



Die im Vortrag gezeigten Laborbefunde dienen der
Verdeutlichung der fachlichen Inhalte.

Wir weisen ausdrücklich darauf hin, dass entsprechende
Laboranalysen auch von anderen Labors durchgeführt
werden und dass die Indikationsstellung für Labordiagnostik
ausschließlich durch den Behandler
oder das Krankenhaus erfolgt.

Neutrophile Granulozyten - Bedeutung für die Immunabwehr

Dr. Cornelia Doebis

Institut für Medizinische Diagnostik Berlin

Zelluläre Elemente des Immunsystems

Unspezifisches Immunsystem

(angeboren, nicht lernfähig)

Monozyten

→ **Gewebemakrophagen**

Granulozyten

- **Neutrophile** > 95%
- **Eosinophile** 1-3%
- **Basophile** < 1%



Spezifisches Immunsystem

(erworben, lernfähig)

- **T-Lymphozyten**

- **B-Lymphozyten**

⇒ **Antikörper**

Mastzellen

Natürliche Killerzellen

Zelluläre Elemente des Immunsystems

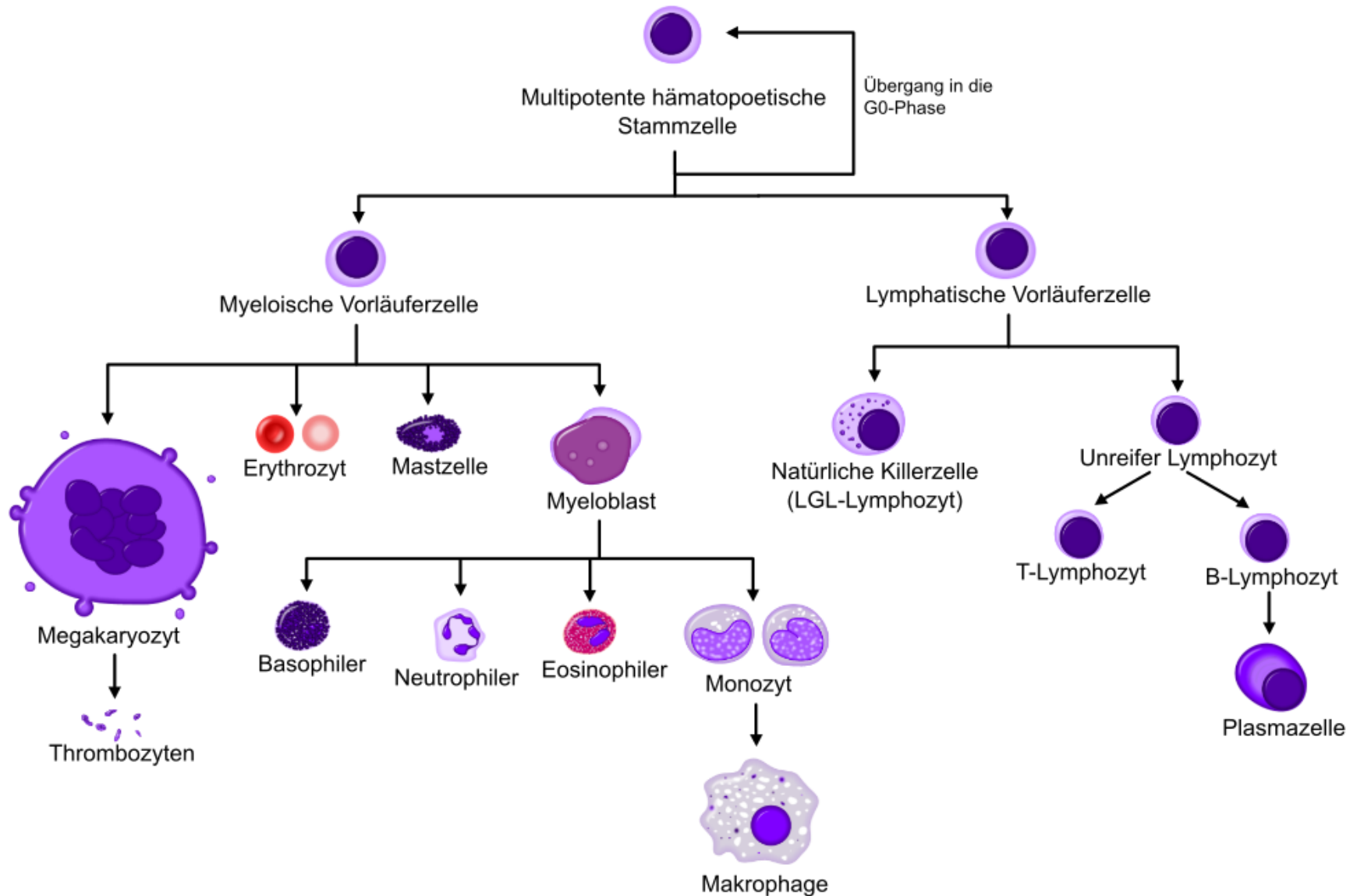
Unspezifisches Immunsystem

- keine Antigen-spezifität, d.h. „jeder kämpft gegen jedes Antigen“
- keine Gedächtnisreaktion
- Effektorzytokine (u.a.):
TNF- α und IL-1

Spezifisches Immunsystem

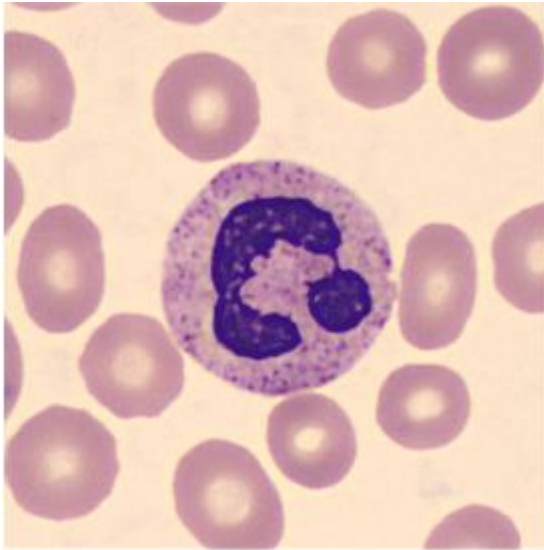
- Antigen-spezifität, d.h. jedes Antigen wird von speziellen Lymphozyten attackiert
- Immunaktivierung nur dann, wenn Gedächtniszellen da sind
- Effektorzytokine (u.a.):
IL-2, IFN- γ , IL-4

Entwicklung der Granulozyten erfolgt im Knochenmark aus myeloischen Progenitorzellen

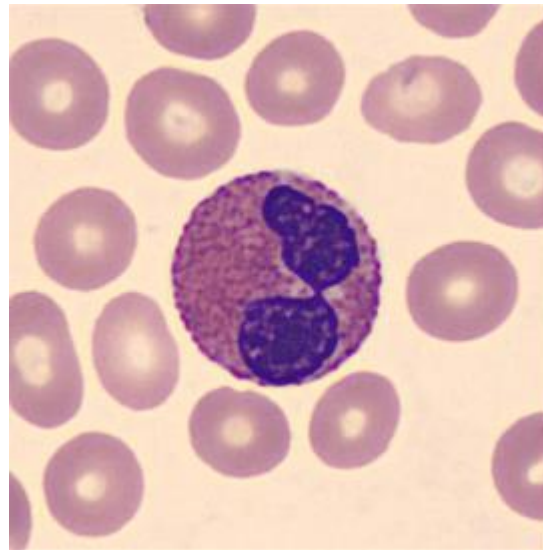


Granulozyt

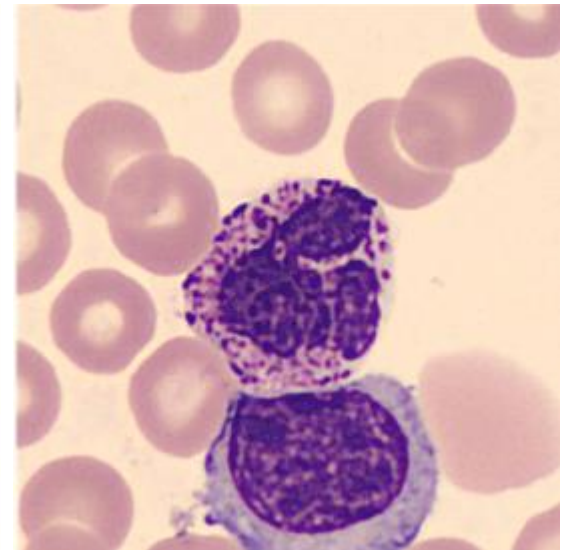
→ von lat. granulum „Körnchen“ und altgriechisch cýtos „Hülle“



Neutrophiler Granulozyt



Eosinophiler Granulozyt



Basophiler Granulozyt

Es gibt neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, die je nach Färbeverhalten des Protoplasmas unterteilt werden.

