

ARNE GÜSSOW

---

Zur Retikulozytose ohne begleitende Anämie  
und dem erhöhten retikulozytären  
Hämoglobingehalt (CHr) bei 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 2017

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 Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere  
Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz

**Zur Retikulozytose ohne begleitende Anämie und dem  
erhöhten retikulozytären Hämoglobingehalt (CHr) bei  
Hunden**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Arne Güssow**  
Tierarzt aus Hannover

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz

2. Gutachter: Prof. Dr. Axel Wehrend

Prüfer : Prof. Dr. Hermann Willems

Tag der Disputation: 30.05.2017

**Meiner Familie, Pepe und Phoenix**

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1.	Retikulozytose bei Hunden ohne begleitende Anämie .....	1
1.2.	Retikulozytärer Hämoglobingehalt (CHr) des Hundes.....	3
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	5
2.1.	Erythropoese.....	5
2.2.	Zelluläre und hormonelle Regulation der Erythropoese .....	7
2.3.	Entwicklung und Reifung der Retikulozyten .....	11
2.3.1.	Entwicklung und Reifung der Retikulozyten innerhalb des Knochenmarks .....	11
2.3.2.	Entwicklung und Reifung der Retikulozyten innerhalb der Milz.....	13
2.4.	Retikulozytose.....	14
2.4.1.	Physiologische Ursachen einer Retikulozytose .....	15
2.4.2.	Pathologische Ursachen einer Retikulozytose .....	17
2.4.3.	Vorkommenshäufigkeit und mögliche Ätiologien einer Retikulozytose ohne zugrundeliegende Anämie .....	18
2.5.	Möglichkeiten der Retikulozytenbestimmung .....	19
2.5.1.	Mikroskopische Untersuchung.....	19
2.5.2.	Automatisierte Messmethoden .....	20
2.6.	Hämoglobingehalt der Erythrozyten .....	21
2.7.	Erythrozytenindizes.....	23
2.8.	Hämoglobingehalt von Retikulozyten .....	24
2.8.1.	Diagnostischer Nutzen des CHr in der Humanmedizin .....	25
2.8.2.	Diagnostischer Nutzen des CHr bei Hunden .....	27
2.8.3.	Erhöhung des CHr .....	30
2.8.3.1.	Potentielle Ursachen für die Erhöhung des CHr.....	31
2.8.3.1.1.	Hyperchromasie.....	31
2.8.3.1.2.	Makrozytose.....	32
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	35
3.1.	Der Einfluss von Kortisol auf die Retikulozytenzahl im peripheren Blut bei Hunden ohne zugrundeliegende Anämie .....	35
3.1.1.	Patienten.....	35

---

3.1.2.	Durchführung .....	36
3.1.3.	Untersuchung der gewonnenen Proben .....	37
3.1.3.1.	Kortisol-Bestimmung .....	37
3.1.3.2.	Hämatologische Untersuchung .....	37
3.1.3.3.	Manuelle Zählung der Retikulozytenzahl .....	41
3.1.4.	Statistische Analyse .....	41
3.2.	CHr-Erhöhung beim Hund: Vorkommenshäufigkeit und Ätiologie .....	43
3.2.1.	Zeitraum, Patienten und Gruppierung der Tiere mit erhöhtem CHr .....	43
3.2.2.	ADVIA® 2120 .....	44
3.2.3.	Auswertung der Daten .....	48
3.2.4.	Statistische Auswertung .....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
4.1.	Retikulozytose bei Hunden ohne zugrundeliegende Anämie .....	50
4.1.1.	Allgemeine Auswertung .....	50
4.1.2.	Ergebnisse Kortisol .....	51
4.1.3.	Ergebnisse Retikulozyten .....	52
4.1.4.	Ergebnisse Erythrozyten und Erythrozyten-Indizes .....	54
4.1.5.	Ergebnisse Leukozyten und Thrombozyten .....	56
4.2.	Erhöhung des CHr: Vorkommenshäufigkeit und Ätiologie .....	58
4.2.1.	Allgemeine Auswertung .....	58
4.2.2.	CHr und Retikulozytenzahl .....	59
4.2.3.	Erythrozytenzahl und Erythrozyten-Indizes .....	61
4.2.4.	Einteilung nach zugrundeliegenden Erkrankungen .....	62
4.2.4.1.	Erkrankungen mit overtten Blutungen .....	64
4.2.4.2.	Hämolytische Erkrankungen .....	66
4.2.4.3.	Systemische Inflammationsreaktion .....	68
4.2.4.4.	Neoplastische Erkrankungen .....	70
4.2.4.5.	Nierenerkrankungen .....	72
4.2.4.6.	Tiere ohne weitere Einteilung .....	74

