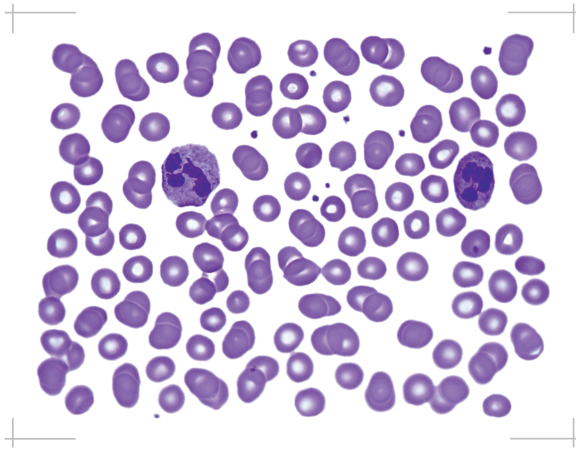


Evaluation des Nucleic acid containing unit
counts (NACU) als prognostischer Faktor
bei systemisch schwer kranken Hunden



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2025

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publisher.

1st Edition 2025

© 2025 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

**Evaluation des Nucleic acid containing unit
counts (NACU) als prognostischer Faktor
bei systemisch schwer kranken Hunden**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Lukas Jozefowitz

Tierarzt aus Greven

Osnabrück, 2024

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Prüfer:

Vorsitzender und 1. Gutachter: Prof. Dr. A. Moritz

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Olias

Prüferin: Prof. Dr. D. Fietz

Tag der Disputation: 02. April 2025

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lukas Jozefowitz

Osnabrück, 27 November 2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	1
2. Angeborenes Immunsystem/ unspezifisches Immunsystem.....	3
2.1 Humorale unspezifische Immunantwort.....	3
2.2 Zelluläre unspezifische Immunantwort.....	4
2.2.1 Mastzellen.....	4
2.2.2 Natürliche Killerzellen.....	5
2.2.3 Makrophagen/Monozyten.....	5
2.2.4 Granulozyten.....	6
2.3 Neutrophil extracellular traps (NETs) und NETose.....	8
2.3.1 Morphologie und Bestandteile von NETs.....	9
2.3.2 Funktion.....	9
2.3.3 Einflussfaktoren auf die Bildung von NETs.....	10
3. NETose und zellfreie DNS in pathologischen Prozessen.....	12
3.1 Infektionen und Sepsis.....	13
3.2 Akute Pankreatitis.....	15
3.3 Immunhämolytische Anämie (IMHA) beim Hund.....	16
3.4 Gerinnungsstörungen.....	17
4. ADVIA® 2120i, RETIC Kanal und der NACU.....	19
4.1 Retikulozytenmessung.....	22
5. Fragestellung.....	24
6. Material und Methoden.....	26
6.1 Referenzwertpopulation.....	26
6.1.1 Variationskoeffizient.....	26
6.1.2 Signalement und diagnostische Aufarbeitung der Patienten.....	26

6.1.3 Probenentnahme.....	27
6.1.4 Probenverarbeitung und -lagerung.....	27
6.1.5 Messungen NACU-Count.....	27
6.1.6 Datenverarbeitung.....	28
6.2 Gemischte Population kranker Patienten.....	28
6.2.1 Diagnosegruppen:.....	29
6.2.2 Einfluss von Medikamenten:.....	30
6.2.3 Körperinnentemperatur:.....	30
6.2.4 Labordiagnostische Marker einer akuten Entzündung:.....	31
6.2.5 Retikulozyten:.....	31
6.2.6 Prognose:.....	31
6.3 Spezifische Erkrankungen.....	33
6.3.1 Signalement und diagnostische Aufarbeitung.....	33
6.3.1.1 Immnhämolytische Anämie (IMHA).....	33
6.3.1.2 Akute Pankreatitis.....	33
6.3.1.3 Sepsis.....	34
6.3.1.4 Disseminierte intravasale Koagulopathie.....	35
6.3.1.5 Mehrere Diagnosen.....	36
7. Statistik.....	37
7.1 Software.....	37
7.2 Bewertungsgrundlagen.....	37
7.3 Methoden der Datenanalyse.....	37
8. Ergebnisse.....	39
8.1 Bestimmung eines Referenzintervalls für den nucleic acid containing unit count (NACU) ...	39
8.1.1 Beschreibung der Gruppe 1 (Referenzintervall).....	39
8.1.2 Referenzbereich.....	40
8.1.3 Variationskoeffizient.....	42
8.2 Ergebnisse der Testung des klinischen Nutzens.....	44

8.2.1 Beschreibung der Gruppe 2 (gemischt krank)	44
8.2.2 Zusammenhänge:	47
Diagnosegruppen	47
Körperinnentemperatur:	55
Medikamente	55
Labordiagnostische Marker einer akuten Entzündung	56
Retikulozyten	57
Prognose	57
8.3 Spezielle Erkrankungskomplexe	60
8.3.1 Beschreibung der Gruppe 3 (spezielle Erkrankungskomplexe)	60
8.3.1 Unterschiede hinsichtlich Erkrankungen	62
9. Diskussion	68
9.1 Studienaufbau und Studienpopulation	68
9.2 Referenzintervall	69
9.3 Klinische Testung	71
9.4 Definierte Krankheitskomplexe	76
9.5 Diskussion Einzelpatienten:	78
9.6 Neoplasien und der NACU-Count	81
9.7 Vermutungen zum Inhalt des NACU	83
9.8 Limitationen	85
9.9 Abschließende Betrachtung: Was bringt der NACU-Count?	86
9.10 Ausblick	87
10. Zusammenfassung	90
11. Summary	93
12. Abkürzungen	95
13. Abbildungsverzeichnis	97
14. Tabellenverzeichnis:	99
15. Literaturverzeichnis	100

16. Danksagung.....	122
---------------------	-----

1. Einleitung

In der AutoReticMethode des ADVIA® 2120i der Firma Siemens HealthCare GmbH (Erlangen) werden zellhaltige Proben mittels ihrer Größe und ihres Nukleinsäuregehaltes aufgeschlüsselt (Siemens HealthCare Diagnostics 2010). In der tierärztlichen Praxis wird diese Methode bereits erfolgreich verwendet, um regenerative Prozesse bei Thrombo- und Erythrozyten frühzeitig feststellen zu können (Retikulozytenmessung, retikulierte Thrombozyten) (Moritz 2000, Steinberg & Olver 2005, Schaefer & Stokol 2015). Vor allem bei schwer kranken Patienten fielen dabei immer wieder Ereignisse im Scattergramm auf, die einen hohen Gehalt an Nukleinsäuren aufwiesen und von geringer Größe waren. Diese Partikel wurden als *Nucleic acid containing units* (NACU, Nukleinsäure enthaltende Partikel) bezeichnet. Es lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher benennen, welche Strukturen alle im so genannten NACU-Count erfasst werden. Die Vermutungen bestehen jedoch, dass sich neben Bakterien, Pilzen, Ribonukleinsäuren (RNS) von lysierten Retikulozyten, Desoxyribonukleinsäuren (DNS) Stränge von lysierten Leukozyten oder zellfreie DNS/RNS anderen Ursprungs, auch ein großer Anteil an so genannten *neutrophil extracellular traps* (NETs) in diesem Parameter finden lassen (Kleinert 2019, Gibbs et al., 2020). Dabei handelt es sich um überwiegend von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNG) freigesetzte Strukturen, die zu einem großen Teil aus Nukleinsäuren bestehen (Brinkmann et al., 2004). Dr. Nadine Kleinert zeigte in ihrer Studie zur Etablierung von Nachweisverfahren für Neutrophil Extracellular Traps beim Hund einen gewissen, wenn auch nicht signifikanten Zusammenhang, zwischen gesteigerter NETose (Prozess der Freisetzung von NETs) Aktivität und einer Erhöhung des NACU-Counts (Kleinert 2019). So liegt die Vermutung nah, dass sich mittels NACU die NETose Aktivität bei einzelnen Patienten recht einfach und ausreichend zuverlässig quantifizieren und messen lässt. Ferner soll hier jedoch der klinische Nutzen des NACU-Counts evaluiert werden und versucht werden Zusammenhänge zwischen Abweichungen dieses Laborparameters und klinischen Entwicklungen der betroffenen Patienten darzustellen.

Die Beantwortung der Frage nach der Ätiologie des NACU-Counts kann und soll in der hieraus folgenden Dissertation nicht abschließend geklärt werden.

Als Grundlage für die im weiteren Verlauf aufgestellten Hypothesen gelten verschiedene Literaturberichte. Schon 2004 mutmaßten Brinkmann et al. (2004), dass NETs eine Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen spielen könnten. Knapp 15 Jahre später häufen sich immer mehr Berichte und Beobachtungen, die einen Zusammenhang zwischen exzessiver NETose (oder

zumindest einem erhöhten Gehalt an zellfreier DNA (cfDNA)), verschiedenen Erkrankungen und einer schlechteren Prognose für Patienten sehen. Die Berichte beziehen sich nicht mehr nur auf Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus erythematoses oder immunmedierte Anämien, sondern auch bei Sepsis, Gerinnungsstörungen mit hyper- und hypokoagulablen Zuständen, akuter Pankreatitis und verschiedenen Tumorerkrankungen werden Zusammenhänge mit NETose gesehen (*Saukkonen et al., 2007 & 2008; Forsblom et al., 2014; Merz et al., 2015; Lawson et al., 2018; Murthy et al., 2019*).

2. Angeborenes Immunsystem/ unspezifisches Immunsystem

2.1 Humorale unspezifische Immunantwort

Die humorale Immunantwort besteht aus einer Fülle von im Plasma gelösten Stoffen, die die erste Reaktion auf eindringende Pathogene darstellen. Neben den Enzymen des Komplementsystems und natürlichen präformierten Antikörpern, spielen auch sogenannte „fluide phase PRMs (pattern recognition molecules)“ eine Rolle (*Bottazzi et al., 2010; Shishido et al., 2012*).

Bei dem Komplementbindungssystem handelt es sich um verschiedene Serum- und Membranproteine, die sich, nach Initialisierung, in einem Kaskadensystem selbst aktivieren. Überwiegend findet ihre Produktion in der Leber statt, nur ein geringer Anteil wird im Gewebe selbst produziert. (*Regal et al., 2017*). Sie liegen als Proenzyme vor, wobei den membrangebundenen Proteinen eine regulatorische Funktion zukommt. Somit schützen sie den Körper vor einer ungerichteten Autoaggressivität (*Reddy et al., 2017*). Der finale Schritt dieser Kaskade stellt die Bildung des „membrane attack complex“ (MAC) dar, welcher sich als Pore in die Zelle einbaut und somit eine Lyse der betroffenen Zelle herbeiführt (*Shishido et al., 2012*).

Das Kontaktsystem besteht aus verschiedenen im Plasma gelösten inaktiven Substanzen, die in der Leber produziert werden. Neben seinen proinflammatorischen Anteilen weist es ebenfalls prokoagulable Aspekte seines kaskadenartigen Ablaufes auf (*Renne 2012*).

Die Aktivierung des Kontaktsystems beginnt unter anderem durch den Kontakt von Faktor XII mit negativ geladenen Oberflächen (*Maas et al., 2011*). Der dadurch aktivierte Faktor XIIa spaltet Plasma Prekallikrein (PPK) zu Plasma Kallikrein (PK), welches wiederum zu einer verstärkten Aktivierung von Faktor XII führt. Über die so angestoßene Kaskade mediiert das Kontaktsystem, vermittelt über die Bildung von Bradikinin, eine proinflammatorische Wirkung. Diese zeigt sich klinisch in einer vermehrten Vasodilatation, erhöhten Gefäßpermeabilität und verstärkter Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten (*Leeb-Lundberg et al., 2005, Muller & Renne 2008*). Durch die Spaltung von Faktor XI zu XIa kommt es zudem zu einer Aktivierung des intrinsischen Weges der Gerinnung und somit zur Ausbildung von Thromben (*Renne et al., 2000*).

Als natürliche Antikörper werden jene Antikörper bezeichnet, die ohne antigenetische Stimulation vorhanden sind (*Holodick et al., 2017, Binder et al., 2005*). Sie sind in der Regel vom IgM Typ,

seltener IgA oder IgG und werden von B-1 Zellen produziert, welche bereits pränatal vorhanden sind. Grundsätzlich werden hier monoreaktive von polyreaktiven Antikörpern unterschieden (*Holodick et al., 2017*), beide können sich jedoch sowohl gegen körpereigene als auch körperfremde Antigene richten (*Binder et al., 2005*). Als Teil der angeborenen Immunantwort besteht ihre Aufgabe zum einen darin, eindringende Pathogene unschädlich zu machen, zum anderen haben sie immunmodulatorische Aufgaben. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Beseitigung gealterter und beschädigter Zellen. Die somit proapoptischen Effekte dieser Antikörper schützen vor einer etwaigen Autoimmunität (*Binder et al., 2005*). Darüberhinaus schützt ihr regulatorisches Verhalten gegenüber anderen Antikörpern vor einer überschießenden Immunantwort (*Holodick et al., 2017*).

Die Gruppe der PRMs unterteilt sich hinsichtlich ihrer Struktur in Collectine, Ficoline und Pentraxine. Zu den Pentraxinen gehören die beiden in der Veterinärmedizin etablierten Marker der akuten Entzündung, C-reaktives Protein (CRP) und Serum-Amyloid-A (SAA) (*Fransson et al., 2007, Tamamoto et al., 2008*). Bei zellulärer Schädigung oder eindringenden Mikroorganismen werden sie, wenn auch von Gruppe zu Gruppe unterschiedlich, von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen freigesetzt. Trotz des heterogenen Aufbaus zwischen den einzelnen Gruppen ist ihre Funktion recht ähnlich. Sie aktivieren das Komplementsystem, führen zu einer Opsonierung von Antigenen, sowie zur Neutralisation und Agglutination von Mikroorganismen und gealterten Zellen. Darüber hinaus übernehmen sie eine regulatorische Aufgabe in den Wechselwirkungen zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort (*Botazzi et al., 2010*).

2.2 Zelluläre unspezifische Immunantwort

2.2.1 Mastzellen

Mastzellen sind vor allem für ihre Beteiligung an allergischen Reaktionen bekannt. Im Allgemeinen stammen sie von den gleichen myeloischen Vorläuferzellen wie Granulozyten ab und finden sich gehäuft an Stellen, wo ein vermehrter Kontakt zwischen Organismus und Umwelt stattfindet, wie zum Beispiel der Haut und allen Schleimhäuten, aber es konnte auch ein vermehrtes Vorkommen um Blutgefäße nachgewiesen werden. Neben ihrer Hauptrolle bei allergischen Geschehen fanden sich auch zunehmend Hinweise, dass sie eine wichtige Rolle im angeborenen zellulärem

Immunsystem darstellen (*da Silva et al., 2014*). So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass Mastzellen eine vermehrte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten auslösen (*de Filippo et al., 2013*). Ebenso weisen sie phagozytäre Eigenschaften auf und zerstören aufgenommene Mikroorganismen in säurehaltigen Vakuolen und mittels Superoxidanionen (*da Silva et al., 2014*). Diese Phagozytose ist nicht zwingend an eine vorherige Opsonierung der betroffenen Strukturen gebunden (*Malaviya et Abraham 2001*).

2.2.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen stammen von angeborenen lymphoiden Zellen ab und benötigen, anders als T- oder B- Lymphozyten, keinen vorherigen Kontakt zu Antigenen. Sie werden deshalb auch als angeborene Lymphozyten bezeichnet. Die Funktion der natürlichen Killerzellen ist durch ihre Oberflächenrezeptoren bedingt, diese sind unveränderlich codiert. Durch rasche Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen durch diese Zellen ist es schnell möglich eingedrungene Pathogene oder entartete Zellen zu beseitigen (*Geiger & Sun 2016*). Mittlerweile wird bei natürlichen Killerzellen davon ausgegangen, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von tumorösen Erkrankungen spielen (*Naumova et al., 2016*).

2.2.3 Makrophagen/Monozyten

Makrophagen und Monozyten stammen, wie auch dendritische Zellen, von den gleichen myeloischen Vorläuferzellen des monozytären Phagozytosesystems ab (*Doulatov et al., 2010*). Im Gegensatz zu anderen primären Phagozytenzellen (Granulozyten), welche nur eine Lebenserwartung von wenigen Stunden haben, können Makrophagen bis zu mehreren Jahren im Gewebe aktiv bleiben, abhängig von der Art und Weise der Immunantwort (*Geissmann et al., 2010*).

Hauptaufgabe der Makrophagen ist es eindringende Pathogene zu erkennen und unschädlich zu machen. Darüber hinaus kommt ihnen jedoch auch eine wichtige Funktion bei „Aufräumarbeiten“, also der Beseitigung abgestorbener Zellen und zellulären Debris zu, und auch bei Umbauprozessen nach Verletzungen spielen sie eine entscheidende Rolle (*Gordon et al., 2005; Geissmann et al., 2010, Wynn & Barron 2010*).

Abhängig vom Gewebetyp, in dem sich Makrophagen befinden, werden andere Nomenklaturen verwendet. So werden sie im Knochen als Osteoklasten, im zentralen Nervensystem als Mikroglia,

in den Lungen als Alveolarmakrophagen und in der Leber als Kupfer'sche Sternzellen bezeichnet (Yona & Gordon 2015). Aus immunologischer Sicht wichtiger erscheint jedoch die Unterteilung in proinflammatorische und antiinflammatorische Makrophagen. Die Gruppe der antiinflammatorischen Makrophagen unterteilt sich zudem in drei weitere Untergruppen, die je nach Untergruppe die Aufgabe der Gewebereparation, Immunmodulation oder Abwehrfunktion übernimmt (Galli et al., 2011).

2.2.4 Granulozyten

Die Zellpopulation der Granulozyten wird grundlegend anhand der Anfärbarkeit ihrer zytoplasmatischen Granula in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt. Gemein ist ihnen allen ihre Beteiligung an der Wirkungsweise des angeborenen unspezifischen Immunsystems (Aristizábal & González 2013).

Eosinophile Granulozyten sind vor allem für ihre Wirkung bei Infektionen mit parasitären Erregern, aber auch für ihre Funktion bei allergischen Geschehen, bekannt (Wen & Rothenberg 2016). Ein geringer Prozentsatz der eosinophilen Granulozyten ist in der Zirkulation nachzuweisen (1-4%), die überwiegende Mehrzahl findet sich jedoch auf Schleimhäuten, also dort wo ein Kontakt zur Außenwelt stattfindet, und in sekundären lymphatischen Organen. Über die auf Pathogenen befindlichen pathogen-associated molecular patterns (PAMP) und damage-associated molecular patterns (DAMP) erfolgt eine Aktivierung der eosinophilen Granulozyten. Direkte Reaktionen sind die Phagozytose etwaiger Pathogene (Ramirez et al., 2018) und die Freisetzung kationischer Proteine und reaktiver Sauerstoffspezies, welche direkt zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Darüber hinaus zeigte sich in den letzten Jahren zunehmend, dass sie eine Interaktion mit Mastzellen, T-Lymphozyten, Bindegewebszellen und Nervenzellen aufweisen und somit sowohl die Entzündungsreaktion verstärken als auch modulieren. Des Weiteren wird ihnen eine Schutzfunktion epithelialer Barrieren zugeschrieben (Shamri et al., 2011).

Basophile Granulozyten bilden nur einen kleinen Anteil der zirkulierenden Leukozyten und zeichnen sich durch basophil angefärbte, zytoplasmatische Granula aus. Die Rolle der basophilen Granulozyten ist auch heute noch nicht vollständig geklärt. Hinweise auf eine Funktion bei der angeborenen Immunantwort lassen Berichte vermuten, wie zum Beispiel die Freisetzung von Interleukin 4 (IL-4) aus basophilen Granulozyten bei Kontakt mit Antigenen von Schistosoma

mansoni (*Falcone et al., 1996*) oder die Produktion von IL-4 in basophilen Granulozyten durch Kontakt mit Antigenen, welche bei humanen Patienten mit viraler Hepatitis freigesetzt werden (*Patella et al., 1998*). Mittlerweile geht man vor allem davon aus, dass basophilen Granulozyten vor allem eine Mitwirkung bei der Bekämpfung parasitärer Infektionen und bei allergischen Erkrankungen haben (*Karasuyama et al., 2018*).

Der polymorphkernige neutrophile Granulozyt stellt die dominierende Population an Granulozyten im Differentialblutbild des Hundes dar. In der Literatur wird die Überlebenszeit von wenigen Stunden (*Summers et al., 2010*) bis hin zu einigen Tagen (*Pillay et al., 2010*) angegeben. Sie sind Teil der unspezifischen Immunabwehr und ihre Aufgaben bestehen darin, Mikroorganismen direkt nach dem Eindringen unschädlich zu machen. Ein Schlüsselereignis bei diesen Vorgängen ist die Extravasation von neutrophilen Granulozyten. Dabei handelt es sich um einen rezeptorabhängigen Vorgang, der durch im Plasma gelöste Mediatoren angestoßen wird (*Kobayashi & DeLeo 2009*). Durch konservierte Oberflächenstrukturen auf Bakterien, sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), welche an die unterschiedlichen Rezeptoren von neutrophilen Granulozyten binden, sind letztere dazu befähigt Mikroorganismen zu phagozytieren und somit unschädlich zu machen. (*Hayashi 2003*) Der Vorgang der Phagozytose kann durch Opsonierung von Mikroorganismen, durch Antikörper oder Proteine der Komplement-Bindungsreaktion, verstärkt werden (*Katzenmeyer & Bryers 2011, Hřčková et al., 2016*). Neben dem vorher beschriebenen Vorgang führt die Bindung der PAMP-Rezeptoren ebenfalls zu einer vermehrten Freisetzung von Cytokinen und freien Sauerstoffradikalen, welche den Entzündungsprozess unterstützen und eine mikrobizide Aktivität aufweisen (*Hayashi 2003*). Die mikrobizide Aktivität von neutrophilen Granulozyten beruht neben der Produktion von freien Sauerstoffradikalen (ROS) (*Pruchniak et al., 2013*) auch auf der Freisetzung von Granula, die eine weite Spanne von antimikrobiellen Peptiden, Proteinen und lysierenden Enzymen enthalten (*Kobayashi & DeLeo 2009*). Durch die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten kommt es zu einer vermehrten Aufnahme von Sauerstoff und über den membrangebundenen Komplex einer NADPH abhängigen Oxidase zum sogenannten respiratory burst, also der Produktion und Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen. Die dabei produzierten Radikale sind vor allem Hydroperoxide-Anionen, Hydroxyl-Radikale und Wasserstoffperoxid (*Pruchniak et al., 2013*). Ein weiterer Vorgang ist die Verschmelzung der zytoplasmatischen Granula mit der Zellmembran

und nachfolgender Ausschleusung per Exozytose. Der neutrophile Granulozyt degranuliert und die in den Granula angereicherten Stoffe werden in die Umgebung abgegeben. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen rezeptormediierten Vorgang (*Kobayashi & DeLeo 2009*).

Sowohl der respiratory burst, als auch die Degranulation sind zwar ein maßgeblicher Bestandteil der angeborenen Immunantwort, jedoch sind sie keineswegs spezifisch gegen eingedrungene Mikroorganismen gerichtet, weshalb es hierbei immer auch zur Schädigung des umliegenden Gewebes kommt (*Kobayashi & DeLeo 2009*).

Neben diesen bereits seit längerer Zeit bekannten Mechanismen kam im Jahre 2004 ein weiterer Mechanismus hinzu. Die Arbeitsgruppe von Brinkmann et al. konnte nachweisen, dass durch verschiedene Stimuli, neutrophile Granulozyten beginnen netzartige Strukturen, bestehend überwiegend aus DNS und Histonen, freizusetzen. Sie benannten diese Strukturen als Neutrophil extracellular traps (NETs), der Vorgang der Freisetzung wurde als NETose bezeichnet (*Brinkmann et al., 2004*).

2.3 Neutrophil extracellular traps (NETs) und NETose

Bei NETs handelt es sich um filamentöse Strukturen, die durch Stimulation des angeborenen Immunsystems gebildet werden. Sie wurden erstmals von Brinkmann 2004 beschrieben, wobei anzumerken ist, dass auch Takei et al in ihrer früheren Arbeit bereits die Freisetzung von DNS-haltigen Strukturen aus neutrophilen Granulozyten in Folge bestimmter Stimuli beschreiben (*Takei et al., 1996*). Auch andere Zellen des angeborenen Immunsystems, zum Beispiel eosinophile Granulozyten und Mastzellen, sind in der Lage sogenannte Extracellular traps (ETs) zu formen (*von Köckritz-Blickwede 2008; Schorn et al., 2012*).

Die Freisetzung von NETs kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen.

Durch die Bildung von ROS durch die NADPH Oxidase kommt es zu Umbauprozessen in der Zelle, welche zu einer Auflösung der Kernhüllen und Membranen der Granula führt und somit die Mischung von NET-Strukturen ermöglicht. Durch Zerstörung der Zellmembran kommt es schlussendlich zu einer Freisetzung der NETs. Dieser Vorgang resultiert in einem Verlust der zellulären Integrität und Funktion der Zelle (*Fuchs et al., 2007*).

Bei der zweiten Form der NETose kommt es, nach Stimulation mit zum Beispiel granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), ebenfalls zu einer Freisetzung von NETs, jedoch bleiben hier die ausführenden Zellen vital und zeigen weiterhin eine Funktion. Auch dieser Vorgang scheint ROS abhängig zu sein (*Yousefi et al., 2009*). Der Nukleinsäureanteil bei

dieser Form der NETose kann sowohl von mitochondrialer DNS (*Yousefi et al., 2009*), als auch nukleärer DNS stammen (*Pilszczek et al., 2010*).

2.3.1 Morphologie und Bestandteile von NETs

Durch Stimulation mit Interleukin-8 (IL-8), Phorbol myristate acetate (PMA) oder Lipopolysacchariden beginnen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNGs) ihre Form von rund zu flach zu ändern, formen Membranprotrusionen und setzen filamentöse Strukturen frei. Diese bestehen aus glatten Anteilen mit einer Größe von 15 -17nm und globulären Strukturen, die eine Größe von 25nm aufwiesen. Auch größere Aggregate von bis zu 50 nm können beobachtet werden. Im Transmissionselektronenmikroskop zeigt sich, dass diese Strukturen nicht von einer Membran umgeben sind (*Brinkmann et al., 2004*).

Ein großer Teil dieser Strukturen besteht aus DNS, erkennbar daran, dass sie sich mit in DNS einlagernden Lösungen anfärben und eine Behandlung mit Deoxyribonukleasen (DNase) zur Auflösung der Strukturen führt. Des Weiteren reagieren sie mit Antikörpern gegen Histone H1, H2A, H2B, H3, H4 und gegen den H2A-H2B- DNA Komplex. In den globulären Abschnitten lassen sich neutrophile Elastasen und Histone nachweisen (*Brinkmann et al., 2004*).

2.3.2 Funktion

Die exakte Arbeitsweise und Funktion von NETs ist, auch knapp 15 Jahre nach ihrer Entdeckung, ein viel diskutierter Punkt.

Recht einig sind sich die Forschenden, dass NETs, mittels ihrer filamentösen Strukturen, in der Lage sind, Bakterien zu fangen und zu fixieren (*Yipp et al., 2012; McDonald et al., 2012*). Schon Brinkmann konnte 2004 feststellen, dass sich in einem Model der Kaninchen Shigellose die Bakterien an den NETs angeheftet vorfanden (*Brinkmann et al., 2004*). Auch bei einer Endotoxämie zeigte sich, dass bei Freisetzen von NETs dies zu einem Einfangen der E. Coli in den Lebersinusoiden führte und eine weitere Dissemination im Organismus verhindert wurde (*McDonald et al., 2012*). Eine Applikation von DNase während einer Hautinfektion mit Staphylokokken resultierte in einem raschen Entkommen der Bakterien vom Ort der Infektion und einer erhöhten bakteriellen Last im Blut (*Yipp et al., 2012*). All diese Beobachtungen zeigen, dass die von neutrophilen Granulozyten produzierten NETs sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der systemischen Ausbreitung von Erregern spielen.

Über den genauen Mechanismus der Fixation bestehen bisher nur Hypothesen. Die Vermutung besteht, dass die negative Ladung der Erreger in Wechselwirkung mit kationischen Ladungen der NET-Strukturen eine Rolle dabei spielt (*Medina 2009*).

Darüber hinaus finden sich in NETs eine Vielzahl von antimikrobiell wirksamen Proteinen und Enzymen (*Brinkmann et al., 2004; Urban et al., 2009*). Es zeigt sich, dass NETs die Fähigkeit besitzen bakterielle Virulenzfaktoren unwirksam zu machen, wie dies zum Beispiel bei dem Virulenzfaktor IpaB von *Shigella flexneri* der Fall ist (*Brinkmann et al., 2004*). Histone, welche einen Hauptbestandteil der NETs ausmachen, haben zusätzlich einen nachgewiesenen bakteriziden Effekt (*Doolin et al., 2020*). Diskussionspunkt ist hier jedoch, ob diese Bestandteile eine wirkliche effiziente antimikrobielle Wirkung besitzen.

Des Weiteren verstärken sie immunologische Reaktion, durch eine Förderung der Freisetzung von ROS und einer gesteigerten Phagozytoseaktivität. Dies führt zu einer vermehrten Abtötung von Erregern (*Dömer et al., 2021*).

2.3.3 Einflussfaktoren auf die Bildung von NETs

Für die Bildung und Freisetzung von NETs gibt es stimulierende und inhibierende Faktoren. Die unten aufgeführten Tabellen (siehe Tabelle 1 & 2) sind eine zusammengefasste und gekürzte Version der Tabelle aus dem Review Artikel von Laukova und Konečná aus dem Jahre 2017 (*Laukova & Konečná 2017*). Die Tabelle wurde auf die, in dieser Arbeit und im klinischen Alltag, interessant erscheinenden Parameter reduziert.

Tabelle 1 NETs fördernde Stoffe

Gram positive Bakterien	Malachowa et al., 2013; Ramos-Kichik et al., 2009
Gram negative Bakterien	Juneau et al., 2011; Marin-Esteban et al., 2012
Viren	Narasaraju et al., 2011
Protozoen	Abi Abdallah et al., 2012; Ventura-Juarez et al., 2016
Lipopolysaccharide (LPS)	Brinkmann et al., 2004
Cytokine	Alfaro et al., 2016; de Boer et al., 2013
Immunkomplexe	Behnen et al., 2014
Aktivierete Thrombozyten	Clark et al., 2007

Tabelle 2 NETs hemmende Stoffe

Gallensäuren	Haute et al., 2015
Acetylsalicylsäure	Lapponi et al., 2013
Cyclosporin	Gupta et al., 2014

3. NETose und zellfreie DNS in pathologischen Prozessen

In der Literatur finden sich immer mehr Hinweise, dass die Produktion von NETs oder das alleinige Vorliegen freier DNS (wie sie zum Beispiel bei NETose vorkommt), mit der Schwere der Erkrankung korreliert, bei bestimmten Krankheiten eine Rolle in der Pathophysiologie spielt und es darüber hinaus als prognostischer Parameter bei schwerkranken Patienten einen Nutzen hat (*Saukkonen et al., 2007; Tovbin et al., 2012, Forsblom et al., 2014, Letendre & Goggs 2017, Rannikko et al., 2018, Abrams et al., 2019, Kim et al., 2021, Mao et al., 2021, Gibor et al., 2022, Su et al., 2023, Xu et al., 2024*).

So zeigten Versuche an Mäusen, dass bei einer Injektion mit LPS (ein potenter Auslöser für NETs), eine Hemmung der Peptidylarginin deiminase 2 (PAD-2), also jenes Enzym das essenziell ist um NETs auszubilden, eine deutliche Erhöhung der Überlebenschancen und ein Sinken der Mortalität mit sich bringt, als bei jenen die NETs exprimieren können (*Wu et al., 2020*).

Aber auch die Gesamtmessung von im Blut zirkulierender DNS zeigt einen klinischen Nutzen. Eine finnische Studie betrachtete den Gehalt an zellfreier Desoxyribonukleinsäure im Blut von kritisch kranken Patienten auf einer Intensivstation in Helsinki. Sie konnten beobachten, dass bei Patienten, die im späteren Verlauf verstarben, der Gehalt an cfDNA höher war als bei jenen, die ihren Krankenhausaufenthalt überlebten. Zudem zeigte sich, dass cfDNA einen Marker für die Schwere der Erkrankung und die auftretenden Organschädigungen darstellt (*Saukkonen et al., 2007*).