Neutrophile Granulozyten

- Neuproduktion von 1×10^{11} Granulozyten pro Tag im Knochenmark
- Zirkulation im Blutkreislauf über 6 bis 8 Stunden
- anschließend Apoptose und Elimination durch Makrophagen in
Leber oder Milz
- Eiter = abgestorbene Granulozyten

Wozu braucht unser Immunsystem Neutrophile Granulozyten?

⇒ „Fressen, töten und weitere Zellen anlocken“

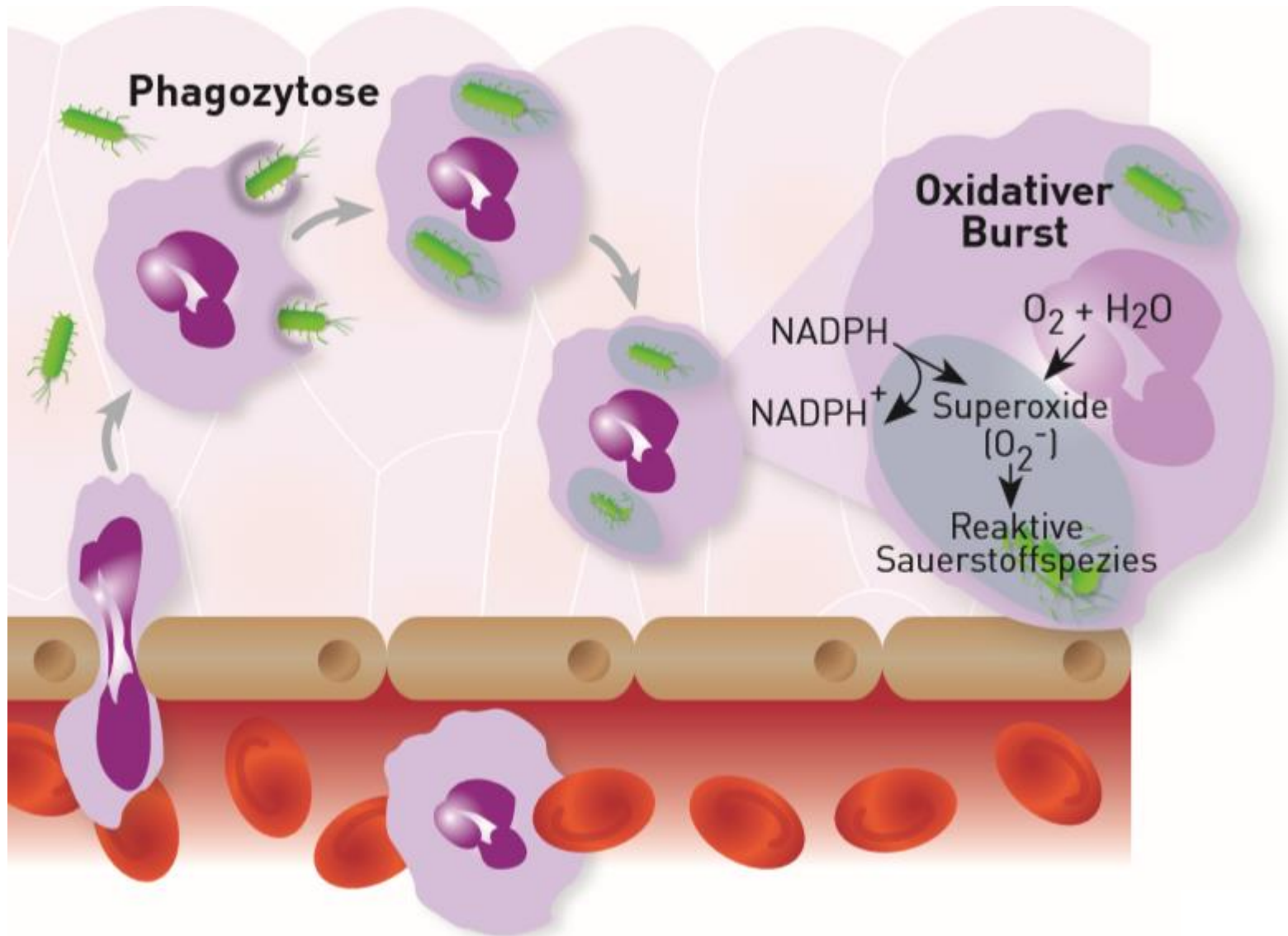
Beseitigung von Partikeln ($> 1 \mu\text{m}$) durch Phagozytose:

1. Apoptotische Zellen

→ Abräumfunktion, ehe eine entzündliche Reaktion eintritt!