---

4.2.5.	Gruppenvergleich.....	76
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>80</b>
5.1.	Einfluss von Kortisol auf die Retikulozytenzahl von Hunden.....	80
5.1.1.	Kortisol .....	81
5.1.2.	Retikulozytenzahl.....	81
5.1.3.	Leukozytenzahl .....	85
5.1.4.	Limitationen der Studie .....	86
5.1.5.	Schlussfolgerung .....	87
5.1.6.	CHr-Erhöhung beim Hund: Vorkommenshäufigkeit und Ätiologie .....	88
5.1.6.1.	Retikulozytose.....	91
5.1.6.2.	Artefakt.....	92
5.1.6.2.1.	Lagerungsartefakt.....	93
5.1.6.2.2.	Erythrozytenagglutinate .....	94
5.1.6.2.3.	Hyperchromasie.....	95
5.1.6.2.4.	Leukozyten.....	96
5.1.6.3.	Makrozytose.....	96
5.1.6.4.	Limitationen der Studie .....	99
5.1.6.5.	Schlussfolgerung .....	100
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>101</b>
6.1.	Der Einfluss von Kortisol auf die Retikulozytenzahl von Hunden.....	101
6.2.	CHr-Erhöhung: Vorkommenshäufigkeit und Ätiologie .....	103
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>105</b>
7.1.	The influence of cortisol on the reticulocyte count in dogs.....	105
7.2.	Elevated values of CHr: prevalence and etiology .....	107
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>124</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Erythrozyten- und Thrombozyten-Scattergramm eines gesunden Hundes.....	<b>38</b>
<b>Abbildung 2:</b>	Leukozyten- Scattergramm eines gesunden Hundes.....	<b>39</b>
<b>Abbildung 3:</b>	Erythrozyten-Punktvolken (Scattergramm) als RBC-Matrix oder Tic Tac Toe eines gesunden Hundes.....	<b>46</b>
<b>Abbildung 4:</b>	Histogramm zur Darstellung des Zellulären Volumens und des zellulären Hämoglobingehaltes bei einem gesunden Hund. ....	<b>46</b>
<b>Abbildung 5:</b>	Darstellung der Erythrozyten und Retikulozyten hinsichtlich der unterschiedlichen Granularität (RNA-Gehalt).....	<b>47</b>
<b>Abbildung 6:</b>	Darstellung des Serum-Kortisol-Spiegels vor und 60 Minuten nach Stimulation mit Tetracosactrin.....	<b>51</b>
<b>Abbildung 7:</b>	Darstellung der automatisierten Retikulozytenmessung mittels ProCyte Dx <sup>®</sup> vor und 60 Minuten nach Stimulation mit Tetracosactrin. ....	<b>53</b>
<b>Abbildung 8:</b>	Vergleich der automatisierten Retikulozytenmessung mittels ProCyte Dx <sup>®</sup> und der Handdifferenzierung eines Neumethylen-Blau-gefärbten Blutausstrichs.....	<b>53</b>
<b>Abbildung 9:</b>	Darstellung der Erythrozyten und Erythrozytenindizes mittels ProCyte Dx <sup>®</sup> vor und 60 Minuten nach Stimulation mit Tetracosactrin.....	<b>55</b>
<b>Abbildung 10:</b>	Darstellung der Leukozytenzahl und Leukozytenpopulationen mittels ProCyte Dx <sup>®</sup> vor und 60 Minuten nach Stimulation mit Tetracosactrin.....	<b>57</b>
<b>Abbildung 11:</b>	Darstellung der Hunde mit einem CHR oberhalb von 1,85fmol/l.....	<b>60</b>
<b>Abbildung 12:</b>	Darstellung der Retikulozytenzahl aller Hunde mit einem CHR $\geq 1,85\text{fmol/l}$ . ....	<b>60</b>
<b>Abbildung 13:</b>	Darstellung des gemessenen und errechneten HB aller Hunde mit einem CHR über 1,85fmol/l. ....	<b>61</b>
<b>Abbildung 14:</b>	Gruppenvergleich erhöhter CHR. ....	<b>63</b>
<b>Abbildung 15:</b>	Patienten mit overten Blutungen. ....	<b>65</b>
<b>Abbildung 16:</b>	Patienten mit hämolytischen Erkrankungen. ....	<b>67</b>
<b>Abbildung 17:</b>	Patienten mit einer systemischen Inflammationsreaktion. ....	<b>69</b>
<b>Abbildung 18:</b>	Patienten mit Neoplasien.....	<b>71</b>
<b>Abbildung 19:</b>	Patienten mit Nierenerkrankungen. ....	<b>73</b>
<b>Abbildung 20:</b>	Patienten mit anderen Erkrankungen.....	<b>75</b>
<b>Abbildung 21:</b>	Gruppenvergleich. ....	<b>76</b>
<b>Abbildung 22:</b>	Retikulozytenzahl der Patienten mit CHR $\geq 1,85\text{fmol/l}$ im Gruppenvergleich.....	<b>77</b>
<b>Abbildung 23:</b>	Erythrozytenzahl, Hämatokrit, MCV und RDW der Tiere mit erhöhtem CHR im Gruppenvergleich. ....	<b>78</b>
<b>Abbildung 24:</b>	Hämoglobin, MCH, MCHC und CHCM der Tiere mit erhöhtem CHR im Gruppenvergleich. ....	<b>79</b>
<b>Abbildung 25:</b>	Scattergramm und Histogramm: Portosystemischer Shunt .....	<b>90</b>
<b>Abbildung 26:</b>	Scattergramm und Histogramm: Retikulozytose.....	<b>91</b>