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in der Tiermedizin gemacht werden. Zwei Studien zeigen, dass es sich bei cfDNA um einen vielversprechenden Marker von Gewebeschädigung handeln könnte. Die erste Untersuchung betrachtete Hunde, die eine Magendrehung aufwiesen. Es zeigte sich, dass die Werte an cfDNA bei Hunden mit einer Magendrehung erhöht waren, dies scheint jedoch kein prognostischer Marker zu sein. Auch ließen sich keine Rückschlüsse auf das Auftreten von postoperativen Komplikationen anhand der Höhe der cfDNA ziehen (*Troia et al., 2018*). Die Arbeitsgruppe von Wilson et al bestätigt in ihrer Studie, dass auch bei einem iatrogenen Gewebeschaden (Hemilaminektomie, Kreuzbannrissoperation, offene Ovariohysterektomie) die Werte an cfDNA nach der Operation ansteigen. Zusätzlich konnten sie ermitteln, dass die

biologische Halbwertszeit der zirkulierenden DNS bei 5,94h liegt (Wilson et al., 2018). Eine weitere tiermedizinische Arbeit bestätigt die Beobachtungen von Saukkonen et al. (2007) beim Hund. Sie konnten feststellen, dass bei kranken Hunden verschiedener Ätiologie die Werte an cfDNA im Plasma höher liegen als bei gesunden Patienten und, dass die Schwere der Erkrankung positiv mit dem Gehalt an cfDNA korrelierte. Darüber hinaus zeigte sich, dass mit steigenden Werten die Überlebenswahrscheinlichkeit bei diesen Patienten abnahm (Burnett et al., 2016).

3.1 Infektionen und Sepsis

Eine humanmedizinische Studie, die sich mit dem Zusammenhang von Bakteriämie und cfDNA beschäftigte, konnte einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an cfDNA und der Überlebenswahrscheinlichkeit bei septischen Patienten zeigen. Ein cfDNA Gehalt von $>1.99 \mu\text{g/ml}$, am dritten Tag des Aufenthaltes auf der Intensivstation, zeigte eine Sensitivität von 67% und eine Spezifität von 77% zu versterben (Forsblom et al., 2014). Zwar bezieht sich die Studie von Forsblom et al. nur auf *Staphylococcus aureus* Bakteriämie, trotz alledem sind die Ergebnisse durchaus interessant. Saukkonen et al. konnten in ihrer Studie zu humanen Patienten mit Sepsis oder septischem Schock diese Ergebnisse bestätigen. Auch bei ihnen zeigte sich, dass Nicht-Überlebende signifikant höhere Konzentrationen an cfDNA aufwiesen als jene Überlebenden (Saukkonen et al., 2008). Auch bei Sepsis induzierter akuter Niereninsuffizienz zeigt sich ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an cfDNA und der Prognose bei humanen Patienten. Hohe Werte an cfDNA gingen mit einer hohen Mortalität einher (Xu et al. 2024).

In ihrer veterinärmedizinischen Studie konnten auch Letendre et Goggs zeigen, dass septische Hunde oder solche mit einem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) einen erhöhten Gehalt an cfDNA hatten. Sie konnten erste Hinweise erarbeiten, die einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an cfDNA und dem klinischen Outcome bei SIRS-Patienten erahnen lassen, vor allem in Relation zur Leukozytenzahl. Auch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Patienten mit einer positiven Blutkultur, die somit als sicher bakteriämisch bezeichnet werden können, und der Höhe der gemessenen cfDNA. In ihrer Studie zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Konzentration an cfDNA in Patienten mit einem SIRS, die infektiösen Ursprungs war und solchen die nicht infektiösen Ursprungs waren (nSIRS). Eine abschließende Beantwortung der Frage, ob die Messung von cfDNA einen prognostischen Mehrwert bei septischen Patienten bringt, war in ihren Studien nicht möglich. Jedoch könnten cfDNA Messungen helfen, Tiere zu identifizieren, die eine Bakteriämie aufweisen (Letendre & Goggs 2018).

Neben dem Nachweis und prognostischen Nutzen von cfDNA, welche nicht zwangsläufig mit NETose übereinstimmen muss, zeigten auch etliche Studien das Vorkommen und die Effekte von NETose bei verschiedenen Infektionen, bis hin zu septischen Patienten.

Eine Studie, die sich mit neonataler Sepsis beschäftigte, konnte im Mausmodell die Beobachtung machen, dass juvenile Mäuse, nach intraperitonealer Injektion von Bakterien oder LPS, mehr NETs produzieren als adulte Mäuse. Zusätzlich fanden sich bei juvenilen Mäusen mehr Organschäden und ein höherer Gehalt an proinflammatorischen Zytokinen als bei ihren adulten Kollegen. Die Schwere der Sepsis korrelierte mit dem Gehalt an NETs. Eine Behandlung mit Dornase alpha (rhDNase) oder Petidylarginin Deiminase 4 (PAD4) -Inhibitoren milderte den Verlauf der Sepsis jedoch deutlich ab (Colón *et al.*, 2019). Ähnliche Beobachtungen konnten in einem weiteren Sepsis Mausmodell nachgewiesen werden. PAD4 negative Mäuse zeigten einen reduzierten ROS und in Teilen ein längeres Überleben. Wobei anzumerken ist, dass die Forscher in dieser Studie je nach Art des Sepsismodells auch gewisse protektive Effekte der NETs beobachteten (Kiwit *et al.*, 2024).

In klinischen Studien bestätigen sich diese Beobachtungen. Es zeigt sich, dass septische Patienten höhere Werte an NETs und NETose-Markern aufwiesen und, dass dieses darüber hinaus prognostische Marker waren (Abrams *et al.*, 2019, Mao *et al.*, 2021, Su *et al.*, 2023).

Auch bei dem neuartigen Coronavirus SARS-COV2 konnten Forscher einen Zusammenhang zwischen Markern einer akuten Entzündung (C-reaktives Protein, Leukozyten, proinflammatorische Zytokine) und NETs, sowie mit Markern für Endothelschaden, Fibrinolyse und Gerinnung feststellen. Grundlegend wiesen an SARS-COV2 erkrankte Patienten höhere Werte an Markern für NETose als Gesunde auf. Darüber hinaus zeigte sich, dass jene, die im Verlauf verstarben, oder unterstützte Beatmung benötigten, vergleichsweise höhere NETose-Marker aufwiesen (Ng *et al.*, 2020). Den prognostischen Wert von NETs konnten Forscher bestätigen (Krinsky *et al.*, 2023, Kapoor *et al.*, 2024).

Der direkte Nachweis von NETs gelang auch aus Gewebe bei septischen Hunden (Li *et al.*, 2018) und aus Uterusmaterial bei Hunden, die aufgrund einer Pyometra kastriert wurden. Bei Hunden, die aufgrund einer anderen Ursache als einer Pyometra kastriert wurden, konnten hingegen keine NETs nachgewiesen werden (Rebordão *et al.*, 2017). Einen weiteren Hinweis, dass auch bei Tieren NETs eine Rolle bei verschiedenen, aktuell noch nicht gänzlich geklärten Prozessen bei infektiösen Erkrankungen liefern könnten, zeigte eine Studie, die sich mit NETs und Infektionen mit dem feline Leukämievirus (FeLV) beschäftigte. Katzen, die an FeLV erkrankt waren und zusätzlich Symptome ihrer Erkrankung aufwiesen, setzten mehr NETs frei als Katzen die zwar infiziert, aber

asymptomatisch waren (Wardini et al., 2010). Bei parasitären Erkrankungen konnten ebenfalls NETs nachgewiesen werden. Studien konnten zeigen, dass infektiöse Stadien von *Angiostrongylus vasorum* und bei *Dirofilaria immitis* sowohl infektiöse Stadien, als auch Mikrofilarien, *in vitro* eine Freisetzung von NETs aus kaninen neutrophilen Granulozyten herbeiführen und eine Festsetzung der Larven durch NETs erfolgte (Muñoz Caro et al., 2018; Grob et al., 2021). Ebenfalls konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass kanine neutrophile Granulozyten, sowohl aus Blut, als auch aus Kolostrum stammend, bei Kontakt mit *Neospora caninum* NETs freisetzen (Wie et al., 2016; Demattio et al., 2022).

3.2 Akute Pankreatitis

Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass NETs bei der Pathogenese einer akuten Pankreatitis eine Rolle spielen. Sie aktivieren Trypsin, verstärken die Inflammationsreaktion sowie den Gewebeschaden (Merz et al., 2015). Auch konnte gezeigt werden, dass exzessive NETose das Risiko einer Verlegung des Pankreasganges erhöht (Leppkes et al., 2016). Unterstützend zu diesen Beobachtungen fanden sich bei humanen Patienten mit einer akuten Pankreatitis erhöhte Werte von indirekten NETosemarkern (cfDNA, Histone DNS (HisDNA)) (Merz et al., 2015). Bei Hunden wurden ebenfalls erhöhte Werte an cfDNA bei akuten Pankreatitiden nachgewiesen (Kim et al., 2024). Darüber hinaus zeigte sich, dass ein höherer Gehalt an cfDNA mit einer längeren Hospitalisierungsdauer einhergeht. Ebenfalls ließ sich eine Korrelation zwischen klinischen Scores zur Graduierung der Schwere einer Pankreatitis, Markern einer Gallenblasenobstruktion, und der Höhe der gemessenen cfDNA nachvollziehen (Gibor et al., 2022). Die Vermutung besteht, dass die Schwere der Pankreatitis anhand cfDNA näher eingeschätzt werden kann (Sun et al., 2021, Kim et al., 2024).

Murthy et al (2019) untersuchten in ihrer Studie, inwiefern der Autophagiehemmer Chloroquin einen positiven Effekt auf die Überlebenszeit einer akuten Pankreatitis in Mausmodellen hat und ob sich eine Verringerung der NET-Produktion *in vivo* und *in vitro* beobachten lässt. Sie konnten nachweisen, dass bei Mäusen mit einer akuten Pankreatitis indirekte Marker für NETose erhöht waren (cfDNA, Myeloperoxidase-Deoxyribonukleinsäurekomplex (MPO-DNA)) und, dass diese unter Chloroquinverabreichung sanken. Weiter konnte beobachtet werden, dass, nach Verabreichung von Chloroquin, labordiagnostische Parameter für eine akute Pankreatitis zurückgingen (Trypsin, Amylase). Gleiches galt für Entzündungsmarker wie Interleukin-6 (IL6) und High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1). Auch auf klinischer Seite zeigte sich eine Verbesserung der Überlebenszeit

bei Applikation jenes Medikamentes. Um die These zu verifizieren, dass die gezeigten Verbesserungen auf eine Hemmung der exzessiven NET-Produktion bei einer akuten Pankreatitis zurückzuführen sind, wurden gleiche Versuche an PAD4 negativen Mäuse durchgeführt. Da PAD4 eine wichtige Rolle in der Bildung von NETs spielt sind Mäuse, welchen dieses Enzym fehlt, somit nicht in der Lage NETs zu bilden (*Li et al., 2014*). Es stellte sich heraus, dass PAD4 negative Tiere (bei Vorliegen einer Pankreatitis) geringere Konzentrationen an Trypsin und Amylasen aufwiesen als ihre PAD4 positiven Artgenossen. Auch war die Überlebensdauer bei jenen Tieren höher als bei zur NET-Bildung befähigten Mäusen. Eine Behandlung mit Chloroquin sorgte bei diesen Tieren jedoch nicht für eine Verbesserung der Überlebenszeit. Die Forscher führen diesen fehlenden positiven Effekt von Chloroquin auf die fehlende Fähigkeit zur Bildung von NETs zurück (*Murthy et al., 2019*).

3.3 Immunhämolytische Anämie (IMHA) beim Hund

Die Gruppe von Lawson et al. (2018) betrachtete in einer Studie mit 35 Hunden, die an einer immunhämolytischen Anämie litten, zwei indirekte (zellfreie DNS, hisDNA) und einen direkten Nachweis von NET-Strukturen (citruilliniertes Histon H3 (H3Cit)).

In den Untersuchungen ließen sich erhöhte Werte an citruillinierten Histonen bei 84% der Hunde mit einer IMHA im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen, und auch die Werte von Histon DNS waren bei 94% der Hunde mit einer IMHA erhöht. Auch zeigten sich geringfügige Zusammenhänge zwischen der Höhe der untersuchten Marker und dem späteren klinischen Ausgang, wenn diese auch nicht signifikant waren. Der Anteil zellfreier DNS war lediglich bei 17% der Hunde mit einer IMHA erhöht (*Lawson et al., 2018*).

In einer weiteren Arbeit, die sich mit dem Zusammenhang von zellfreier DNS und IMHA beschäftigt, fanden sich bei den erkrankten Tieren eine deutlich erhöhte Konzentration an zellfreier DNS im Vergleich zu gesunden Hunden. Aus der sich nicht, zwischen gesund und erkrankter Population, unterscheidenden Konzentration an DNase schlossen die Forscher hier, dass es zu einer erhöhten Bildung und nicht zu einem reduzierten Abbau kommt. Zusätzlich zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Versterben der Patienten und den Spiegeln an zellfreier DNS. Aufgrund der geringen Gruppengröße ist hier jedoch die Aussagekraft begrenzt und weitere Untersuchungen sind nötig. Die Vermutung besteht jedoch, dass zellfreie DNS ein prognostischer Faktor bei IMHA-Patienten sein könnte (*Jeffery et al., 2015*).

Humanmedizinische Studien, die sich mit dem Gehalt an cfDNA bei anämischen Patienten

unterschiedlicher Grunderkrankung beschäftigten, konnten einen diagnostischen Nutzen im Gehalt der cfDNA zur Differenzierung der unterschiedlichen Ätiologien nachweisen (*Elwardany et al., 2021, Lam et al., 2017*).

Eine der häufigsten Komplikationen einer IMHA stellt die Neigung zu Thrombosen dar. Der genaue Pathomechanismus der Entstehung von Thromben ist jedoch noch unklar (*Kidd & Mackmann 2013*). Ein Zusammenhang zwischen systemischer Inflammation und einer Neigung zu Thrombosen ist beschrieben (*Esmon 2003*) und, basierend auf der Arbeit von Lawson et al (2018), ist eine Beteiligung von NET-Strukturen bei diesem Geschehen durchaus denkbar. Jeffery et al (2015) konnten in ihrer Studie keinen Zusammenhang zwischen thrombotischen Ereignissen und Konzentrationen an zellfreier DNS nachweisen, jedoch konnten in der gesamten Studie auch nur fünf Thromboseverdächtige Ereignisse detektiert werden (*Jeffery et al., 2015*).

3.4 Gerinnungsstörungen

Ein Zusammenhang zwischen den Zellen und Mediatoren des Immunsystems und des Gerinnungssystems ist hinreichend beschrieben (*Esmon 2003*). So ist es nicht verwunderlich, dass auch NETs einen Einfluss auf das Gerinnungssystem zu haben scheinen. Es konnte nachgewiesen werden, dass NETs zwar keinen Einfluss auf die Fibrinclotbildung haben, jedoch die maximale Clotformationsgeschwindigkeit erhöhen und die Fibrinolyse verlangsamen (*Jeffery & Levine 2017*). Auch die Beobachtung, dass NETs, sowohl in thrombozytenarmen als auch -reichen Plasma die Bildung von Thrombin fördern, spricht ihnen eine gewisse prokoagulatorische Rolle zu (*Gould et al., 2014*). Des Weiteren wurde beobachtet, dass bei erhöhten Konzentrationen an cfDNA die entstehenden Clots bei septischen Patienten resistent gegenüber Fibrinolyse sind und erst der Zusatz von DNase eine Fibrinolyse wieder ermöglichte (*Gould et al., 2015*). Im Mausmodell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass NETs die intravaskuläre Gerinnung fördern und die Mikrozirkulation behindern. Diese Effekte waren durch Behandlung mit DNase reversible (*McDonald et al., 2017*). Zudem konnte gezeigt werden, dass in schwer kranken COVID-19 Patienten NETs eine Rolle spielen bei der Entwicklung von Thrombosen (*Middleton et al., 2020*). Die disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) ist eine schwere Komplikation verschiedener systemischer Erkrankungen wie zum Beispiel Infektionen, hämatopoetische oder solitäre Tumoren oder Traumata (*Wada et al., 2014*). Es handelt sich bei der DIC um einen Symptomkomplex, der mit der systemischen Aktivierung des Gerinnungssystems und der Ausbildung von Thromben (Hyperkoagulabilität) beginnt, und nicht selten in Multiorganversagen und schweren Blutungen

(Hypokoagulabilität) endet (*Taylor et al., 2001*).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass bei Patienten mit einer DIC, ein indirekter oder direkter Nachweis von NETs möglich ist. Die Gruppe um Delabranche et al. (2017) konnte nachweisen, dass bei Patienten, die in Folge einer Sepsis eine DIC entwickelten, erhöhte Konzentrationen an NETs vorlagen, als bei jenen Patienten, die nur septisch waren (*Delabranche et al., 2017*). Auch die Gruppe um Stiel et al. (2019) konnte durch Zellfluoreszenz direkt belegen, dass bei Patienten, die infolge eines septischen Schocks eine DIC entwickelten, NETs nachzuweisen waren. Bei gesunden Kontrollpatienten oder jenen die eine Sepsis ohne DIC zeigten gelang der direkte Nachweis von NET-Strukturen nicht (*Stiel et al., 2019*).

Wie bereits bei septischen Patienten (*Forsblom et al., 2014*) zeigt auch der direkte Nachweis von NETs bei humanen Patienten mit DIC einen negativ prognostischen Wert (*Mao et al., 2021, Abrams et al., 2019*). Zusätzlich konnte mittels Assay prädiktiert werden, ob jene Patienten im Verlauf ihres Klinikaufenthaltes eine DIC als Folge ihrer Sepsis entwickelten (*Abrams et al., 2019*). Die Höhe der gemessenen cfDNA scheint mit der Schwere der DIC zu korrelieren (*Rannikko et al., 2018*).

4. ADVIA® 2120i, RETIC Kanal und der NACU

Der ADVIA® 2120i der Firma Siemens Healthcare ist ein vollautomatisiertes Hämatologiesystem, das in der Lage ist, aus Vollblutproben tierartsspezifisch ein komplettes großes Blutbild inklusive Retikulozytenanalyse zu erstellen. Es besteht die Möglichkeit Panels aus verschiedenen Messparametern auszuwählen: komplette Zellzahl (CBC), komplette Zellzahl inklusive Leukozytendifferenzierung (CBC/diff), komplette absolute und prozentuale Retikulozytenzahl inklusive Indizes (retic), komplette Zellzahl mit Retikulozytenmessung (CBC/retic), Leukozytendifferenzierung und Retikulozytenmessung (CBC/diff/retic) (*Siemens Healthcare Diagnostics 2010*).

Grundlegend besteht der ADVIA® 2120i aus zwei Hauptbestandteilen. Zum einen dem Analysegerät, bestehend aus Elektronik, Hydraulik, Pneumatik und der Probenverarbeitung, zum anderen aus dem Computeranteil, inklusive Bildschirm, Maus und Tastatur. Teil des Analysegeräts stellt der sogenannte Unified fluid circuit dar, in welchem die gewonnene Probe mittels Sherventils auf die fünf unterschiedlichen Reaktionskammern aufgeteilt wird (Hgb-, Baso-, RBC-, Retis- und Peroxidase-Reaktionskammer). Dort werden sie mit den, für die Messungen, notwendigen Reagenzien versetzt (*Siemens Healthcare Diagnostics 2010*).

Der ADVIA® 2120i verwendet zur Analyse der Probe Streulichtmessung, Lyse der Leukozyten und Färbungen mit Myeloperoxidase und Oxazine 750 (*Siemens Healthcare Diagnostics 2010*).

Für die Messung und Differenzierung der Leukozytenzahl sind im ADVIA® 2120i zwei getrennte Kanäle vorhanden, die synergistisch zueinander wirken. Im Peroxidasekanal erfolgt, nach vorheriger Lyse der Erythrozyten, eine Messung des Peroxidasegehalts der vorhandenen Zellen und daraus resultierend eine Unterscheidung in Peroxidase-positive (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten) und Peroxidase-negative (Lymphozyten, Basophile Granulozyten, Large unstained cells (LUC)) Leukozyten. Die nicht lysierten Thrombozyten werden anhand ihres Größenunterschieds zu Leukozyten unterschieden. Mittels Halogen-Lichtquelle wird die Größe (Streulichtmessung) und die Absorptionsfähigkeit (Färbeintensität) der gemessenen Zellen

bestimmt. Die Absorption verhält sich proportional zum Peroxidasegehalt der jeweiligen Zelle und wird im generierten Scattergramm auf der X-Achse angezeigt. Die Größe wird in dieser Darstellung auf der Y-Achse aufgetragen (siehe Abbildung 1) (Siemens Healthcare Diagnostics 2010).

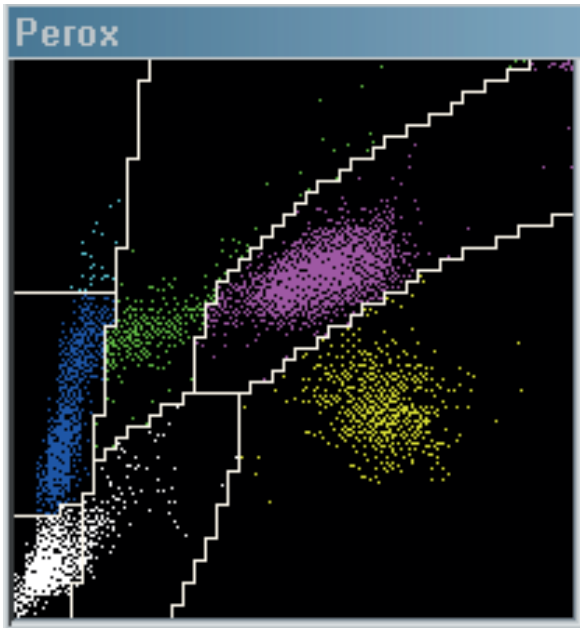


Abbildung 1 Scattergramm des Peroxidasekanal. weiß: Zelldebris und kernhaltige Erythrozyten (links) und Thrombozytenaggregate (rechts); blau: Lymphozyten; türkis: Large unstained cells (LUC); grün: Monozyten; magenta: neutrophile Granulozyten, darunter in gelb eosinophile Granulozyten

Der zweite Kanal, der vor allem zur Bestimmung der Leukozytenzahl genutzt wird, ist der Lobularitäts-/Kerndichtekanal, oft auch als Basokanal bezeichnet. In diesem werden mittels Zugabe von Surfactant und Phthalsäure neben Erythrozyten und Thrombozyten, auch die Zellmembranen aller Leukozyten lysiert. Ausgenommen davon sind Lyse-resistente Zellen, vor allem basophile Granulozyten. Es erfolgt eine Klassifizierung anhand von Größe, Lobularität, Kerndichte und Zahl der Zellen. Somit lässt sich nicht nur die Anzahl der jeweiligen Leukozyten bestimmen, sondern auch eine Aussage über Kernmorphologie sowie Resistenz gegen Zellyse treffen. Die Erkennung von basophilen Granulozyten basiert auf dem vergleichsweise größeren Volumen der intakten Zellen gegenüber den übriggebliebenen Kernen der lysierten Leukozyten (ADVIA Operator Guide).

Es ist anzumerken, dass keine echte Messung von basophilen Granulozyten erfolgt, sondern nur Zellen als Basophile klassifiziert werden, die sich als lyseresistent (im besagten Kanal, unter vorherig beschriebenen Bedingungen) erweisen und in ihren Lichtbrechungseigenschaften am ehesten den basophilen Granulozyten entsprechen. Dieser Tatsache geschuldet ist das recht häufige Auftreten einer sogenannten „Pseudobasophilie“ (siehe Abbildung 2). Dabei handelt es sich um falsch hoch gemessene Zahlen an „basophilen Granulozyten“, die dadurch entstehen, dass im Blut vermehrt lyseresistente Zellen vorliegen, die eine ähnliche Lichtbrechung haben wie basophile Granulozyten. Beobachtet werden kann dies vor allem bei neoplastischen Erkrankungen wie akuten oder chronischen Leukämien, Lymphomen, leukämischen Formen von Myelomen, eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden Plasmazellen, oder bei aktivierten Granulozyten. Aber auch Fehler im Antikoagulanz (Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)) oder Gerätefehlfunktionen können zu einer Pseudobasophilie führen (*Gibbs et al., 2009*).

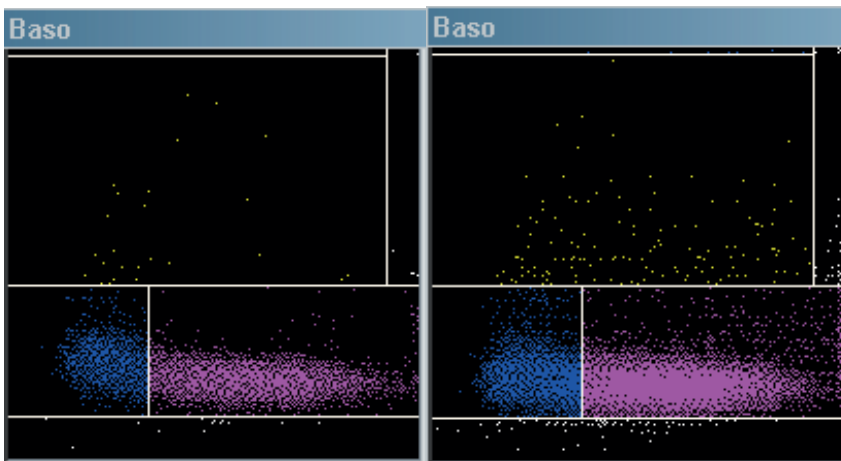


Abbildung 2 Scattergramm BASO Kanal, links gesund, rechts Pseudobasophilie, blau mononukleäre Zellen (Monozyten, Lymphozyten), magenta: neutrophile und eosinophile Granulozyten, gelb: Basophile bzw lyseresistente Zellen, Pseudobasophilie

Durch die Messung ähnlicher Parameter in verschiedenen Kanälen erfolgt ein interner Abgleich der Ergebnisse. So führt zum Beispiel eine unzureichende Übereinstimmung der gemessenen Leukozytenzahlen im Peroxidasekanal und Lobularitätskanal zur Erstellung von Fehlermeldungen,

die an den Gerätebediener gemeldet werden. Ähnliches gilt bei Abweichungen im Peroxidasekanal im Bereich der LUCs und bei der Ausbildung einer sogenannten Blastenase im Lobularitätskanal, welches zur Generierung einer Blastenmeldung führt (*Harris et al., 2005*). Hierin besteht ein Selbstkontrollmechanismus, was erheblich zur Qualitätskontrolle der Messungen beiträgt.

Die Bestimmung der NACUs findet im Retikulozytenkanal statt. Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

4.1. Retikulozytenmessung

Der RETIC-Kanal des ADVIA®2120i beinhaltet, neben den zwei Detergenzien, welche die notwendige morphologische Veränderung der Blutzellen hervorrufen, auch Oxazin 750, welches ein Abkömmling vom Neumethylenblau ist und zur Anfärbung von Nukleinsäuren verwendet wird. Durch den unterschiedlichen Gehalt von DNS in reifen Erythrozyten (enthalten keine DNS mehr) und Retikulozyten lassen sich diese hier unterscheiden. Ein konstantes Volumen der Suspension passiert die Flusszelle, wird dort durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und mittels eines Argonlasers abgetastet. Bei dieser Methode wird das auftreffende Licht in einem flachen ($2-3^\circ$) und steilem ($5-15^\circ$) Winkel gestreut, was von einer Photodiode gemessen wird. Die beiden gemessenen Winkel sind proportional zur Größe und Hämoglobinkonzentration der Zellen. Zusätzlich wird durch einen Detektor die Absorption gemessen, welche proportional zum DNS-Gehalt ist. Neben der absoluten Darstellung, erstellt der ADVIA® 2120i ebenfalls ein Scattergramm der im autoRETIC gemessenen Probe. In dieser werden die Zellen nach ihrer Größe (y-Achse) und ihrer Anfärbbarkeit mittels Oxazin 750 bzw. ihrer Reife (x-Achse) in einem Koordinatensystem dargestellt (*Siemens HealthCare Diagnostics 2010*).

Im RETIC Kanal des ADVIA® 2120i fallen vor allem bei schwer kranken Patienten immer wieder Events im unteren Bereich des Scattergramms auf. Diese zeigen sich von geringer Größe, färben sich aber stark mit Oxazin 750 an, was für einen hohen Gehalt an Nukleinsäure spricht (siehe Abbildung 3). Diese Events werden als Nucleic acid containing units bezeichnet. Es besteht die Vermutung, dass es sich hierbei zum Großteil um NET-Strukturen handelt, welche von aktivierten segmentkernigen Neutrophilen Granulozyten im Zuge der Immunantwort freigesetzt werden. Neben besagten NETs können jedoch auch Bakterien, Pilze, RNS von lysierten Retikulozyten, DNS-

Stränge von lysierten Leukozyten oder zellfreie DNS/RNS anderen Ursprungs in diesem Parameter identifiziert werden (Kleinert 2019, Gibbs et al., 2020) (siehe Abbildung 3).

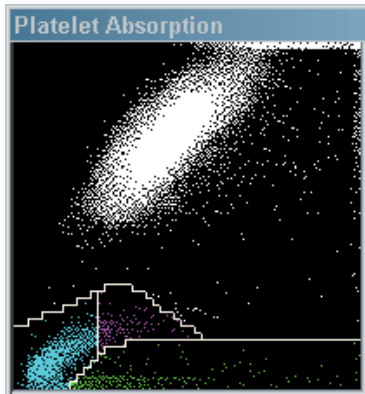


Abbildung 3 Retic-Scattergramm einer Messung des ADVIA® 2120i (Firma Siemens Healthcare), in weiß: Erythrozyten mit Retikulozyten (rechts aus dem Bild ziehend), in Türkis Thrombozyten mit angrenzenden, in magenta abgebildeten, retikulierten Thrombozyten, unten rechts (hellgrün) NACU-Count

Tabelle 3 Darstellung der gemessenen Werte, zugehörig zum Scattergramm des obigen Patienten

Parameter	Gemessener Wert
<i>%RtcPlts</i>	6,98
<i>RtcPlts Count</i>	130
<i>RtcPlts Threshold</i>	12
<i>RtcPlt Vi</i>	41,6
<i>RtcPlt Cl</i>	14,1
<i>NACU Count</i>	240

5. Fragestellung

Ziel dieser Dissertation ist, den NACU-Count beim Hund hinsichtlich der diagnostischen und prognostischen Bedeutung zu evaluieren. Es gibt zahlreiche Berichte, dass cfDNA und NETs eine Rolle bei einer überschießenden und deregulierten Immunantwort und bei schweren systemischen Entzündungsreaktionen spielen. Es besteht daher die Vermutung, dass sich dieser Marker als weiterer Bestandteil der klinischen Labordiagnostik nutzen lässt, um verschiedene Krankheitsprozesse besser detektieren zu können.

NACU entsprechen nicht zwangsläufig NET-Strukturen, jedoch besteht die Hypothese, dass NET-Strukturen einen hohen Prozentsatz dieses Parameters ausmachen (*Kleinert 2019*). Aber auch zellfreie DNS aus apoptotischen oder nekrotischen Zelluntergängen könnten in diesem Marker erfasst werden (*Gibbs et al., 2020*).

Da es sich beim NACU-Count um einen neuen und wenig erforschten Parameter handelt, soll in dieser Arbeit, neben der Bestimmung eines Referenzintervalls des NACU, eine Bestimmung der verschiedenen Einflussfaktoren auf den NACU erfolgen.

Zum einen soll eine Betrachtung hinsichtlich verschiedener klinischer Parameter erfolgen, wie zum Beispiel der Einfluss des Gesundheitsstatus des Patienten, der Einfluss der Körpertemperatur, der Einfluss von Medikamenten (Antibiotika, Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs), Immunsuppressiva, Glukokortikoide, etc.), oder auch ob sich verschiedene Erkrankungsarten hinsichtlich ihres NACUs unterscheiden (sterile oder infektiöse Entzündungen, Neoplasien, Gewebeschäden, etc.). Zum anderen soll die Evaluation des NACU- Counts als prognostischer Marker im klinischen Alltag erfolgen.

Zusätzlich soll eine Betrachtung von verschiedenen labordiagnostischen Standardparametern und ihr Verhältnis zum NACU-Count erfolgen: Zusammenhänge zwischen NACU und den Zellen des standardisierten Differentialblutbildes (Gesamtleukozytenzahl, Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten,) sowie Markern einer akuten Entzündungsreaktion (Stabkernige neutrophile Granulozyten, CRP).

Korrelationen zwischen NACU und den vorherig genannten Faktoren können zusätzlich die bestehende Grundhypothese (NACU erfasst überwiegend NETose und ermöglicht eine Quantifizierung dieser) bekräftigen.

Die oben genannten Punkte sollen als Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich des

klinischen Nutzens des NACU-Counts dienen. Bei dem Studium der Literatur, die sich mit dem Thema NETose beschäftigt, fällt auf, dass, seit der Entdeckung im Jahre 2004, das Wissen zu diesem Thema rasant zugenommen hat. Es gibt etliche Krankheitskomplexe, bei denen NETose eine Rolle zu spielen scheint, und noch mehr Einflussfaktoren auf die Freisetzung von NETs. Eine voll umfassende und detaillierte Betrachtung dessen ist hier nicht möglich. So soll diese Arbeit eher bestätigen, dass der NACU ein Potential für die standardisierte klinische Labordiagnostik und Anstoß geben für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich seines Nutzens im klinischen Alltag hat.

6. Material und Methoden

Die vorliegende Studie gliedert sich wie folgt: retrospektiver Teil I (Referenzwertpopulation), retrospektiver Teil II (gemischte Population kranker Patienten) und prospektiver Teil III (spezifische Erkrankungen). Jede dieser drei Gruppen ist unabhängig voneinander, Überlappungen in den Patienten gibt es nicht.