2. Eliminierung von Pathogenen und somit Verhinderung der
Ausbreitung im Wirt

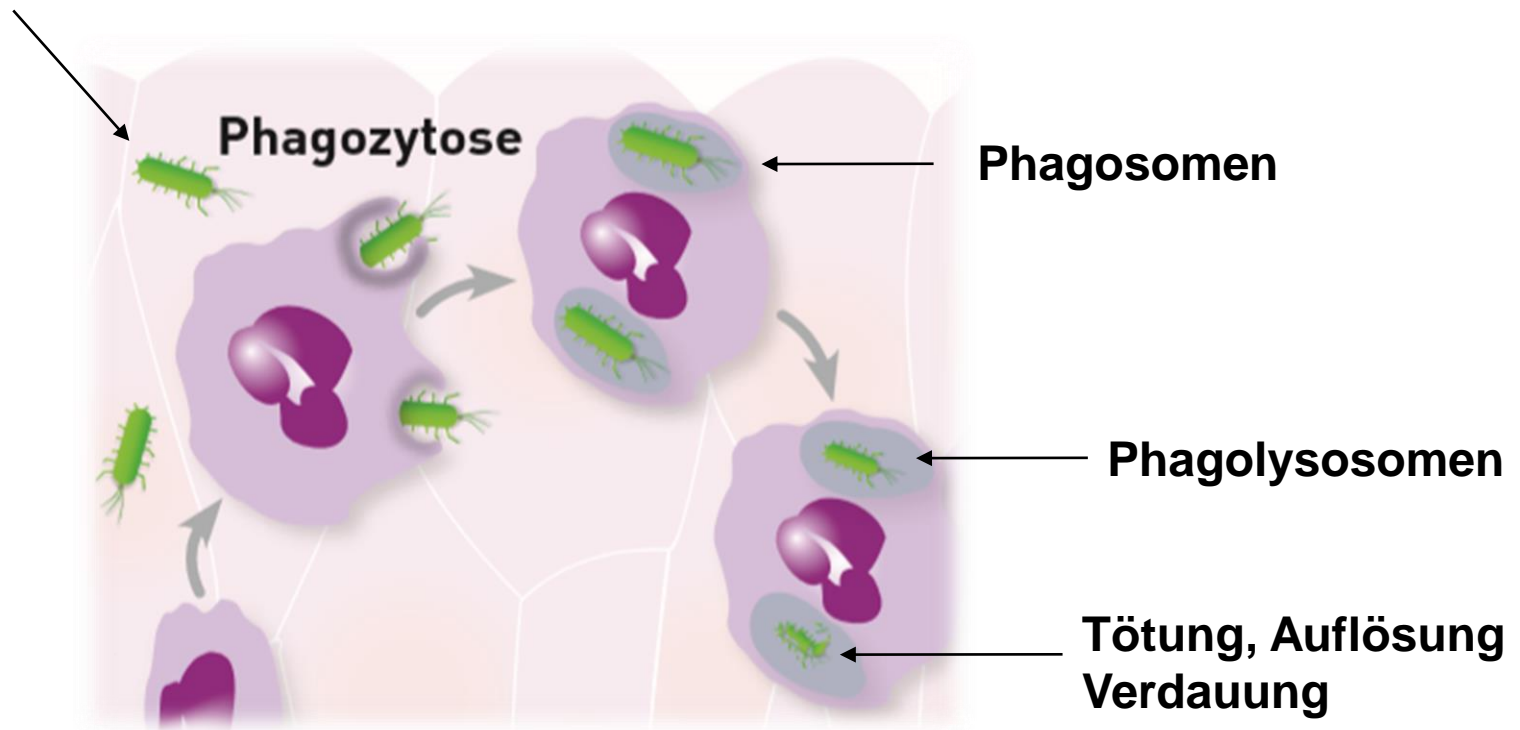
„Fressen, töten ...“



Phagozytose

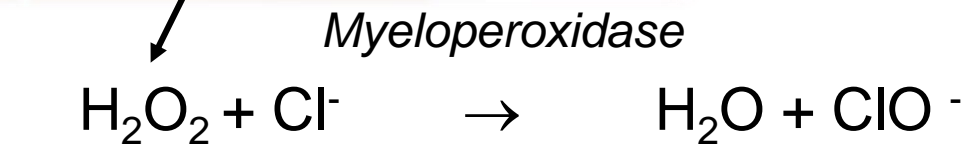
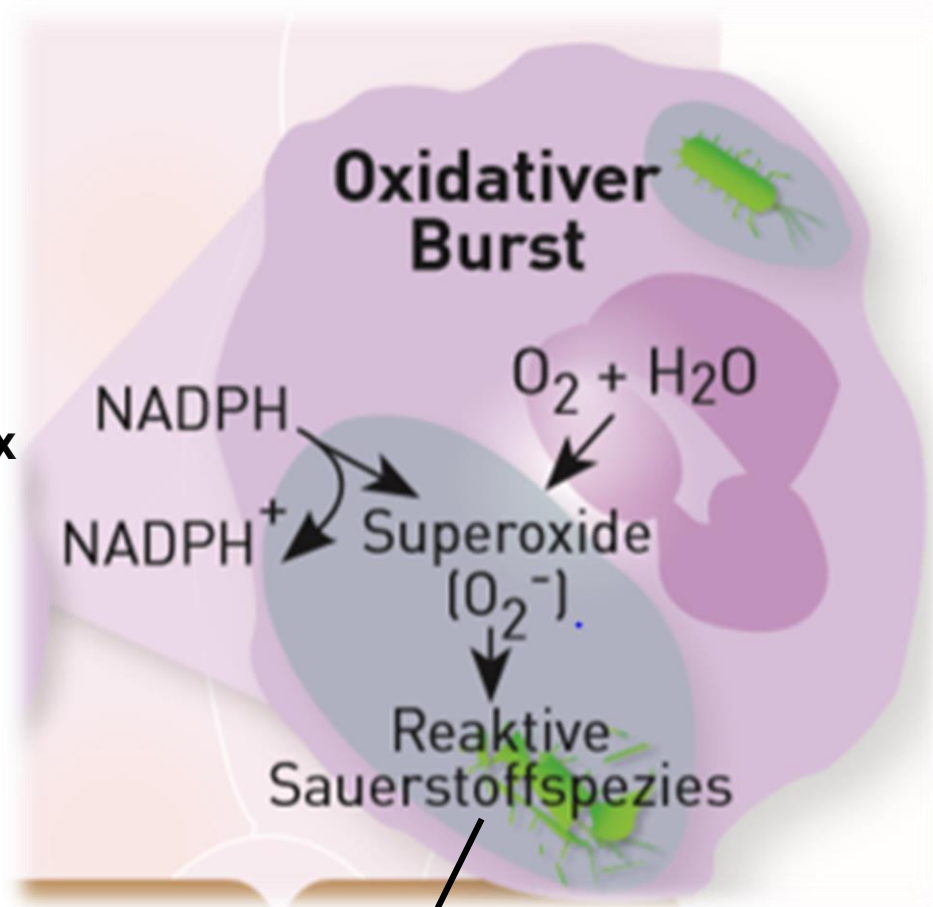
Opsonisierung durch:

- IgM und IgG
- Komplementfaktoren
- Mannose-bindendes Lektin (MBL)



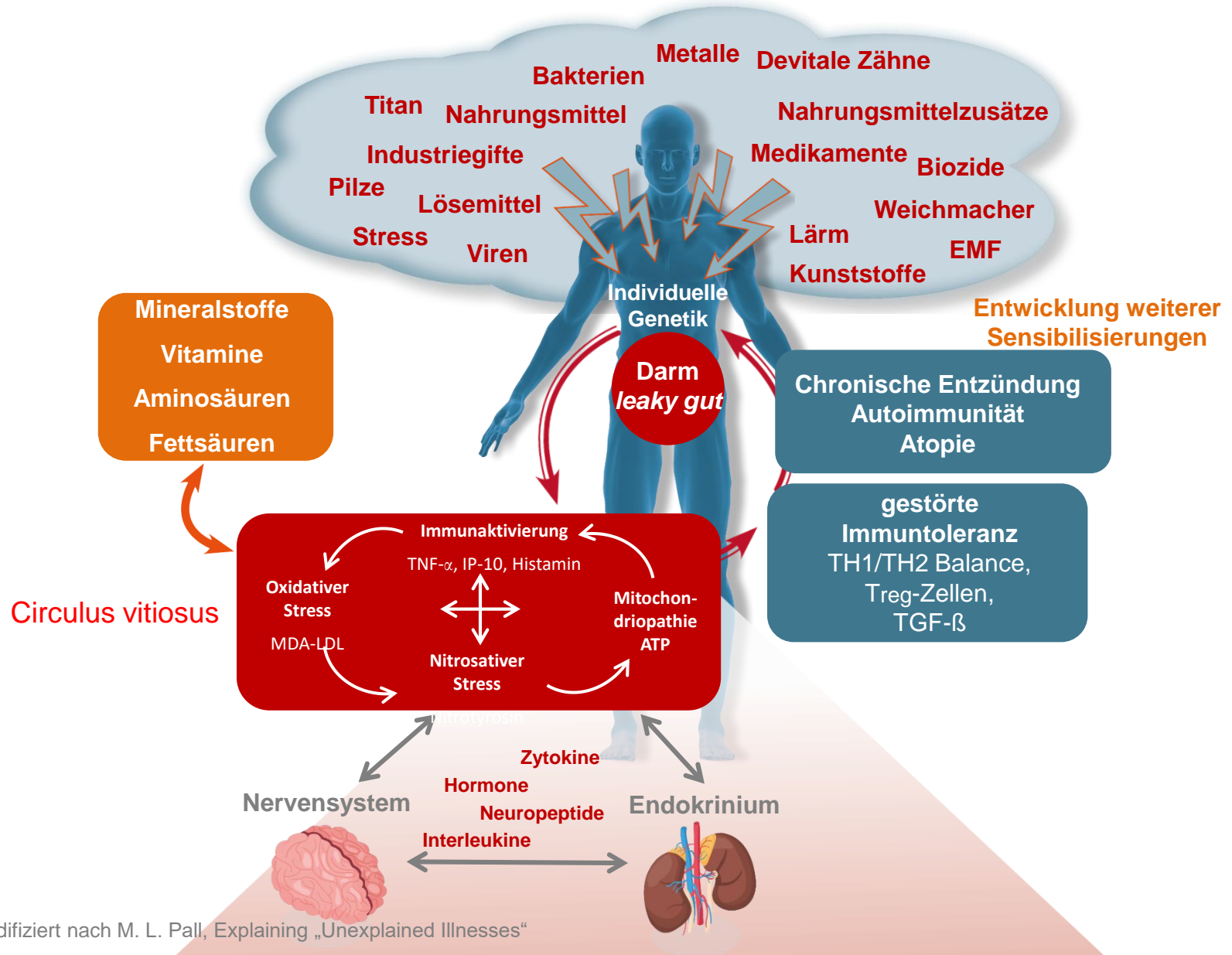
Oxidativer Burst im Inneren der Phagolysosomen

NADPH-
Oxidase-Komplex



Der Sauerstoffverbrauch eines Granulozyten steigt um Faktor 50-100 nach der Phagozytose.