---

<b>Abbildung 27:</b>	Scattergramm und Histogramm: Artefakt durch Lagerung.....	<b>93</b>
<b>Abbildung 28:</b>	Scattergramm und Histogramm: Artefakt durch Erythrozytenagglutinate.....	<b>94</b>
<b>Abbildung 29:</b>	Scattergramm und Histogramm: Artefakt durch Hyperchromasie.....	<b>95</b>
<b>Abbildung 30:</b>	Scattergramm und Histogramm: Artefakt durch Leukozyten .....	<b>96</b>
<b>Abbildung 31:</b>	Scattergramm und Histogramm: Makrozytose des Pudels .....	<b>99</b>

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Tierartsspezifische Referenzbereiche für Hunde des ProCyte Dx® .....	40
<b>Tabelle 2:</b>	Gruppierung der Hunde nach CHR.....	44
<b>Tabelle 3:</b>	Tierartsspezifische Referenzbereich für Hunde des ADVIA® 2120.....	48
<b>Tabelle 4:</b>	Statistische Auswertung der Erythrozyten und Erythrozyten-Indizes.....	54
<b>Tabelle 5:</b>	Statistische Auswertung der Leukozyten, Leukozyten-Populationen sowie der Thrombozyten.....	56
<b>Tabelle 6:</b>	Vorkommenshäufigkeit der gemessenen CHR-Werte nach jeweiligen Cut-Off.....	58
<b>Tabelle 7:</b>	Statistische Auswertung der erythrozytären und retikulozytären Indizes aller Tiere mit einem gemessenen CHR $\geq 1,85$ fmol/l.....	62
<b>Tabelle 8:</b>	Gruppeneinteilung.....	62
<b>Tabelle 9:</b>	Patienten mit einer overten Blutung.....	64
<b>Tabelle 10:</b>	Patienten mit hämolytischen Erkrankungen.....	66
<b>Tabelle 11:</b>	Patienten mit einer systemischen Inflammationsreaktion.....	68
<b>Tabelle 12:</b>	Patienten mit Neoplasien.....	70
<b>Tabelle 13:</b>	Patienten mit Nierenerkrankungen.....	72
<b>Tabelle 14:</b>	Patienten mit Erkrankungen ohne weitere Einteilung.....	74
<b>Tabelle 15:</b>	Humanmedizinische Patienten mit Makrozytose im Vergleich der erythroiden und retikulozytären Indizes .....	88

---

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µg/dl	Mikrogramm pro Deziliter
BASO	Basophile Granulozyten
BFU-E	burst forming unit - erythroid
CFU-E	colony forming unit - erythroid
CHCM	corpuscular hemoglobin concentration mean
CHCMr	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt der Retikulozyten
CHr	reticulocyte hemoglobin concentration
CMP	common myeloid progenitor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	Erythroblasten/Makrophagen-Protein
EOS	Eosinophile Granulozyten
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetin-Rezeptor
fl	Femtoliter
fmol	Femtomol
FSC	forward scatter
g/dl	Gramm pro Deziliter
HB	Hämoglobin
HCT	Hämatokrit
HDW	hemoglobin distribution width
HIF	hypoxia induced factor
HRI	Häm-regulierenden-eIF2 $\alpha$ -Kinase
IF- $\gamma$	Interferon-Gamma
IGF	insulin-like-growth-factor
IL	Interleukin
LYM	Lymphozyten
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration

---

MCV	mean corpuscular volume
MCVr	mean corpuscular volume reticulocyte
MEP	myeloid/erythroid progenitor
MONO	Monozyten
MPV	mean platelet volume
NEU	Neutrophile Granulozyten
PCT	plateletcrit
PDW	platelet distribution width
pg	Pikogramm
PLT	Thrombozyten
RBC-He	Hämoglobinäquivalent der Erythrozyten
RDW	red cell distribution width
RDWr	reticulocyte distribution width
Ret-He	Hämoglobinäquivalent der Retikulozyten
RETIC	Retikulozyten
RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
SFL	side fluorescent scatter
TGF- $\beta$	transforming-growth-factor-beta
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRAIL	Tumor-Nekrose-Faktor verwandter Apoptose-induzierender Ligand
VCAM	vascular-cell-adhesion-molecule
VLA	very late antigen
ICAM	intercellular-adhesion-molecule
WBC	white blood cells



# 1 Einleitung

Die hämatologische Untersuchung zählt in der heutigen Zeit zu den wichtigsten Diagnostika in der Aufarbeitung klinischer Fragestellungen erkrankter Patienten. Besonders moderne Hämatologiesysteme, die mittels lasergestützter Durchflusszytometrie und Impedanzmessung eine exakte Differenzierung des Hämogramms gewährleisten, werden für eine adäquate Beurteilung aller Zellreihen des Blutbildes (Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten) verwendet. Während technisch komplexe laserbasierte Hämatologiesysteme vor einigen Jahren nur größeren hämatologischen Einrichtungen zur Verfügung standen, kamen in den letzten Jahren einige, ebenfalls lasergestützte, kleinere Geräte für den Praxisgebrauch auf den Markt. Diese Geräte in ihrer Gesamtheit bieten eine große Auswahl an bestimmbareren Vollblutparametern. Eine weitere Differenzierung der Leukozytenpopulation bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl gehört ebenso wie eine Zählung der Thrombozyten zur Routinediagnostik.