6.1 Referenzwertpopulation

Die erste Population dient dazu, ein Referenzintervall für den NACU-Count zu etablieren und eine Grundlage für die Betrachtung abweichender NACU-Werte zu schaffen, also Ereignisse, die über den gebildeten Referenzbereich hinausgehen. Dazu wurden Blutproben gesunder Patienten gesammelt, die in der Klinik für Kleintiere aufgrund eines allgemeinen Gesundheitschecks oder zur Blutspende vorstellig wurden und denen in diesem Rahmen Blut entnommen wurde. Notwendig war das Vorliegen einer hämatologischen Messung am ADVIA® 2120i.

6.1.1 Variationskoeffizient

Zusätzlich wurde Restblut von einem gesunden und einem erkrankten Hund verwendet. Beide Proben wurden jeweils zehn Mal am ADVIA® 2120i gemessen. Es wurden Standardabweichung und Mittelwerte bestimmt. Dieses Vorgehen soll der Bestimmung eines Variationskoeffizienten (CV) dienen.

6.1.2 Signalement und diagnostische Aufarbeitung der Patienten

Das Signalement eines jeden Patienten (Rasse, Alter, Geschlecht) ist in der jeweiligen Patientenakte vermerkt. Die ausführliche Anamnese, sowie die klinische Untersuchung erfolgten durch Tierärzte der Klinik für Kleintiere.

Die Diagnosestellung „gesund“ erfolgte anhand der Befunde der Anamnese, klinischen Untersuchung und der hämatologischen und klinisch chemischen Laboruntersuchung durch die behandelnden Tierärzte.

6.1.3 Probenentnahme

Die Probengewinnung erfolgte entweder durch sterile Venenpunktion der Vena cephalica antebrachii, Vena saphena oder Vena jugularis und Überführung in die benötigten Probengefäße (Saugröhrchen (Multivette© 600, Firma Sarstedt, Nümbrecht) mit 0,6ml Fassungsvermögen und Mikro-Probengefäße (Firma Sarstedt, Nümbrecht) mit 1,3ml Fassungsvermögen. Für die Parameter der hämatologischen Untersuchung wurde K2-EDTA-antikoaguliertes Vollblut verwendet. Für die klinisch-chemische Analyse (inklusive CRP) wurde mittels Lithium-Heparin antikoaguliertes Blut verwendet. Für jede Blutprobenentnahme lag eine medizinische Indikation vor, es wurden keine Blutentnahmen ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke durchgeführt.

6.1.4 Probenverarbeitung und -lagerung

Die gewonnenen Proben wurden innerhalb einer Stunde nach Entnahme im Zentrallabor des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität analysiert. Bei der Messung der klinisch-chemischen Parameter wurde die Probe für eine Minute bei 9500g zentrifugiert, abpipettiert und dem klinischem Analyzer Pentra C400 (Firma: Horiba Medical, Frankreich) zugeführt. Bei Probenentnahme außerhalb der Öffnungszeiten wurde die Proben durch Tierärzte/innen der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin nach oben genanntem Schema abzentrifugiert, kühl bei +4-6°C (Heparinplasma) gelagert und in der Regel am nachfolgenden Werktag gemessen. Für die Messung der hämatologischen Parameter wurde das mittels EDTA antikoagulierte Vollblut zügig dem ADVIA® 2120i zugeführt.

6.1.5 Messungen NACU-Count

Der NACU-Count ist zum aktuellen Zeitpunkt ein nicht validierter Parameter, der nicht standardisiert in den Profilen des ADVIA® 2120i angegeben wird.

Während jeder Analyse des ADVIA® 2120i werden, neben den Parametern der Standardprofile, auch zahlreiche Rohdaten erstellt und abgespeichert. Die Auswertung dieser Rohdaten wurde von Herrn Dipl. Ing. Gottfried Prechtel, Fa Siemens durch playback- mittels einer noch nicht freigegebenen neuen MS-Programm Version durchgeführt. Hierbei erfolgte eine quantitative Angabe des gemessenen NACU-Counts. Zum Ende der Studie konnte nach dem Update der ADVIA® 2120i Software das playback auch selbst durchgeführt werden.

Beim NACU handelt es sich um einen Parameter ohne Einheit.

6.1.6 Datenverarbeitung

Die benötigten Informationen zu den untersuchten Tieren wurden aus dem Programm EasyVet akquiriert. Dem Programm LabMan wurden die benötigten Daten der hämatologischen und klinisch-chemischen Messgrößen entnommen. Zusammen wurden alle Daten in einer Exceltabelle gesammelt.

6.2 Gemischte Population kranker Patienten

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden retrospektiv Daten von Hunden ausgewertet, die im Zeitraum von 02.04.2014 bis 09.12.2016 in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität vorstellig wurden und denen, aufgrund medizinischer Indikation, Blut entnommen wurde. Die Diagnosestellung erfolgte anhand der Befunde der Anamnese, klinischen Untersuchung und der weiterführenden Untersuchungen (Labordiagnostik und bildgebende Verfahren) durch die behandelnden Tierärzte. Es wurden sowohl Patienten die zur Erstvorstellung, Kontrolluntersuchung oder solche, die stationär in der Klinik waren, eingeschlossen, als auch Patienten, die zur Blutspende vorstellig wurden. Es wurden ebenfalls Patienten zugelassen, die während ihres Klinikaufenthaltes mehrere Blutentnahmen an unterschiedlichen Tagen erfuhren. Aus diesem Grund handelt es sich bei n= im Folgenden stets um die Anzahl der Messungen und nicht der Patienten, wenn nicht anders angegeben.

Die Probenentnahme erfolgte wie bereits in 6.1.3 beschrieben. Darüber hinaus wurden auch Blutproben aus peripheren oder zentralen Venenkathetern entnommen.

Die Messung der Parameter der Hämatologie und der klinischen Chemie wurde wie unter 6.1.5 beschrieben durchgeführt, die Gerinnungsdiagnostik erfolgte aus Zitratplasma, welches für fünfzehn Minuten bei 24189g zentrifugiert wurde und anschließend dem STA Compact Max3 (Firma: Stago, Frankreich) zugeführt wurde. Gemessen wurden Prothrombin - & aktivierte partielle Thromboplastin Zeit (PT/aPTT), D-Dimere, Antithrombin III und Fibrinogen.

Ausgeschlossen wurden Patienten bei denen im Zytogramm die Wolken zwischen retikulierten Thrombozyten und NACU nicht eindeutig getrennt waren (siehe Abbildung 4).

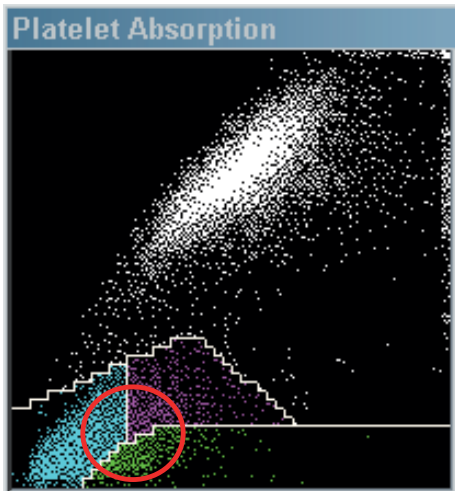


Abbildung 4 Visuelle Interferenz, mangelnde Trennung zwischen retikulierten Thrombozyten (magenta), NACU (grün) und maturaen Thrombozyten (türkis). Dies führt zu visuellen Interferenzen.

Die verbliebene Gruppe wurde zur weiteren Aufarbeitung der Fragestellungen in weitere Untergruppen und Subgruppen aufgeteilt.

6.2.1 Diagnosegruppen:

Die Auftrennung der Population hinsichtlich ihrer Diagnosen ergab eine Aufteilung wie folgt:

- **Gesunde Kontrollgruppe** (anhand klinischer Untersuchung und Labordiagnostik als gesund klassifizierte Individuen)
- **Entzündliche, infektiöse Erkrankungen** (Erkrankungen, die eine deutliche Entzündungskomponente aufgrund einer Infektion (bakteriell, viral, parasitär) aufweisen. Hierbei gilt als Nachweis infektiöser Erreger eine positive mikrobiologische, zytologische/pathohistologische oder weiterer labordiagnostische Untersuchung (Polymerase Kettenreaktion (PCR), Antikörpernachweis, etc.).

Ebenfalls eingeschlossen sind Erkrankungen, bei denen eine bakterielle Beteiligung aus klinischer Erfahrung sehr wahrscheinlich ist (z.B. Aspirationspneumonie))

- **Entzündliche, nicht infektiöse Erkrankungen** (Erkrankungen, die nach heutigem Wissensstand entzündlicher Genese sind, jedoch ohne Beteiligung von Infektionserregern, z.B. akute Pankreatitis, immunmedierte Anämien, akut hämorrhagisches Diarrhoe Syndrom (AHDS))
- **Nicht entzündliche Erkrankungen** (Erkrankungen, bei denen zum aktuellen Zeitpunkt eine Entzündung keine Rolle spielt z.B. angeborene Herzerkrankungen)
- **Neoplastische Erkrankungen** (Erkrankungen, die sich durch Gewebeentartung definieren, sowohl maligne als auch benigne)
- **Gewebeschaden** (Erkrankungen, bei denen die Schädigung des Gewebes aufgrund von äußeren Noxen im Vordergrund steht, akzidentell oder iatrogen)
- **Diverse Erkrankungen** (Hunde mit mehreren oder systemischen Erkrankungen, oder solche, die nicht näher klassifizierbar sind)

Diese Gruppe wird als 2 a bezeichnet. Für die weitere Evaluierung der nachfolgenden Fragestellungen wurde die gesunde Kontrollgruppe ausgeschlossen, sodass sich die weiteren Untersuchungen sich nur noch auf als krank definierte Patienten beziehen. Sie stellen somit die Teilgruppe dar die im, als Teil 2b betitelten, Organigramm beschrieben wird.

6.2.2 Einfluss von Medikamenten:

Die Betrachtung, ob Medikamente einen Einfluss auf den NACU haben, ergab eine Unterteilung in zwei Gruppen (Medikamente erhalten vs. Keine Medikamente erhalten). Hier soll angemerkt werden, dass nur Medikamente, denen ein Einfluss auf die Immunantwort (also NSAIDs inklusive Metamizol, Immunsuppressiva z.B. Ciclosporin A, Mykophenolat- Mofetil, oder Oclacitinib, Glukokortikoide oder Antibiotika) zugeschrieben wird, berücksichtigt wurden. Andere Medikamente wurden hier nicht berücksichtigt.

6.2.3 Körperinnentemperatur:

Zur Betrachtung eines möglichen Zusammenhanges zwischen Körperinnentemperatur und NACU wurde die Gruppe aufgeteilt in Hypothermie (<37,8°C), Normothermie (37,9-39,1°C) und

Hyperthermie/Fieber ($>39,2^{\circ}\text{C}$). Zusätzlich wurde eine Regression der NACU-Werte im Bezug zur absoluten Körpertemperatur ermittelt.

6.2.4 Labordiagnostische Marker einer akuten Entzündung:

Es wurden Zusammenhänge zwischen NACU und labordiagnostischen Markern einer akuten Entzündungsreaktion evaluiert. Hier erfolgt die Betrachtung hinsichtlich NACU und jeweils folgenden Parametern:

- CRP
- Gesamtleukozytenzahl
- absolute Zahl neutrophiler Granulozyten
- absolute Zahl eosinophiler Granulozyten
- gemessene Zahl basophiler Granulozyten,
- absoluter Zahl stabkerniger neutrophiler Granulozyten
- absolute Zahl an Lymphozyten
- absolute Zahl an Monozyten

Es ist hier anzumerken, dass die Ergebnisse der gemessenen Anzahl an basophilen Granulozyten am ADVIA® 2120i aufgrund der bestehenden Messmethodik überaus kritisch betrachtet werden müssen. Hierauf wurde bereits in der vorherigen Erklärung der Messmethodik des ADVIA® 2120i eingegangen (siehe Abschnitt: 4. ADVIA® 2120i, RETIC Kanal und der NACU).

6.2.5 Retikulozyten:

Da sich in der Literatur Berichte darüber fanden, dass cfDNA zu einem Teil aus erythropoetischen Prozessen stammen kann, wurde als Marker der Erythropoese die Anzahl der Retikulozyten betrachtet.

6.2.6 Prognose:

Eine weitere Unterteilung der Population in Hinblick auf die Fragestellung der Prognose ergab eine Unterteilung in überlebend und verstorben. Diese Gruppe wurde als 2 c bezeichnet. Dabei wurde die Gruppe aufgeteilt nach jenen, deren 3- Monatsprognose positiv ausfiel, also die 3 Monate nach Aufenthalt noch lebten, und jenen, deren 3 Monatsprognose negativ ausfiel, also die 3 Monate nach

Aufenthalt nicht mehr lebten. Es wurde keine Unterscheidung getroffen, ob die Patienten euthanasiert wurden oder auf natürlichem Wege gestorben sind. Auch wurden Beweggründe, wie finanzielle Aspekte, nicht berücksichtigt.

Aus dieser Gruppe wurden sowohl gesunde Patienten als auch jene ausgeschlossen, die während ihres stationären Aufenthaltes oder im Rahmen von Kontrollen multiple Blutuntersuchungen erfuhren. Es wurde entweder die erste durchgeführte Messung beibehalten, oder jene Messung zum Zeitpunkt des schwersten Krankheitszustandes ausgewählt. Zum Beispiel wurde bei einem Hund, der mit einem gastrointestinalen Fremdkörper vorstellig wurde und *post operationem* eine Nahtdehiszenz der Enterektomie erlitt mit daraus resultierendem septischem Abdomen, der zweite NACU-Wert gewählt, da diese Komplikation schlussendlich die lebenslimitierende Komponente des Krankheitsgeschehens darstellte.

6.3 Spezifische Erkrankungen

Da in einer ersten vorläufigen Auswertung einzelne spezielle Krankheitsbilder herausstachen, fokussiert sich der prospektive dritte Teil der Studie auf definierte Krankheitsbilder: Sepsis, Immunhämolytische Anämie, akute Pankreatitis und disseminierte intravasale Koagulopathie. Der Studienzeitraum war vom 01.01.2021 bis zum 01.02.2022

6.3.1 Signalement und diagnostische Aufarbeitung

Es wurde wie bereits in 6.1 und 6.2 beschrieben vorgegangen.

Zusätzlich wurden Kriterien zur Zuordnung in die folgenden Gruppen formuliert.

6.3.1.1 Immunhämolytische Anämie (IMHA)

Zur Diagnosestellung einer immunhämolytischen Anämie wurden Anzeichen einer autoimmunen Zerstörung der Erythrozyten (vermehrt Sphärozyten beim Hund, positive Autoagglutination, persistierende Autoagglutination nach Waschen, positiver Coombs- Test, ein Persistieren der Autoagglutination nach „Waschen der Erythrozyten“) und Hinweise eine Hämolyse (Hyperbillirubinämie, signifikante Billirubinurie oder Ikterus ohne funktionelle oder obstruktive Lebererkrankungen oder Hinweisen auf Sepsis, Hämoglobinämie, Hämoglobinurie sowie erythrocyt-ghosts im Blutausstrich) herangezogen. Dabei sollten zwei Anzeichen einer immunmedierten Zerstörung in Kombination mit Hinweisen auf Hämolyse vorliegen. Bei Ausschluss anderer Ursachen einer Anämie konnten auch einzelne der oben genannten Marker zur Diagnosestellung ausreichen (*Garden et al., 2019*).

6.3.1.2 Akute Pankreatitis

Die Diagnosestellung einer Pankreatitis erfolgte anhand eines passenden klinischen Bildes (abdominaler Schmerz, akute gastrointestinale Symptome, Dehydratation, (blutiges) Erbrechen, Anorexie, Schwäche) im Zusammenhang mit einer deutlichen Erhöhung einer pankreasspezifischen Lipase (1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester- Lipase (DGGR-Lipase oder canine pankreasspezifische Lipase (cPLI)). Aufgrund der reduzierten renalen Clearance, der die beiden Lipasen bei eingeschränkter Nierenfunktion unterliegen, ist bei Vorliegen einer Azotämie eine 3-fache Überschreitung des Referenzbereiches notwendig um als klinische Pankreatitis gewertet zu werden

6.3.1.3 Sepsis

Die Diagnosestellung einer Sepsis basiert auf einer bakteriellen Infektion mit nachfolgendem Organversagen.

Die Definition eines Organversagens erfolgte nach dem Punktesystem des Sequential organ failure assessment Scores (SOFA-Score). Patienten müssen mindestens zwei Punkte erreichen, um ein Organversagen aufzuweisen (*Singer et al., 2016*).

Folgende sechs Organsysteme mit dazugehörigen Parametern: Leber (Bilirubinkonzentration), Niere (Kreatininkonzentration), Gerinnungssystem (Thrombozytenzahl), Kreislaufsystem (Blutdruck), Lunge (Horovitz-Quotient ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)) und zentrales Nervensystem (Glasgow Coma scale) wurden betrachtet (*Ripanti et al., 2012*).

Aufgrund der einfacheren Anwendbarkeit, im Vergleich zum Glasgow Coma Scales, wurde zur Betrachtung der Funktion des Zentralen Nervensystems der Mentation Score verwendet (*Hayes et al., 2010*). Bei Betrachtung der Lungenfunktion wurde zusätzlich zu dem im SOFA-Score beschriebenen $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ Verhältnis, als Alternative das Verhältnis von $\text{SPO}_2/\text{FiO}_2$ verwendet, bei Patienten bei denen keine arterielle Blutgasanalyse (BGA) bestimmt wurde. Dieser ist in der aufgeführten Skalierung äquivalent zu den Werten $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (*Pandharipande et al., 2009*).

Da das Zentrallabor des Fachbereichs 10 der Justus-Liebig-Universität teilweise andere Einheiten verwendet, wurden diese umgerechnet. Die genaue Punkteverteilung nach oben genanntem Schema ist in untenstehender Tabelle nachzuvollziehen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 modifizierter SOFA-Score nach Ripanti et al., 2012, ergänzt nach Pandharipande et al., 2009 und Hayes et al., 2010

Punkte	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
Organsystem Parameter					
Leber Bilirubin $\mu\text{mol/l}$	<10,2	<23,9	<85	<187	>187,1
Niere Kreatinin $\mu\text{mol/l}$	<123,2	<167,2	<299	<440	>440
Gerinnung Thrombozytenzahl x $10^9/l$	>150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Kreislauf Blutdruck	Keine Hypotension	Mittlere arterieller Blutdruck <60mmHg	Dopamin oder Dobutamin <5 $\mu\text{g/kg} \times$ Minute	Dopamin >5 $\mu\text{g/kg} \times$ Minute, Epinephrin/Norepinephrin < 0,1 $\mu\text{g/kg} \times$ Minute	Dopamin > 15 $\mu\text{g/kg} \times$ Minute, Epinephrin >0,1 $\mu\text{g/kg}$ \times Minute, oder Norepinephrin < 0,1 $\mu\text{g/kg} \times$ Minute
Lunge PO2/FiO2 mmHg SPO2/FiO2	>400 >512	≤ 400 ≤ 512	≤ 300 ≤ 357	≤ 200 ≤ 214	≤ 100 ≤ 89
Zentrales Nervensystem Mentation score	Normal	Apathisch	Nicht gehfähig, assistiert stehfähig	Seitenlage responsiv	Seitenlage, nicht responsiv

6.3.1.4 Disseminierte intravasale Koagulopathie

Als Klassifizierung, für eine DIC wurden folgende Parameter herangezogen: Erhöhung der aPTT und PT um mindestens 25% des Referenzbereiches: aPTT > 15,31 Sekunden (Referenzbereich 9,85-14,22 Sekunden), PT > 10,1 Sekunden (Referenzbereich 7,1-9,5 Sekunden)), reduzierte Antithrombin III Aktivität (Referenzbereich von 107-128%), erhöhte Anzahl an zirkulierenden D-Dimeren (Referenzbereich <0,67), eine echte Thrombozytopenie (moderate Anzahl von

Thrombozytenaggregaten) von unter 150 000 Thrombozyten (G/l) und eine Hyper- oder Hypofibrinogenämie (Referenzbereich 1,1-3,5 g/L).

Als klassisch für das Vorliegen einer DIC galten hierbei Patienten, die eine passende auslösende Erkrankung zeigen, sowie mindestens drei abnormale, das Gerinnungssystem betreffende, Laborbefunde aufweisen (*Wada et al., 2003*).

Da schwerwiegende Leberfunktionsstörungen ebenfalls einen starken Einfluss auf das Gerinnungssystem haben, wurden Patienten, mit einer schwergradig reduzierten Leberfunktion ausgeschlossen.

6.3.1.5 Mehrere Diagnosen

Da sich viele der oben beschriebenen Krankheitsbilder überschneiden und teilweise auseinander hervorgehen (zum Beispiel DIC in Folge einer Sepsis, Pankreatitis in Folge der Gewebhypoxie bei einer IMHA, etc.), wurden jene Patienten, die mehr als eine der vier oben beschriebenen Erkrankungen aufweisen, in die Gruppe „Mehrere Diagnosen“ sortiert.

7. Statistik

7.1 Software

Die gewonnenen Daten wurden zur weiteren statistischen Auswertung in einer Excell-Tabelle festgehalten.

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit den Programmen GraphPad Prism 6.01 und MedCalc (Version 20.112, MedCalc Software Ltd). Eine visuelle Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mittels GraphPad Prism 6.01.

7.2 Bewertungsgrundlagen

Der Signifikanzwert wurde auf $p < 0,05$ (Signifikanzniveau 95%) festgelegt.

7.3 Methoden der Datenanalyse

Zur Bestimmung des Referenzintervalls wurde aufgrund der Gruppengröße, wie von den Guidelines des American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) empfohlen, eine nicht-parametrische Methode verwendet (*Friedrichs et al., 2012*). Zusätzlich zeigte sich eine mangelnde Normalverteilung in der Testung, weshalb ebenfalls nicht-parametrische Methoden zur weiteren Datenanalyse verwendet wurden (Shapiro Wilk Test $W=0,7627$, $p < 0,0001$).

Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Werte, konnte auf die Bestimmung eines unteren Referenzintervalls verzichtet werden. Es wurde ein 90% Konfidenzintervall für die obere Referenzintervallgrenze gewählt.

Zur Überprüfung einer etwaigen Altersabhängigkeit des NACU schloss sich der Transformation der Daten mittels Box-Cox Verfahren eine anschließende polynomiale Regression an.

Für die Auswertung jener Parameter, die nur zwei Merkmalsausprägungen aufwiesen, wurde eine Auswertung mittels Mann-Whitney-Test vorgenommen. Dies gilt für die Parameter Medikamentenvorbehandlung (ja oder nein) und Prognose (Überleben oder Versterben).

Für jene Parameter die mehr als zwei Ausprägungen haben, wurde eine Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test gewählt. Dies betrifft die Diagnosegruppen (gesund, entzündlich infektiös, entzündlich nicht infektiös, etc.), Körpertemperatur (Hypo-, Normo-, Hyperthermie) und

Ätiologie in der prospektiven Gruppe (IMHA, Pankreatitis, Sepsis, DIC, Mehrere).

Bei Betrachtung der Zusammenhänge zwischen NACU-Count und absoluten Werten wurde eine Spearman-Korrelation berechnet. Dies erfolgte bei allen Parametern der Gruppe „labordiagnostische Marker einer akuten Entzündungsreaktion“, „Retikulozyten“ und bei der absoluten gemessenen Körpertemperatur.

8. Ergebnisse

8.1 Bestimmung eines Referenzintervalls für den nucleic acid containing unit count (NACU)

8.1.1 Beschreibung der Gruppe 1 (Referenzintervall)

Die Einschlusskriterien erfüllten 120 Hunde folgender Rassen:

Tabelle 5 Rasseverteilung in Referenzwertpopulation

Rasse	Anzahl
Mischling	25
Labrador Retriever	21
Deutscher Schäferhund	17
Golden Retriever	14
Rhodesian Ridgeback	6
Bearded Collie	5
Border Collie	3
Deutsche Dogge	3
Beagle	2
Bordeaux Dogge	2
Cocker Spaniel	2
Altdeutscher Hütehund	1
Australian Kettle Dog	1
Australian Kelpie	1
Australian Shepherd	1
Boxer	1
Bullmastiff	1
Cane Corso	1
Curly Coated Retriever	1
Dackel	1
Deutscher Wachtelhund	1
Dobermann	1

Hovawart	1
Husky	1
Jack Russel Terrier	1
Langhaar Collie	1
Magyar Vizsla	1
Mudi	1
Soft Coated Wheaten Terrier	1
Springer Spaniel	1
Weimeraner	1

41 Hunde waren männlich intakt, 22 männlich kastriert, 46 weiblich intakt und 11 weiblich kastriert. Der jüngste Hund der Gruppe war 1 Jahr alt, der älteste war 14 Jahre alt.

8.1.2 Referenzbereich

Aufgrund des stark von der restlichen Population abweichenden Wertes (NACU-Count von 106) eines Hundes wurde dieser als Ausreißer definiert und bei der Bestimmung des Referenzintervalls nicht berücksichtigt. Somit konnten von den 120 gesunden Hunden, 119 in die Berechnung eines Referenzintervalls einbezogen werden (siehe Abbildung 5).

Der maximal gemessene Wert lag bei 53, der minimale Wert lag bei 1. Es konnte kein Wert <1 detektiert werden. Aufgrund des experimentellen Charakters des NACU und des geringen Wissens über die genaue Zusammensetzung der gemessenen Strukturen werden aktuell nur Events im Scattergramm gemessen. Eine Einheit existiert zum aktuellen Zeitpunkt nicht.

Die obere Grenze des ermittelten Referenzintervall liegt bei 37,9 (90% Konfidenzintervall 33,0-53,0). Der Median lag bei 17,1.

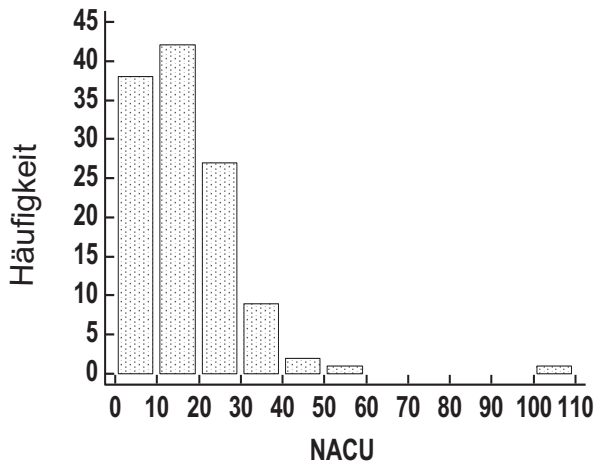


Abbildung 5 Balkendiagramm für die Referenzintervallgruppe, deutlich zu erkennen ist die rechtschiefe Verteilung des Parameters. Die einzelne Messung am rechten Rand (Bereich 100-110) stellt einen Ausreißer dar.

Anhand der statistischen Auswertung zeigte sich keine Altersabhängigkeit des Parameters ($p=0,47$) (siehe Abbildung 6).

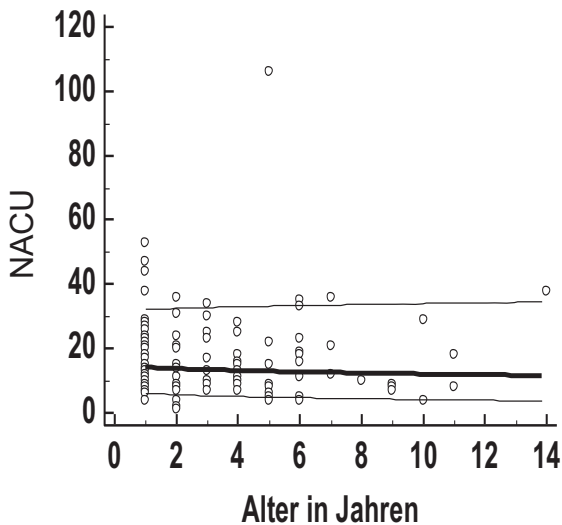


Abbildung 6 Prüfung auf Altersabhängigkeit, die dünnen, schwarzen Linien stellen jeweils das 10. und 90. Zentil dar, die breitere schwarze Linie stellt den Median dar.

8.1.3 Variationskoeffizient

Die Messungen zur Bestimmung des Variationskoeffizienten stammen von einem gesunden (sechs Jahre alter, männlich kastrierter Beagle) und einem an einer Protein losing Nephropathie (PLN) erkrankten Hund mit DIC (drei Jahre alter männlich kastrierter Australian Shepherd).

Bei Bestimmung des Variationskoeffizienten zeigte sich für erkrankte Patienten: ein Mittelwert von 200,3 mit einer Standardabweichung von 16,16 und daraus ein resultierender Variationskoeffizient von 8,1%

Bei gesunden Patienten zeigt sich ein Mittelwert von 38,5, mit einer Standardabweichung von 7,14 und ein daraus resultierender Variationskoeffizient von 18,6%.

Zur Bestimmung eines Graubereichs wurden die 18% Variationskoeffizient auf die obere Grenze des 90% Konfidenzintervalls (53,0) aufaddiert, dieser liegt zwischen 38 und 63 Einheiten. Werte darüber werden als außerhalb des Referenzintervalls angesehen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 postulierte Wertungsbereiche des NACU-Counts

Wertung	Referenzintervall	Graubereich	Außerhalb Referenzintervall
NACU-Count	≥ 1 und ≤ 38	≥ 39 und ≤ 63	≥ 64

8.2 Ergebnisse der Testung des klinischen Nutzens

8.2.1 Beschreibung der Gruppe 2 (gemischt krank)

Die Patienten wurden im Zeitraum vom 02.04.2014 bis zum 09.12.2016 in der Klinik für Kleintiere vorstellig.

Von den 655 Messungen wiesen 204 Messungen eine Retikulozytenmessung auf, sodass für diese ebenfalls ein NACU-Count bestimmt werden konnte. Drei Patienten wurden aufgrund visueller Interferenzen ausgeschlossen (siehe Abbildung 7).

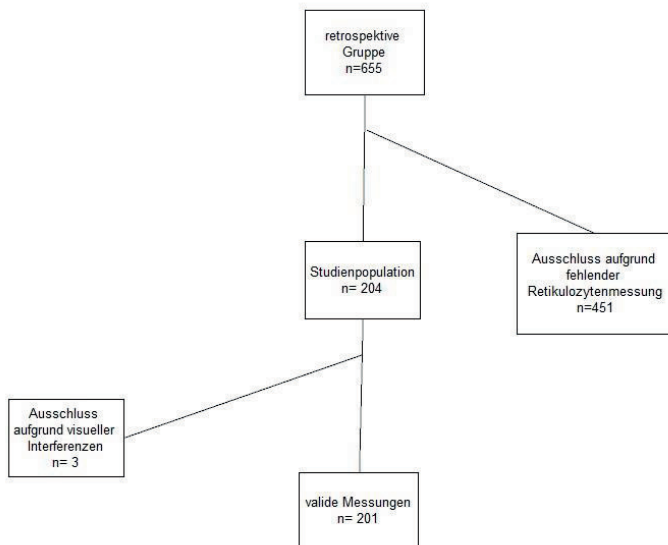


Abbildung 7 Ausschlussprozess und Bestimmung der validen Messungen

Unter der Population fanden sich folgende Rassen:

Tabelle 7 Rasseverteilung in gemischter Population

Rasse	Anzahl
Mischling	45
Labrador Retriever	12
Golden Retriever	9
Deutscher Schäferhund	7
Französische Bulldogge	5
Australian Shepherd	5
Parson Russel Terrier	5
Dackel	4
Mops	4
Rottweiler	4
Boxer	3
Dalmatiner	3
Chihuahua	3
Zwergschnauzer	3
Rhodesian Ridgeback	3
Deutsch Drahthaar	3
Beagle	2
Berner Sennenhund	2
Cocker Spaniel	2
Husky	2
Toy Terrier	2
Yorkshire Terrier	2
Samojede	2
Bearded Collie	2
Kleiner Münsterländer	2
Riesenschnauzer	2
West Highland White Terrier	2
Akita Inu	1

Cane Corso	1
Irish Setter	1
Brandlbracke	1
Briard	1
Cavalier King Charles Spaniel	1
Englische Bulldogge	1
Eurasier	1
Border Collie	1
Deutsch Kurzhaar	1
Dobermann	1
Gordon Setter	1
Foxterrier	1
Bolonka Zwetna	1
Appenzeller Sennenhund	1
Jack Russel Terrier	1
Welsh Corgi	1
Mastiff	1
Malteser	1
Großer Münsterländer	1
Greyhound	1
Nova scotia duck tolling retriever	1
Russischer schwarzer Terrier	1
Bouvier des Flandres	1
Ogar Polski	1
Deutscher Jagdterrier	1
Norwich Terrier	1
Flat coated Retriever	1
Havanese	1
Puli	1
Tervueren	1
Soft coated wheaten terrier	1

Diese Messungen stammen von 172 Patienten: 45 männlich intakte, 32 männlich kastrierte, 46 weiblich intakte und 49 weiblich kastrierte Hunde.