Reaktive Sauerstoffspezies sind „Brennstoff“ des Circulus vitiosus bei Multisystemerkrankungen



Intrazelluläre Abtötung von Pathogenen

Zwei Arten von „Waffen“ sind in zytoplasmatischen Granula gespeichert:

1. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) = Oxidativer Burst

2. Bakterizide Proteine

➤ **Azurophile (primäre, unspezifische) Granula**

- entsprechen den Lysosomen
- enthalten saure Hydrolasen, antimikrobielle Enzyme, Defensine, Myeloperoxidase, Cathelicidine

Fehlende Aktivität in den Granula wird durch pH-Wert geregelt (Norm: < 5)

➤ **Spezifische (sekundäre) Granula**

- enthalten Laktoferrin, Lysozym, Kollagenase, Elastase, Plasminogenaktivatoren, Neuramidase, Cathepsin G, Proteine des NADPH-Oxidase-Komplexes
- lassen sich nicht mit basischen oder sauren (eosinophilen) Farbstoffen färben, daher „neutrophil“

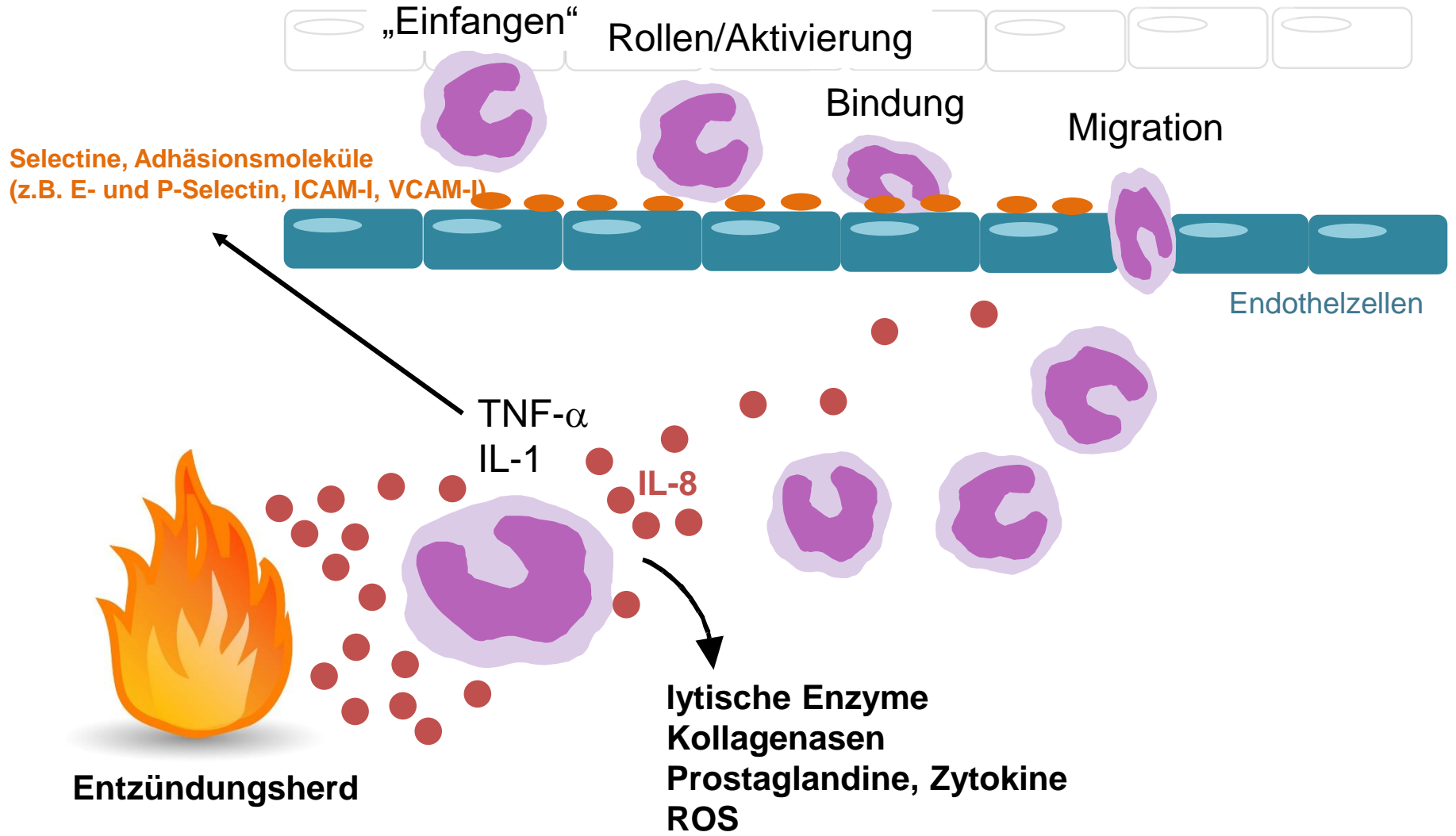
Wie wird „fremd“ von den Granulozyten erkannt?

- **Pattern Recognition Receptors (PRR; „Mustererkennungsrezeptoren“)** erkennen **Pathogen-assoziierte molekulare Pattern/Muster (PAMP)**
 - Scavenger-Rezeptoren → erkennen apoptotische Zellen durch veränderte Glykosylierung auf der Zelloberfläche („*eat me*“-Signale)
 - C-Typ-Lektin-Rezeptoren (Glykorezeptoren; z.B. Mannose-Rezeptor) → erkennt Zuckerstrukturen auf der Oberfläche der Erreger (v.a. wenn durch MBL opsoniert → Bedeutung des MBL-Mangels)
 - Toll-like-Rezeptoren (TLR) → erkennen unterschiedlichste Bestandteile von Pathogenen (NF κ B-Aktivierung)
- Rezeptoren (CR1, CR3, CR4, C1qR) für Komplementspaltprodukte wie C1q, C3, C3bi, C3dg und C4b
- Fc-Rezeptoren für IgG- und IgM-Antikörper

Funktion der Granulozyten


⇒ „Fressen, töten **und weitere Zellen anlocken**“

Chemotaxis = Anlockung weiterer Entzündungszellen an den Ort der tatsächlichen „Bedrohung“



⇒ **Gewebezerstörung am Entzündungsherd**

Neutrophile Granulozyten stellen die zahlenmäßig größte Zellfraktion im Blut




Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Großes Blutbild i. EDTA-Blut			
Leukozyten	6.8	1000/ μ l	4.4 - 11.3
Differentialblutbild (automat.)			
Neutrophile Granulozyten	66.7	%	40.0 - 75.0
Lymphozyten	21.8	%	20.0 - 45.0
Monozyten	9.5	%	2.0 - 13.0
Eosinophile Granulozyten	1.1	%	0 - 4.0
Basophile Granulozyten	0.2	%	0 - 1.0
Differentialblutbild (absolut)			
Neutrophile Granulozyten	 4.54	1000/ μ l	1.80 - 7.70
Lymphozyten	1.48	1000/ μ l	1.00 - 4.80
Monozyten	0.64	1000/ μ l	0.00 - 0.80
Eosinophile Granulozyten	0.07	1000/ μ l	0.00 - 0.45
Basophile Granulozyten	0.01	1000/ μ l	0.00 - 0.11

Für die Beurteilung der Immunkompetenz sind die Absolutzahlen (Zellen / μ l) entscheidend.

Eine (reaktive) Granulozytose ist ein Entzündungszeichen.

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Großes Blutbild i. EDTA-Blut			
Leukozyten	17.8	1000/ μ l	4.4 - 11.3
Differentialblutbild (automat.)			
Neutrophile Granulozyten	88.0	%	40.0 - 75.0
Lymphozyten	8.5	%	20.0 - 45.0
Monozyten	2.6	%	2.0 - 13.0
Eosinophile Granulozyten	0.9	%	0 - 4.0
Basophile Granulozyten	0.0	%	0 - 1.0
Differentialblutbild (absolut)			
Neutrophile Granulozyten	15.7	1000/ μ l	1.80 - 7.70
Lymphozyten	1.51	1000/ μ l	1.00 - 4.80
Monozyten	0.46	1000/ μ l	0.00 - 0.80
Eosinophile Granulozyten	0.16	1000/ μ l	0.00 - 0.45
Basophile Granulozyten	0.00	1000/ μ l	0.00 - 0.11

Wichtig: Befund nicht als Lymphozytopenie missdeuten!