Besonders im Hinblick auf die Erythrozyten kann eine Kopplung einer durchfluss- und impedanzzytometrischen Untersuchung Aufschluss über Beschaffenheit, Größe, Dichte und Reife geben. Resultate sind als Wintrobe Indizes (MCV, MCH, MCHC) sowie als erythroide Vorläuferzellen (Normoblasten, Retikulozyten) zu sehen. Besonders die Bestimmung von kernhaltigen erythroiden Vorläuferzellen sowie Retikulozyten kann im Hinblick auf eine zugrundeliegende Erkrankung wichtige Hinweise liefern und steht dank der modernen Hämatologiesysteme auch im Routinebetrieb zur Verfügung.

## 1.1. Retikulozytose bei Hunden ohne begleitende Anämie

Während ein Großteil der Erythropoese im Knochenmark oder der Milz verläuft, werden die ersten in der peripheren Zirkulation vorkommenden kernlosen erythroiden Vorläuferzellen als Retikulozyten bezeichnet (Riley et al., 2001). Zu einer Erhöhung der Retikulozytenzahl kommt es im Rahmen einer Anämie. Durch den Verlust an Erythrozyten und einer dadurch verminderten Sauerstofftransportkapazität und Hypoxie wird vermehrt das Hormon Erythropoetin (EPO) ausgeschüttet. Dieses vornehmlich in der Niere produzierte Glykoprotein führt im Falle einer detektierten Gewebshypoxie zu einem positiven

Feedback des Knochenmarks und einer Steigerung der Erythropoese. Eine Erhöhung der Retikulozytenzahl im peripheren Blut, im Weiteren als Retikulozytose bezeichnet, ist die Folge (Thomas, 2012b).

Klassischerweise gilt die Retikulozytenzahl als Marker der Knochenmarksaktivität und dient einer Unterscheidung zwischen regenerativen und aregenerativen Anämien (Riley et al., 2001) .

Gelegentlich kann eine Retikulozytose auch bei augenscheinlich gesunden Tieren ohne detektierbare Anämie nachgewiesen werden (DeNicola et al., 2011; Pattullo et al., 2014). In diesen Fällen werden hypoxische Zustände sowie ein okkultes Blutverlust diskutiert. Weiterhin kann eine aufregungsbedingte Katecholaminausschüttung zu einer Milzkontraktion und Erhöhung der Retikulozytenzahl führen (Metzger et al., 2011). Ursachen, welche die Ausschüttung von Katecholaminen begünstigen, sind Aufregung und physischer Stress (Song and Groom, 1971; Stewart and McKenzie, 2002; Schumacher et al., 2010; Horvath et al., 2014).

Neben Katecholaminen sind Glukokortikoide ebenfalls für ihren positiven Einfluss auf die Erythropoese und die Retikulozytenzahl *in vivo* und *in vitro* bekannt (Amylon et al., 1986; Leberbauer, 2005). Während eine verminderte Produktion von Glukokortikoiden, besonders im Rahmen eines Hypocortisolismus, zu einer Ausprägung von Anämien führen kann, ist als Folge eines Cortisolüberschusses (Hypercortisolismus oder Hyperadrenokortizismus) die Entwicklung einer Erythrozytose beschrieben (Leberbauer, 2005; Wessely et al., 1997; Amylon et al., 1986).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte ebenfalls mögliche Pathophysiologien einer Retikulozytose ohne zugrundeliegende Anämie (Pattullo et al., 2015). Die Autoren diskutieren einen Zusammenhang mit konkurrierenden Erkrankungen sowie möglichen Nebenwirkungen eingesetzter Medikamente (Nicht-steroidale Antiphlogistika, Glukokortikoide) und Nahrungsergänzungsmittel (Glukosaminoglykane, Zink). Ein Zusammenhang zwischen orthopädischen Erkrankungen (Osteoarthritis) und einer nachweisbaren Retikulozytose wurde vermutet. Eine Studie aus dem eigenen Haus belegte diese Tatsache und zeigte

zudem eine höhere Mortalitätsrate sowie eine kurze mediane Überlebenszeit bei Tieren mit Retikulozytose ohne zugrundeliegende Anämie (Fuchs, 2017).