Der jüngste Hund der Population war drei Wochen alt, der älteste Hund war 15 Jahre alt. Der Median liegt bei 6 Jahren.

8.2.2 Zusammenhänge:

Diagnosegruppen

Die Aufteilung nach Ätiologie ergab ein zahlenmäßiges Ergebnis wie folgt: 6 (gesund), 29 (infektiös), 27 (entzündlich nicht infektiös), 20 (Neoplasien), 59 (nicht entzündlich), 37 (Gewebeschaden), 23 (Mehrere) (siehe Abbildung 8).

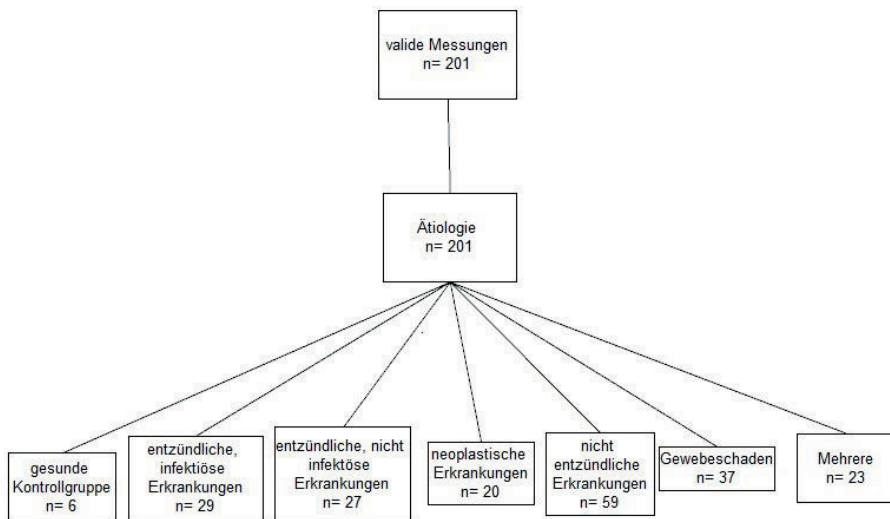


Abbildung 8 Gruppe 2a Evaluation der Diagnosegruppen

In der durchgeführten statistischen Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,4$). Einzig neoplastische Erkrankungen (und in geringerem Maße infektiöse und nicht infektiöse Entzündungen) scheinen sich visuell von den anderen Erkrankungen abzusetzen (siehe Abbildung 9).

Der Median der jeweiligen Erkrankungen liegt bei: 14 (gesund), 22 (infektiös), 21 (entzündlich, aber nicht infektiös), 26,5 (Neoplasien), 16 (nicht entzündlich), 17 (Gewebeschaden), 18 (Mehrere Erkrankungen).

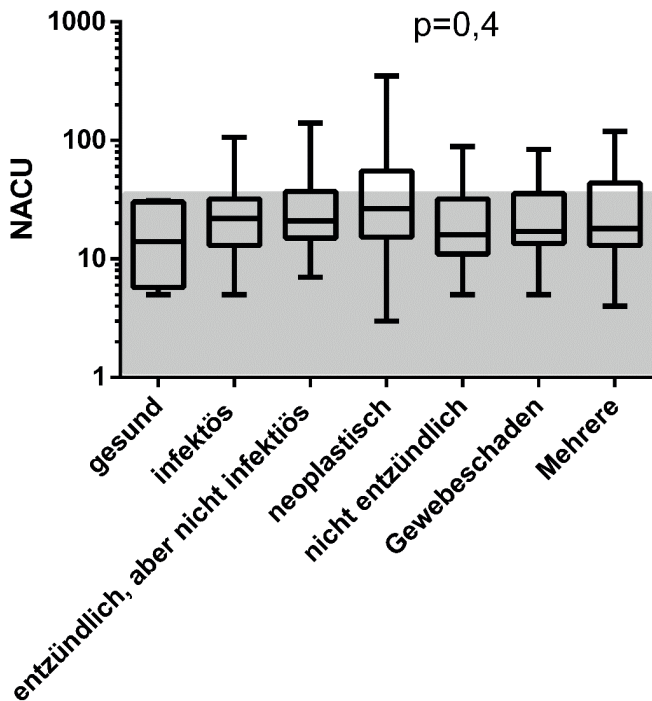


Abbildung 9 Untersuchung der Ätiologie als Einflussfaktor auf den NACU-Count, der grau hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar

Wie im Abschnitt „Bestimmung eines Referenzintervalls für den nucleic acid containing unit Count (NACU)“ beschrieben, wurde eine Staffelung der Werte vorgenommen. Es ergab sich somit eine Unterteilung der gemessenen Werte in: im Referenzintervall (≤ 38), Graubereich (≥ 39 ; ≤ 63) und als außerhalb des Referenzintervalls liegende Werte (≥ 64).

Es wurde eine deskriptive Auswertung vorgenommen. Diese ist untenstehender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 8 Verteilung NACU-Werte nach Ätiologieklassen

Ätiologie	Gesamtzahl (n)	im Referenzintervall, ≤ 38	Graubereich, ≥ 39 und ≤ 63	Außerhalb des Referenzintervalls ≥ 64
Gesunde Kontrollgruppe	6	6	0	0
Entzündliche, infektiöse Erkrankungen	29	22	3	4
Entzündliche, nicht infektiöse Erkrankungen	27	20	4	3
Neoplastische Erkrankungen	20	13	3	4
Nicht entzündliche Erkrankungen	59	47	8	4
Gewebeschaden	37	30	2	5
Diverse Erkrankungen	23	17	2	4

Als weiterer Schritt wurden die Patienten, welche NACU-Werte aufweisen, die außerhalb des Referenzintervalls liegen, aufgeführt und in unten folgender Tabelle genauer betrachtet.

Tabelle 9 NACU-Werte ≥ 64

NACU-Wert	Erkrankung	Ätiologie
349	rupturiertes Hämangiosarkom der Milz mit Hämoperitoneum und weiteren, nicht resezierbaren, Lebermetastasen	Neoplastische Erkrankung
140	primär immunmedierte hämolytische Anämie	Entzündliche, nicht infektiöse Erkrankung
128	Adenokarzinom der Lunge mit sekundärer hochgradig regenerativer Anämie	Neoplastische Erkrankung
119	primär immunmedierte hämolytische Anämie, pulmonale Hypertension, Verdacht auf Thrombembolien	Entzündliche, nicht infektiöse Erkrankung
114	Gastrointestinale Blutungen, Nebennierentumor, Perikarderguss, Verdacht auf Milztumor	Diverse Erkrankung
106	eitrig abszedierende Peritonitis und Steatitis, Milzrandinfarkt, sekundär immunmedierte hämolytische Anämie	Entzündlich, infektiöse Erkrankung
102	7 Tage nach Re-Intervention eines intrahepatischen Lebershunts, bakterielle Zystitis	Diverse Erkrankung
97	klinisch immunmedierte Erkrankungen (SRMA, Polyarthrit, Endokarditis) in der pathologischen Untersuchung septische Polyarthrit, nekrotisierende Pneumonie, Myokarditis, Endokarditis, Enteritis	Entzündliche, infektiöse Erkrankung
96	Verdacht auf sekundäre Panzytopenie (Ursache chronische Ehrlichiose vs. Myelofibrose), bereits unter Medikation mit Prednisolon und Ciclosporin	Entzündliche, nicht infektiöse Erkrankung
89	1 Tag nach Laparotomie mit Milzextirpation aufgrund Hämangiosarkom in der Milz mit Metastasen in der Leber	Neoplastische Erkrankungen
84	1 Tag nach Milzextirpation (Regeneratknoten) und Leberbiopsie	Gewebescheiden
83	1 Tag nach Tibia plateau leveling osteotomy (TPLO)	Gewebescheiden
82	1 Tag nach Pulmonalstenosendilatation, Hämatom an der Punktionsstelle	Gewebescheiden

82	Kreuzbandriss rechts und Verdacht auf Kreuzbandriss links	Nicht entzündliche Erkrankung
80	Bocavirusinfektion unter symptomatischer Therapie	Entzündliche, infektiöse Erkrankung
79	5 Tage nach Pulmonalstenosendilatation	Gewebeschaden
77	undifferenzierte Neoplasie im Bereich Mittelohr mit infiltrativen Wachstum in Knochen, Metastasen in Lymphknoten und sekundärer septischer Entzündung	Neoplastische Erkrankung
76	primär immunmedierte hämolytische Anämie unter Prednisolon und Mykophenolat, Choleangiohepatitis, Pankreatitis, pulmonale Hypertension	Entzündliche, nicht infektiöse Erkrankung
73	5 Tage nach Laparotomie mit Enterektomie aufgrund Fremdkörper (Stein), Nahtdehiszenz mit septischem Abdomen und nekrotischen Darmschlingen, Pankreatitis	Diverse Erkrankung
73	Zyste Halswirbelsäule in Bereich C4	Nicht entzündliche Erkrankung
71	2 Tage nach Thorakotomie mit Perikardfenestration und Curretage Masse am Herzen, chronisch eitriger Perikarditis mit Perikarderguss, Verdacht Fremdkörper aus Magen als Ursache	Diverse Erkrankung
67	Hämangiosarkom in der Milz, nach Milzextirpation	Neoplastische Erkrankung
66	9 Tage nach Hemilaminektomie aufgrund eines Bandscheibenvorfalles	Gewebeschaden
64	3 Monate nach Re- Intervention Lebershunt, Restshunt vorhanden	Nicht entzündliche Erkrankung

Es ist auffällig, dass ein großer Anteil der Patienten, bei denen ein vermutlich relevanter NACU-Count festgestellt wurde, sich in einer postoperativen Phase befinden (9 von 17 Patienten). Vier der Erkrankungen wird ein immunmediertes Geschehen zugeschrieben (Myelofibrose und IMHA). Weiterhin markant ist, dass zwei Patienten ein Hämangiosarkom aufwiesen. Insgesamt befinden sich in der Gruppe 5 Patienten mit malignen Tumoren.

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Erkrankungen mit hohen NACU-Werten fällt auf, dass bei vielen Patienten in den oberen Bereichen eine klinisch relevante Anämie vorliegt. Zwei der Patienten zeigten eine Blutungsanämie. Erster Patient in Folge eines rupturierten

Hämangiosarkoms, zweiter Patient in Folge gastrointestinaler Blutungen. Es ist bei beiden Patienten zu vermuten, dass eine chronische Blutung (gastrointestinale Blutungen) oder chronische Zerstörung von Erythrozyten (Mikroangiopathie des Hämangiosarkoms) vorlag. Bei den anderen vier Patienten fällt auf, dass es sich bei allen um Patienten handelt, die eine immunmedierte hämolytische Anämie haben, oder zumindest Hinweise auf immunmedierte Zerstörung. Dabei waren zwei primär immunmediert und die zwei weiteren Patienten wiesen eine sekundäre immunmedierte Anämie in Folge einer eitrig abszedierenden Peritonitis und eines pulmonalen Adenokarzinoms auf. Bei Letzterem ist eine chronische Blutungskomponente ebenfalls möglich, aber aufgrund des Nachweises von Sphärozyten im Blutaussstrich kann eine gewisse immunmedierte Komponente als durchaus plausibel angesehen werden. Von den sechs Patienten zeigten sich fünf mit einer regenerativen Anämie (Retikulozyten $>140\ 000$).

Des Weiteren ist auffällig, dass fünf der Patienten tumoröse Erkrankungen aufwiesen. Ob es sich bei dem ultrasonographisch detektierten Nebennierentumor um einen klinisch relevanten Tumor handelte oder ob es sich um ein Inzidentalinom handelte, ist nicht mehr nachvollziehbar.

Der Patient (Patient A) mit dem höchsten gemessenen NACU-Count (349) wurde einen Tag nach erfolgreicher Milzextirpation erneut hämatologisch untersucht. Es fällt auf, dass der Wert auf 89 abgesunken ist. Dies stellt eine deutliche Reduktion dar, wenn auch dieser Wert immer noch im, als vermutlich klinisch relevant postulierten, Bereich liegt.

Ein ähnlicher Verlauf des NACU konnte auch bei einer fünf Jahre alten Rhodesian Ridgeback Hündin (Patient B) beobachtet werden. Die Hündin wurde knapp zwei Wochen vor Vorstellung in der Klinik für Kleintiere bereits in einer anderen Klinik aufgrund des Verdachts einer Milztorsion operiert. Die Milz wurde dabei zurückgedreht und in der Bauchhöhle belassen. Eine erneute Vorstellung beim Tierarzt erfolgte aufgrund von Apathie und rezidivierend erhöhter Körpertemperatur. Die weiterführenden Untersuchungen zeigten neben einer hochgradigen regenerativen Anämie, sonographische Veränderungen in der Milz. Aufgrund dieser Milzveränderungen wurde einen Tag nach Vorstellung eine Probelaparotomie mit Entfernung der Milz durchgeführt. Zusätzlich zeigte sich eine knotige Veränderung im Mesenterium. Beides wurde in toto entfernt und zur histopathologischen Untersuchung eingeschickt. Diese konnte in der Milz vermehrt Hämosiderineinlagerungen und extramedulläre Hämatopoese feststellen, sowie Regeneratknoten und Hinweise auf einen frischen Milzinfarkt. Die knotige Veränderung im

Mesenterium stellte sich als lipogranulomatöse Entzündung heraus. Am Tag der Vorstellung wies die Hündin einen NACU-Count von 106 auf. Einen Tag nach Operation sank dieser auf 32 und fiel am vierten Tag nach Operation weiter auf 25 ab. Es wurde eine sekundär immunmedierte Anämie vermutet, weshalb die Hündin unter Glukokortikoiden entlassen wurde.

Ein weiterer Patient, der genauer betrachtet wurde, ist ein acht Jahre alter, männlich kastrierter Mischlingsrüde (Patient C), der in der chirurgischen Abteilung der Kleintierklinik aufgrund eines duodenalen Fremdkörpers (Stein) vorstellig wurde. Es wurde eine Laparotomie durchgeführt. Aufgrund der kranial des Fremdkörpers gelegenen Verfärbung und Amotilität des Darms wurde zusätzlich eine Enterektomie durchgeführt. In der Messung am Folgetag (Tag 1 *post operationem*) zeigte der Rüde einen NACU-Count von 13. Es zeigte sich eine Verbesserung des Allgemeinbefindens mit einsetzender Futteraufnahme. Am Tag 5 entwickelte der Rüde einen hochgradigen Aszites. In der durchgeführten Re-Laparotomie stellte sich eine Nahtdehiszenz mit daraus resultierendem septischem Abdomen dar. Der gemessene NACU-Count am 5. Tag nach Operation lag bei 73 und ist somit außerhalb des Referenzintervalls. Der CRP-Wert verlief rückläufig vom Tag der Vorstellung an und hatte seinen Tiefstwert von circa 40 mg/L am Tag der Diagnose der Nahtdehiszenz. Da sich das Allgemeinbefinden des Patienten am siebten Tag nach der ersten Operation verschlechterte wurde der Hund euthanasiert.

Bei 15 Patienten waren Messergebnisse von mehreren unterschiedlichen Tagen vorhanden. In der Regel handelte es sich dabei um Patienten, die operiert wurden oder einen Eingriff im Herzkatheterlabor erfuhren. Es sticht hervor, dass einige Patienten einen Anstieg des NACU-Counts in der postoperativen Phase aufweisen.

Nach dem Ausschluss der sechs gesunden Patienten blieben 195 Messungen übrig (siehe Abbildung 10).

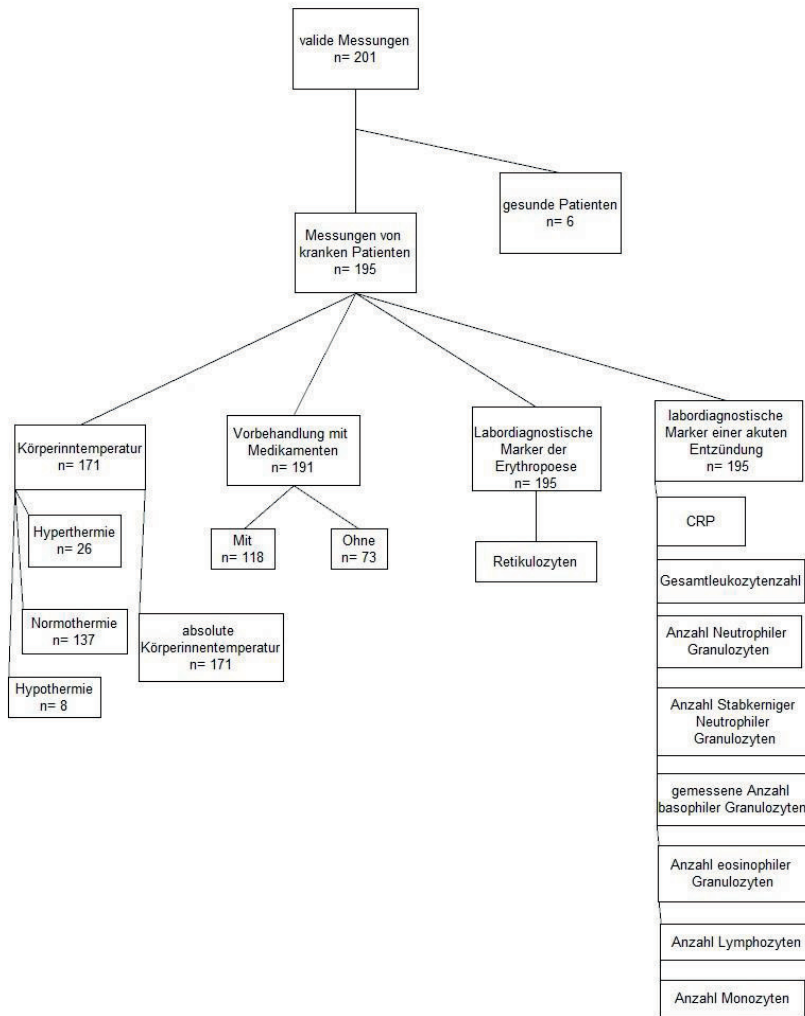


Abbildung 10 Gruppe 2b, klinische Testung

Körperinnentemperatur:

Es lagen 171 Messungen der Körperinnentemperatur vor. Davon wiesen acht Patienten eine Hypothermie, 137 Patienten eine Normothermie und 26 eine Hyperthermie auf. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p=0,088$) (siehe Abbildung 11).

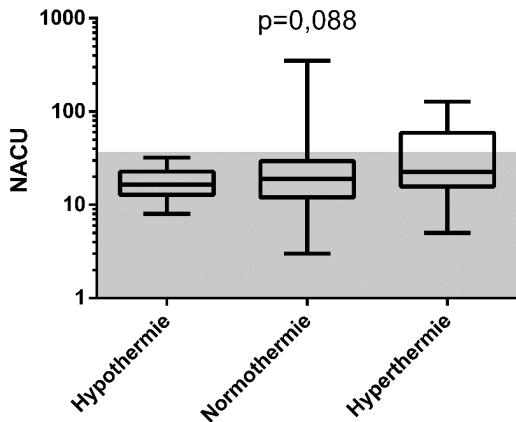


Abbildung 11 Einfluss der Körperinnentemperatur auf den NACU-Count, der grau hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar

Auch eine Korrelation zwischen den nicht nach klinischer Wertung (Hyper-, Normo- und Hypothermie), gestaffelten Körperinnentemperaturen und den dazugehörigen NACUs zeigte keinen signifikanten Zusammenhang ($p=0,20$, Korrelationskoeffizient 0,098)

Medikamente

Von den 201 Messungen war für 171 der dazugehörigen Patienten bekannt, ob sie Medikamente erhalten hatten. Es erhielten 118 Hunde vor der Messung immunmodulatorische Medikamente, 73 bekamen keine Medikamente.

Unter den verabreichten Medikamenten waren: Entzündungshemmer (Metamizol, Caprofen, Paracetamol, Firocoxib, Meloxicam, Robenacoxib, Cimicoxib), Glukokortikoide (Prednisolon, Dexamethason, Fludrocortison), Immunsuppressiva (Mycophenolat), Antibiotika

(AmoxicillinClavulansäure, Ampicillin, Enrofloxacin, Clindamycin, Doxycyclin, Cefotaxim).

Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Vorbehandlung mit immunmodulatorischen Medikamenten und der Höhe des NACU ($p=0,043$). In der Gruppe, die keine Vorbehandlungen erhielten, liegt der Median bei 16,0. Bei jenen die eine Vorbehandlung mit immunmodulatorischen Medikamenten erhielten, liegt der Median bei 22 (siehe Abbildung 12).

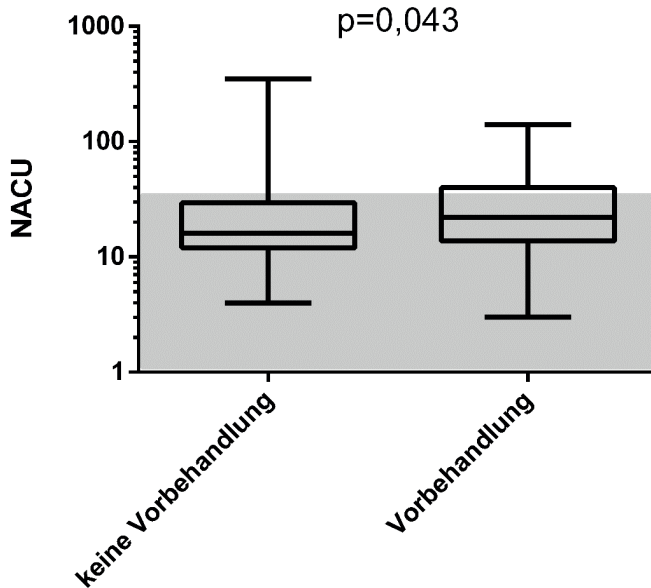


Abbildung 12 Einfluss der Vorbehandlung mit immunmodulatorischen Medikamenten auf den NACU-Count, der grau hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar

Labordiagnostische Marker einer akuten Entzündung

Bei allen 195 Messungen lagen alle Zellen des Differentialblutbildes und eine Messung des CRPs vor ($n=195$).

Bei der Untersuchung der labordiagnostischen Marker einer akuten Entzündung zeigen sich signifikante Ergebnisse bei vielen der untersuchten Parameter. Einschränkend zu betrachteten sind diese Ergebnisse jedoch hinsichtlich der ermittelten Korrelationskoeffizienten (r -Werte), welche

durchgehend sehr niedrig sind.

Die Ergebnisse sind zur besseren Übersicht in untenstehender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 10 Ergebnisse der Testung auf Korrelation zwischen NACU-Count und Markern einer akuten Entzündungsreaktion, die fettgedruckten Zahlen stellen die signifikanten p-Werte dar

Laborwert	p-Wert	r -Wert
CRP	0,004	0,204
Gesamtleukozytenzahl	0,001	0,232
Neutrophile Granulozyten	0,003	0,21
Stabkernige Neutrophile Granulozyten	0,00005	0,286
Eosinophile Granulozyten	0,34	-0,069
Gemessene Anzahl an basophilen Granulozyten	0,104	-0,117
Monozyten	0,034	0,152
Lymphozyten	0,391	0,062

Retikulozyten

Für alle 195 Messungen lagen Retikulozytenmessungen vor.

Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den gemessenen Retikulozyten und dem NACU-Count ($p=0,01$). Eingeschränkt wird dieses Ergebnis, wie bei den Markern der akuten Entzündung ebenfalls beobachtet, durch einen niedrigen Korrelationskoeffizienten ($r = 0,185$).

Prognose

Nach den oben beschriebenen Kriterien blieben 172 Patienten übrig, deren drei Monatsprognose bekannt ist. Dabei verstarben 37 Patienten und 135 überlebten in dem benannten Zeitraum (siehe Abbildung 13).

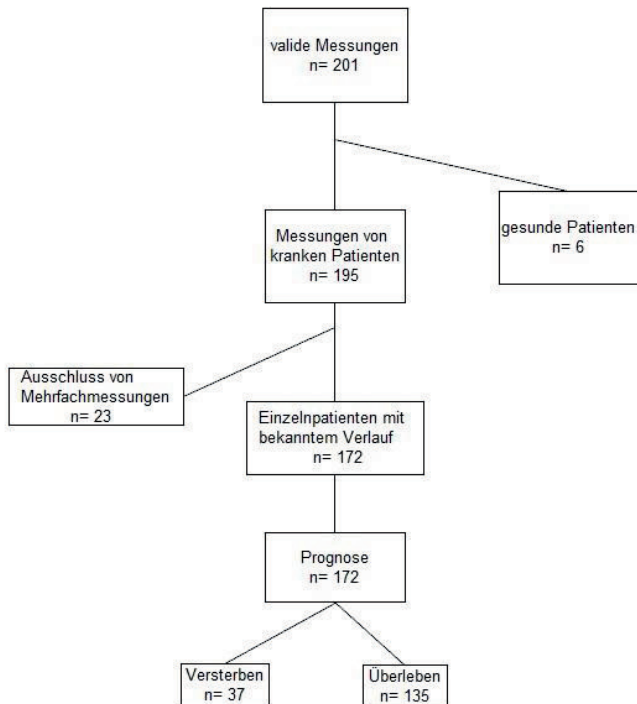


Abbildung 13 Gruppe 2 c, prognostische Evaluation

Bei vergleichender Betrachtung der NACU-Werte zwischen den Gruppen „lebend“ und „verstorben“ zeigt sich ein signifikanter Unterschied in den Gruppen ($p= 0,0059$). Der Medianwert in der Gruppe „überleben“ liegt bei 18, in der Gruppe „versterben“ bei 26 (siehe Abbildung 15).

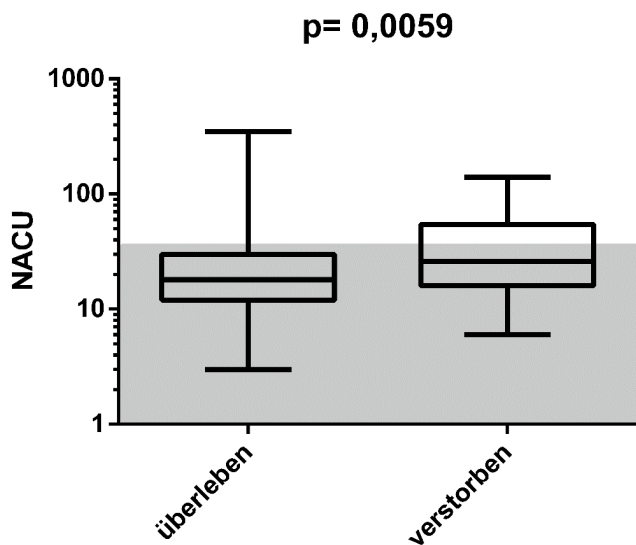


Abbildung 14 Evaluation des Verhältnisses von Prognose zu NACU-Count, der grau hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar

Des Weiteren wurde betrachtet wie sich das Verhältnis „lebend“ zu „verstorben“ in den bereits oben genannten Bereichen (Referenzintervall, Graubereich, außerhalb Referenzintervall) verhält. Die Ergebnisse sind in untenstehender Tabelle dargestellt.

Tabelle 11 Verteilung NACU-Werte in Intervallen

	Lebend absolut	prozentual	Verstorben absolut	prozentual
NACU \geq 64	11	69%	8	31%
Graubereich	14	70%	6	30%
Referenzbereich	110	83%	23	17%

8.3 Spezielle Erkrankungskomplexe

8.3.1 Beschreibung der Gruppe 3 (spezielle Erkrankungskomplexe)

Die dritte Gruppe setzt sich aus insgesamt 5 Untergruppen zusammen (Sepsis, IMHA, Pankreatitis, DIC, Mehrere) und besteht aus insgesamt 74 Hunden. Zwei Patienten mussten, aufgrund visueller Interferenzen im Scattergramm, ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 15).

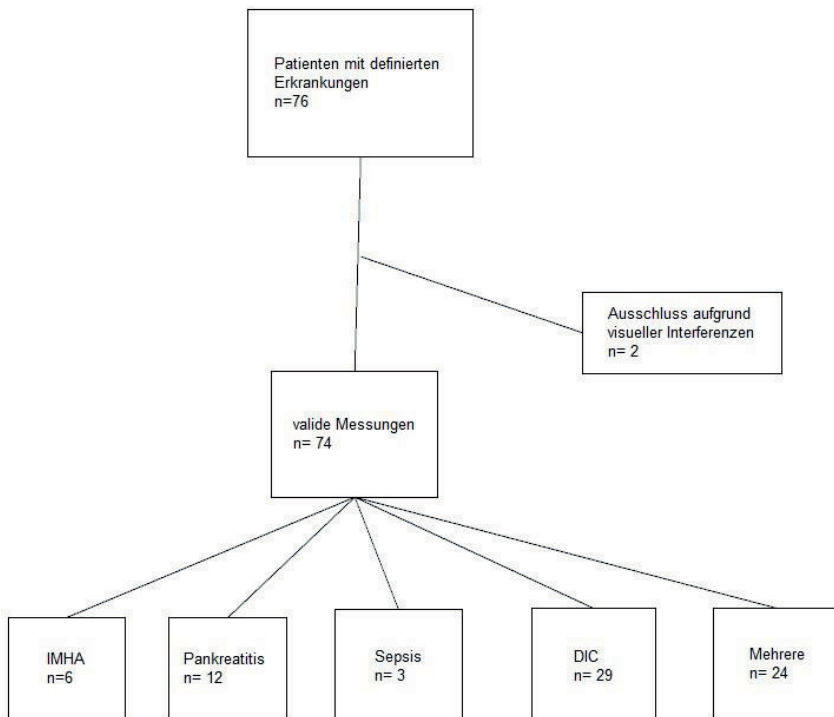


Abbildung 15 Zusammensetzung der prospektiven Gruppe

Die Rasseverteilung der Patienten war wie folgt:

Tabelle 12 Rasseverteilung in prospektiver Gruppe

Rasse	Anzahl
Mischling	17
Labrador Retriever	8
Dackel	6
Deutscher Schäferhund	3
Jack Russel Terrier	3
Australian Shepherd	2
Berner Sennenhund	2
Dobermann	2
Französische Bulldogge	2
Mops	2
Barbet	1
Basset	1
Bearded Collie	1
Border Collie	1
Broholmer	1
Bullterrier	1
Bullmastiff	1
Chihuahua	1
Deutsch Kurzhaar	1
Deutsch Langhaar	1
Deutsche Bracke	1
Deutscher Pinscher	1
Epagneul Breton	1
Eurasier	1
Foxterrier	1
Golden Retriever	1
Kleiner Münsterländer	1
Malinois	1
Malteser	1
Deutscher Wachtelhund	1
West Highland White Terrier	1
Westfalen Terrier	1
Whippet	1
Yorkshire Terrier	1
Zwergpudel	1
Zwergschnauzer	1

Die Geschlechtsverteilung lag bei: 24 männlich und 20 weiblich intakten Patienten, 13 der Patienten waren männlich kastriert und 17 waren weiblich kastriert.

Der jüngste Hund der Gruppe war 7 Monate alt, der älteste war 14 Jahre alt.

Von den 74 untersuchten Patienten wiesen 24 mehrere der untersuchten Erkrankungen auf. Die Verteilung liegt bei 29 Patienten mit einer DIC, 12 Patienten mit einer Pankreatitis, 6 Patienten mit einer IMHA und 3 weitere Patienten wiesen eine Sepsis auf.

Patienten mit einer Lebererkrankung mit Leberfunktionsstörung wurden, aufgrund des DIC-ähnlichen Charakters, von der Studie ausgeschlossen.

8.3.1 Unterschiede hinsichtlich Erkrankungen

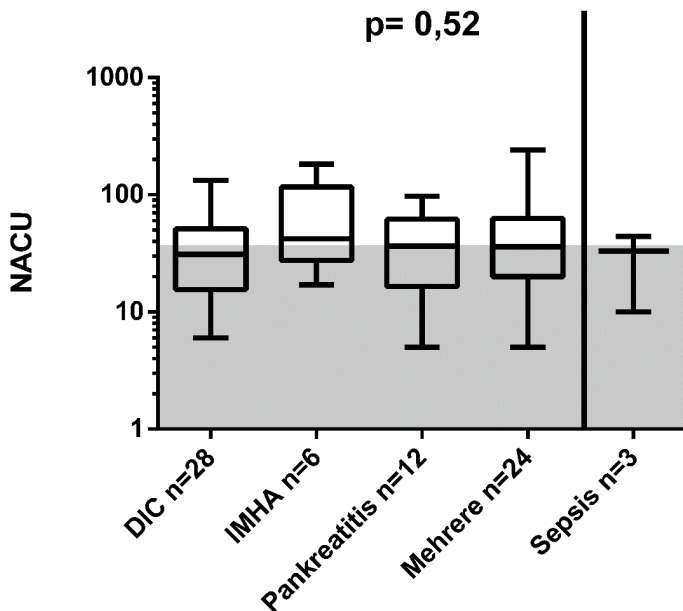


Abbildung 16 Zusammenhang NACU und verschiedene definierte Krankheitsbilder; die schwarze Linie zwischen Sepsis und „Mehrere“ stellt den Ausschluss der Gruppe „Sepsis“ aufgrund sehr geringer Probenanzahl dar (3 Patienten mit reiner Sepsis), der graue hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar

Es zeigt sich auch hier ein recht ähnliches Bild zur Gruppe 2. Zwar stechen visuell Patienten mit einer IMHA und einer Pankreatitis hervor, jedoch ist keine statistische Signifikanz zu beobachten ($p=0,52$). Die Gruppe der Patienten mit einer „reinen“ Sepsis ist, aufgrund der häufigen Begleiterkrankung einer DIC auf drei Patienten geschrumpft und war somit zu klein für jegliche statistische Auswertung.