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Großes Blutbild i. EDTA-Blut			
Leukozyten	17.8	1000/ μ l	4.4 - 11.3
Differentialblutbild (automat.)			
Neutrophile Granulozyten	88.0	%	40.0 - 75.0
Lymphozyten	8.5	%	20.0 - 45.0
Monozyten	2.6	%	2.0 - 13.0
Eosinophile Granulozyten	0.9	%	0 - 4.0
Basophile Granulozyten	0.0	%	0 - 1.0
Differentialblutbild (absolut)			
Neutrophile Granulozyten	15.7	1000/ μ l	1.80 - 7.70
Lymphozyten	1.51	1000/ μ l	1.00 - 4.80
Monozyten	0.46	1000/ μ l	0.00 - 0.80
Eosinophile Granulozyten	0.16	1000/ μ l	0.00 - 0.45
Basophile Granulozyten	0.00	1000/ μ l	0.00 - 0.11
Differentialblutbild (mikroskopisch)			
Stabkernige 	14	%	< 3
Segmentkernige	73	%	40 - 70
Lymphozyten	9	%	20 - 45
Monozyten	3	%	0 - 10
Eosinophile Granulozyten	1	%	< 4
Basophile Granulozyten	0	%	< 1
TNF-alpha i.S. 	22.7	pg/ml	< 8.1
Hinweis auf systemische Entzündung			
CRP hoch sensitiv i.S. (CLIA) 	15.3	mg/l	< 3.0

Bei einer „Linksverschiebung“ tauchen unreife Granulozytenvorstufen im peripheren Blut auf

„unreif“



„reif“



⇒ Proentzündliche Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 wirken als „releasing factors“ im Knochenmark.

Neutropenie (Granulozytopenie) - Agranulozytose

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Großes Blutbild i. EDTA-Blut			
Leukozyten	7.8	1000/ μ l	4.4 - 11.3
Differentialblutbild (automat.)			
Neutrophile Granulozyten	1.1	%	40.0 - 75.0
Lymphozyten	89.6	%	20.0 - 45.0
Monozyten	5.3	%	2.0 - 13.0
Eosinophile Granulozyten	3.4	%	0 - 4.0
Basophile Granulozyten	0.6	%	0 - 1.0
Differentialblutbild (absolut)			
Neutrophile Granulozyten	0.09	1000/ μ l	1.80 - 7.70
Lymphozyten	6.99	1000/ μ l	1.00 - 4.80
Monozyten	0.41	1000/ μ l	0.00 - 0.80
Eosinophile Granulozyten	0.26	1000/ μ l	0.00 - 0.45
Basophile Granulozyten	0.05	1000/ μ l	0.00 - 0.11

Ursache?

Granulozytopenie: < 1500 Zellen / μ l Blut
Agranulozytose: < 500 Zellen / μ l Blut

Neutropenie (Granulozytopenie) - Agranulozytose

Verminderte Bildung der Granulozyten

- Unverträglichkeitsreaktion auf Arzneimittel (Analgetika (*Metamizol*), Antipyretika, Neuroleptika (*Clozapin*), Thyreostatika, Sulfonamide, seltener: Chemotherapeutika) sowie Chemikalien und Schadstoffe
- Virusinfektionen (Parvoviren, CMV, Adenoviren u.a.)
- Neoplasien (z.B. bei Leukämien, Myelofibrose, T-Zell-Lymphome)

CD8+ T-Zell-Lymphom als Ursache einer Agranulozytose

Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen aus EDTA-Blut

		Normwerte		Normwerte
Leukozyten	10950 / μ l	4000 - 10000		
Lymphozyten	10074 / μ l	1100 - 4000	92 %	20 - 40
Monozyten	657 / μ l	140 - 800	6 %	2 - 14
Granulozyten	→ 219 / μ l	2400 - 7400	2 %	42 - 75
T-Zellen	9811 / μ l	900 - 2200	97 %	62 - 78
CD4-Helfer	1240 / μ l	590 - 1460	12 %	32 - 54
CD8-Lymph.	→ 8541 / μ l	320 - 930	85 %	23 - 40
CD8+/CD28+ (zytotox.)	243 / μ l	130 - 450	3 %	57 - 94
CD8+/CD28- (regulativ)	8295 / μ l	20 - 300	97 %	6 - 43
CD4/CD8-Ratio	0,15	1 - 3		
CD4+/CD8+T-Zellen	11 / μ l	<100	0,1 %	< 5
B-Zellen	136 / μ l	80 - 600	1 %	7 - 19
NK-Zellen	89 / μ l	200 - 780	1 %	10 - 32
Aktivierte T-Zellen				
CD3/HLADR	3195 / μ l	<230	32 %	< 11

Deutliche Granulozytopenie und Expansion der CD8-Lymphozyten.
Dringender Verdacht auf lymphoproliferative Erkrankung.

Neutropenie (Granulozytopenie) - Agranulozytose

Verminderte Bildung der Granulozyten

- Unverträglichkeitsreaktion auf Arzneimittel (Analgetika (*Metamizol*), Antipyretika, Neuroleptika (*Clozapin*), Thyreostatika, Sulfonamide, seltener: Chemotherapeutika) sowie Chemikalien und Schadstoffe
- Virusinfektionen (Parvoviren, CMV, Adenoviren u.a.)
- Neoplasien (z.B. bei Leukämien, Myelofibrose, T-Zell-Lymphome)

Erhöhter Verbrauch der Granulozyten

- Auswanderung ins Gewebe bei akuten (bakteriellen) Entzündungen, wenn der Bedarf die Neubildung im Knochenmark übersteigt (ggf. mit Linksverschiebung → vermehrt unreife Vorläuferzellen freigesetzt)

Verstärkter „Abbau“ der Granulozyten

- primäre oder sekundäre autoimmune Granulozytopenie:
 - primär: AAK gg. Fc-gamma III-Rezeptor, CD11b/CD18 u.a.
 - sekundär: z.B. bei Systemischer Lupus erythematodes

Qualitative Immunanalysen

T-Lymphozyten: ⇒ LTT-Immunkfunktion

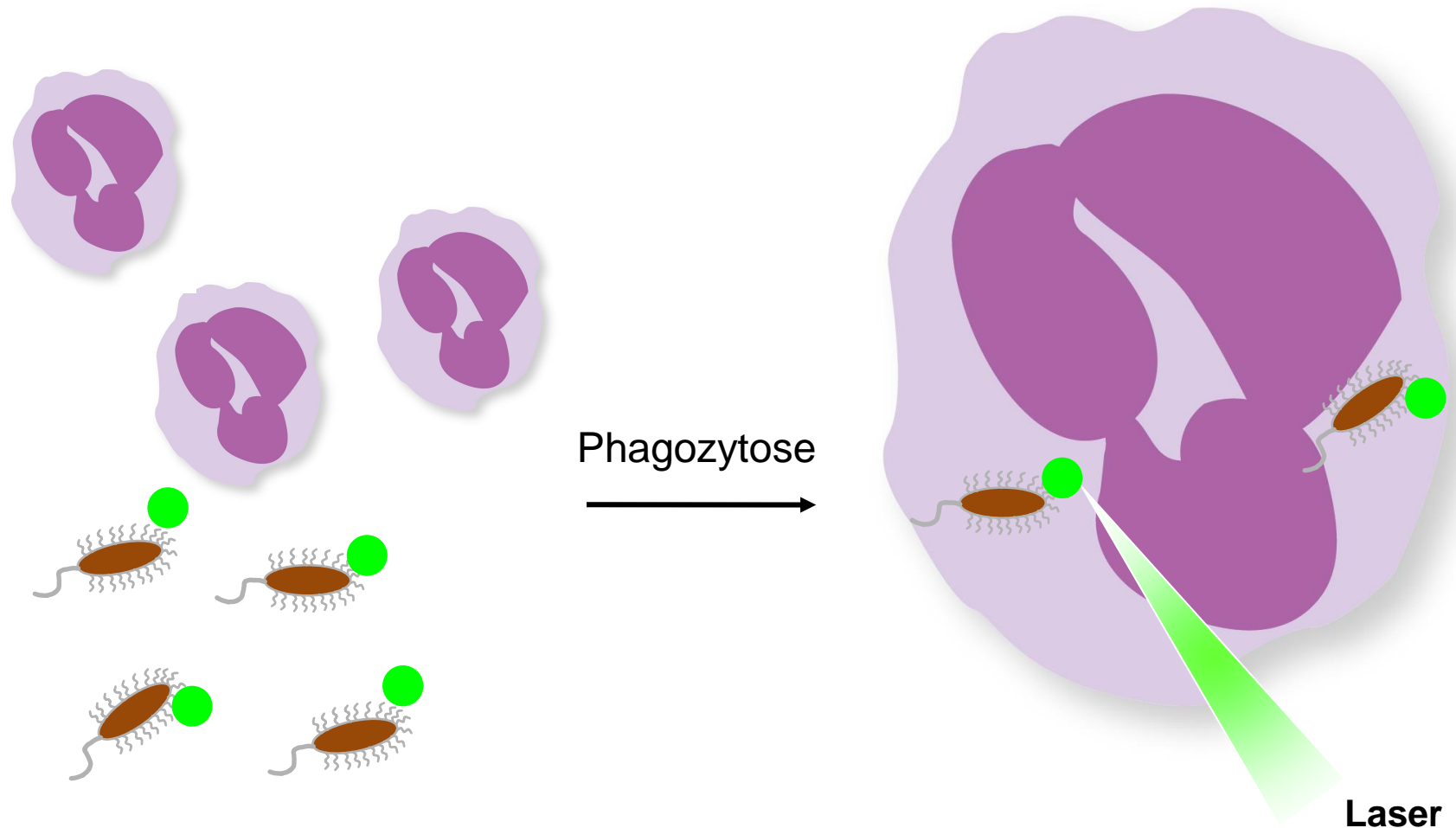
B-Lymphozyten ⇒ IgG, IgA, IgM im Serum ausreichend

NK-Zellen ⇒ NK-Zell-Zytotoxizitätstest

Granulozyten ⇒ Phagozytostest
 ⇒ Respiratory Burst Test
 (Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen)

Quantitative Analysen ersetzen niemals die immunologischen Funktionstests!