Während eine Retikulozytose ohne zugrundeliegende Anämie in der Vergangenheit als physiologisch angesehen wurde, legen die Ergebnisse der genannten Studien die Vermutung nahe, dass ebenfalls ein nicht unerheblicher Anteil an pathologischen Konditionen für die Entwicklung einer Retikulozytose vermutet werden kann.

Das Ziel dieses prospektiven Teils der vorliegenden Dissertation ist es den Kurzzeiteffekt von Kortisol auf die Retikulozytenzahl im peripheren Blut von Hunden zu evaluieren. Die Hypothese ist, dass ein erhöhter Serum-Cortisol-Spiegel zu einer Erhöhung der messbaren Retikulozytenzahl führt.

## **1.2. Retikulozytärer Hämoglobingehalt (CHr) des Hundes**

Der retikulzytäre Hämoglobingehalt gilt als ein analoger Parameter zu dem Hämoglobingehalt der adulten Erythrozyten und bezeichnet den errechneten Hämoglobingehalt der Retikulozyten aus den Variablen des retikulozytären korpuskulären Volumens (MCVr) sowie der wahrhaft gemessenen Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten (CHCMr) (Thomas, 2012b). Der Begriff CHr ist dabei eine Bezeichnung der Messmethodik des retikulozytären Hämoglobingehaltes der Firma Siemens und spezifisch durch das Hämatologieanalysegerät ADVIA® 2120 (Siemens, 2009; Moritz et al., 2004). Mit Werten deutlich unterhalb eines für Human- und Tiermedizin etablierten Referenzbereiches gilt die Hämatopoeseleistung der Patienten als eisendefizient (Mast et al., 2008; Marković et al., 2004). Demnach ist der CHr ein speziesunabhängig etablierter Marker für einen Eisenmangel. Der CHr erlaubt dabei eine zeitnahe Betrachtung der aktuellen Hämatopoeseleistung des Knochenmarkes und der zur Verfügung stehenden Eisenreserven (Thomas, 2012b). Dies ist auf die kurze Reifungszeit von Retikulozyten zurückzuführen, die in der Regel etwa vier Tage in Anspruch nimmt (Olver, 2010). Eine Änderung des körpereigenen Vorrates an Eisen wird bereits innerhalb der folgenden 48-72 Stunden in einer Abnahme des CHr bemerkbar und erlaubt ein zeitgerechtes Eingreifen bei bestimmten Erkrankungen. Demgegenüber reagiert die adulte Erythrozytenpopulation mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 100 Tagen

bei Hunden durchaus träger, so dass die bekannten Erythrozytenindizes lange Zeit unverändert bleiben (Olver, 2010). Umgekehrt normalisiert sich der gemessene CHr bei einer Erholung, die auf eine adäquate Behandlung oder Elimination der zugrundeliegenden Erkrankung gründet, rasch, während bei längerfristigen eisendefizitären Zuständen die Erythrozytenmorphologie auf Grund der langen Halbwertszeit mikrozytär und hypochrom bleibt .

Während erniedrigte Werte sowohl human- als auch tiermedizinisch Gegenstand vieler Untersuchungen sind, ist die Beschreibung von eindeutig erhöhten Werten rar. So ist die Beschreibung von makrozytischen Zuständen in der Humanmedizin, die neben adulten Erythrozyten auch die Retikulozytenmorphologie beeinflusst, die zum jetzigen Zeitpunkt einzig beschriebene Ursache für eine Erhöhung des CHr (Kaferle and Strzoda, 2009). Typische Zustände am Modell des Menschen sind dabei Mangelzustände von Cobalamin und Folsäure, primäre Knochenmarkserkrankungen oder Dyserythropoesen, Alkoholabusus und eine medikamentell bedingte Makrozytose. Neben Hepatopathien sind weiterhin hypothyreote Zustände sowie präanalytische Fehler als Ursache der Makrozytose zu nennen (Kaferle and Strzoda, 2009).

Tiermedizinisch ist nach Wissen des Autoren zum jetzigen Zeitpunkt keine Beschreibung der Vorkommenshäufigkeit oder der möglichen Ätiologie eines erhöhten CHr bekannt. Ziel des zweiten Teiles der vorliegenden Arbeit wird daher die Erstbeschreibung des erhöhten retikulozytären Hämoglobingehaltes bei der Spezies Hund sein. Besonderes Augenmerk soll in diesem Rahmen auf die auslösenden Ursachen und die mit einem erhöhten CHr einhergehenden Veränderungen der Retikulozytenzahl und der erythrozytären Indizes gelegt werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1. Erythropoese

Unter dem Begriff der Erythropoese versteht man den Prozess der Bildung und Entwicklung von reifen Erythrozyten aus hämatopoetischen Stammzellen (Adams and Scadden, 2006). Dieser kontinuierlich stattfindende Prozess der Proliferation und Differenzierung wird hauptsächlich durch das Hormon Erythropoetin (EPO) reguliert (Olver, 2010; Car, 2010; Sato et al., 2000; Stein et al., 1991; Giger, 1992).