Die Mediane der einzelnen Gruppe liegen bei 31,0 (DIC), 42,0 (IMHA), 36,5 (Pankreatitis) und 36 (Mehrere). Auch bei der Betrachtung spezieller Krankheitsbilder zeichnet sich ab, dass ein Großteil der Patienten einen NACU-Count im Referenzintervall, oder zumindest im klinischen Graubereich, aufweist (siehe Abbildung 16).

Die folgende Tabelle stellt eine deskriptive Auswertung der Patienten dar, welche einen NACU-Count außerhalb des Referenzintervalls aufweisen. Zusätzlich ergänzt wurde der Erkrankungsverlauf.

Tabelle 13 hohe NACU-Werte in der Gruppe 3, außerhalb des Referenzintervalls

NACU	Erkrankung	Verlauf
240	pyogranulomatöse Perikarditis, Pankreatitis, DIC	lebend
182	IMHA, Verdacht auf akute Thrombembolie	verstorben
163	Myositis und Steatitis, eitrig nekrotisierende bakterielle Splenitis, purulente Polyarthritits, Milz- und Nierenrandinfarkte, DIC	verstorben
133	maligne epitheliale Neoplasie im Knochenmark unbekanntes Ursprungs, akute, anurische Nierenerkrankung, DIC	verstorben
132	immunmedierte Anämie, Pankreatitis,	lebend
109	Gallenblasenmukozele, Pankreatitis, DIC, Sepsis	verstorben
112	IMHA, Pankreatitis	lebend
96	chronische DIC, am ehesten in Folge Tumors unbekannter Genese	verstorben
97	Pankreatitis, Blutungsanämie	lebend
95	IMHA	lebend
88	Pankreatitis, chronische Gastroenteropathie	lebend
67	Pankreatitis	lebend

Es fällt auf, dass bei Betrachtung von NACU-Werten, die außerhalb des Referenzintervalls liegen die Patienten mit einer Pankreatitis (alleinig oder mit anderen Erkrankungen kombiniert) subjektiv überrepräsentiert sind, was jedoch kein prognostischer Faktor zu sein scheint. Allgemein fällt hier eine recht regelmäßige Verteilung der Merkmale Überleben/Versterben auf.

Eine nähere Betrachtung, bezüglich der in Teil 2 aufgestellten Hypothese, ist hier aufgrund der

Auswahlkriterien der Patienten nicht möglich.

In der gesamten Gruppe zeigt sich ebenfalls, dass ein großer Teil der Patienten NACU-Counts im Referenzintervall (55%) oder zumindest im Graubereich (26%) aufweist. Im Vergleich zu 11% aus der nicht vorselektierten retrospektiven Gruppe erreichen ebenfalls wenige Patienten einen NACU-Count der sicher über dem Referenzintervall liegt (19%)

Tabelle 14 auslösende Ursachen der an einer DIC erkrankten Patienten

	gesamt	Referenzintervall	Graubereich	Außerhalb Referenzintervall
Tumor	8	5	1	2
infektiös	12	8	2	2
steril entzündlich	7	3	3	1
Gewebeschaden	13	10	2	1
sonstiges	9	4	4	1

Bei Betrachtung der der DIC zugrundeliegenden Ursache zeigt sich eine recht ebene Verteilung über die einzelnen Wertungsbereiche heraus (siehe Tabelle 14). Es gibt keinen Ursachenkomplex, der hier deutlich heraussticht.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, die eine DIC überlebten und jenen die an einer DIC erkrankten und verstarben ($p=0,24$). Der Median der Gruppe überleben liegt bei 27, in der Gruppe versterben liegt er bei 34,5 (siehe Abbildung 17). Aufgrund der sehr kleinen Patientenzahl in der Gruppe Sepsis und IMHA lässt sich keine prognostische Aussage aus dem

NACU treffen.

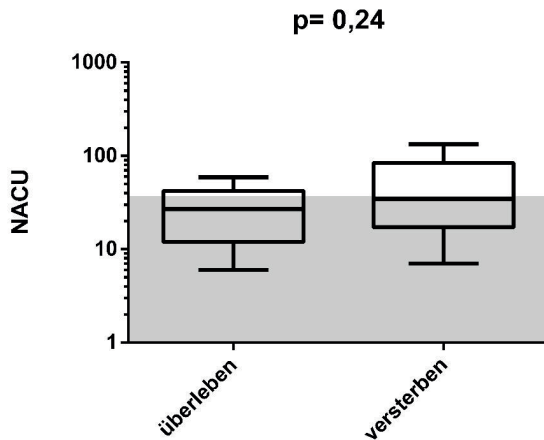


Abbildung 17 prognostischer Nutzen des NACU bei an einer DIC erkrankten Patienten

Es ist anzumerken, dass visuell jedoch die Werte der beiden Gruppen variieren. In der graphischen Darstellung fällt ebenfalls auf, dass in der Gruppe der verstorbenen Patienten mehr Patienten über dem Referenzintervall liegen als in der Gruppe der Überlebenden (siehe Abbildung 17).

Auch bei Patienten mit einer Pankreatitis zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der statistischen Auswertung ($p=0,44$). Der Median der überlebenden Patienten liegt bei 38, in der versterben Gruppe liegt er bei 34 (siehe Abbildung 18).

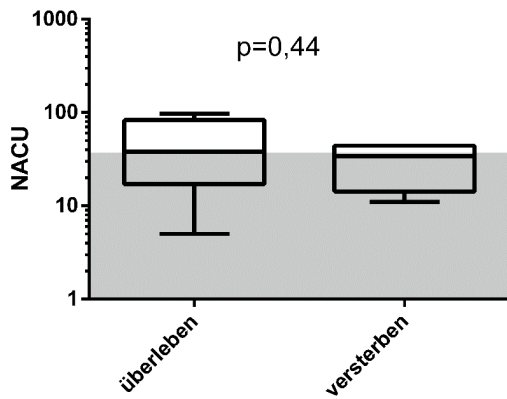


Abbildung 18 prognostischer Nutzen des NACU bei an Pankreatitis erkrankten Patienten

Es liegt zudem kein Zusammenhang zwischen dem NACU-Count und der Hospitalisierungsdauer bei einer Pankreatitis vor ($p=0,46$, Korrelationskoeffizient $-0,225$) vor (siehe Tabelle 15). Sowohl Patienten mit kurzem oder keinem stationären Aufenthalt als auch jene mit langem stationärem Aufenthalt zeigen sowohl hohe als auch niedrige NACU-Count Werte.

Tabelle 15 NACU-Count im Bezug zur Hospitalisierungsdauer bei Patienten mit einer Pankreatitis

NACU-Count	Hospitalisierungsdauer in Tagen	Verlauf	Anmerkungen
5	11	lebend	
11	10	verstorben	
14	2	lebend	Entlassung gegen tierärztlichen Rat
24	9	verstorben	
29	0	lebend	
36	15	verstorben	
44	4	verstorben	
44	7	verstorben	
47	4	lebend	
67	0	lebend	
88	13	lebend	
97	7	lebend	

9. Diskussion

9.1 Studienaufbau und Studienpopulation

Die Geschlechterverteilung ist in allen Gruppen als recht gleichmäßig zu beurteilen. Ähnlich sieht es mit der Altersverteilung in den Gruppen 2 (klinische Evaluation) und Gruppe 3 (spezielle Krankheitsbilder) aus. In der zur Bestimmung eines Referenzintervalls herangezogenen Gruppe (1) ist die Altersverteilung in Richtung jüngerer Patienten hin verschoben (siehe Abbildung 6). Dies ist zum einen der Auswahl der Patienten geschuldet, zum anderen aber auch sicherlich der Tatsache, dass Patienten mit fortschreitendem Alter mehr Erkrankungen entwickeln. Aus diesem Grund wurde eine Prüfung des Alters als Einfluss auf den NACU-Count vorgenommen. Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert.

Aufgrund des überwiegend retrospektiven Charakters der Studie lassen sich verschiedene Vor- auch Nachteile benennen. Die Vorteile des retrospektiven Charakters liegen in der einfachen Akquirierung einer großen Anzahl verschiedener Patienten. Eine Ein- oder Beschränkung aus Gründen des Tierschutzgesetzes ist nicht vorhanden, da für jede Probenentnahme eine medizinische Indikation im Rahmen der klinischen Aufarbeitung der Erkrankung des Patienten vorlag. Zusätzlich liegen all diese Daten bereits vor und müssen nicht aufwendig erstellt werden. Des Weiteren können sie in Tabellenform aus dem Laborsystemen exportiert werden. Durch diese Aspekte ist es einfach eine möglichst große und heterogene Gruppe an Patienten zu erstellen, welche das vielfältige Behandlungsspektrum der tierärztlichen Sprechstunde widerspiegelt. Bei einer erstmaligen Evaluation eines neuen und unbekanntem Parameters erscheint dies sinnvoll.

Jedoch sind auch verschiedene Einschränkungen und Limitationen durch den Studienaufbau bedingt. Die Klassifizierung der Patienten hinsichtlich ihrer Ätiologie erfolgte nach bestem Wissen der behandelnden Tierärzte, ist aufgrund des retrospektiven Charakters jedoch gewissen Ungenauigkeiten unterworfen. Darüber hinaus ist eine starke Heterogenität der Patienten in ihrem zeitlichen Krankheitsverlauf zu beobachten. Bei einigen Patienten stammen die Messungen vom Tag der Vorstellung, bei anderen hingegen sind erst Messungen vorhanden, nachdem sie bereits einige Tage therapiert wurden und eine Besserung der Symptomatik eintrat. Auch ist aufzuführen, dass Therapie und Diagnostik aufgrund interindividueller Unterschiede der behandelnden Tierärzte immer einer gewissen Heterogenität unterworfen sind. Durch die allgemeine Arbeitsweise an der Universitätsklinik (Besprechung der Fälle mit Oberärzten und fachliche Diskussionen in den täglichen Visiten) ist dieser Faktor zwar auf ein mögliches Minimum reduziert, ein gewisser

Einfluss ist jedoch nie komplett zu verhindern.

Um die Gruppe 2 (gemischt krank) mit einem fokussierterem Teil zu ergänzen, wurde ein prospektiver Teil mit Krankheitsbildern ergänzt, bei denen zu erwarten war, das NACU in unterschiedlicher Anzahl vorkommen sollten. So konnten in diesem Teil die diagnostischen Ungenauigkeiten, wie zuvor beschrieben, auf ein Minimum reduziert werden. Jedoch ist diese Gruppe 3 (spezielle Erkrankungskomplexe) durch Überlappungen und kleine Gruppennzahlen gekennzeichnet. Auf die Problematik der synergistischen Erkrankungen (Hypoxie bei IMHA begünstigt Pankreatitis, Sepsis führt häufig zu DIC) wird im Folgenden näher eingegangen.

Die Feststellung eines infektiösen Erregers als Ursache für die beobachtete Krankheit richtet sich in dieser Studie nicht nur alleinig nach dem positiven Nachweis von Bakterien in mikrobiologischer, zytologischer oder (Histo-)Pathologischer Untersuchung. Es wurden auch Patienten als „infektiös“ eingeteilt, bei denen ein infektiöser Erreger wahrscheinlich ursächlich an dem bestehenden Krankheitsbild ist oder zumindest daran beteiligt.

Die Messung von Retikulozyten im Hämatologieprofil des Zentrallabors der Kleintierklinik Gießen ist erst seit 2019 Standard. Zuvor mussten Retikulozyten gesondert angefordert werden. Da jeglicher Diagnostik stets eine Indikation zugrunde liegen muss, erfolgte bei diesen Patienten nur eine Retikulozytenmessung, wenn sie anämisch waren oder anderweitige Indikationen vorlagen. Da der NACU-Count nur bei jenen Patienten bestimmt werden konnte, bei denen eine Retikulozytenmessung durchgeführt wurde, sind die Messungen vorselektiert. In der Auswertung der Gruppe mit NACU-Count >100 fällt auf, dass viele Patienten eine Retikulozytose mit Anämie aufweisen.

9.2 Referenzintervall

Dr. Nadine Kleinert aus unserer Arbeitsgruppe stellte die Vermutung auf, dass junge Patienten einen höheren NACU-Count aufweisen als ältere Tiere (*Kleinert 2019*). Bei anderen Laborparametern ist dies ebenfalls beschrieben (*Connolly et al., 2020; Kuhn et al., 2022*) und ist ein wichtiger Faktor für die Auswertung der erhobenen Befunde. Andernfalls kann es zu einer Fehl- oder Überinterpretation der Befunde kommen. In dieser Arbeit bestätigte sich diese Vermutung nicht (siehe Abbildung 6). Es konnte kein Einfluss des Alters auf den NACU-Count nachgewiesen werden.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen waren nahezu alle Hunde unter 10 Jahre alt, und die Rassen Labrador Retriever (n=21), Deutscher Schäferhund (n=17) und Golden Retriever (n=14) sind zahlenmäßig überrepräsentiert (vergleiche Abschnitt 8.1.2). Das ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei diesen Patienten fast ausschließlich um Patienten handelt, die im Rahmen einer Blutspende in der Klinik für Kleintiere vorstellig wurden und einen hämatologische und klinisch-chemische Routineuntersuchung erfuhren. Sehr viele befanden sich zudem in einer sehr engen Altersspanne vom 1. bis 2. Lebensjahr, da diese Hunde vorsorglich auf Hüftgelenks- und Ellenbogengelenksdysplasie (HD/ED) geröntgt wurden und in Rahmen dieser Narkose die Besitzer einer Blutspende zustimmten. Dies stellt einen vorselektionierenden Faktor dar.

Es zeigt sich, dass der NACU-Count einen recht hohen Variationskoeffizienten von 18,6% bei gesunden Patienten, und 8,1% bei erkrankten Patienten aufweist. Die Präzision ist im Bereich des Referenzintervalls als schlecht zu bezeichnen. Höhere Werte erbringen ein zufriedenstellenderes Ergebnis (*Moritz et al., 2000; Harvey 2012*). Die Werte sind vergleichbar mit den ebenfalls am ADVIA® 2120 gemessenen retikulierten Thrombozyten (rPLTs) (*Kuhn et al., 2022*).

Die mangelnde Präzision eines Parameters, vor allem im Bereich der oberen Referenzintervallgrenze, ist ein bekanntes Problem in der Labordiagnostik (*Harvey 2012; Kuhn et al., 2022*). Bei vielen Parametern nimmt der Variationskoeffizient mit steigenden Werten ab, je höher die Werte, desto geringer ist der Einfluss der Messvarianz. Da im Bereich des Referenzintervalls überwiegend niedrige Werte vorzufinden sind, ist hier der Einfluss deutlich größer und führt somit zu einem erhöhten CV (*Harvey 2012*).

Um diesem Problem entgegenzuwirken wurde ein Graubereich definiert, also ein Bereich oberhalb des Referenzintervalls, in dem der NACU-Count eine fragliche Relevanz hat. Dazu wurden die 18% Variationskoeffizient auf die obere Grenze des 90% Konfidenzintervalls aufaddiert. Der dadurch definierte Graubereich liegt somit bei 38-64. Werte, die oberhalb dieses klinischen Graubereichs liegen, werden als außerhalb des Referenzintervalls postuliert.

Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Werte (Skewness-Koeffizient: 3,1234; $p < 0,0001$) wurde auf die Bestimmung eines unteren Referenzbereiches verzichtet. Zusätzlich finden sich in der Literatur keine Hinweise, dass niedrige Werte an NETose eine klinische Relevanz haben.

9.3 Klinische Testung

Wie bereits beschrieben, zeigen sich in einigen Fällen Interferenzen mit der Messung der retikulierten Thrombozyten (siehe Abbildung 4). Dies äußert sich in nicht getrennten Wolken im Scattergramm des Reti-Kanals zwischen Thrombozyten (adult und juvenil/retikuliert) und dem NACU-Count. Eine mögliche Erklärung für dieser Beobachtung könnte in einer vermehrten Streubreite der retikulierten Thrombozyten, wie sie eventuell bei regenerativen Prozessen auftreten könnte, liegen. Durch die Möglichkeit von falsch hohen NACU-Werten erscheint eine visuelle Kontrolle, zumindest von hochgradigen Befunden, sinnvoll.

Auf eine Testung der kranken gemischten Gruppe gegen eine gesunde Gruppe musste aus zweierlei Gründen verzichtet werden. Zum einen ist die gesunde Kontrollgruppe mit $n=6$ sehr klein und eine statistische Signifikanz wäre grundlegend anzuzweifeln, auf der anderen Seite stammen die Patienten der gemischt kranken Gruppe und der Gruppe zur Bestimmung eines Referenzintervalls aus unterschiedlichen Jahren, sodass ein Vergleich dieser beiden Gruppen gegeneinander, aufgrund nicht auszuschließender zeitlicher Messvariabilität, nicht sinnvoll erscheint.

Aufgrund der Berichte aus der Literatur, dass NETose und cfDNA eine wichtige Rolle bei verschiedenen infektiösen und steril entzündlichen Erkrankungen spielt, wurden gängige Krankheitsgruppen hinsichtlich ihrer NACU-Werte evaluiert. Die Vermutung bestand, dass sich einzelne Erkrankungsarten durch ihren NACU-Count von anderen signifikant unterscheiden. Dies hätte zum einen die Berichte aus der Literatur bestätigt, zum anderen aber auch den Verdacht erhärtet, dass im NACU-Count NETose recht einfach quantifizierbar wäre. Die Mediane der Gruppen sind wie in Abschnitt 8.2.2. beschrieben: 14 (gesund), 22 (infektiös), 21 (entzündlich, aber nicht infektiös), 26,5 (Neoplasien), 16 (nicht entzündlich), 17 (Gewebeschaden), 18 (Mehrere). Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen konnte nicht festgestellt werden, es setzen sich jedoch die Mediane der Gruppen Neoplasie (26,5), infektiöse Entzündung (22) und sterile Entzündung (21) von den anderen Gruppen ab (siehe Abbildung 9).

Wie im Literaturteil beschrieben, gibt es Hinweise, dass NETose vermehrt bei immunhämolytischen Anämien auftritt (*Jeffery et al 2015; Lawson et al., 2018*). Gleiches gilt für die Pankreatitis (*Merz et al., 2015; Murthy et al., 2019*). Bei beiden Erkrankungen handelt es sich um schwerwiegende systemische, aber sterile Entzündungsreaktionen. Auch eine Sepsis, als schwerstwiegendste Form der Infektion, ist in der Literatur in Zusammenhang mit exzessiver NETose beschrieben (*Colón et al., 2019*).

Bei neoplastischen Erkrankungen lassen sich mehrere Ursachen für den erhöhten NACU-Count diskutieren, wobei bei den vorgefunden neoplastischen Erkrankungen NETose nicht als Mechanismus beschrieben wurde. Hier erscheint die Vermutung plausibler, dass eine Erhöhung des NACU-Counts von Zelluntergängen und Freisetzung aus neoplastischen Zellen stammt (*Jahr et al., 2001; Bettgowda et al., 2014*). Gerade bei solitären Tumormassen sind Nekrosen häufig vorzufinden (*Siravegna et al., 2017*) und Jahr et al (2001) konnten Hinweise erarbeiten, dass sowohl Nekrose als auch Apoptose eine der Hauptquellen für freie DNS bei Tumoren sind (*Jahr et al., 2001*).

Vor allem bei Betrachtung der Patienten, die einen NACU-Count über 100 aufweisen, fällt auf, dass sich hier fast ausschließlich stark lebensbedrohliche Erkrankungen finden. Einzige Ausnahme stellt hier ein Patient sieben Tage nach Re-Intervention zum Verschluss eines intrahepatischen Lebershunts dar. Eine mögliche Erklärung der hohen Werte bei diesem Patienten könnte in der Art und Weise des Verschlusses liegen. In der Klinik für Kleintiere Gießen werden jene Patienten, die nach erstmaligem Eingriff einen nicht ausreichenden Shuntverschluss aufweisen, erneut mittels Coilembolisation verschlossen. Bei einer Coilembolisation werden, minimalinvasiv über einen venösen Zugang, Drahtspiralen (Coils) in das Shuntgefäß eingebracht, die über die nächsten Wochen zu einem kompletten Verschluss dieses Gefäßes führen sollen (*Léveillé et al., 2003*). Eine mögliche Erklärung wäre, dass an diesem eingebrachten Fremdmaterial Blutzellen kaputt gehen und somit DNS-Fragmente freisetzen. Auch könnte es durch die Zunahme der Leberdurchblutung zu einem Schaden des Leberparenchyms kommen, was wiederum den Zelluntergang und damit die Freisetzung von DNS-Fragmenten begünstigt. Ein Zusammenhang mit NETose lässt sich bei diesem Patienten nicht finden.

Weiterhin auffällig ist eine Häufung von Patienten mit einer regenerativen Anämie in der Gruppe mit einem NACU-Count über 100. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass im Mittel 30,1% der freien DNS bei gesunden Patienten ihren Ursprung in der Erythropoese hat. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Gehalt von DNS aus erythroiden Vorläuferzellen positiv korrelierte mit der Aktivität des Knochenmarks. (*Lam et al., 2017*). So erscheint die Vermutung plausibel, dass es bei regenerativen Prozessen in der Erythropoese durch einen gesteigerten Gehalt an cfDNA ebenfalls zu einem Anstieg des NACU-Counts kommt. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass durchschnittlich die freie DNS aus erythroiden Vorläuferzellen größer ist als jene aus anderen Quellen. Zwar waren die gemessenen Fragmente alle im Bereich 150 Basenpaare (*Zheng et al., 2012*), jedoch kann auch

hier die Vermutung einer zunehmenden Streuungsbreite bei gesteigerter Freisetzung getroffen werden. Von den sechs Patienten zeigten fünf eine deutliche Retikulozytose (>140 000), weshalb kritisch hinterfragt werden kann, welche Mehrinformation der NACU-Count bei Anämie bringt. Ein Patient jedoch zeigte trotz Anämie (Hämatokrit 26%) keine Retikulozytose. Der NACU-Count war jedoch hoch. In der Studie von Lam et al (2017) konnten sie nachweisen, dass die nachgewiesene freie DNS nicht immer mit den gemessenen Zahlen von Retikulozyten korrelierte, sondern vielmehr die erythropoetische Aktivität auf Knochenmarksebene widerspiegelte (Lam et al., 2017). Die Hündin zeigte vorberichtlich bereits ein reduziertes Allgemeinbefinden seit circa zwei Wochen, was ein (per-)akutes Geschehen (Pseudoaregenerativ/Präregenerative Anämie) unwahrscheinlich macht. Auch in den mehrfach durchgeführten hämatologischen Blutuntersuchungen zeigten sich keine Hinweise auf eine Regeneration der Erythrozyten, weshalb hier von einer echten aregenerativen Anämie ausgegangen werden kann. Die behandelnden Tierärzte stellten die Diagnose einer nicht regenerativen immunmedierten Anämie. Eine Knochenmarksuntersuchung erfolgte, aufgrund der Verschlechterung des Allgemeinbefindens und der Entscheidung der Besitzer zur Euthanasie, nicht mehr. In der retrospektiven Betrachtung ist diese Diagnose schwieriger nachzuvollziehen. Die Patientin zeigte ebenfalls eine mittel- bis hochgradige Thrombozytopenie mit positiven labordiagnostischen Markern einer DIC und klinischen Anzeichen einer Störung im Gerinnungssystem (Petechien und Ekchymosen). All diese Befunde sprechen für eine overte DIC. Bei jenen *precursor-directed immunmediated anemia* ist dies beschrieben (Assenmacher et al., 2019). Die gemessenen Erythrozytenindices waren alle im physiologischen Bereich, was eine chronische Blutungsanämie unwahrscheinlicher macht. Bei jener nicht regenerativen immunmedierten Anämie kommt es zu einer Phagozytose von erythroiden Vorläuferzellen, was in einem Abbruch im Ablauf der Erythropoese resultiert. Dies unterscheidet diese Anämieform von anderen mit einer Hypo- bis Aplasie der erythroiden Reihe, wie sie zum Beispiel bei einer Pure red cell aplasia vorkommt (Weiss 2002). Die Möglichkeit besteht, dass sich diese pathophysiologischen Unterschiede bei Anämien anhand ihres NACU-Counts differenzieren lassen könnten. Einschränkend sind diese Ergebnisse jedoch hinsichtlich der Tatsache zu betrachten, dass viele der Patienten, auch jene schwer kranken, einen NACU-Count im Referenzintervall aufweisen. Diese Tatsache ist ein limitierender Faktor in der klinischen Verwendbarkeit. Es zeigt sich, dass nur hohe Werte eine Aussagekraft haben. Niedrige Werte lassen in der Regel, nur sehr eingeschränkte Rückschluss auf den Zustand des Patienten zu. Vor allem jene Patienten, bei denen Mehrfachmessungen des NACU-Counts vorlagen, zeigen eine,

wenn auch beschränkte, klinische Relevanz. Bei Entfernung des Problems (des Erkrankungsherd) zeigt sich eine rasche Reduktion des NACU-Counts (Patient A und B) und bei einer Verschlechterung des Zustandes des Patienten steigt der NACU-Count an (Patient C). Auch die Beobachtung von einigen Patienten nach Operation (Anstieg des NACU-Counts, wenn auch nicht immer in einen als klinisch vermutlich relevant postulierten Bereich) zeigt, dass es sich durchaus um einen Marker handeln könnte, der cfDNA quantifiziert. Eine veterinärmedizinische Studie konnte nachweisen, dass der Gehalt an cfDNA im Blut von Hunden nach einer Operation initial ansteigt, danach aber auch rasch wieder abfällt. Sie konnten eine Halbwertszeit von circa 5,64 Stunden feststellen (*Wilson et al., 2018*). Ein ähnlicher Anstieg nach einer Operation kann auch beim NACU-Count beobachtet werden.

Die Beobachtung, dass Patienten, welche eine Vorbehandlung mit immunmodulatorischen Medikamenten erhielten, einen höheren NACU-Count aufweisen, widerspricht ein wenig der Hypothese, dass im NACU-Count überwiegend NETs gemessen werden. Wie im Literaturteil beschrieben, zeigen Studien, dass verschiedene Pharmaka eine hemmende Rolle auf die Freisetzung von NETs haben. Darunter waren Medikamente, die eine häufige Verwendung in der veterinärmedizinischen Praxis haben (Glukokortikoide, Cyclosporin, NSAIDs etc.) (*Laukova & Konečná 2017*). Somit wären in der mit immunmodulatorischen Medikamenten vorbehandelten Gruppe niedrigere NACU-Counts zu erwarten gewesen, zumindest, wenn die Therapie anschlägt und der Patient eine klinische Besserung zeigt. Ein möglicher Erklärungsversuch liegt in einer, zumindest in gewissen Maßen vorliegenden, Vorselektion der Patienten. An einer Überweisungsklinik, wie der Klinik für Kleintiere Gießen, ist dies unvermeidbar. In der Regel werden in dieser Klinik nur Tiere vorgestellt, die bereits eine erste haustierärztliche Behandlung erfahren haben und oftmals schwerwiegendere Krankheiten aufweisen als die durchschnittliche Population einer Haustierarztpraxis. Darüber hinaus kann die Theorie aufgestellt werden, dass aufgrund einer schwereren Erkrankung, ein vermehrter Handlungsbedarf auf Seiten des behandelnden Tierarztes besteht. Dies stellt jedoch nur eine Hypothese dar, die zum aktuellen Zeitpunkt nicht beweisbar wäre. Um eine exaktere Antwort auf die Fragestellung zu bekommen, ob der NACU-Count durch Medikamente beeinflusst wird, wäre eine größere Standardisierung der Patientengruppen notwendig. Eine Betrachtung vom NACU-Count bei einer einzelnen Erkrankung, mit und ohne Vorbehandlung im oben beschriebenen Sinne, würde eine bessere Evaluation erlauben. Zwar ist auch bei diesem Vorgehen der Einfluss der Erkrankung auf den NACU-Count nicht gleich

null, es wäre aber zumindest postulierbar, dass er bei allen Patienten ein ähnliches Ausmaß hat.

Grundlage für die Anfertigung dieser Arbeit war die Beobachtung von hohen NACU-Counts bei schwer kranken Patienten. Daraus resultierte die Fragestellung welchen klinischen Nutzen dieser Parameter grundlegend hat und insbesondere, ob dieser Parameter einen prognostischen Wert in der Veterinärmedizin haben könnte. Unterstützt wird diese Vermutung von verschiedenen Studien, die bei der Messung von cfDNA oder NETose einen prognostischen Wert feststellen konnten (*Saukkonen et al., 2007; Burnett et al., 2016; Clementi et al., 2016; Wu et al., 2020*).

Auch in dieser Arbeit zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Menge an gemessenen zirkulierenden Nukleinsäuren (unabhängig davon, ob es sich dabei um cfDNA oder NETs handelt) und der Prognose. In der Aufteilung der Patienten nach Wertungsbereichen (Referenzintervall, Graubereich, außerhalb des Referenzintervalls) zeigte sich dies ebenfalls. Je höher der gemessene NACU-Count war, desto größer war die Wahrscheinlichkeit zu versterben in dieser Studie. Ein hoher NACU-Count geht mit einer signifikant schlechteren Prognose einher.

Als Ursache für diese Beobachtung lassen sich verschiedene Vermutungen aufstellen, die in ihrer Grundlage wieder die Frage nach der Zusammensetzung der NACU-Counts haben. Erstens kann aufgeführt werden, dass die gemessenen NACU-Werte die im Körper stattfindende Nekrose widerspiegeln. Je stärker dieser Prozess ist, desto schwerwiegender ist logischerweise auch die Erkrankung und somit auch die Prognose vorsichtiger. Eine weitere Erklärung stellen die oft mit freien Nukleinsäuren einhergehenden Histone dar. Ihnen wird sowohl eine prokoagulable Rolle zugeschrieben (*Zhang et al., 2022*) als auch eine direkte Toxizität für Endothelzellen des Gefäßsystems (*Xu et al., 2009*). Somit wirkt sich eine massive Freisetzung von Histonen negativ auf den Gesamtorganismus aus, verschlimmert also den Krankheitszustand (*Xu et al., 2009*), fördert einen prothrombotischen Zustand und begünstigt im weiteren Verlauf eine DIC (*Gould et al., 2014, Zhang et al., 2022*). Auch das Erfassen von NETs im NACU-Count ist möglich. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Höhe von NETs mit der Schwere der Erkrankung korreliert und einen negativ prognostischen Faktor bei verschiedenen Krankheiten darstellt (*Ng et al., 2020; Colón et al., 2019; Murthy et al., 2019*).

Auch wenn sich statistisch ein signifikanter Unterschied zwischen den überlebenden und verstorbenen Patienten hinsichtlich ihres NACU-Counts zeigt, ist dieser Parameter nicht geeignet, um Entscheidungen über das Weiterführen von Therapien oder das schmerzlose Erlösen von Patienten zu treffen. Es konnte kein Nachweis erbracht werden, dass ab einem bestimmten Wert alle

Patienten verstarben. Eine so schwerwiegende und folgenschwere Entscheidung sollte und kann nicht auf einem einzelnen Laborparameter basieren und muss immer den gesamten Patienten und dessen Besitzer mit einbeziehen.

Wahrscheinlich ist eher die Entwicklung des NACU-Counts im Krankheitsverlauf ein prognostischer Faktor und kann Hinweise auf das Ansprechen auf die eingeleitete Therapie geben. Bekräftigend für diese Vermutung ist der Verlauf der bereits beschriebenen fünf Jahre alten Ridgeback Hündin. Nach Entfernung des entzündlichen Herdes aus dem Mesenterium fiel der NACU-Count zügig ab und erreichte schnell den Referenzbereich. Trotz des initial hohen NACU-Counts überlebt die Hündin ihre Erkrankung und erholte sich komplett.

Die Ergebnisse der Testung auf Korrelation zwischen NACU-Count und Markern einer akuten Entzündungsreaktion zeigen teilweise signifikante Ergebnisse. Diese sind jedoch alle einschränkend zu betrachten aufgrund des sehr niedrigen Korrelationskoeffizienten.

Ähnliches kann beobachtet werden beim Zusammenhang zwischen Retikulozyten und NACU-Count. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang, bei niedrigem Korrelationskoeffizienten. Zwar würde eine positive Korrelation zwischen diesem Marker der Erythropoese gut zu den Beobachtungen von Lam et al aus dem Jahre 2017 passen, jedoch lässt der niedrige Korrelationskoeffizient keine fundierten Rückschlüsse zu (*Lam et al., 2017*).

9.4 Definierte Krankheitskomplexe

Wie in Abschnitt 8.3.1. beschrieben wurden die akquirierten Patienten hinsichtlich ihrer Erkrankung in die Gruppen DIC (n=29), Pankreatitis (n=12), IMHA (n=6), Sepsis (n=3) und Mehrere (n= 24) aufgeteilt. Die Mediane der Gruppen waren wie folgend: 31 (DIC), 36,5 (Pankreatitis), 42 (IMHA), 36 (Mehrere). In der Gruppe Sepsis war aufgrund der Gruppengröße keine Bildung eines Medians möglich (siehe Abbildung 16).