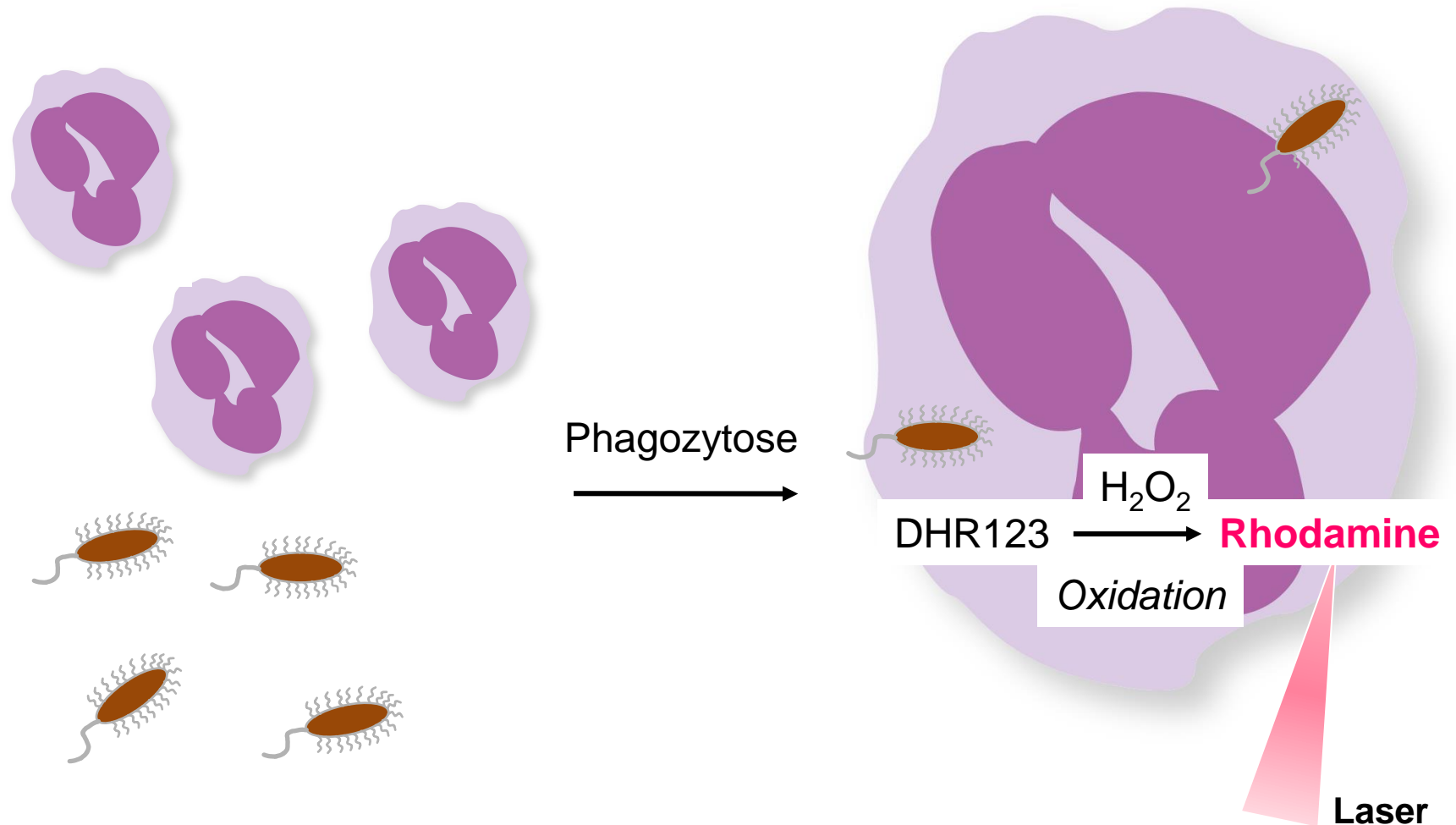
Nachweis der Phagozytose-Leistung



Inkubation von Patientenblut mit
FITC-markierten, opsonierten E.coli

Analyse des Anteils
aufgenommener E.coli

Nachweis der Burst-Leistung



Inkubation von Patientenblut mit
opsonierten **E.coli**

Analyse des Umsatzes von DHR123
zu fluoreszierendem Rhodamine

Eine intakte Phagozytose- und Oxidativer Burst-Funktion schließen einen primären und sekundären Immundefekt der Granulozyten aus.

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<u>Phagozytostest Granulozyten</u>			
E.coli-Phagozytose	98.6	% pos.	> 84
<u>Oxidativer Burst Granulozyten</u>			
Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten nach Stimulation. (Heparin-Blut)			
Burst-positive Zellen	98.7	%	> 90
Burst-Aktivität	11774	mean	> 8900

Interpretation

Der normale Anteil an Granulozyten, die zur Phagozytose und zum Respiratory Burst in der Lage sind, sowie die normale Respiratory Burst-Aktivität schließen einen Immundefekt der Granulozyten aus.

Intakte Phagozytose ABER deutlich reduzierter Oxidativer Burst, sowohl prozentual als auch bei der Aktivität

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<u>Phagozytostest Granulozyten</u>			
E.coli-Phagozytose	90.1	% pos.	> 84
<u>Oxidativer Burst Granulozyten</u>			
Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten nach Stimulation. (Heparin-Blut)			
Burst-positive Zellen	52.9	%	> 90
Burst-Aktivität	4757	mean	> 8900

Interpretation

Verminderte Burst-Aktivität der Granulozyten. Dieses weist auf eine reduzierte Bildung freier Sauerstoffradikale hin. Vorkommen bei granulozytärer Immundefizienz aber auch sekundär bei systemischen Entzündungen, konsumierenden Grunderkrankungen, und auch als Nebenwirkung antioxidativer Therapiemaßnahmen.

- in seltenen Fällen CGD = septische Granulomatose
- häufiger sekundäre Fehlfunktion der Granulozyten

Ursachen für eine sekundäre (latente) Störung des Oxidativen Burst

1. Akute und chronische systemische Entzündungen

- Ausschüttung unreifer Granulozyten aus dem Knochenmark
- Einwirkung von TNF- α und IL-1 auf zirkulierende Granulozyten

2. Antioxidative Therapien bei Hinweis auf oxidativen Stress

- Vitamine C, E, Coenzym Q10
- sekundäre Pflanzenstoffe: Karotinoide, Flavonoide, Polyphenole

Hilfe:

- Absenkung der Aktivität
- Therapiestopp bei prozentualen Werten < 90%

Ein derartiger Befund kann Resultat einer antioxidativen Therapie sein!

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<u>Phagozytostest Granulozyten</u>			
E.coli-Phagozytose	99.4	% pos.	> 84
<u>Oxidativer Burst Granulozyten</u>			
<small>Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten nach Stimulation. (Heparin-Blut)</small>			
Burst-positive Zellen	98.0	%	> 90
Burst-Aktivität	8127	mean	> 8900

Interpretation

Der normale Anteil an Granulozyten, die zur Phagozytose und zum Respiratory Burst in der Lage sind, schließt einen signifikanten Immundefekt der Granulozyten aus. Eine verminderte Respiratory Burst-Aktivität der Granulozyten ist jenseits des Kleinkindalters zumeist sekundär bedingt. Sie belegt eine reduzierte Bildung freier Sauerstoffradikale, was unter antioxidativer oder immunsuppressiver Therapie als Folge chronischer Immunaktivierungen oder z.B. auch bei Diabetes mellitus vorkommen kann.