Als Ursprung der Hämatopoesekapazität gelten pluripotente Stammzellen, die eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit besitzen (Adams and Scadden, 2006). Über eine gemeinsame multipotente myeloische Stammzelle (common myeloid progenitor/CMP), welche das Differenzierungspotential in lymphatische Progenitorzellen verloren hat, entwickelt sich eine megakaryozytäre und erythroide Progenitorzelle (megakaryocyte/erythroid progenitor/MEP) (Olver, 2010; Guenechea et al., 2001). Im nächsten Schritt differenziert sich diese unter dem Einfluss von Interleukin-3 (IL-3) in die burst-forming units – erythroid (BFU-E) (Aglietta et al., 1993). Diese Zellreihe, gekennzeichnet durch eine sehr hohe Proliferationskapazität, differenziert sich in die weniger proliferationsfähigen colony-forming units – erythroid (CFU-E) (Harvey, 2012). Unter dem weiteren Einfluss von EPO kommt es durch fortschreitende Proliferations- und Differenzierungsschritte zur Ausbildung von erythroiden Vorläuferzellen, welche zytologisch eindeutig von den vorausgehenden Differenzierungsstadien unterschieden werden können. Als erste erythroide Vorläuferzelle wird der Proerythroblast (Rubriblast, Pronormoblast) bezeichnet. Aus diesem bilden sich frühe Normoblasten (Prorubrizyt, basophile Erythroblasten). In weiteren Differenzierungsschritten verlieren diese Proerythroblasten an Zellgröße und nehmen an Hämoglobingehalt zu. Durch den steigenden Hämoglobingehalt steigt auch die Anfärbbarkeit der Zellen und verleiht den Folgestadien auf Grund der zytologischen Morphologie unterschiedliche Bezeichnungen (Olver, 2010).

Nachfolger der Prorubrizyten ist der basophile Normoblast (basophiler Rubrizyt, basophiler Erythroblast), gefolgt von den polychromatischen Normoblasten

(polychromatischer Rubrizyt, polychromatischer Erythroblast) und den orthochromatischen Normoblasten (Metarubrizyt, orthochromatischer Erythroblast). Während dieses Prozesses der Teilung werden die Zellen zunehmend kleiner und verlieren die Zellkompartimente (Neukleoli, Golgi-Apparat, Mitochondrien und Ribosomen). Durch Zunahme der zellulären Hämoglobinkonzentration kommt es ab einer bestimmten Menge zum Ausstoß des noch verbleibenden Zellkerns. Nach Ausstoßung des Zellkerns werden die entstandenen Zellen als Retikulozyten oder polychromatische Erythrozyten bezeichnet (Olver, 2010).

Die Differenzierung und Proliferation der erythroiden Vorläuferzellen in die kernlosen Retikulozyten wird als terminale erythroide Differenzierung bezeichnet. Über einen Zeitraum von etwa drei bis vier Tagen entsteht aus einem Prorerythroblast über mehrere Zellteilungen ein orthochromatischer Normoblast, welcher die Fähigkeit zur Zellteilung verloren hat. Bis zur Ausprägung eines Retikulozyten von der BFU-E an, vergehen etwa sieben Tage (Géminard et al., 2002; An and Mohandas, 2011; Harvey, 2012).

Die weitere Ausreifung der Retikulozyten beginnt im Knochenmark und wird im peripheren Blut sowie in der Milz fortgeführt und beendet. Während der Ausreifung kommt es zu einer stetigen Zunahme des Hämoglobingehaltes der Zellen und zu einem Verlust der Zellorganellen (Harvey, 2012). Insgesamt nimmt die Größe der Zellen im Rahmen der Maturation ab. In Kombination mit der verminderten Zellgröße führt ein Verlust der Oberflächenadhäsionsmoleküle und Rezeptoren sowie eine vermehrte Verformbarkeit zu einer Freisetzung der Retikulozyten aus dem Knochenmark (Chasis et al., 1989). Eine Unterscheidung der Retikulozyten zu reifen Erythrozyten ist in diesem Stadium sehr gut durch die Größe (etwa 35% mehr Volumen) sowie den verbleibenden Gehalt an Zellorganellen möglich. Die als *substantia reticulo-filamentosa* bezeichneten residualen Zellorganellen (Ribosomen, Golgi-Membranen, und Mitochondrien) können mittels Supravitalfärbung (Neumethylenblau oder Brilliantkresylblau) als blaue retikuläre Strukturen dargestellt werden (Riley et al., 2001). In Abhängigkeit von dem fortschreitenden Verlust der Organellen und der zunehmenden Zellreife sind diese in früheren Stadien als aggregierte Präzipitate (aggregierte Retikulozyten) und

später nur noch als verbleibende punktförmige Restbestände (punktierte Retikulozyten) zu erkennen.

Die Retikulozytenzahl im peripheren Blut gilt als Maßstab für den Grad der Erythropoese (Cowgill et al., 2003; Riley et al., 2001). Eine Unterscheidung zwischen einer Regenerationsfähigkeit im Rahmen einer Anämie ist durch die Bestimmung der Retikulozytenzahl möglich (Riley et al., 2001).