Bei allen vier untersuchten Krankheiten handelt es sich um häufige Erkrankungen im Alltag einer Überweisungsklinik. Leider überschneiden sich diese Erkrankungen oftmals auch, sodass eine Kategorisierung in die einzelnen Gruppen vielfach nicht möglich war. Eine Sepsis geht sehr oft mit Veränderungen des Gerinnungssystems einher (*de Laforcade et al., 2003*), und auch IMHA und Pankreatitis stellen oft hyperkoagulable Zustände dar (*Fenty et al., 2011, Nielsen et al., 2019*), und somit einen gewissen prä-DIC-Zustand. Somit besteht eine deutliche Einschränkung hinsichtlich der gesonderten Betrachtung dieser Krankheitskomplexe und es kann kritisch hinterfragt werden, ob

bei den drei verbliebenen Sepsis-Patienten, und vielen der IMHA- und Pankreatitis-Patienten, wirklich keine DIC vorlag oder ob sie einfach nicht oder noch nicht detektiert werden konnte. Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft der durchgeführten Untersuchung ist der Gruppengröße geschuldet. Wie oben beschrieben handelt es sich, zumindest in einer Überweisungsklinik, um nicht seltene Krankheiten, jedoch sind sie häufig mit anderen, hier ebenfalls betrachteten Erkrankungen, vergesellschaftet. Dies ist bei einer statistischen Auswertung ungünstig und führte zur Klassifizierung der Gruppe „Mehrere“, also Patienten die Kombinationen aus den vier untersuchten Erkrankungen aufwiesen. Ein daraus resultierender Aspekt ist das enorme Schrumpfen einzelner Gruppen, bis hin zur statistischen Bedeutungslosigkeit. Besonders in der Gruppe Sepsis führte dies zu allein drei Patienten die eine Sepsis ohne IMHA, Pankreatitis oder DIC aufwiesen. Ob eine Sepsis allein zu hohen NACU-Counts führt, ist hieraus nicht zu entscheiden. Ähnlich, wenn auch nicht so extrem, verlief es mit der Gruppe IMHA. Viele Patienten entwickelten zusätzlich eine Pankreatitis, wahrscheinlich aufgrund der Anämie bedingten Gewebhypoxie, oder eine DIC, sowohl die zerstörte Erythrozytenmembran, als auch inflammatorische Cytokine sind als Ursache plausibel (*Scott-Moncrieff et al., 2001*). Somit schrumpfte auch diese Gruppe auf allein sechs Patienten zusammen. Die statistische Aussagekraft ist auch hier überaus kritisch zu betrachten. Trotzdem fällt auf, dass gerade Patienten mit einer regenerativen Anämie vermehrt einen hohen bis sehr hohen NACU-Count aufweisen. Eine mögliche plausible Erklärung wäre die Messung von „Zellschrott“, der durch eine vermehrte Zerstörung von Erythrozyten zu Stande kommt, wie dies bereits in der Studie von Kleinert beobachtet werden konnte (*Kleinert 2019*). Auch ein gehäuftes Auftreten von längeren DNS-Fragmenten durch eine gesteigerte Erythropoese (*Zheng et al., 2012; Lam et al., 2017*) oder eine gesteigerte Produktion von NETs, wie es bei Hunden mit einer IMHA beschrieben ist (*Lawson et al., 2018*), kann als Ursache in Betracht gezogen werden. Auf eine spezielle Betrachtung des Zusammenhanges von NACU-Count und typischen labordiagnostischen Veränderungen bei IMHA-Patienten (z.B. Retikulozytenzahl, Bilirubinkonzentration und Sphärozytenzahl) wurde aufgrund der geringen Patientenzahl verzichtet. Aus gleichem Grund wurde keine Evaluierung des Zusammenhanges zwischen NACU-Counts und der Schwere der IMHA vorgenommen (zum Beispiel anhand der Dauer der Symptome vor Vorstellung, Anzahl Bluttransfusionen nach Diagnosestellung, Monotherapien oder Kombinationen an Immunsuppressiva). Rückblickend hätte hierdurch eine nähere Eingrenzung der Zusammensetzung des NACU-Counts bei IMHA-Patienten erfolgen können.

Die kanine Pankreatitis ist eine Erkrankung, die hinsichtlich ihres Verlaufes und ihrer Intensität überaus divers ist. Es kommen sowohl schwerste Verläufe mit lebensbedrohlichen Komplikationen als auch leichte Verläufe mit reduzierter Futteraufnahme und selbstlimitierenden gastrointestinalen Symptomen vor (*Bostrom et al., 2013*). Durch diese starke Varianz ist es schwer einen allgemein gültigen Zusammenhang zwischen Höhe des NACU-Counts und dem Vorliegen einer Pankreatitis zu treffen. Der Versuch einer Graduierung des Schweregrades anhand der Hospitalisierungsdauer zeigte keine Korrelation mit der Höhe des NACU-Counts. Die Beobachtung, dass weder der Schweregrad (Hospitalisierungsdauer) noch die Prognose einen Zusammenhang zum NACU-Count aufweisen (siehe Abbildung 18 und Tabelle 15), widerspricht der Hypothese, dass im NACU-Count NETs gemessen werden. Wie im Literaturteil aufgeführt konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass NETs zu schwereren Verläufen bei Pankreatitiden führen (*Merz et al., 2015; Leppkes et al., 2016; Murthy et al., 2019*). Hierbei ist jedoch aufzuführen, dass sich die Versuche an Mäusen nur in eingeschränktem Maße auf den Hund übertragen lassen. Es ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht geklärt, ob NETs bei der Pathogenese einer Pankreatitis beim Hund eine Rolle spielen. Weitere Studien zum Zusammenhang von NETs und Pankreatitis sind notwendig.

Die beschriebenen Punkte schränken die Aussagekraft der erbrachten Ergebnisse teilweise stark ein. Eine gute Alternative wäre es gewesen, die erstellten Gruppen nicht zueinander zu vergleichen, sondern einen Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zu führen, die ebenfalls im Zeitraum der Datenerfassung in der Klinik für Kleintiere vorstellig wurde. Ein Vergleich mit jenen Patienten, die zur Bestimmung eines Referenzintervalls herbeigezogen wurden, ist, aufgrund der zeitlichen Differenz und der damit einhergehenden Möglichkeit von unterschiedlichen analytischen Fehlerquellen, nicht möglich. Bei einer deskriptiven Betrachtung fällt jedoch auf, dass sich die Mediane der erkrankten Patienten (31,0 (DIC), 42,0 (IMHA), 36,5 (Pankreatitis)) deutlich vom Median der Gruppe zur Bestimmung des Referenzintervalls (14,1) absetzen. Diese Beobachtung lässt ein solches Vorgehen vielversprechend erscheinen.

Auf die Betrachtung von weiter aufgeschlüsselten Krankheitskomplexen, also zum Beispiel Patienten mit einer Sepsis und DIC oder Patienten mit IMHA und Pankreatitis, wurde aufgrund der geringen Anzahl dieser Patienten ebenfalls verzichtet.

9.5 Diskussion Einzelpatienten:

Zwar hat sich gezeigt, dass der NACU-Count nur bei wenigen Patienten mit schwerwiegenden

Erkrankungen eine klinisch signifikante Erhöhung zeigt, jedoch rechtfertigen gerade diese Patienten und ihre klinische Entwicklung eine weitere Betrachtung des Parameters und zeigen, dass er eine Relevanz hat oder zumindest haben könnte. Aus diesen Gründen möchte ich im Weiteren auf verschiedene Einzelpatienten eingehen und kurz die Rolle des NACU-Counts anreißen.

Ein circa zwei Jahre alter Bullmastiff Rüde wurde in die Klinik für Kleintiere Gießen zur Dialyse aufgrund einer akuten anurischen Nierenerkrankung überwiesen. Neben dieser schwerwiegenden Nierenerkrankung wurden ebenfalls radiologische Veränderungen in der Lunge festgestellt. In der, im Rahmen der weiterführenden klinischen Aufarbeitung durchgeführten Untersuchung des Knochenmarks, aufgrund persistierender Hyperkalzämie, ließ sich eine maligne epitheliale Neoplasie nachweisen. Eine Zuordnung zu einem Organ war aufgrund der starken Dedifferenzierung der Zellen nicht mehr möglich. Bereits initial zeigte der Patient eine geringgradige Anämie, diese verlief progressiv. Der gemessene NACU-Count stammt vom 26. Mai 2021 und liegt bei 133. Die Untersuchung des Knochenmarks vom 31. Mai 2021 zeigte eine hochgradig gesteigerte Zellularität mit mittel- bis hochgradig granulozytärer Hyperplasie und geringgradig gesteigerter Erythropoese, welche als nicht adäquat in Relation zur Schwere der vorliegenden Anämie bewertet wurde. Als Ursache für alle beobachteten Veränderungen (hämatologische Abweichungen, akute Nierenerkrankung, radiologische Lungenveränderungen und DIC) ist die nachgewiesene Neoplasie als wahrscheinlich anzusehen. Insbesondere im Hinblick auf die Tatsache, dass andere Ursachen für eine akute Nierenerkrankung ausgeschlossen werden konnten. Anhand dieses Patienten lässt sich die Vermutung treffen, dass, ähnlich wie in der Studie von Lam et al 2017, der NACU-Count in gewissem Maße die Aktivität des Knochenmarks widerspiegelt. Es soll aber nochmals darauf hingewiesen sein, dass es sich dabei um Vermutungen handelt, die an einzelnen Patienten keineswegs belegt werden können. Für eine adäquate Beantwortung dieser Frage sind weitere Studien zwingend erforderlich.

Ein nicht traumatisches Hämoperitoneum stellt einen häufigen Notfall bei mittelalten bis älteren Hunden dar. Bei circa 75% der Patienten liegt die Ursache in einem malignen Tumor, am häufigsten ist hier das Hämangiosarkom vorzufinden (*Hammond et al., 2008*). Ähnliches zeigte sich bei einem 12 Jahre alten Hund, der aufgrund von Schwäche vorstellig wurde. Es konnte die Diagnose eines rupturierten Milztumors gestellt werden. In der anschließenden Operation wurde die Milz entfernt. Es zeigten sich jedoch weitere nicht rezidivierbare Metastasen in der Leber. Anhand der Befunde und

durch die pathohistologische Untersuchung der Milz, bestätigte sich die bereits vermutete Diagnose eines Hämangiosarkoms. Die Messung vor Operation zeigte einen NACU-Count von 349, einen Tag nach Operation lag dieser nur noch bei 89. Es zeigt sich ein drastischer Abfall des NACU-Counts nach, zumindest teilweiser, Entfernung des Problems. Dieser rasche Abfall wäre vereinbar mit der überaus kurzen Halbwertszeit von cfDNA bei Hunden (*Wilson et al., 2018*). Als Ursache für diesen hohen NACU-Count können verschiedene Gründe vermutet werden. Erstens kann eine Freisetzung von cfDNA durch neoplastische Zellen vermutet werden (auch wenn dies im speziellen beim Hämangiosarkom nicht beschrieben ist), des Weiteren erscheint auch eine intratumorale Nekrose plausibel, gerade bei Tumormassen ist ein erhöhter Grad an Nekrose beschrieben (*Siravegna et al., 2017*). Auch die bei Hämangiosarkomen häufig vorliegende DIC (*Hammer et al., 1991*) kann als Ursache oder Folge eines erhöhten Gehaltes an zirkulierenden Nukleinsäuren in Betracht gezogen werden.

Die bereits in den Ergebnissen des Abschnittes klinische Testung beschriebene Patientin B (Verdacht auf sekundäre IMHA aufgrund Abszesses) zeigt ein ähnliches Bild. Eine Entfernung des Krankheitsprozesses (hier der Abszess im Mesenterium) führte zu einer Besserung des Krankheitszustandes. Dies spiegelte sich ebenfalls in den sinkenden NACU-Werten wider.

Der acht Jahre alte Mischlingsrüde (Patient C), der aufgrund eines aufgenommen Steins mit daraus resultierendem Ileus operiert werden musste, zeigt das prognostische Potential des NACU-Counts. Vorstellig wurde der Patient mit einem niedrigen, im Referenzintervall liegenden, NACU-Count von 13. Nach Nahtdehiszenz und Entwicklung eines septischen Abdomens steigt dieser Wert auf 73. Von einer Erkrankung, die oftmals nicht zum Tode des Patienten führt (gastrointestinaler Fremdkörper), ging dieser Patient in einen akut lebensbedrohlichen Zustand über, an dem er auch letztendlich verstarb. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Ätiologie, oder zumindest die Schwere der Erkrankung, in Einzelfällen doch mit dem NACU-Count im Zusammenhang zu stehen scheint, auch wenn sich keine statistischen Unterschiede darstellen lassen. Besonders interessant ist auch die Tatsache, dass die gemessenen CRP-Werte seit Aufnahme stetig abfielen, und ihren Tiefpunkt am Tag der Diagnose des septischen Abdomens erreichten. In diesem Fall spiegelte der NACU-Count (wenn auch noch komplett neu und nicht wirklich evaluiert im klinischen Alltag) die klinische Situation des Patienten besser wieder als das etablierte CRP. Der maximale Peak-Wert beim kaninen CRP nach einem akuten Insult ist in der Regel nach 24 Stunden erreicht (*Conner et*

al., 1988), vergleichend zum NACU-Count lässt sich die Vermutung aufstellen das dieser gegebenenfalls einen früheren Maximalwert verzeichnet.

Bei all diesen Patienten handelt sich oft um Einzelfälle, jedoch geben sie Hinweise, dass der NACU-Count, und generell die Messung freier Nukleinsäuren, ein nützlicher Parameter in der Tiermedizin werden könnte.

9.6 Neoplasien und der NACU-Count

Es fällt auf, dass in allen Gruppen sich eine gehäufte Zahl an Patienten mit malignen Neoplasien befindet, da dies nicht den initialen Erwartungen entsprach, möchte ich diese Beobachtung hier näher beleuchten. Wie auch zuvor können verschiedene Ursachen als möglicher Grund für hohe NACU-Werte bei Neoplasie aufgeführt werden.

Direkte Nachweise von erhöhten Konzentrationen an NETs bei Patienten mit Krebs sind in der Literatur spärlich zu finden. So konnten unterschiedliche Studien nachweisen, dass verschiedene Tumore beim Menschen einen stimulierenden Faktor auf die Freisetzung von NETs haben können (*Decker et al., 2019, Zhu et al., 2021*). Eine andere Studie konnte einen vermehrten Nachweis an H3Cit in Thromben feststellen. Bei Patienten mit Neoplasien war der Gehalt von H3Cit im Vergleich zu anderen Patienten erhöht (*Thålin et al., 2016*). Andere Studien konnten keinen Nachweis einer gesteigerten NETose bei Patienten mit Lungentumoren bringen, einzig im Mausmodell ließ sich eine gesteigerte Produktion nach Stimulation nachweisen (*Arpinati et al., 2020*). Des Weiteren gibt es immer mehr Hinweise, dass NETose bei der Tumorgenese und -progression eine Rolle spielt. Eine Studie zum Einfluss von NETose bei Patienten mit Magenkrebs kam zu dem Schluss, dass NETs die Tumorprogression zu einem bösartigeren Phänotyp fördern und im fortgeschrittenen Stadium zirkulierende neutrophile Granulozyten eine größere Neigung zur Freisetzung von NETs zeigen als jene Patienten in früheren Stadien (*Zhu et al., 2021*). Auch konnten Forscher nachweisen, dass sich in NETs Tumorzellen verfangen und sie somit eine Metastasierung begünstigen. Mäuse, die eine Behandlung mit DNase erhielten, zeigten eine niedrigere metastatische Belastung als jene, die keine solche Therapie erhielten (*Cools-Lartigue et al., 2013*). Eine weitere Studie zu kutanen ulzerierten Melanomen konnte hingegen *in vitro* eine Hemmung der Migration und direkte zytotoxische Wirkungen von NETs auf Melanomzellen nachweisen (*Schedel et al., 2019*). Darüber hinaus scheinen auch bei Tumoren NETs einen prognostischen Wert zu haben. Hohe Werte des NETose Markers H3Cit zeigten in einer Studie

signifikant kürzere Überlebenszeiten an (Thälín et al., 2018). Grundlegend zeigen verschiedene Studien einen negativen Einfluss von NETs bei neoplastischen Erkrankungen, sie scheinen Metastasen zu begünstigen und eine Tumorprogression zu beschleunigen (Demkow 2021). Andere Studien beschäftigen sich mit der Untersuchung von frei in der Blutbahn zirkulierender DNS bei Patienten mit Neoplasien. Eine Arbeitsgruppe konnte dabei nachweisen, dass sowohl Nekrose als auch Apoptose eine Quelle für cfDNA bei Tumorpatienten sind, wobei sie anmerken, dass eine große Variation zwischen der Menge an cfDNA vorliegt, die tumorösen Ursprungs ist (3-93%). Allgemein ließen sich bei Nekrose größere Basenpaare nachweisen (bis zu 10000bp) (Jahr et al., 2001). Eine andere Studie konnte darüber hinaus nachweisen, dass auch ohne zirkulierende Tumorzellen, im Blut freie DNS von Tumorzellen (ctDNA) zirkuliert (Bettegowda et al., 2014). Die nachweisbare Menge an cfDNA im Blut scheint im allgemeinen Rückschlüsse auf die tumoröse Dignität zuzulassen (Shapiro et al., 1983, Liang et al., 2021), aber auch im spezielleren, zum Beispiel bei Lungen- oder Prostataveränderungen, konnten niedrigere cfDNA Konzentrationen (in Blut oder Seminalflüssigkeit) bei gutartigen, im Vergleich zu bösartigen Veränderungen nachgewiesen werden (Liang et al., 2021, Ponti et al., 2019). Jedoch muss hier aufgeführt werden, dass nicht alle malignen Tumore mit hohen Werten an cfDNA einhergehen, einige zeigen deutliche Abweichungen, andere hingegen nur geringgradige bis keine Veränderungen (Shapiro et al., 1983). Hier ist eine starke Ähnlichkeit zum NACU-Count vorhanden.

Auch die Länge der zirkulierenden Fragmente ist bei bösartigen Tumorerkrankungen im Durchschnitt kürzer als bei gesunden Patienten (Giacona et al., 1998; Underhill et al., 2016; Yamamoto et al., 2018) und eine Studie zu Patienten mit Nierenkarzinomen zeigte das kürzere Fragmente mit einer kürzeren Progressionsfreien Überlebenszeit assoziiert sind (Yamamoto et al., 2018).

Neben all diesen Beobachtungen aus der Humanmedizin finden sich mittlerweile auch Studien zum Thema cfDNA und Neoplasien in der Veterinärmedizin. Eine Studie untersuchte gesunde, kranke und Hunde mit Mammatumoren. Es zeigte sich, dass anhand des Gehaltes an langen und kurzen cfDNA Fragmenten und des Integritätsindex eine Unterscheidung zwischen neoplastisch und nicht neoplastischen/gesunden Patienten zu treffen war. Hunde mit Mammatumoren hatten deutlich höhere Werte. Zusätzlich ließ sich bei malignen Mammatumoren ein signifikant kleinerer Integritätsindex nachweisen als bei benignen Mammatumoren (Beffagna et al., 2017). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass sich kaum Unterschiede an Gehalt von cfDNA fanden zwischen Hunden mit nicht lymphoiden Neoplasien, kranken Hunden oder gesunden Hunden. Einzig primär

lymphoide Neoplasien setzten sich deutlich ab und mittels Antigenrezeptor Reassessment konnte gezeigt werden, dass es sich um DNS von primär lymphatischen Tumoren handelt. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen Gehalt an cfDNA und Remissionszeit nachgewiesen werden. Ein cfDNA Gehalt von >25ng/ml geht mit einer signifikant kürzeren Remissionszeit bei diesen Tumoren einher (*Schaefer et al., 2007*).

All dies zeigt, dass die Messung von freien Nukleinsäuren (wie es im NACU-Count erfolgt), unabhängig davon, ob es sich dabei um DNS-Fragmente (cfDNA) oder NETs handelt, einen interessanten Ansatzpunkt für die Diagnostik und im weitergeführten Sinne auch die Therapie von neoplastischen Erkrankungen bietet. In keiner der Gruppen waren einzelne neoplastische Erkrankungen mehrfach vorhanden, weshalb aus dieser Arbeit keinerlei Aussage über die NACU-Werte bei zum Beispiel Hämangiosarkomen oder Lymphomen beim Hund getroffen werden kann. Eine mögliche Idee für weiterführende Studien wäre eine genauere Betrachtung bei häufigen neoplastischen Erkrankungen. Auf dies möchte ich im Abschnitt „Ausblick“ näher eingehen.

9.7 Vermutungen zum Inhalt des NACU

Auch wenn es nicht das primäre Ziel dieser Arbeit war und ist, die gemessenen Bestandteile des NACU-Counts zu evaluieren, lassen sich aus den erhobenen Befunden doch nähere Vermutungen aufstellen.

Anhand der erhobenen Befunde fällt auf, dass nur bei wenigen Patienten der NACU-Count deutlich über das Referenzwertintervall ansteigt. Viele Erkrankungen führen zu keinen nennenswerten Abweichungen von der Norm. Tendenzen zeigen sich jedoch bei Erkrankungen die einen starken Turn-over von Zellen zeigen, also bei allen entzündlichen Erkrankungen (unabhängig von der Ursache der Entzündung) und bei Neoplasien. Gerade neoplastische Erkrankungen sind charakterisiert durch ein ungehemmtes Wachstum, bei soliden Neoplasien kommt es zusätzlich häufig zu einer zentralen Nekrose aufgrund der mangelnden Versorgung mit Blutgefäßen und einer damit einhergehenden Hypoxie (*Thomlinson & Gray 1955*). So scheint eine plausible Erklärung für hohe NACU-Werte nicht nur in der NETose zu liegen, sondern auch in den entstehenden Resten, die bei einer vermehrten Produktion und Zerstörung von Entzündungszellen und einem allgemeinem Gewebeuntergang in Folge von Nekrose und Apoptose anfallen. Dies wird auch durch die Beobachtung in der Arbeit von Kleinert gestärkt. In ihrer Arbeit zur Etablierung von Nachweisverfahren von NETs beim Hund konnte sie die Beobachtung machen, dass durch Behandlung der Vollblutproben mit DNase, der NACU-Count nicht abfiel, sondern ganz im

Gegenteil stark anstieg. Bei vergleichender Betrachtung der Scattergramme (vor Behandlung und nach Behandlung mit DNase) fällt auf, dass die Wolke der Retikulozyten und Thrombozyten fast gänzlich verschwunden sind und eine weitere Wolke sich in das Gate des NACU-Counts ausbreitete. Die Vermutung liegt dementsprechend nahe, dass die starke Erhöhung des NACU-Counts in dieser Untersuchung durch die Messung von freigesetzten Nukleinsäuren herrührt, wie sie bei der Lyse von Zellen entsteht. (Kleinert 2019).

Dass Patienten mit einer Anämie häufig auch einen erhöhten NACU-Count aufweisen, ist ebenfalls hinweisend für die Messung an cfDNA im NACU-Count. So konnte eine Studie nachweisen, dass im Median 30,1% der cfDNA bei gesunden Patienten von erythroiden Vorläuferzellen abstammt (Lam et al., 2017). Interessanterweise konnten sie auch anhand der Menge der cfDNA eine Unterscheidung der Form der Anämie treffen. Es zeigte sich, dass bei reduzierter erythropoetischer Aktivität im Knochenmark auch der Gehalt an cfDNA reduziert war. Zusätzlich war, anhand der Menge an cfDNA, eine Unterscheidung zwischen myelodysplastischem Syndrom und aplastischer Anämie möglich, und der Gehalt an cfDNA korrelierte positiv mit dem Ansprechen auf die Therapie bei Patienten mit aplastischer Anämie (Lam et al., 2017). Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass cfDNA von nicht hämatopoetischen Zellen kürzer ist als die cfDNA hämatopoetischen Ursprungs (Zheng et al., 2012). Diese beiden Tatsachen kombinierend erscheint ebenfalls die Hypothese plausibel, dass im NACU-Count ein Anteil der zirkulierenden cfDNA gemessen wird. Bei starker Stimulation des Knochenmarks, wie es im Rahmen einer regenerativen Anämie vorkommt, wäre der erhöhte NACU-Count durchaus plausibel zu erklären mit einer größeren Spanne der freiwerdenden cfDNA-Fragmente.

Gegen die Vermutung, dass zellfreie DNS gemessen wird, sprechen ein wenig die größtenbedingten technischen Limitationen des hämatologischen Analyzers ADVIA® 2120i. Jedoch konnte eine Studie zu Pankreastumoren eine Aufschlüsselung der Länge der zirkulierenden DNS, zumindest bei diesen Tumoren, liefern. Sie konnten eine Spannweite der gemessenen Fragmente von 30-80 000 nm feststellen, wobei 50% der gemessenen Fragmente im Bereich von 100-900nm lagen (Giacona et al., 1998). Somit lag ein Teil der gemessenen Fragmente bei einer Länge von über 900nm, was vermutlich für einen hämatologischen Analyzer erfassbar ist. Aufgrund dieser großen Spannweite ist aber nicht davon auszugehen, dass in der Messung des NACU-Counts die gesamte zellfreie DNS gemessen wird. Viel mehr erscheint es wahrscheinlicher, dass nur die obere Spitze des Eisberges mit dieser Methode erfassbar ist.

Einige Studien zeigten, dass die Länge der cfDNA abhängig ist von der Art der die cfDNA

freisetzenden Zelle (*Zheng et al., 2012*). Aber auch bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen zeigten sich Längenunterschiede der cfDNA im Vergleich zu gesunden Patienten (*Shapiro et al., 1983; Giacona et al., 1998; Underhill et al., 2016; Yamamoto et al., 2018; Ponti et al., 2019*). Manche Studien zeigten, dass bei verschiedenen Tumorerkrankungen deutlich mehr kleinere Fragmente an cfDNA im Blut feststellbar waren als bei gesunden Patienten (*Underhill et al., 2016, Yamamoto et al., 2018*). Wieder andere konnten das Gegenteil beobachten, in der Studie von Ponti et al (2019) beobachteten sie, dass cfDNA Fragmente von >1000 Basenpaaren gehäuft auftraten bei Patienten mit einem Prostatakarzinom als bei Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie (*Ponti et al., 2019*). Diese Differenzen zwischen den einzelnen Neoplasien würden gut die unterschiedlichen NACU-Werte der in dieser Studie vorhandenen Neoplasien erklären. Gerade Hämangiosarkome fielen durch einen NACU-Count im erhöhten Bereich auf, wobei hier neben der Freisetzung von cfDNA aus neoplastischen Zellen auch die regenerative Anämie oder die vermehrte Zerstörung von Blutzellen im netzartigen Geflecht des Tumors als mögliche Ursache in Frage kommen.

Die oben aufgeführten Aspekte sprechen eher gegen eine Messung von NETose und mehr für eine Erfassung von cfDNA im NACU-Count. Jedoch kann auch logisch argumentiert werden, dass eine Erfassung von aufgeknäulter und untereinander vernetzter DNS, wie sie bei NETose vorliegt, anhand der Messmethodik des ADVIA® 2120/120i einfacher und somit wahrscheinlicher ist. Bekräftigt wird dies durch die von den zu messenden Teilchen benötigte Mindestgröße. Auch die Beobachtung, dass gerade bei Patienten mit einer immunmedierten Anämie häufiger ein hoher NACU-Count vorliegt, ist hinweisend auf die Messung von NETs. Die Studie von Lawson et al (2018) konnte recht eindeutig eine erhöhte Konzentration von NETs bei Hunden mit einer IMHA nachweisen (*Lawson et al., 2018*). Kritisch anzumerken ist jedoch, dass auch ein erhöhter cfDNA Gehalt bei Hunden mit einer IMHA nachgewiesen ist (*Jeffery et al., 2015*). Bei der, in dieser Studie nachgewiesenen cfDNA könnte es sich aber auch einfach um NETs handeln.

Die endgültige Beantwortung der Frage, was exakt im NACU-Count erfasst wird, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch ausstehend. Schlussendlich ist auch eine Messung von sowohl cfDNA als auch NETose möglich.

9.8 Limitationen

Nach Beendigung der Auswertung der erhobenen Befunde sind verschiedene Limitationen der Arbeit deutlich geworden.

Als erstes kann hier die Messung von Retikulozyten, und somit die Bestimmbarkeit des NACU-Counts, aufgeführt werden. Standardmäßig werden Retikulozyten erst seit 2019 im Zentrallabor der Justus-Liebig-Universität erfasst. Zuvor war eine gesonderte Anforderung notwendig, welche immer einer vorherigen Indikation bedurfte. Dies kann zu einer Verschiebung führen, die ein gehäuftes Auftreten von anämischen Patienten zur Folge hat.

Darüber hinaus handelt es sich bei der Kleintierklinik der Justus-Liebig-Universität um eine tertiäre Überweisungsklinik. Dem geschuldet ist ein stark vorselektioniertes Patientengut. Ein großer Teil der Patienten wird mit akut lebensbedrohlichen und schwerwiegenden Krankheiten vorgestellt. Patienten mit leichten Erkrankungen (zum Beispiel Zahnstein, leichter Durchfall/Arthrose oder Zwingerhusten) stellen eine Ausnahme im Patientengut dar. Hierbei ist jedoch aufzuführen, dass eine Einschätzung der Schwere der Erkrankung rein subjektiv auf klinischen Erfahrungen erfolgte. Eine evidenzbasierte, graduelle Evaluierung der Schwere der Erkrankung fand nicht statt. Auch liegt eine starke Ausrichtung auf kardiologische Patienten, und hier insbesondere angeborene Herzerkrankungen, vor. Dies bedingt einen überdurchschnittlich hohen Anteil an Patienten nach Herzkathetereingriffen.

Somit lässt sich zwar sagen, dass die erhobene Population ein breitgefächertes Bild der Patienten der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität repräsentiert, aufgrund der oben aufgeführten Ausrichtung der Klinik, dieses Bild jedoch nur eingeschränkt vergleichbar ist mit den Patienten in kleineren Kliniken oder Praxen.

Viele Patienten zeigen „falsch negative“ Ergebnisse im Hinblick auf den NACU-Count. So sind sie zwar schwerstwiegend erkrankt, zeigen aber Werte im Referenz- oder Graubereich. Drastischer formuliert lässt sich sagen, dass Patienten mit einem NACU-Count im Referenzbereich zwischen kerngesund und lebensbedrohlich erkrankt schwanken können. Die Sensitivität des NACU-Counts kann als schlecht angenommen werden. Anders sieht es hingegen bei hohen Werten aus. Wie in den Ergebnissen beschrieben, zeigen nahezu ausnahmslos alle Patienten mit hohen Werten schwere Krankheitsbilder. Bis auf einzelne Ausreißer zeigte sich zusätzlich, dass gesunde Patienten in der Regel einen NACU-Count im Referenz- bis Graubereich aufweisen. Die Spezifität kann als akzeptabel bis gut vermutet werden.

9.9 Abschließende Betrachtung: Was bringt der NACU-Count?

Die durchgeführten Auswertungen zeigen, dass es sich beim NACU-Count um einen Marker handelt, der einen prognostischen Wert besitzt und, wenn auch in geringerem Maße, vermutlich mit

der Schwere der Erkrankung korreliert. Es zeigt sich jedoch auch, dass er ein wenig sensibler Marker ist. Nur wenige Patienten zeigen Ausschläge in einen relevanten Bereich, unabhängig von der Schwere oder ihrer zugrundeliegenden Erkrankung. Viele Patienten mit einer schwerwiegenden, lebensbedrohlichen Erkrankung zeigen einen NACU-Count im Referenzintervall auf, jedoch zeigt sich, dass Patienten mit hohen Werten in der Regel schwerstwiegendste Erkrankungen aufweisen. Es lässt sich vereinfacht sagen, nur hohe Werte haben eine Aussagekraft, niedrige Werte sagen, nüchtern betrachtet, nicht viel aus. Auch die Fragestellung, ob sich einzelne ätiologische Gruppen oder spezielle Erkrankungen anhand ihres NACU-Counts unterscheiden lassen, ist ähnlich zu beantworten. Keine Erkrankung sticht signifikant hervor, keine der ätiologischen Gruppen setzt sich statistisch voneinander ab. Vielen Patienten, unabhängig von der Art ihrer Erkrankung besitzen Werte im Referenzintervall. Der NACU-Count kann bei systemischen Neoplasien oder Entzündungen erhöht sein, muss es aber nicht. Niedrige Werte lassen auch hier keinen Rückschluss auf den Gesundheitsstatus des Patienten zu.

Der Fakt, dass ein sehr großer Anteil der Patienten einen NACU-Count im Referenzintervall, oder zumindest im klinischen Graubereich, aufweist, ist einer der großen, die klinische Verwendbarkeit stark einschränkenden, Aspekte.

Des Weiteren, und wie bereits zu erwarten war, ist die Frage nach dem Inhalt des NACU-Counts nicht näher einzugrenzen. Dies war jedoch auch nie Ziel dieser Arbeit.

