurczają się, odczynnik lizuje błonę krwinek czerwonych i specyficznie znakuje jądra obecnych erytroblastów, co obrazuje tabela 1. W ten sposób niwelowane są interferencje ze strony lipidów lub erytrocytów opornych na lizę. Ze względu na różnice w świetle fluorescencyjnym i świetle rozproszonym, komórki mogą być rozdzielone, w sposób przedstawiony na ryc. 1.



Ryc. 1 Skatergram WNR

Z pomocą analizatora XN, erytroblasty mogą być dokładnie zliczane zarówno w niskich jak i wysokich zakresach, a wynik może być przedstawiony w wartościach bezwzględnych (NRBC# - liczba erytroblastów w mikrolitrze) i względnych (NRBC%, /100 WBC) (ryc. 2). Określenie i wyświetlenie wartości bezwzględnej chroni przed sytuacją kiedy np. względnie niski odsetek NRBC może pojawić się w przypadku wysokiej liczby NRBC i jednocześnie znacznej leukocytozy.

Kliniczne znaczenie oceny 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 przeszczepie komórek macierzystych przeprowadzone przez Jikei University Tokyo w Japonii, opublikowane w 2005 r. [9]:
 - 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 zagnieżdżeniu komórek macierzystych spadła do 17% w grupie osób, które przeżyły. W grupie chorych, którzy zmarli wykrywalność NRBC wzrosła nawet do 100% po zagnieżdżeniu 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. [10]:
- W badaniu oceniono stężenie NRBC we krwi obwodowej 152 pacjentów i porównano je z 26 wynikami pacjentów z dziedziczną 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 [11, 12, 13, 14]:
- W jednym z pierwszych badań A. Stachon i wsp. ocenili 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%), a ich ilość wzrastała 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 wzrostem liczby NRBC i okresem ich obecności.
 - W kolejnych badaniach [13-14] 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.
 - Badanie przesiewowe NRBC może być pomocne w szybkiej identyfikacji pacjentów z dużym ryzykiem, ponieważ obecność NRBC we krwi obwodowej jest objawem występującym w okresie względnie bliskim przed śmiercią. Dodatkowo pacjenci z NRBC powinni otrzymywać dłuższą opiekę na oddziale intensywnej opieki medycznej, ponieważ śmiertelność pacjentów z NRBC, przeniesionych na zwykły oddział była wyższa niż u pacjentów, u których w dniu przeniesienia nie wykryto NRBC.

Źródła

- [1] Lippman HS. (1924): Morphologic and quantitative study of blood corpuscles in the newborn period. *Am J Dis Child* 27: 473–515.
- [2] Naye RL, Localio AR. (1995): Determining the time before birth when ischemia and hypoxemia initiated cerebral palsy. *Obstet Gynecol* 86: 713–19.
- [3] Green DW. (1990): Mimoumi G. Nucleated erythrocytes in healthy infants and in infants of diabetic mothers. *J Pediatr* 166: 129–31.
- [4] Green DW, Hendon B, Mimouni FB. (1995): Nucleated erythrocytes and intraventricular hemorrhage in preterm neonates. *Pediatrics* 96: 475–8.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Constantino BT, Cogionis B. (2000): Nucleated RBCs – Significance in the peripheral blood film. *Lab Med* 31 : 223–229.
- [8] 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–
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Hermansen MC. (2001): Nucleated red blood cells in the fetus and newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 84: F211–F215.