Auf Grund der graduellen Maturation der Retikulozyten im peripheren Blut sowie der Milz sind diese als heterogene Gruppe zu bewerten. Eine speziesspezifische Unterscheidung muss bei Hunden und Katzen getroffen werden (Cowgill et al., 2003). Während bei Hunden vermehrt aggregierte Retikulozyten als unreifere Stadien aus dem Knochenmark entlassen werden und punktierte Retikulozyten nur in unwesentlicher Anzahl nachgewiesen werden, verlassen bei der Katze dominierend punktierte Retikulozyten das Knochenmark und erfahren im peripheren Blut eine weitere Reifung (Perkins et al., 1995; Reagan et al., 2016). Ebenso ist die Möglichkeit der Produktion von Retikulozyten beim Hund speziessvergleichend am größten (annähernd siebenfacher Anstieg der Retikulozytenzahl)(Christian, 2010; Cowgill et al., 2003).

Durch den Einfluss von Stressoren (hochgradige Anämie, hohe EPO-Spiegel) kann es zum Ausstoß von unreiferen Retikulozytenstadien aus dem Knochenmark kommen. Diese sogenannten Stressretikulozyten sind deutlich größer, weniger differenziert und enthalten größere Mengen an retikulozytärer RNA (Olver, 2010; Harvey, 2012; Noble et al., 1990).

## **2.2. Zelluläre und hormonelle Regulation der Erythropoese**

Hauptsächlicher Faktor für eine Stimulation der Hämatopoese ist der zelluläre Sauerstoffgehalt. Das Glykoprotein-Hormon EPO wird bei einer detektierten Gewebshypoxie vermehrt gebildet und in die Zirkulation freigegeben (Fisher, 2003). Eigentlicher Bildungsort des EPO ist die Niere, in welcher die Synthese des Hormons von peritubulären interstitiellen Zellen vollzogen wird (Fisher et al., 1996; Eckardt et al., 1993; Eckardt, 1996). Neben den Nieren sind im Falle von hypoxischen Zuständen, wie einer Anämie, ebenfalls die Hepatozyten der Leber zur EPO-Bildung befähigt (Bondurant and Koury, 1986; Eckardt, 1996). Parakrin

oder autokrin wird eine zusätzliche Produktion von EPO weiterhin in den Makrophagen und erythroiden Progenitorzellen des Knochenmarks vermutet (Majka et al., 2001).

Die Regulation der EPO-Bildung geschieht über die Detektion eines niedrigen Sauerstoffpartialdruckes des peripheren Blutes in den peritubulären interstitiellen Zellen der Nieren (Olver, 2010; Fisher et al., 1996; Eckardt et al., 1993). Durch hypoxische Zustände wird die  $\alpha$ -Untereinheit von Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) aktiviert (Haase, 2013). Durch eine Translokation dieser Transkriptionsfaktoren vom Zytoplasma der Zellen in den Zellkern kommt es zu einer EPO Genexpression. Von den drei bekannten Hypoxie-induzierten Faktoren HIF-1, -2 und -3 ist HIF-2 der die EPO-Produktion induzierende Faktor (Haase, 2013; Liu et al., 2012). Bei physiologischen Sauerstoffverhältnissen liegen die HIFs innerhalb des Zytoplasmas der peritubulären interstitiellen Zellen vor; zu einer Translokation zur Transkription in den Nukleus kommt es erst bei hypoxischen Zuständen.

Die eigentliche Wirkung des hormonell aktiven Erythropoetins erfolgt über Erythropoetin-Rezeptoren (EPOR) (Munugalavadla and Kapur, 2005; Olver, 2010). Diese oberflächlich vorliegenden Rezeptoren werden von erythroiden Progenitor-Zellen sowie erythroiden Vorläufern exprimiert. Die größte Anzahl an exprimierten EPORs besitzen die CFU-Es gefolgt von den BFU-Es sowie den erythroiden Vorläuferzellen. Eine Steigerung der Hämatopoese wird durch eine Inhibition der Apoptose erzielt (Broudy et al., 1991; Sato et al., 2000).

Neben dem Wachstumsfaktor EPO wirken weitere Faktoren stimulierend auf die Erythropoese. Zu diesen gehören Interleukin-3, Thrombopoetin, Stammzellfaktoren sowie der Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (Aglietta et al., 1993; Muta et al., 1994; Kaushansky et al., 1995). Die Expression der jeweiligen Rezeptoren ist abhängig von Art und Differenzierungsgrad der Zellen. Allen gemein ist eine synergistische Wirkung mit EPO (Olver, 2010).