Neutrophile Granulozyten und COVID-19

Nat Rev Immunol 2020

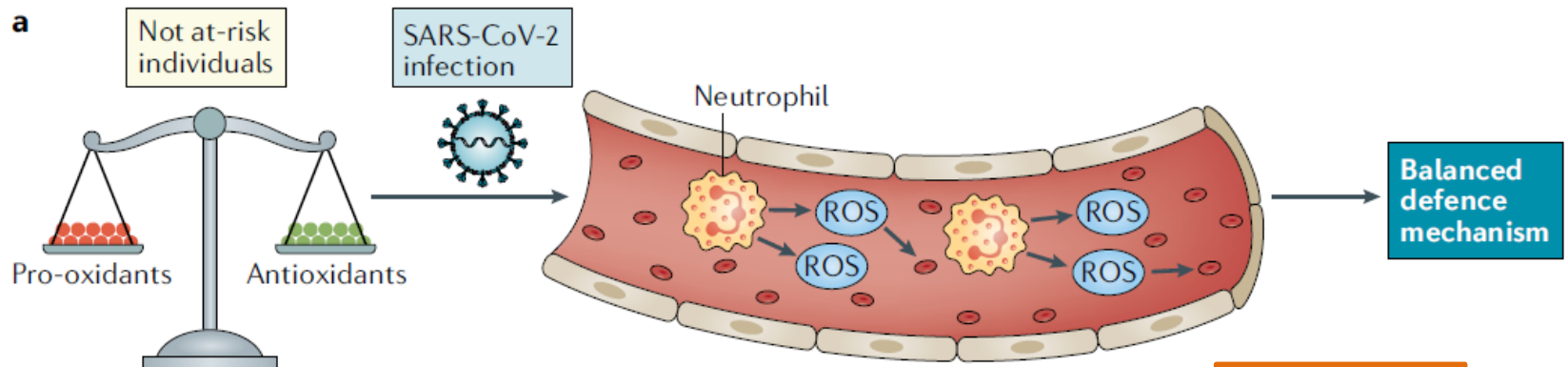
Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19

Mireille Laforge¹, Carole Elbim², Corinne Frère³, Miryana Hémadi⁴, Charbel Massaad¹, Philippe Nuss^{2,5}, Jean-Jacques Benoliel^{1,6} and Chrystel Becker¹ ✉

The high neutrophil to lymphocyte ratio observed in critically ill patients with COVID-19 is associated with excessive levels of reactive oxygen species (ROS), which promote a cascade of biological events that drive pathological host responses. ROS induce tissue damage, thrombosis and red blood cell dysfunction, which contribute to COVID-19 disease severity. We suggest that free radical scavengers could be beneficial for the most vulnerable patients.

- erhöhte Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio bei schweren Verläufen beobachtet
- erhöhte Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) → oxidativer Stress
- resultiert in Gewebedestruktion, Thrombose, Dysfunktion der Erythrozyten
- respiratorische virale Infektionen sind allgemein dafür bekannt, dass sie die antioxidativen Defenzmechanismen inhibieren

Neutrophile Granulozyten und COVID-19



⇒ Antioxidantien und Elastase-Inhibitoren könnten therapeutisches Potential in Hochrisiko-Patienten haben



NETs and COVID-19



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

EBioMedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ebiom

Research paper

Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19

Neutrophil extracellular traps = Neutrophile extrazelluläre Fallen (NETs):

- ⇒ extrazelluläre Netzwerke aus DNA, Histonen, mikrobiziden Proteinen und oxidativen Enzymen, die von Neutrophilen freigesetzt werden
- ⇒ NETs enthalten und bündeln antimikrobielle Substanzen in hoher Konzentration
- ⇒ dadurch binden, immobilisieren und töten sie Pathogene extrazellulär
- ⇒ Zerstörung körpereigener Zellen geringer
- ⇒ NETs = physikalische Barriere
- ⇒ „NETose“ = Prozess der Aktivierung und Freisetzung von NETs

„NETose“

⇒ Sonderform des programmierten Zelltods unter Ausbildung von „Neutrophile extrazelluläre Fallen“ (NETs)

Suizidale NETose – langsam ablaufend

- kann durch Toll-like Rezeptoren, Fc-Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren ausgelöst werden
- auf die intrazelluläre Bildung der NETs folgt ein Riss der Plasmamembran und ihre Freisetzung in den Extrazellulärraum
- die Zelle geht dadurch unter

„NETose“

⇒ Sonderform des programmierten Zelltods unter Ausbildung von „Neutrophile extrazelluläre Fallen“ (NETs)

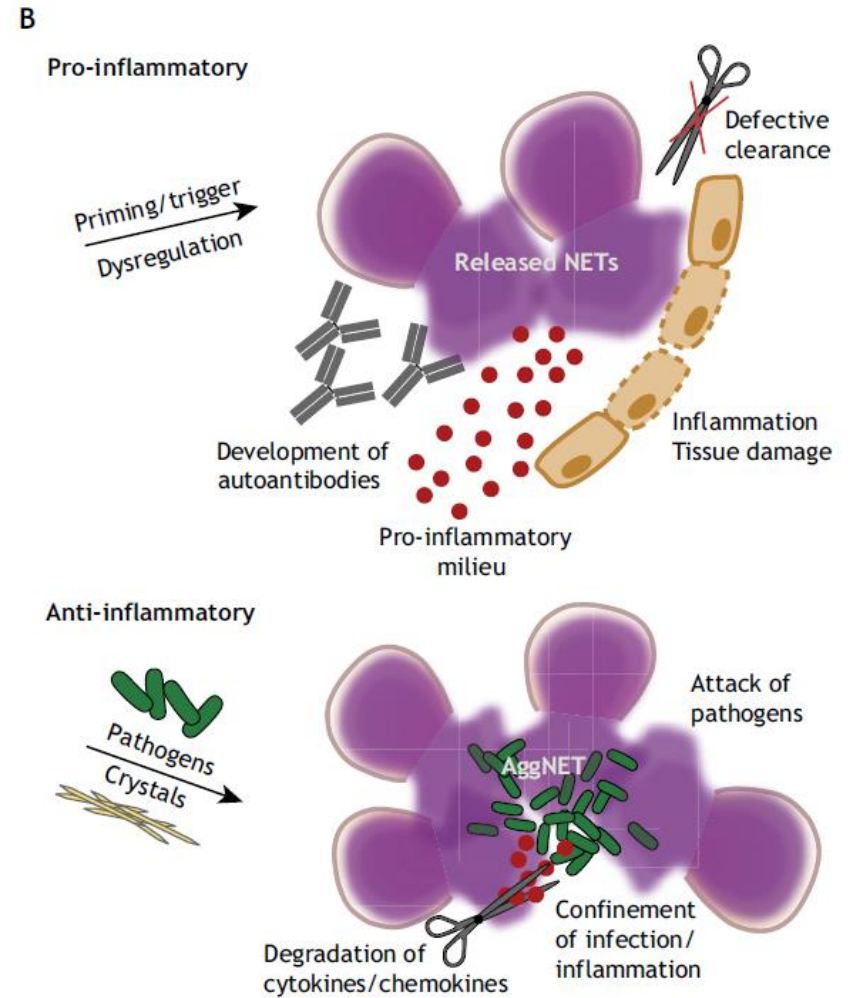
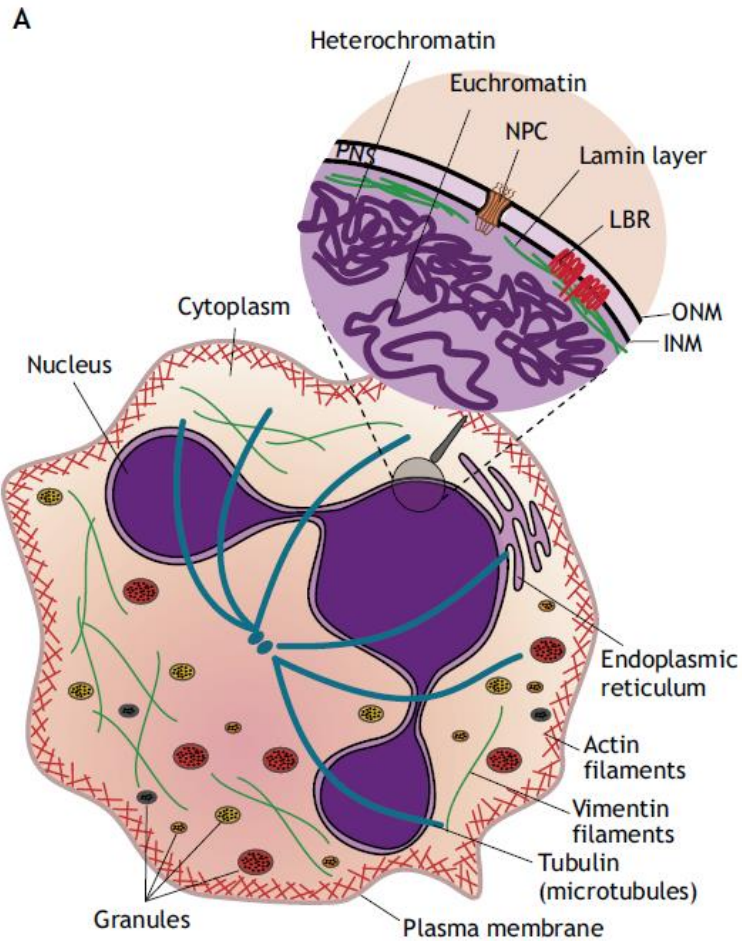
Suizidale NETose – langsam ablaufend