Der NACU-Count hat einen prognostischen Wert und kann ein nützliches Werkzeug werden, um kritisch kranke Patienten zu erkennen oder das Ansprechen auf die eingeleitete Therapie zu quantifizieren. Bevor er jedoch als Teil der Routinediagnostik verwendet werden kann, sind weitere, spezialisiertere Studien zwingend erforderlich. Bei jeglicher Verwendung, insbesondere bei sehr hohen Werten, ist eine visuelle Plausibilitätskontrolle erforderlich, um visuelle Interferenzen zu erkennen.

9.10 Ausblick

Basierend auf der Tatsache, dass Patienten mit einer regenerativen Anämie einen höheren NACU-Count aufweisen und den Beobachtungen der Forschungsgruppe von Lam et al. (2017), erscheint die weitere Betrachtung des NACU-Counts bei anämischen Patienten sinnvoll. Wenn sich mit dem NACU-Count wirklich die großen Fragmente von cfDNA nachweisen lassen, so könnte er eventuelle Aussagen über die Regeneration einer Anämie liefern. Eine häufige Frage bei nicht regenerativen Anämien in der Tiermedizin ist: Wirklich nicht regenerativ (aregenerativ) oder noch

nicht regenerativ (pseudoaregenerativ/präregenerativ)? Da sich die Therapie und Prognose bei Anämien grundlegend nach ihrer Ursache richtet ist eine genaue Klassifizierung der Anämie (Retikulozytenzahl bzw. Aktivität im Knochenmark, Erythrozytenidices) essenziell zur Findung der exakten Diagnose. Eine Bestimmung der Aktivität des Knochenmarks könnte hierbei einen entscheidenden Zeitvorteil gegenüber der Messung der Retikulozyten bringen.

Dies beschränkt sich jedoch keineswegs auf den Hund. Gerade Katzen zeigen häufiger aregenerative Anämie, wobei bei dieser Tierart die Aktivität im Knochenmark in Bezug auf ihre Ätiologie variiert. So zeigen Katzen mit einer nicht regenerativen immunmedierten hämolytischen Anämie auf Knochenmarksebene eine gesteigerte Erythropoese (*Weiss 2008*), während Katzen mit einer pure red cell aplasia eine Hypoplasie der erythroiden Reihe im Knochenmark zeigen (*Viviano et al., 2011*). So lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eventuell verschiedene Anämieformen anhand ihres NACU-Counts unterschieden werden könnten.

Auch im Bereich der veterinärmedizinischen Onkologie könnte sich der NACU-Count als ein nützliches Diagnostikum entwickeln, um maligne von benignen Prozessen zu unterscheiden. Die zwei aufgeführten veterinärmedizinischen Studien (*Schaefer et al., 2007; Beffagna et al., 2017*) zeigen, dass die Messung von freien Nukleinsäuren durchaus ein Potential hat, dem weiter nachgegangen werden sollte. Auch als Marker für die Dauer der zu erwartenden Remission bei Lymphompatienten könnte er nützlich sein. Leider waren in der gesamten Patientenpopulation nur zwei Patienten, die an einem Lymphom erkrankt waren, wobei nur einer eine Chemotherapie erfuhr. Bei diesem Patienten liegt nur eine einzelne Messung vor. Mögliche Fragestellungen für weitere Studien wären: Wie verhält sich der NACU-Count bei Patienten mit Lymphomen? Gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien (I-V), Substadien (klinisch (b) oder nicht klinisch (a)), Immunophänotypen (B- oder T-Zell) oder Lokalisationen (primär hepatisch, gastrointestinal, kutan, multizentrisch etc.)? Lässt die Höhe des NACU-Counts eine Vermutung über die Remission (komplette, partielle oder ausbleibende Remission) zu? Bestätigt sich, dass Patienten mit höheren NACU-Counts eine kürzere Remission als Patienten mit niedrigeren Werten zeigen? Steigt der NACU-Count vielleicht kurz vor einem klinisch detektierbaren Relaps an? Das Lymphom wäre hierfür ideal, da es die häufigste hämatopoetische Neoplasie des Hundes ist (*Dorn et al., 1970*) und recht standardisierte Chemotherapieprotokolle weit verbreitet sind. Erste Studien bei Hunden mit verschiedenen Neoplasien lassen diese Betrachtung als sinnvoll erscheinen (*Kim et al., 2021*). Ein weiterer speziellerer Ansatzpunkt wäre die Betrachtung bei Hunden mit rupturierten Milztumor. Wie in der Diskussion der Einzelpatienten beschrieben zeigen sich hier Hinweise zur Nützlichkeit

des NACU-Counts. Der aktuelle Stand der Bildgebung und Labordiagnostik ist nicht ausreichend für eine sichere Unterscheidung zwischen malignen und benignen Prozessen (*Hammond et al., 2008; Lee et al., 2018*). Solange keine Metastasen vorliegen, ist es somit, ohne pathologische Untersuchung, nahezu unmöglich eine Unterscheidung zwischen gutartiger Veränderung und bösartiger Veränderung (in der Regel Hämangiosarkom) zu treffen. Eventuell wäre anhand des NACU-Counts endlich eine sichere Unterscheidung zwischen benignen und malignen Ursachen für einen rupturierten Milztumor zu treffen. Die im oberen Abschnitt aufgeführten Studien zum Thema zellfreie DNS lassen eine Betrachtung des NACU-Counts als Unterscheidungshilfe zwischen beiden Prozessen sinnvoll erscheinen (*Schaefer et al., 2007; Beffagna et al., 2017; Ponti et al., 2019; Liang et al., 2021*). Um dieser These näher auf den Grund gehen zu können sind jedoch weitere Studien notwendig. Auch interessant wäre eine Betrachtung bei Patienten, bei denen im Rahmen einer Kontrolluntersuchung nicht-rupturierte Milztumore auffallen.

Auch eine generellere Betrachtung bei verschiedenen Neoplasien erscheint sinnvoll. Sollten sich einzelne Neoplasien absetzen, könnte die Entwicklung des NACU-Counts nach einer Operation Hinweise liefern auf eventuelle Metastasen oder verbliebenes Tumorrestgewebe.

Aber auch nach anderen Operationen konnte in einzelnen Fällen ein Anstieg des NACU-Counts beobachtet werden. Der Zeitraum dieses Anstiegs und der Verbleib bis zur Normalisierung ist jedoch deutlich länger als die in der Studie von Wilson et al bestimmte Zeitspanne (*Wilson et al., 2018*). Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass nur besonders große DNS-Fragmente gemessen werden oder, dass eine Erfassung von NETs erfolgt, denen mittlerweile eine Rolle bei verschiedenen Wundheilungsstörungen zugeschrieben wird (*Fadini et al., 2016*). Auch hier wären mehr Verlaufskontrollen bei Patienten nach typischen Operationen interessant. Mögliche Beobachtungen könnten die frühzeitige Detektion von Wundheilungsstörungen oder anderweitigen postoperativen Komplikationen sein.

Es zeigt sich, dass nach einer erstmaligen Betrachtung dieses Laborparameters mehr Fragen entstanden sind als beantwortet werden konnten. Dies wirkt auf den ersten Blick unbefriedigend, zeigt aber das weitere Studien nicht nur notwendig, sondern auch sinnvoll sind, um das volle Potential dieses Parameters zu evaluieren.

10. Zusammenfassung

Bei schwer kranken Patienten zeigten sich immer wieder vermehrte Events im Bereich des NACU-Counts. Die Vermutung besteht, dass der NACU-Count zu einem großen Teil aus NETs besteht. Bei NETs handelt es sich um filamentöse Strukturen, die aus Nukleinsäuren und Histonen bestehen. Sie sind Teil der angeborenen, unspezifischen Immunantwort und werden bei verschiedenen Stimuli überwiegend von PMNGs freigesetzt (*Brinkmann et al., 2004*). Es wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Verhinderung der systemischen Ausbreitung spielen (*Urban et al., 2009; McDonald et al., 2012; Yipp et al., 2012*). In den letzten Jahren konnte auch bei verschiedenen Erkrankungen ein Zusammenhang mit NETs (oder alleinig cfDNS) gestellt werden. Mehrere Studien konnten im allgemeinen zeigen, dass sowohl NETs im speziellen als auch cfDNS ein prognostischer Faktor zu sein scheinen (*Forsbloom et al., 2014; Saukkonen et al., 2007*). Aber auch in Bezug auf spezielle Erkrankungen zeigte sich zum Beispiel, dass die Hemmung der Produktion von NETs im Sepsismodell die Prognose verbesserte (*Colón et al., 2019*), bei Pankreatitiden NETs mit der Schwere der Erkrankung korrelieren (*Merz et al., 2015*), und eine Hemmung der NETose die Prognose bei Pankreatitiden verbessert (*Murthy et al., 2019*). Auch bei Patienten mit einer septischen DIC konnte ein erhöhter Gehalt an NETs nachgewiesen werden (*Delabranche et al., 2017; Stiel et al., 2019*).

Basierend auf diesen Berichten aus der Literatur und der Arbeit von Kleinert (2019) war es Ziel dieser Arbeit eine allgemeine Betrachtung aus klinischer Perspektive dieses neuen Parameters vorzunehmen. Als erster Schritt wurden retrospektiv Patienten akquiriert, die aufgrund eines Gesundheitschecks in der Klinik für Kleintiere vorstellig wurden. Im zweiten Schritt wurde retrospektiv eine gemischte Patientengruppe gesammelt, die in der Klinik für Kleintiere vorstellig wurden. Aufgrund der Berichte der Literatur, und gestärkt durch erste vorläufige Auswertungen, wurden diese zwei Teile um einen dritten prospektiven Teil in dem spezifische Erkrankungen genauer untersucht wurden erweitert. Es wurden gezielt Patienten mit einer Sepsis, Pankreatitis, IMHA und DIC gesammelt.

Zur Bestimmung eines Referenzintervalls wurden 120 gesunde Hunde gesammelt. Es zeigte sich ein Ausreißer, sodass für die statische Auswertung 119 Hunde zur Verfügung standen. Der Median der Gruppe liegt bei 17,1, das gebildete obere Referenzintervall liegt bei 37,9 (90% Konfidenzintervall, 33-53,0). Kein Wert lag unter 1, weshalb auf die Bestimmung eines unteren

Referenzintervalls verzichtet wurde. Es konnte keine Altersabhängigkeit festgestellt werden. Zur Bestimmung des Variationskoeffizienten wurden ein gesunder und ein kranker Hund zehnmalig gemessen. Es zeigten sich folgende Ergebnisse für gesund: 38,5 Mittelwert, Standardabweichung 7,14 und Variationskoeffizient 18,6% und bei krank: Mittelwert 300,3, Standardabweichung 16,16 und Variationskoeffizient 8,6%. Die 18% Variationskoeffizient wurden auf die obere Grenze der Konfidenzintervalls addiert, sodass sich ein Graubereich ergibt (38-63 NACUs).

Der zweite Teil der Studie besteht aus 201 Patienten, die überwiegend als krank einzustufen sind. Drei Patienten mussten aufgrund visueller Interferenzen im Scattergramm ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Diagnosegruppen waren wie folgend: gesund n=6, Median 14; entzündlich infektiös n=29, Median 22; entzündlich nicht infektiös n=27, Median 21, nicht entzündlich n=59, Median 16; Neoplasien n=20, Median 26,5; Gewebeschaden n=37, Median 17; diverse Erkrankungen n= 23, Median 18. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, einzig die Mediane der Gruppen Neoplasie, infektiös und nicht infektiös, aber entzündlich setzten sich visuell von den anderen Gruppen ab. Bei 171 Patienten war bekannt, ob sie eine Vorbehandlung mit immunmodulatorischen Medikamenten bekamen, 118 Patienten erhielten Medikamente, 73 erhielten keine Medikamente. Es zeigte sich ein schwach signifikanter Zusammenhang zur Vorbehandlung mit Medikamenten. Es lagen 171 Temperaturmessungen vor, 137 Patienten wiesen eine Normothermie auf, 26 eine Hyperthermie und 8 Patienten eine Hypothermie. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen NACU-Count und Temperatur. Die teils bestehenden signifikanten Zusammenhänge zwischen Markern einer Entzündungsreaktion und den Retikulozyten in Hinblick auf den NACU-Count sind aufgrund der sehr niedrigen Korrelationskoeffizienten nur eingeschränkt zu betrachten. Im Bezug zur Prognose zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen NACU und dem Überlebensstatus des Patienten. Bei 172 Patienten war ihre drei Monatsprognose bekannt, davon verstarben 37, 135 Patienten überlebten den benannten Zeitraum. Es zeigt sich zwar, dass je höher der NACU-Count, desto eher versterben die Patienten, es ließ sich jedoch kein Cut-off Wert erkennen, ab dem alle Patienten verstarben.

Die dritte Gruppe besteht aus insgesamt 74 Hunde, wobei zwei aufgrund visueller Interferenzen ausgeschlossen wurden. Aufgrund des häufigen Vorkommens von mehr als einer der untersuchten Erkrankungen mussten etliche Patienten in die Gruppe „Mehrere“ klassifiziert werden, was zu einem Zusammenschumpfen der Gruppen führte. Die Ergebnisse hinsichtlich des NACU-Counts waren wie folgende: IMHA: n= 6, Median 42; DIC: n=29, Median 31; Sepsis n=3; Pankreatitis n=12, Median 36,5; Mehrere n=21, Median 36. Es zeigen sich keine statistischen Unterschiede.

Ebenfalls zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Prognose und dem NACU-Count bei Patienten mit einer DIC, oder der Schwere (gemessen an der Hospitalisierungsdauer) einer Pankreatitis und dem NACU-Count.

Die erste, breitgefächerte Betrachtung des klinischen Nutzens des NACU-Counts liefert gemischte Ergebnisse. So zeigen sich einzelne Antworten auf die gestellten Fragen, welchen jedoch mehr neue Fragen folgen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Parameter bei einigen Patienten einen klinischen Nutzen haben kann. Gerade da der NACU-Count bei jeglichen Messungen des Hämatologischen Profils am ADVIA® 2120i automatisch erfasst wird, ist die Erfassung großer Patientenmengen einfach zu erreichen. Was zum aktuellen Zeitpunkt sicher anzuraten ist, ist eine visuelle Prüfung (Auswertung der Scattergramme) der erhobenen NACU-Werte, insbesondere bei sehr hohen Werten. Eine weitere Betrachtung des NACU-Counts in fokussierteren Studien erscheint notwendig, aufgrund der immer neuen Erkenntnisse im Bereich der Pathophysiologie und klinischen Diagnostik von zellfreier DNS und NETose ebenfalls vielversprechend.

11. Summary

In severely ill patients, there were consistently increased events in the NACU count. It is suspected that the NACU count largely consists of NETs. NETs are filamentous structures composed of nucleic acids and histones. They are part of the innate, nonspecific immune response and are predominantly released by PMNs in response to various stimuli (*Brinkmann et al., 2004*). They are believed to play a role in preventing systemic spread (*Yipp et al., 2012; McDonald et al., 2012; Urban et al., 2009*). In recent years, a correlation between NETs (or solely cfDNA) and various diseases has been established. Several studies have generally shown that both NETs specifically and cfDNA appear to be prognostic factors (*Forsbloom et al., 2014; Saukkonen et al., 2007*). For example, in relation to specific diseases, it was found that the inhibition of NET production improved prognosis in a sepsis model (*Colon et al., 2019*), that NETs correlate with the severity of pancreatitis (*Merz et al., 2015*), and that inhibition of NETosis improved prognosis in pancreatitis (*Murthy et al., 2019*). Elevated NET levels were also detected in patients with septic DIC (*Delabranche et al., 2017; Stiel et al., 2019*).

Based on these reports from the literature and the work of Kleinert (2019), the aim of this study was to provide a general clinical perspective on this new parameter. In the first step, patients who visited the Small Animal Clinic for a health check were retrospectively recruited. In the second step, a mixed patient group who visited the Small Animal Clinic was retrospectively collected. Based on the literature reports and supported by initial preliminary evaluations, these two parts were extended by a third prospective part, where specific diseases were examined more closely. Patients with sepsis, pancreatitis, IMHA, and DIC were specifically collected. To determine a reference interval, 120 healthy dogs were collected. One outlier was identified, leaving 119 dogs for statistical evaluation. The median of the group was 17.1, with the upper reference interval at 37.9 (90% confidence interval, 33-53.0). No value was below 1, so a lower reference interval was not determined. No age dependence was found. To determine the coefficient of variation, a healthy and a sick dog were measured ten times each. The results were as follows for healthy: mean 38.5, standard deviation 7.14, and coefficient of variation 18.6%, and for sick: mean 300.3, standard deviation 16.16, and coefficient of variation 8.6%. The 18% coefficient of variation was added to the upper limit of the confidence interval, resulting in a gray area (38-63 NACUs).

The second part of the study consists of 201 patients, predominantly classified as sick. Three patients had to be excluded due to visual interference in the scattergram. The results regarding their

diagnostic groups were as follows: healthy n=6, median 14; inflammatory infectious n=29, median 22; inflammatory non-infectious n=27, median 21; non-inflammatory n=59, median 16; neoplasms n=20, median 26.5; tissue damage n=37, median 17; various diseases n=23, median 18. No significant differences were found between the groups, although the medians of the neoplasia, infectious, and non-infectious, but inflammatory groups were subjectively different from the other groups. Of the 171 patients, it was known whether they received pretreatment with immunomodulatory drugs; 118 patients received medication, and 73 did not. A weakly significant association with pretreatment with drugs was found. There were 171 temperature measurements; 137 patients had normothermia, 26 had hyperthermia, and 8 had hypothermia. No correlation was found between the NACU count and temperature. The partially significant correlations between markers of inflammatory response and reticulocytes regarding the NACU count are limited due to very low correlation coefficients. Concerning prognosis, a significant relationship was observed between NACU and the patient's survival status. Of 172 patients with a three-month prognosis known, 37 died, and 135 survived the specified period. Although higher NACU counts were associated with a higher likelihood of death, no cut-off value could be identified where all patients died. The third group consists of 74 dogs, with two excluded due to visual interference. Due to the frequent occurrence of more than one of the studied diseases, several patients had to be classified into the "Multiple" group, leading to a reduction in the groups. The results regarding NACU count were as follows: IMHA: n=6, median 42; DIC: n=29, median 31; sepsis n=3; pancreatitis n=12, median 36.5; Multiple n=21, median 36. No statistical differences were observed. No significant relationship was found between prognosis and NACU count in patients with DIC or the severity (measured by hospitalization duration) of pancreatitis and NACU count.

The first broad consideration of the clinical utility of the NACU count provides mixed results. While some answers to the questions posed are evident, many new questions arise. It has been shown that this parameter can have clinical utility in some patients. Since the NACU count is automatically recorded in any hematological profile measurements on the ADVIA® 2120i, capturing large patient populations is relatively easy. What is currently advisable is a visual review (evaluation of scattergrams) of the collected NACU values, especially with very high values. Further focused studies on the NACU count are necessary and promising, given the ongoing discoveries in the field of pathophysiology and clinical diagnostics of cell-free DNA and NETosis.

12. Abkürzungen

aPTT: aktivierte partielle Thromboplastinzeit

ASVCP: American society for veterinary clinical pathology

cfDNA: cell free DNA, zellfreie DNS

cPLI: canine pankresspezifische Lipase

CRP: C-reaktives Protein

CV: Variationskoeffizient

DAMPs: damage associated molecular patterns

DGGR-Lipase: 1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester- Lipase

DIC: disseminierte intravasale Koagulopathie

DNase: Desoxyribonuklease

DNS: Desoxyribonukleinsäure

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ETs: Extracellular traps

GM-CSF: granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

H3Cit: citrulliniertes Histon H3

hisDNA: Histon Desoxyribonukleinsäure

HMGb1: High mobility group protein 1

IL-4: Interleukin 4

IL-6: Interleukin 6

IL-8: Interleukin 8

IMHA: immunhämolytische Anämie

LPS: Lipopolysaccharide

MAC: membrane attack complex

MPO-DNA: Myeloperoxidase-Deoxyribonukleinsäure-Komplexe

NACU: nucleic acid containing unit count

NADPH-Peroxidase: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-Peroxidase

NETs: neutrophil extracellular traps (extrazelluläre Neutrophilennetze)

NETose: Vorgang der Freisetzung von NETs

NSAID: Nicht steroidale Antiphlogistika

nSIRS: nicht infektiöses systemische inflammatorisches Response-Syndrom

PAD4: Peptidylarginine Deiminase 4

PAMPs: pathogen assoziierte molekulare Muster

PaO₂/FiO₂: Horovitz-Quotient

PCR: Polymerase Kettenreaktion

PLN: Protein losing nephropathy

PMA: Phorbol myristate acetate

PMNG: polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyt

PKK: Plasma Prekallikrein

PK: Plasma Kallikrein

PRM: Pattern recognition molecules

PT: Prothombin Zeit

rhDNase: dornase alfa

RNS: Ribonukleinsäure

ROS: reactive oxygen species (freie Sauerstoffradikale)

rPLTs: retikulierte Thrombozyten

SAA: Serum-Amyloid A

SIRS: systemisches inflammatorisches Response-Syndrom

SOFA score: sequential organ function assessment score

TPLO: Tibia plateau leveling osteotomy

13. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Scattergramm des Peroxidasekanal. schwarz: Zellschrot und kernhaltige Erythrozyten (links) und Thrombozytenaggregate (rechts); blau: Lymphozyten; türkis: Large unstained cells (LUC); grün: Monozyten; magenta: neutrophile Granulozyten, darunter in gelb eosinophile Granulozyten 20

Abbildung 2 Scattergramm BASO Kanal, links gesund, rechts Pseudobasophilie, blau mononukleäre Zellen (Monozyten, Lymphozyten), magenta: neutrophile und eosinophile Granulozyten, gelb: Basophile bzw lyeresistente Zellen, Pseudobasophilie 21

Abbildung 3 Retic-Scattergramm einer Messung des ADVIA® 2120i (Firma Siemens Healthcare), in schwarz: Erythrozyten mit Retikulozyten (rechts aus dem Bild ziehend), in Türkis Thrombozyten mit angrenzenden, in magenta abgebildeten, retikulierten Thrombozyten, unten rechts (hellgrün) NACU-Count 23

Abbildung 4 Visuelle Interferenz, mangelnde Trennung zwischen retikulierten Thrombozyten (magenta), NACU (grün) und maturaen Thrombozyten (türkis). Dies führt zu visuellen Interferenzen. 29

Abbildung 5 Balkendiagramm für die Referenzintervallgruppe, deutlich zu erkennen ist die rechtschiefe Verteilung des Parameters. Die einzelne Messung am rechten Rand (Bereich 100-110) stellt einen Ausreißer dar. 41

Abbildung 6 Prüfung auf Altersabhängigkeit, die dünnen, schwarzen Linien stellen jeweils das 10. und 90. Zentil dar, die breitere schwarze Linie stellt den Median dar. 42

Abbildung 7 Ausschlussprozess und Bestimmung der validen Messungen 44

Abbildung 8 Gruppe 2a Evaluation der Diagnosegruppen 47

Abbildung 9 Untersuchung der Ätiologie als Einflussfaktor auf den NACU-Count, der grau hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar 48

Abbildung 10 Gruppe 2b, klinische Testung..... 54

Abbildung 11 Einfluss der Körpertemperatur auf den NACU-Count, der grau hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar 55

Abbildung 12 Einfluss der Vorbehandlung mit immunmodulatorischen Medikamenten auf den NACU-Count, der grau hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar 56

Abbildung 13 Gruppe 2 c, prognostische Evaluation 58

Abbildung 14 Evaluation des Verhältnisses von Prognose zu NACU-Count, der grau hinterlegte

Bereich stellt das Referenzintervall dar	59
Abbildung 15 Zusammensetzung der prospektiven Gruppe.....	60
Abbildung 16 Zusammenhang NACU und verschiedene definierte Krankheitsbilder, die schwarze Linie zwischen Sepsis und „Mehrere“ stellt den Ausschluss der Gruppe „Sepsis“ aufgrund sehr geringer Probenanzahl dar (3 Patienten mit reiner Sepsis), der graue hinterlegte Bereich stellt das Referenzintervall dar	62
Abbildung 17 prognostischer Nutzen des NACU bei an einer DIC erkrankten Patienten	65
Abbildung 18 prognostischer Nutzen des NACU bei an Pankreatitis erkrankten Patienten	66

14. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 NETs fördernde Stoffe.....	11
Tabelle 2 NETs hemmende Stoffe.....	11
Tabelle 3 Darstellung der gemessenen Werte, zugehörig zum Scattergramm des obrigen Patienten	23
Tabelle 4 modifizierter SOFA-Score nach Ripanti et al., 2012, ergänzt nach Pandharipande et al., 2009 und Hayes et al., 2010.....	35
Tabelle 5 Rasseverteilung in Referenzwertpopulation.....	39
Tabelle 6 postulierte Wertungsbereiche des NACU-Counts.....	43
Tabelle 7 Rasseverteilung in gemischter Population.....	45
Tabelle 8 Verteilung NACU-Werte nach Ätiologieklassen.....	49
Tabelle 9 NACU-Werte ≥ 64	50
Tabelle 10 Ergebnisse der Testung auf Korrelation zwischen NACU-Count und Markern einer akuten Entzündungsreaktion, die fettgedruckten Zahlen stellen die signifikanten p-Werte dar.....	57
Tabelle 11 Verteilung NACU-Werte in Intervallen.....	59
Tabelle 12 Rasseverteilung in prospektiver Gruppe.....	61
Tabelle 13 hohe NACU-Werte in der Gruppe 3, außerhalb des Referenzintervalls.....	63
Tabelle 14 auslösende Ursachen der an einer DIC erkrankten Patienten.....	64
Tabelle 15 NACU-Count im Bezug zur Hospitalisierungsdauer bei Patienten mit einer Pankreatitis.....	67

15. Literaturverzeichnis

- Abi Abdallah, D. S., Lin, C., Ball, C. J., King, M. R., Duhamel, G. E., & Denkers, E. Y. (2012). Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infection and immunity*, 80(2), 768–777.
- Abrams S., Morton B., Alhamdi Y., Alsabani M., Lane S., Welters I., Wang G., and Toh CH. (2019). A Novel Assay for Neutrophil Extracellular Trap Formation Independently Predicts Disseminated Intravascular Coagulation and Mortality in Critically Ill Patients, *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019 Oct 1;200(7):869-880.
- Alfaro, C., Teijeira, A., Oñate, C., Pérez, G., Sanmamed, M. F., Andueza, M. P., Alignani, D., Labiano, S., Azpilikueta, A., Rodriguez-Paulete, A., Garasa, S., Fusco, J. P., Aznar, A., Inogés, S., De Pizzol, M., Allegretti, M., Medina-Echeverz, J., Berraondo, P., Perez-Gracia, J. L., & Melero, I. (2016). Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(15), 3924–3936.
- Aristizábal, B., & González, Á. (2013). Innate immune system. In *Autoimmunity: From bench to bedside [Internet]*. El Rosario University Press.
- Arpinati, L., Shaul, M.E., Kaiser-Iluz, N., Mali, S., Mahroum, S., Fridlender, Z.G. (2020). NETosis in cancer: a critical analysis of the impact of cancer on neutrophil extracellular trap (NET) release in lung cancer patients vs. mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 69, 199–213 (2020).
- Assenmacher, TD., Jutkowitz, LA., Koenigshof, AM., de A Lucidi, C., Scott, MA. (2019). Clinical features of precursor-targeted immune-mediated anemia in dogs: 66 cases (2004-2013). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2019 Aug 1;255(3):366-376.
- Beffagna G., Sammarco A., Bedin C., Romualdi C., Mainenti M., Mollo A., Cavicchioli L., Ferro S., Trez D., De Maria R., Nitti D., Saccani A., Campanella M., Agostini M., Zappulli V. (2017). Circulating Cell-Free DNA in Dogs with Mammary Tumors: Short and Long Fragments and Integrity Index. *PLoS One*, 12(1), e0169454.

- Behnen, M., Leszczczyk, C., Möller, S., Batel, T., Klinger, M., Solbach, W., & Laskay, T. (2014). Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 193(4), 1954–1965.
- Bettgowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, BR., Wang, H., Lubner, B., Alani, RM., Antonarakis, ES., Azad, NS., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J.L., Lee, CC., Fecher, LA., Gallia, GL., Gibbs, P., Le, D., Giuntoli, RL., Goggins, M., Hogarty, MD., Holdhoff, M., Hong, SM., Jiao, Y., Juhl, HH., Kim, JJ., Siravegna, G., Laheru, DA., Lauricella, C., Lim, M., Lipson, EJ., Marie, SK., Netto, GJ., Oliner, KS., Olivi, A., Olsson, L., Riggins, GJ., Sartore-Bianchi, A., Schmidt, K., Shih, IM., Oba-Shinjo, SM., Siena, S., Theodorescu, D., Tie, J., Harkins, TT., Veronese, S., Wang, TL., Weingart, JD., Wolfgang, CL., Wood, LD., Xing, D., Hruban, RH., Wu, J., Allen, PJ., Schmidt, CM., Choti, MA., Velculescu, VE., Kinzler, KW., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Diaz, LA Jr. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*. 2014 Feb 19;6(224):224ra24
- Bostrom, BM., Xenoulis, PG., Newman, SJ., Pool, R., Fosgate, G., Steiner, M. (2013). Chronic pancreatitis in dogs: a retrospective study of clinical, clinicopathological, and histopathological findings in 61 cases. *The Veterinary journal*. 2013;195:73–79.
- Bottazzi, B., Doni, A., Garlanada, C., Mantovani, A., (2010). An integrated view of humoral innate immunity: Pentraxins as paradigm. *Annual Review of Immunology* Vol. 28:157-183 (Volume publication date 1 March 2010)
- Binder, CJ., Shaw, PX., Chang, M-K., Boullier, A., Hartvigsen, K., Horkko, S., Miller, YI., Woelkers, DA., Corr, M., Witztum, JL (2005). The role of natural antibodies in atherogenesis. *Journal of Lipid Research* 46: 1353–1363.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D., Weinrauch, Y., Zychlinski, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 05 Mar 2004: Vol. 303, Issue 5663, pp. 1532-1535
- Burnett, DL., Cave, NJ., Gedye, KR., Bridges, JP. (2016). Investigation of cell-free DNA in canine plasma and its relation to disease. *The Veterinary Quarterly* . 2016;36(3):122–129

- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H., & Kubes, P. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine*, 13(4), 463–469.
- Clementi, A, Virzi, GM, Brocca, A, Pastori, S, de Cal, M, Marcante, S, Granata, A, Ronco, C. (2016). The Role of Cell-Free Plasma DNA in Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purif.* 2016;41(1-3):34-40.
- Colón, D. F., Wanderley, C. W., Franchin, M., Silva, C. M., Hiroki, C. H., Castanheira, F. V. S., Donate, P. B., Lopes, A. H., Volpon, L. C., Kavaguti, S. K., Borges, V. F., Speck-Hernandez, C. A., Ramalho, F., Carlotti, A. P., Carmona, F., Alves-Filho, J. C., Liew, F. Y., & Cunha, F. Q. (2019). Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. *Critical care (London, England)*, 23(1), 113.
- Connolly, SL., Nelson, S., Jones, T., Kahn, J., Constable, PD. (2020). The effect of age and sex on selected hematologic and serum biochemical analytes in 4,804 elite endurance-trained sled dogs participating in the Iditarod Trail Sled Dog Race pre-race examination program. *PLOS ONE* 15(8): e0237706.
- Conner, J. G., Eckersall, P. D., Ferguson, J., & Douglas, T. A. (1988). Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in veterinary science*, 45(1), 107–110.
- Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P., Ferri, L. (2013). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *Journal of Clinical Investigation*. 2013 Jul 1;123(8):3446–58. .
- da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 698-738.
- de Boer, O. J., Li, X., Teeling, P., Mackaay, C., Ploegmakers, H. J., van der Loos, C. M., Daemen, M. J., de Winter, R. J., & van der Wal, A. C. (2013). Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis*, 109(2), 290–297.

- De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., & Hogg, N. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, *121*(24), 4930–4937. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-486217>
- De Laforcade, A.M., Freeman, L.M., Shaw, S.P., Brooks, M.B., Rozanski, E.A. and Rush, J.E. (2003). Hemostatic Changes in Dogs with Naturally Occurring Sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *17*: 674-679.
- Decker, A.S.; Pylaeva, E.; Brenzel, A.; Spyra, I.; Droege, F.; Hussain, T.; Lang, S.; Jablonska, J. (2019). Prognostic Role of Blood NETosis in the Progression of Head and Neck Cancer. *Cells* 2019, *8*, 946.
- Delabranche, X., Stiel, L., Severac, F., Galoisy, A., Mauvieux, L., Zobairi, F., Lavigne, T., Toti, F., Anglès-Cano, E., Meziani, F., Boisramé-Helms, J. (2017). Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation, ; Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches, Volume 47, Number 3, March 2017, pp. 313-317(5)
- Demattio, L., Conejeros, I., Grob, D., Gärtner, U., Taubert, A., Hermosilla, C., Wehrend, A. (2022). Neospora caninum-induced NETosis in canine colostral polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Reproductive Immunology*. 154. 103749. 10.1016/j.jri.2022.103749.
- Demkow, U. (2021). Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Invasion, Evasion and Metastasis *Cancers* *13*, *17*: 4495.
- Dömer, D., Walther, T., Möller, S., Behnen, M., & Laskay, T. (2021). Neutrophil Extracellular Traps Activate Proinflammatory Functions of Human Neutrophils. *Frontiers in immunology*, *12*, 636954.
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., & Dick, J. E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature immunology*, *11*(7), 585–593.
- Doolin, T., Gross, S., & Siryaporn, A. (2020). Physical mechanisms of bacterial killing by histones. *Physical Microbiology*, 117-133.