- kann durch Toll-like Rezeptoren, Fc-Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren ausgelöst werden
- auf die intrazelluläre Bildung der NETs folgt ein Riss der Plasmamembran und ihre Freisetzung in den Extrazellulärraum
- die Zelle geht dadurch unter

Vitale NETose – schnell ablaufend

- durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und andere bakterielle Strukturkomponenten, TLR4-aktivierte Thrombozyten oder Komplement-Proteine ausgelöst
- keine Auflösung des Zellkerns
- durch sog. Blebbing wird ein DNA-gefülltes Vesikel gebildet, das bei intakter Zellmembran schnell exozytiert wird
- neutrophile Granulozyten können trotz fehlender DNA anschließend noch in der Lage sein, Mikroorganismen zu phagozytieren und zu töten

Neutrophil Granulozyten und NETs



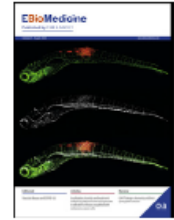
NETs and COVID-19



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ebiom



Research paper

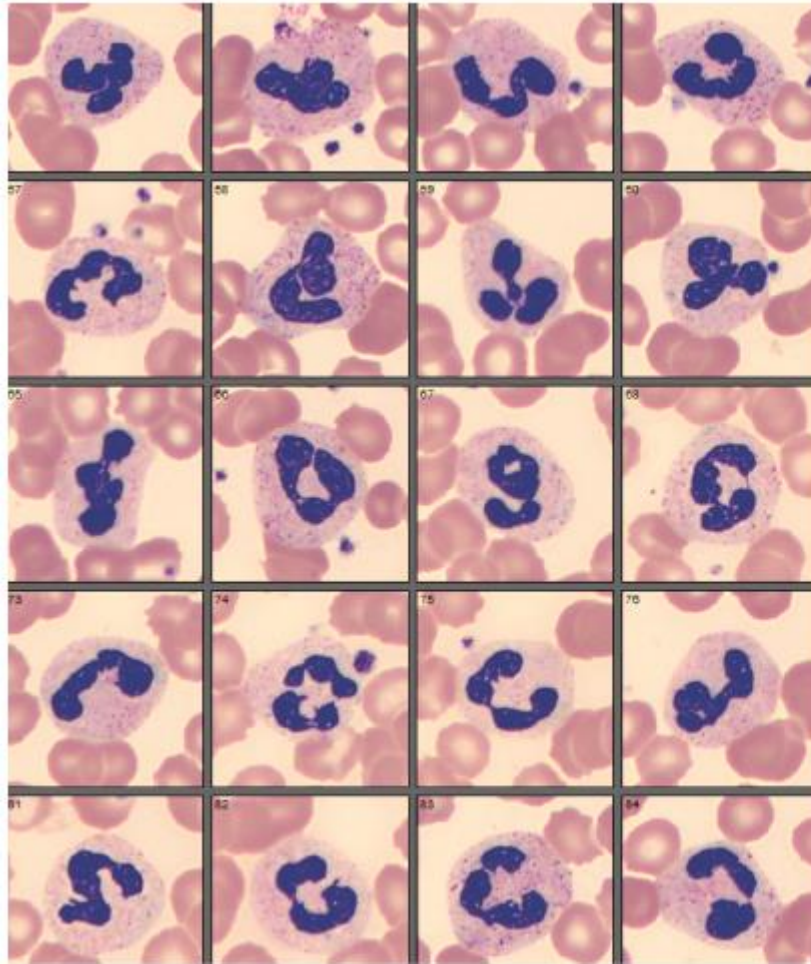
Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19



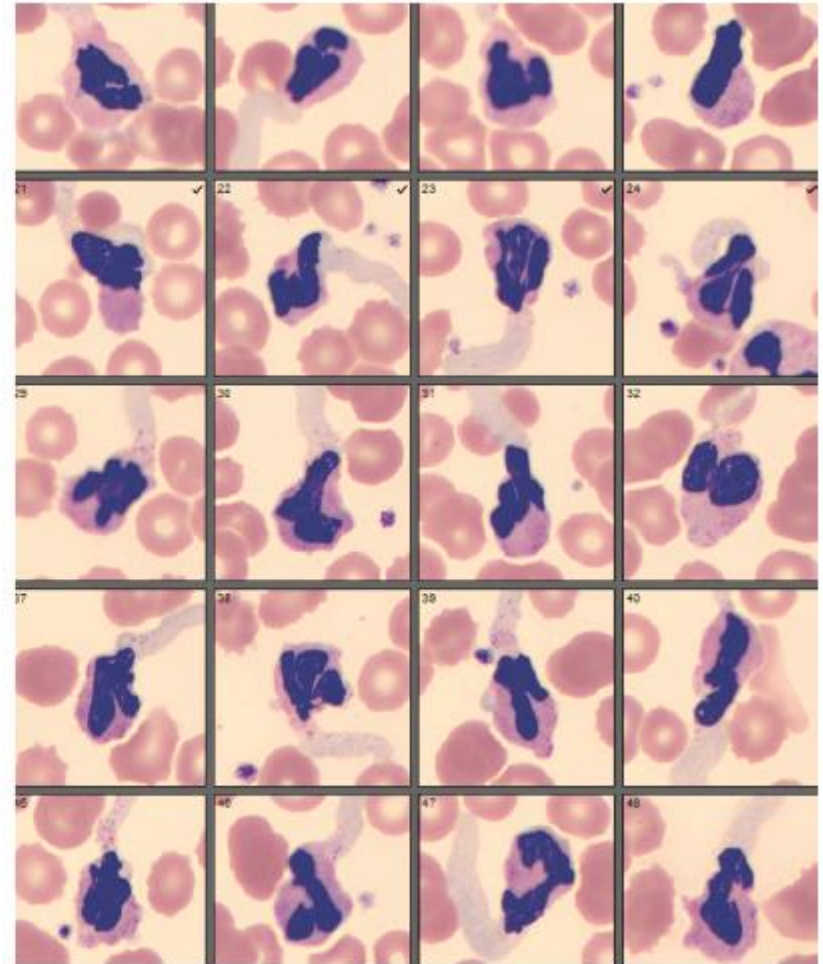
- IL-8 in COVID-19-Patienten erhöht → Rekrutierung von Neutrophilen an den Entzündungsherd
 - Organfunktionsstörungen sind assoziiert mit exzessiver, intravaskulärer Neutrophilen-Aggregation, NET-Bildung und Gefäßschäden
 - Granulozyten nehmen Phänotyp „geringer Dichte“ an
 - hohe Neigung zur Aggregation
 - hohe Neigung zur spontanen Bildung von NETs
 - auch bei Autoimmunerkrankungen beobachtet
- ⇒ Inhibierung der NET-Formation durch Gabe von Dexamethason und Heparin

NETs and COVID-19

am Tag der Aufnahme



Tag 5 nach Aufnahme



Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind wichtig für:

- Elimination von extrazellulären Erregern
(Bakterien, Pilze, Hefen)
- Verhinderung von Autoimmunphänomenen
(Elimination gealterter Zellen)

Neutrophile Granulozyten im Kontext einer COVID-19-Infektion:

- schwere Verläufe scheinen mit einer verstärkten Granulozytenaktivität und -aggregation sowie NET-Bildung assoziiert zu sein
- reaktive Sauerstoffspezies verursachen Gewebeerstörung
- NETs führen zu vaskulärem Verschluss