- Dorn CR, Taylor DO, Schneider R. (1970): The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibl Haematol.* 1970;(36):403-15.
- Elwardany, R. M., Kotb, F. M., Alhabibi, A. M., El-ghafour, A., & Mohamed, S. (2021). Plasma cell-free erythroid DNA as a new marker for differentiation between many types of anemia. *Scientific Journal of Al-Azhar Medical Faculty, Girls*, 5(2): 405-411.
- Esmon C. T. (2003). Inflammation and thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH, 1(7), 1343–1348.
- Fadini, G. P., Menegazzo, L., Rigato, M., Scattolini, V., Poncina, N., Bruttocao, A., Ciciliot, S., Mammano, F., Ciubotaru, C. D., Brocco, E., Maescotti, M. C., Cappellari, R., Arrigoni, G., Millioni, R., Vigili de Kreutzenberg, S., Albiero, M., & Avogaro, A. (2016). NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans. *Diabetes*, 65(4), 1061–1071.
- Falcone, FH., Dahinden, CA., Gibbs, BF., Noll, T., Amon, U., Hebestreit, H., Abrahamson, O., Klaucke, J., Schlaak, M., Haas, H. (1996) Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen. *European Journal of Immunology*. 1996 May;26(5):1147-55.
- Fenty, RK., Delaforcade, AM., Shaw, SE., O'Toole, TE. (2011). Identification of hypercoagulability in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia by means of thromboelastography. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. 2011 Feb 15;238(4):463-7.
- Forsblom, E., Aittoniemi, J., Ruotsalainen, E., Helmijoki, V., Huttunen, R., Jylhävä, J., Hurme, M., & Järvinen, A. (2014). High cell-free DNA predicts fatal outcome among *Staphylococcus aureus* bacteraemia patients with intensive care unit treatment. *PloS one*, 9(2), e87741.
- Fransson, B. A., Bergström, A., Wardrop, K. J., & Hagman, R. (2007). Assessment of three automated assays for C-reactive protein determination in dogs. *American journal of veterinary research*, 68(12), 1281-1286.
- Friedrichs, K., Harr, K., Freeman, K., Szladvits, B., Walton, R., Barnhart, K., Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference

intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology* (2012) 41(4) 441-453

- Fuchs, TA., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology* 2007 Jan 15;176(2):231-41.
- Garden, O. A., Kidd, L., Mexas, A. M., Chang, Y. M., Jeffery, U., Blois, S. L., Fogle, J. E., MacNeill, A. L., Lubas, G., Birkenheuer, A., Buoncompagni, S., Dandrieux, J. R. S., Di Loria, A., Fellman, C. L., Glanemann, B., Goggs, R., Granick, J. L., LeVine, D. N., Sharp, C. R., Smith-Carr, S., Swann, J.W., Szladovits, B. (2019). ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 33(2), 313–334.
- Galli, SJ., Borregaard, N., Wynn, TA. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*. 2011 Oct;12(11):1035-1044.
- Geiger, TL., Sun, JC. (2016). Development and maturation of natural killer cells. *Current Opinion in Immunology*. 2016 Apr; 39:82-89.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), 656-661.
- Giacona, M. B., Ruben, G. C., Iczkowski, K. A., Roos, T. B., Porter, D. M., & Sorenson, G. D. (1998). Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17(1), 89–97.
- Gibbs G.,Prechtl G., Jones V., (2020). Nucleic acid containing units (NACU); a new parameter in haematology. https://www.postersessiononline.eu/173580348_eu/congresos/BSH2020/aula/-EP_41_BSH2020.pdf
- Gibbs, G., Campbell, G., & Christie, I. (2009). Pseudobasophilia and the Advia 120. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 14(3), 159–163.

- Gibor, U., Perry, Z., Netz, U., Kirshtein, B., Mizrahi, S., Czeiger, D., Sebbag, G., & Douvdevani, A. (2022). Circulating Cell-free DNA in Patients With Acute Biliary Pancreatitis: Association With Disease Markers and Prolonged Hospitalization Time-A Prospective Cohort Study. *Annals of surgery*, 276(6), e861–e867.
- Grob, D., Conejeros, I., López-Osorio, S., Velásquez, Z. D., Segeritz, L., Gärtner, U., Schaper, R., Hermosilla, C., & Taubert, A. (2021). Canine Angiostrongylus vasorum-induced early innate immune reactions based on NETs formation and canine vascular endothelial cell activation in vitro. *Biology*, 10(5), 427.
- Gordon, S., Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 2005;5:953–964.
- Gould, T. J., Vu, T. T., Swystun, L. L., Dwivedi, D. J., Mai, S. H., Weitz, J. I., & Liaw, P. C. (2014). Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(9), 1977–1984.
- Gould, T. J., Vu, T. T., Stafford, A. R., Dwivedi, D. J., Kim, P. Y., Fox-Robichaud, A. E., Weitz J. I., Liaw, P. C. (2015). Cell-free DNA modulates clot structure and impairs fibrinolysis in sepsis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(12), 2544-2553.
- Gupta, A. K., Giaglis, S., Hasler, P., & Hahn, S. (2014). Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *PloS one*, 9(5), e97088.
- Hammer, A.S., Couto, C.G., Swardson, C. and Getzy, D. (1991), Hemostatic Abnormalities in Dogs With Hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5: 11-14.
- Hammond, T. N., & Pesillo-Crosby, S. A. (2008). Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003–2005), *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(4), 553-558. Retrieved Apr 16, 2023,

- Harris, N., Kunicka, J., Kratz, A. (2005). The ADVIA 2120 hematology system: flow cytometry-based analysis of blood and body fluids in the routine hematology laboratory. *International journal of Laboratory Hematology* . 2005;11(1):47-61.
- Harvey, JW. (2012). Introduction to Veterinary Hematology. *Veterinary Hematology*. 2012:1–10.
- Haute, G. V., Caberlon, E., Squizani, E., de Mesquita, F. C., Pedrazza, L., Martha, B. A., da Silva Melo, D. A., Cassel, E., Czepielewski, R. S., Bitencourt, S., Goettert, M. I., & de Oliveira, J. R. (2015): Gallic acid reduces the effect of LPS on apoptosis and inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 30(1 Pt B), 309–317.
- Hayashi, F. (2003): Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102: 2660–2669.
- Hayes, G., Mathews, K., Doig, G., Kruth, S., Boston, S., Nykamp, S., Poljak, Z. and Dewey, C. (2010), The Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation (APPLE) Score: A Severity of Illness Stratification System for Hospitalized Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 1034-1047.
- Holodick, N. E., Rodríguez-Zhurbenko, N., & Hernández, A. M. (2017). Defining natural antibodies. *Frontiers in immunology*, 8, 872.
- Hřčková, G., Vendelova, E., & Velebný, S. (2016). Phagocytosis in-induced peritoneal monocytes/macrophages via opsonin-dependent or independent pathways. *Helminthologia*, 53(1), 3-13.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, FO., Hesch, RD., Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *American Association for Cancer Research* 2001 Feb 15;61(4):1659-65.
- Jeffery, U., Levine, DN. (2017). Canine neutrophil extracellular traps enhance clot formation and delay lysis. *Veterinary Pathology*. 55:116–23.

- Jeffery, U., Kimura, K., Gray, R., Lueth, P., Bellaire, B., & LeVine, D. (2015). Dogs cast NETs too: Canine neutrophil extracellular traps in health and immune-mediated hemolytic anemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 168(3-4), 262-268.
- Juneau, R. A., Pang, B., Weimer, K. E., Armbruster, C. E., & Swords, W. E. (2011). Non-typeable *Haemophilus influenzae* initiates formation of neutrophil extracellular traps. *Infection and immunity*, 79(1), 431–438.
- Kapoor, S., Mihalovičová, L., Pisareva, E., Pastor, B., Mirandola, A., Roch, B., Bryant, J., Princy, A. P., Chouaib, S., & Thierry, A. R. (2024). Association of vascular netosis with COVID-19 severity in asymptomatic and symptomatic patients. *iScience*, 27(5), 109573.
- Karasuyama, H., Miyake, K., Yoshikawa, S., & Yamanishi, Y. (2018). Multifaceted roles of basophils in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(2), 370-380.
- Katzenmeyer, K. N., & Bryers, J. D. (2011). Multivalent artificial opsonin for the recognition and phagocytosis of Gram-positive bacteria by human phagocytes. *Biomaterials*, 32(16), 4042-4051.
- Kidd, L., Mackmann, N. (2013). Prothrombic mechanisms and anticoagulant therapy in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 23:3-13
- Kim, J., Bae, H., Ahn, S., Shin, S., Cho, A., Cho, K. W., Jung, D. I., & Yu, D. (2021). Cell-Free DNA as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Dogs With Tumors. *Frontiers in veterinary science*, 8, 735682.
- Kim, J. H., Jeong, S. Y., & Park, C. (2024). Investigation of Circulating Cell-Free DNA Concentration in Dogs with Pancreatitis. *Journal of veterinary clinics*, 41(3), 143-149.
- Kiwit, A., Lu, Y., Lenz, M., Knopf, J., Mohr, C., Ledermann, Y., ... & Elrod, J. (2024). The Dual Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Sepsis and Ischemia-Reperfusion Injury: Comparative Analysis across Murine Models. *International journal of molecular sciences*, 25(7), 3787.
- Kleinert N., Hermonsilla C., Moritz A., (2019). Etablierung von Nachweismethoden für

neutrophil extracellular traps beim Hund aus Vollblutproben, VVB Lauferweiler Verlag
2019

- Kobayashi, S.D. and DeLeo, F.R. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1: 309-333.
- Krinsky, N., Sizikov, S., Nissim, S., Dror, A., Sas, A., Prinz, H., Pri-Or, E., Perek, S., Raz-Pasteur, A., Lejbkowitz, I., Cohen-Matsliah, S. I., Almog, R., Chen, N., Kurd, R., Jarjou'i, A., Rokach, A., Ben-Chetrit, E., Schroeder, A., Caulin, A. F., Yost, C. C., Schiffmann, J. D., Goldfeder M., Martinod, K. (2023). NETosis induction reflects COVID-19 severity and long COVID: insights from a 2-center patient cohort study in Israel. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 21(9), 2569–2584.
- Kuhn, A, Weiler, K, Gibbs, G, Prechtel, G, Bauer, N, Moritz, A. (2022). Evaluation of a novel moving threshold gating strategy for assessment of reticulated platelets in dogs using the ADVIA 2120 analyzer. *Veterinary Clinical Pathology*. 2022; 00: 1- 11.
- Lam, WKJ., Gai, W., Sun, K., Wong, RSM., Chan, RWY., Jiang, P., Chan, NPH., Hui, WWI., Chan, AWH., Szeto, CC., Ng, SC., Law, MF., Chan, KCA., Chiu, RWK., Lo, YMD. (2017) DNA of Erythroid Origin Is Present in Human Plasma and Informs the Types of Anemia. *Clinical Chemistry*. 2017 Oct;63(10):1614-1623.
- Laponi, M. J., Carestia, A., Landoni, V. I., Rivadeneyra, L., Etulain, J., Negrotto, S., Pozner, R. G., & Schattner, M. (2013). Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 345(3), 430–437.
- Lauková L, Konečná B.(2017). NETosis - Dr. Jekyll and Mr. Hyde in inflammation. *Journal of Applied Biomedicine*. 2018;16(1):1-9.
- Lawson C., Smith S.A., O'Brien M., and McMichael M. (2018). Neutrophil Extracellular Traps in Plasma from Dogs with Immunemediated Hemolytic Anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32: 128-134

- Lee, M., Park, J., Choi, H., Lee, H., & Jeong, S. M. (2018). Presurgical assessment of splenic tumors in dogs: a retrospective study of 57 cases (2012–2017). *Journal of Veterinary Science*, 19(6), 827-834.
- Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D. J., & Zuraw, B. L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological reviews*, 57(1), 27–77.
- Leppkes, M., Maueroeder, C., Hirth, S., Nowecki, S., Gunther, C., Billmeier, U., Paulus, S., (2016). Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nature Communications* 7:10973
- Letendre, J.-A. and Goggs, R. (2017). Measurement of plasma cell-free DNA concentrations in dogs with sepsis, trauma, and neoplasia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 27: 307-314.
- Letendre JA, Goggs R. (2018): Determining prognosis in canine sepsis by bedside measurement of cell-free DNA and nucleosomes. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* (San Antonio). 2018 Nov;28(6):503-511.
- Léveillé, R., Johnson, S. E., & Birchard, S. J. (2003). Transvenous coil embolization of portosystemic shunt in dogs. *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 44(1), 32–36.
- Li, Y., Liu, Z., Liu, B., Zhao, T., Chong, W., Wang, Y., & Alam, H. B. (2014). Citrullinated histone H3: a novel target for the treatment of sepsis. *Surgery*, 156(2), 229-234.
- Li, R. H. L., Johnson, L. R., Kohen, C., & Tablin, F. (2018). A novel approach to identifying and quantifying neutrophil extracellular trap formation in septic dogs using immunofluorescence microscopy. *BMC veterinary research*, 14(1), 210.
- Liang, W., Chen, Z., Li, C., Liu, J., Tao, J., Liu, X., Zhao, D., Yin, W., Chen, H., Cheng, C., Yu, F., Zhang, C., Lui, L., Tian, H., Cai, C., Liu, X., Wang, Z., Xu, N., Dong, Q., Chen, L., Yang, Y., Zhi, X., Li, H., Tu, X., Cai, X., Jiang, Z., Ji, H., Mo, L., Wang, J., Fan, J.-B., &

He, J. (2021). Accurate diagnosis of pulmonary nodules using a noninvasive DNA methylation test. *The Journal of clinical investigation*, 131(10).

- Maas, C., Oschatz, C., Renne, T. (2011). The plasma contact system 2.0. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2011; 37: 375– 81.
- Malachowa, N., Kobayashi, S. D., Freedman, B., Dorward, D. W., & DeLeo, F. R. (2013). Staphylococcus aureus leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 191(12), 6022–6029.
- Malaviya, R., & Abraham, S. N. (2001). Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunological reviews*, 179(1), 16-24.
- Mao, J. Y., Zhang, J. H., Cheng, W., Chen, J. W., & Cui, N. (2021). Effects of neutrophil extracellular traps in patients with septic coagulopathy and their interaction with autophagy. *Frontiers in Immunology*, 12, 757041.
- Marin-Esteban, V., Turbica, I., Dufour, G., Semiramoth, N., Gleizes, A., Gorges, R., Beau, I., Servin, A. L., Lievin-Le Moal, V., Sandré, C., & Chollet-Martin, S. (2012). Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. *Infection and immunity*, 80(5), 1891–1899.
- McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N., Kubes, P. (2012). Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3): 324-333
- McDonald, B., Davis, R. P., Kim, S. J., Tse, M., Esmon, C. T., Kolaczowska, E., & Jenne, C. N. (2017). Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*, 129(10), 1357–1367.
- Medina E (2009). Neutrophil Extracellular Traps: A Strategic Tactic to Defeat Pathogens with Potential Consequences for the Host. *Journal of Innate Immunity* 1: 176–180.

- Merz, M., Hartmann, H., Rahman, M., Hwaiz, R., Zhang, E., Renstrom, E., Luo, L., Mörgelein, M., Regner, S., Thorlacius, H., (2015). Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 149: 1920-31
- Middleton, E. A., He, X. Y., Denorme, F., Campbell, R. A., Ng, D., Salvatore, S. P., Mostyka, M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A. C., Loda, M., Cody, M. J., Manne, B. K., Portier, I., Harris, E. S., Petrey, A. C., Beswick, E. J., Caulin, A. F., Iovino, A., Abegglen, L. M., Weyrich, A. S., Rondina, M. T., Egeblad, M., Schiffrmann, J. D. & Yost, C. C. (2020). Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood*, 136(10), 1169–1179.
- Moritz, A. (2000). Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik Innere Krankheiten der Kleintiere, Monografie
- Muller, F., Renne, T. (2008): Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. *Current Opinion in Hematology* 2008; 15: 516– 21
- Muñoz Caro, T., Conejeros, I., Zhou, E., Pikhovych, A., Gärtner, U., Hermosilla, C., Kulke, D., Taubert, A. (2018). *Dirofilaria immitis* Microfilariae and Third-Stage Larvae Induce Canine NETosis Resulting in Different Types of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*. 9. 10.3389/fimmu.2018.00968.
- Murthy, P., Singhi, A. D., Ross, M. A., Loughran, P., Paragomi, P., Papachristou, G. I., Whitcomb, D. C., Zureikat, A. H., Lotze, M. T., Zeh Iii, H. J., & Boone, B. A. (2019). Enhanced Neutrophil Extracellular Trap Formation in Acute Pancreatitis Contributes to Disease Severity and Is Reduced by Chloroquine. *Frontiers in immunology*, 10, 28.
- Narasaraju, T., Yang, E., Samy, R. P., Ng, H. H., Poh, W. P., Liew, A. A., Phoon, M. C., van Rooijen, N., & Chow, V. T. (2011). Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *The American journal of pathology*, 179(1), 199–210.

- Naumova, E., Pawelec, G., & Mihaylova, A. (2016). Natural killer cells, ageing and cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65, 367-370.
- Ng, H., Havervall, S., Rosell, A., Aguilera, K., Parv, K., von Meijenfheldt, FA., Lisman, T., Mackman, N., Thålin, C., Phillipson, M. (2020). Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps Are of Prognostic Value in Patients With COVID-19. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2021 Feb;41(2):988-994.
- Nielsen, L., Holm, J., Rozanski, E., Meola, D., Price, LL., de Laforcade, A. (2019) Multi-center investigation of hemostatic dysfunction in 15 dogs with acute pancreatitis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2019; 29: 264– 268.
- Pandharipande, P. P., Shintani, A. K., Hagerman, H. E., St Jacques, P. J., Rice, T. W., Sanders, N. W., Ware, L. B., Bernard, G. R., & Ely, E. W. (2009). Derivation and validation of Spo2/Fio2 ratio to impute for Pao2/Fio2 ratio in the respiratory component of the Sequential Organ Failure Assessment score. *Critical care medicine*, 37(4), 1317–1321.
- Patella V, Giuliano A, Bouvet JP, Marone G. (1998). Endogenous superallergen protein Fv induces IL-4 secretion from human Fc epsilon RI+ cells through interaction with the VH3 region of IgE. *J Immunol*. 1998 Nov 15;161(10):5647-55.
- Pruchniak, MP., Arazna, M., Demkow, U. (2013). Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 187: 68–73.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, LM., Boer, RJ. de, Borghans, JAM., Tesselaar, K., Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116: 625–627
- Pilszczek, FH., Salina, D., Poon, KK., Fahey, C., Yipp, BG., Sibley, CD., Robbins, SM., Green, FH., Surette, MG., Sugai, M., Bowden, MG., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology* 2010 Dec 15;185(12):7413-25.
- Ponti, G., Maccaferri, M., Manfredini, M., Micali, S., Torricelli, F., Milandri, R., del Prete, C., Ciarrocchi, A., Ruini, C., Benassi, L., Bettelli, S., Kaleci, S., Ozben, T., Tomasi, A. (2019). Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-

invasive prostate cancer diagnosis, *Clinica Chimica Acta*, Volume 497, 2019, Pages 76-80, ISSN 0009-8981,

- Ramirez, G. A., Yacoub, M. R., Ripa, M., Mannina, D., Cariddi, A., Saporiti, N., ... & Dagna, L. (2018). Eosinophils from physiology to disease: a comprehensive review. *BioMed research international*, 2018(1), 9095275.
- Ramos-Kichik, V., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Castelán, M., Gonzalez-Pozos, S., Muñoz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O., Chacón-Salinas, R., Estrada-Parra, S., & Estrada-García, I. (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 89(1), 29–37.
- Rannikko, J., Seiskari, T., Huttunen, R., Tarkiainen, I., Jylhävä, J., Hurme, M., Syrjänen, J., & Aittoniemi, J. (2018). Plasma cell-free DNA and qSOFA score predict 7-day mortality in 481 emergency department bacteraemia patients. *Journal of internal medicine*, 284(4), 418–426. <https://doi.org/10.1111/joim.12766>
- Rebordão, M. R., Alexandre-Pires, G., Carreira, M., Adriano, L., Carneiro, C., Nunes, T., Mateus, L., & Ferreira-Dias, G. (2017). Bacteria causing pyometra in bitch and queen induce neutrophil extracellular traps. *Veterinary immunology and immunopathology*, 192, 8–12.
- Reddy YN, Siedlecki AM, Francis JM. (2017): Breaking down the complement system: a review and update on novel therapies. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2017 Mar;26(2):123-128.
- Regal, J. F., Burwick, R. M., & Fleming, S. D. (2017). The complement system and pre-eclampsia. *Current hypertension reports*, 19, 1-12.
- Renne, T., Dedio, J., David, G., Muller-Ester, W. (2000). High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation on endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 33688– 96
- Renne T. (2012). The procoagulant and proinflammatory plasma contact system. *Seminars Immunopathology* 2012; 34: 31– 41

- Ripanti, D., Dino, G., Piovano, G., & Farca, A. M. (2012). Application of the sequential organ failure assessment score to predict outcome in critically ill dogs: preliminary results. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 154(8), 325.
- Saukkonen, K., Lakkisto, P., Varpula, M., Varpula, T., Voipio-Pulkki, L. M., Pettilä, V., & Pulkki, K. (2007). Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. *Intensive care medicine*, 33(9), 1624–1627.
- Saukkonen K., Lakkisto P., Pettilä V., Varpula M., Karlsson S., Ruokonen E., Pulkki K, for the Finnsepsis Study Group (2008): Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock, *Clinical Chemistry*, Volume 54, Issue 6, 1 June 2008, Pages 1000–1007,
- Schaefer, DM., Forman, MA., Kisseberth, WC., Lehman, AM., Kelbick, NT., Harper, P., Rush, LJ. (2007). Quantification of plasma DNA as a prognostic indicator in canine lymphoid neoplasia. *Veterinary and Comparative Oncology* 2007 Sep;5(3):145-55. doi: 10.1111/j.1476-5829.2007.00122.x. PMID: 19754786
- Schaefer, D. M., & Stokol, T. (2015). The utility of reticulocyte indices in distinguishing iron deficiency anemia from anemia of inflammatory disease, portosystemic shunting, and breed-associated microcytosis in dogs. *Veterinary clinical pathology*, 44(1), 109-119.
- Schedel, F., Mayer-Hain, S., Pappelbaum, K. I., Metzke, D., Stock, M., Goerge, T., Loser, K., Sunderkötter, C., Luger, T. A., & Weishaupt, C. (2020). Evidence and impact of neutrophil extracellular traps in malignant melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 33(1), 63–73.
- Scott-Moncrieff, JC., Treadwell, NG., McCullough, SM., Brooks, MB. (2001) Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37(3), 220–227.
- Schorn, C., Janko, C., Latzko, M., Chaurio, R., Schett, G., & Herrmann, M. (2012). Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Frontiers in immunology*, 3, 277.
- Shamri, R., Xenakis, J.J. & Spencer, L.A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an

evolving story. *Cell and Tissue Research* 343, 57–83 (2011).

- Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, EM., Leon, SA. (1983). Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. 1983 Jun 1;51(11):2116-20.
- Shishido, SN., Varahan, S., Yuan, K., Li, X., Fleming, SD. (2012). Humoral innate immune response and disease. *Clinical Immunology* 2012 Aug;144(2):142-58.
- Siemens Healthcare Diagnostics (2010): ADVIA 2120/2120i Hematology systems. Operator guide
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Journal of the American Medical Association*, 315(8), 801–810.
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(9), 531-548.
- Steinberg, J. D., & Olver, C. S. (2005). Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(1), 23-27.
- Stiel, L., Mayeur-Rousse, C., Helms, J., Meziani, F., Mauvieux, L. (2019). First visualization of circulating neutrophil extracellular traps using cell fluorescence during human septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Research* 2019 Nov;183:153-158.
- Su Y, Li D, Deng S, Zhu X, Liu D. (2023). Prognostic value of coagulation and fibrinolysis function indexes and NETs for sepsis patients. *Am J Transl Res*. 2023 Jun 15;15(6):4164-4171.
- Summers, C., Rankin, SM., Condliffe, AM., Singh, N., Peters, AM., Chilvers, ER. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* 31: 318–324.

- Sun, H. W., Dai, S. J., Kong, H. R., Fan, J. X., Yang, F. Y., Dai, J. Q., Jin, Y. P., Yu, G. Z., Chen, B. C., & Shi, K. Q. (2021). Accurate prediction of acute pancreatitis severity based on genome-wide cell free DNA methylation profiles. *Clinical epigenetics*, 13(1), 223.
- Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., & Sendo, F. (1996). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(2), 229–240.
- Tamamoto, T., Ohno, K., Ohmi, A., Goto-Koshino, Y., & Tsujimoto, H. (2008). Verification of measurement of the feline serum amyloid A (SAA) concentration by human SAA turbidimetric immunoassay and its clinical application. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(11), 1247-1252.
- Taylor, FB., Toh, CH., Hoots, WK., Wada, H., Levi, M. (2001). Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis and Haemostasis* 2001, 86: 1327-1330.
- Thålin, C., Lundström, S., Seignez, C., Daleskog, M., Lundström, A., Henriksson, P., Helleday, T., Phillipson, M., Wallén, H., Demers, M. (2018). Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS One*. 2018 Jan 11;13(1):e0191231
- Thålin, C., Demers, M., Blomgren, B., Wong, S. L., von Arbin, M., von Heijne, A., Laska, A. C., Wallén, H., Wagner, D. D., & Aspberg, S. (2016). NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. *Thrombosis research*, 139, 56–64.
- Thomlinson, RH., Gray, LH. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British Journal of Cancer J Cancer*. 1955 Dec;9(4):539-49.
- Troia, R., Giunti, M., Calipa, S., & Goggs, R. (2018). Cell-Free DNA, High-Mobility Group Box-1, and Procalcitonin Concentrations in Dogs With Gastric Dilatation-Volvulus Syndrome. *Frontiers in veterinary science*, 5, 67.

- Tovbin, D., Novack, V., Wiessman, M. P., Elkadir, A. A., Zlotnik, M., & Douvdevani, A. (2012). Circulating cell-free DNA in hemodialysis patients predicts mortality. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(10), 3929-3935.
- Underhill, H. R., Kitzman, J. O., Hellwig, S., Welker, N. C., Daza, R., Baker, D. N., Gligorich, K. M., Rostomily, R. C., Bronner, M. P., & Shendure, J. (2016). Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS genetics*, 12(7), e1006162.
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., & Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000639.
- Ventura-Juarez, J., Campos-Esparza, M., Pacheco-Yeppez, J., López-Blanco, J. A., Adabache-Ortíz, A., Silva-Briano, M., & Campos-Rodríguez, R. (2016). *Entamoeba histolytica* induces human neutrophils to form NETs. *Parasite immunology*, 38(8), 503–509.
- von Köckritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., & Medina, E. (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*, 111(6), 3070-3080.
- Viviano, KR., Webb, JL. (2011). Clinical use of cyclosporine as an adjunctive therapy in the management of feline idiopathic pure red cell aplasia. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2011 Dec;13(12):885-95.
- Wada, H., Gabazza, E. C., Asakura, H., Koike, K., Okamoto, K., Maruyama, I., Shiku, H., & Nobori, T. (2003). Comparison of diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation (DIC): diagnostic criteria of the International Society of Thrombosis and Hemostasis and of the Japanese Ministry of Health and Welfare for overt DIC. *American journal of hematology*, 74(1), 17–22.
- Wada, H., Matsumoto, T. & Yamashita, Y. (2014): Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *Journal of intensive care* 2, 15 (2014).

- Wardini, A. B., Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T., Nadaes, N. R., Danelli, M. G., Mazur, C., Benjamim, C. F., Saraiva, E. M., & Pinto-da-Silva, L. H. (2010). Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *The Journal of general virology*, 91(Pt 1), 259–264.
- Wen, T., & Rothenberg, M. E. (2016). The regulatory function of eosinophils. *Microbiology spectrum*, 4(5), 10-1128.
- Wie, Z., Hermosilla, C., Taubert, A., He, X., Wang, X., Gong, P., Li, Y., Yang, Z., Zhang, X. (2016). Canine Neutrophil Extracellular Traps Release Induced by the Apicomplexan Parasite *Neospora caninum* In Vitro. *Frontiers in Immunology*. 7. 10.3389/fimmu.2016.00436
- Weiss, DJ. (2002). Primary pure red cell aplasia in dogs: 13 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc*. 2002 Jul 1;221(1):93-5.
- Weiss, DJ. (2008). Bone marrow pathology in dogs and cats with non-regenerative immune-mediated haemolytic anaemia and pure red cell aplasia. *J Comp Pathol*. 2008 Jan;138(1):46-53.
- Wilson, I.J., Burchell, R.K., Worth, A.J., Burton, S.E., Gedye, K.R., Clark, K.J., Crosse, K.R., Jack, M., Odom, T.F., De Grey, S.J., McGlade, K.M.S., Tomlin, S.C., Lopez-Villalobos, N. and Gal, A. (2018). Kinetics of Plasma Cell-Free DNA and Creatine Kinase in a Canine Model of Tissue Injury. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32: 157-164.
- Wu, Z., Deng, Q., Pan, B., Alam, H. B., Tian, Y., Bhatti, U. F., Liu, B., Mondal, S., Thompson, P. R., & Li, Y. (2020). Inhibition of PAD2 Improves Survival in a Mouse Model of Lethal LPS-Induced Endotoxic Shock. *Inflammation*, 43(4), 1436–1445.
- Wynn, T. A., & Barron, L. (2010, August). Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. In *Seminars in liver disease* (Vol. 30, No. 03, pp. 245-257). © Thieme Medical Publishers.
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, CT., Semeraro, F., Taylor, FB., Esmon, NL., Lupu, F., Esmon, CT. (2009): Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine* 2009 Nov;15(11):1318-21

- Xu, F., Tan, X., Wang, J., Lu, S., Ding, H., Xue, M., Chen, Y., Wang, S., Teng, J., Shi, Y., & Song, Z. (2024). Cell-free DNA predicts all-cause mortality of sepsis-induced acute kidney injury. *Renal failure*, 46(1), 2273422.
- Yamamoto, Y., Uemura, M., Nakano, K., Hayashi, Y., Wang, C., Ishizuya, Y., Kinouchi, T., Hayashi, T., Matsuzaki, K., Jingushi, K., Kato, T., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., Fujita, K., Imamura, R., & Nonomura, N. (2018). Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 9(29), 20467–20475.
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytnuik, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., de Boisleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., & Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature medicine*, 18(9), 1386–1393.
- Yona, S., & Gordon, S. (2015). From the reticuloendothelial to mononuclear phagocyte system—the unaccounted years. *Frontiers in immunology*, 6, 328.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozłowski, E., Schmid, I., Simon, HU. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death & Differentiation* 2009 Nov;16(11):1438-44.
- Zhang, Y., Wu, C., Li, L., Pandeya, A., Zhang, G., Cui, J., Kirchhofer, D., Wood, J.P., Smyth, S.S., Wei, Y., Li, Z. (2022). Extracellular Histones Trigger Disseminated Intravascular Coagulation by Lytic Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*.2022, 23, 6800.
- Zheng, YW., Chan, KC., Sun, H., Jiang, P., Su, X., Chen, EZ., Lun, FM., Hung, EC., Lee, V., Wong, J., Lai, PB., Li, CK., Chiu, RW., Lo, YM. (2012). Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: a transplantation model. *Clinical Chemistry* 2012 Mar;58(3):549-58.
- Zhu, T., Zou, X., Yang, C., Li, L., Wang, B., Li, R., Li, H., Xu, Z., Huang, D., Wu, Q. (2021). Neutrophil extracellular traps promote gastric cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Int J Mol Med*. 2021 Jul;48(1):127.

16. Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen bedanken die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Vor allem bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Moritz der mich auch nach Beendigung meiner Arbeit an der Klinik für Kleintiere noch aus der Ferne betreut hat und mir dieses spannende Thema vorgeschlagen hat möchte ich mich bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank Prof. Dr. Natali Bauer für ihre unermüdliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentrallabors des Fachbereichs 10 für die Hilfe bei allen technischen Fragen rund um die Software und Geräte des Zentrallabors bedanken, die mir viel händische Arbeit ersparen konnte. Insbesondere auch Dr. Sarah Hindenberg und Dr. Kristina Weiler möchte ich hier nochmal im speziellen danken für die große Hilfe bei der Grundlagensetzung dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich natürlich meinen Eltern und allen meinen Freunden danken, die mich in allen Krisen immer unterstützen und nie allein im Regen stehen ließen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978 3 8359 7238 4



9 783835 197238 4