Weiterhin sind - ebenfalls in Anwesenheit von Erythropoetin - Glukokortikoide, Insulin und der insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) für eine Stimulation der Erythropoese und weitere Proliferation und Ausdifferenzierung der Stammzellen

des Knochenmarkes relevant (Lindern et al., 1999; Miyagawa et al., 2000; Muta et al., 1994). *Flygare et al.* zeigten, dass es unter Einfluss von Glukokortikoiden zu einer Stimulation und gesteigerten Teilung der BFUs kam und so die Bildung der CFUs um mehr als das zwanzigfache zunahm. Weiterhin konnte eine vermehrte Expression von HIF-1 gezeigt werden, die unter Stimulation wiederum zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl an CFUs führte (Flygare et al., 2011). Grundsätzlich gelten Glukokortikoide durch den positiven Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der erythroiden Progenitoren als hämatopoesesteigernd (Leberbauer, 2005). Der genaue Mechanismus ist nicht vollständig geklärt. Ein Zusammenspiel von Glukokortikoiden, EPO und Stammzellofaktor werden diskutiert (Leberbauer, 2005). Über einen längeren Zeitraum kommt es durch den Einfluss von Glukokortikoiden zu einer Steigerung der Hämatopoeseleistung (Wessely et al., 1997).

Bei der Erythropoese kann nicht von einem kontinuierlichen Prozess gesprochen werden, da komplexe Regulationsmechanismen zu einer Steigerung oder Hemmung führen. *Morley et al.* gehen im Hinblick auf positive und negative Feedback-Mechanismen von einem periodischen Geschehen aus (Morley and Stohlman, 1969).

Neben den positiven Regulatoren der Erythropoese fungieren der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 und -6 (IL-1, IL-6), Interferon-gamma (IF- $\gamma$ ), transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sowie der TNF-verwandte-Apoptose-induzierende Ligand (TRAIL) als hemmende Proteine (Rusten and Jacobsen, 1995; Felli et al., 2005; Olver, 2010; Car, 2010). Allen gemein ist eine supprimierende Wirkung auf die EPO-Produktion. Steigende Konzentrationen dieser Zytokine führen zu einer Verminderung der Erythropoese-Kapazität des Knochenmarks (Car, 2010). Unter anderem ist dies Auslöser für die Anämie chronischer Erkrankungen (Roy, 2010; Thomas and Thomas, 2005).

Der Großteil der erythroiden Proliferation und Differenzierung vollzieht sich innerhalb des Knochenmarks (Verfaillie et al., 1994; Weiss, 1976). Eine Schlüsselposition nehmen hierbei spezialisierte Makrophagen ein, die in erythropoetischen Nischen als Ammenzellen fungieren und als zentrale Zelle von unterschiedlich weit entwickelten erythroiden Vorläuferzellen umgeben sind (Olver, 2010; Car, 2010; Chasis and Mohandas, 2008). Diese Formation wird als

erythroblastische Insel bezeichnet (Chasis, 2006). Die zentral gelegenen Makrophagen übernehmen dabei die Aufgabe der Phagozytose von extrudierten Organellen und Zellkernen, sind an der Übertragung von Eisen zur Häm-Synthese der erythroiden Zellen beteiligt und können sowohl hemmenden als auch steigernden Einfluss auf das Ausmaß der Hämatopoese nehmen (Chasis and Mohandas, 2008; Chasis, 2006). Der Zell-zu-Zell-Kontakt wird hierbei über Oberflächen-Adhäsionsmoleküle vermittelt, welche in unterschiedlicher Variation und Anzahl nach Reifungsgrad der erythroiden Zelllinie gebildet und exprimiert werden (Telen, 2005; Spring et al., 2001). Das Erythroblasten-Makrophagen-Protein (EMP) vermittelt so nicht nur den Kontakt zwischen Ammenzelle und erythroiden Zellen, sondern ist auch maßgeblich durch Expression auf der Nukleus-Membran an der Phagozytose von extrudierten Nuklei beteiligt (Ney, 2011). Weitere interzelluläre Kontaktmöglichkeiten bieten auf Seiten der erythroiden Zellen Glykoproteine (Spring et al., 2001). Hierzu zählen das  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, welches auch als very late antigen-4 (VLA-4) bezeichnet wird sowie das Interzelluläre-Adhäsions-Molekül-4 (ICAM-4) (Lee, 2002). Oberflächenexprimierte Proteine als Kontaktstellen auf Seiten der Makrophagen sind das Vaskuläre-Zell-Adhäsions-Molekül-1 (VCAM-1) sowie  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine (Lee, 2002; Chasis and Mohandas, 2008). Neben interzellulären Kontakten sind erythroide Zellen und Makrophagen in der Lage über die exprimierten Integrine eine Bindung zu Fibronectin und Laminin als extrazellulären Matrixproteinen aufzunehmen (Eshghi et al., 2007). Während der progressiven Maturation verlieren die erythroiden Zellen zunehmend an adhäsiven Proteinen; der Verlust der meisten Adhäsionsmoleküle findet zum Zeitpunkt der E nukleation statt (Eshghi et al., 2007; Vuillet-Gaugler et al., 1990; Chasis and Mohandas, 2008). Während der Retikulozytenreifung kommt es durch Bildung von Exosomen zu einem fortschreitenden Verlust von Integrinen (Rieu et al., 2000).

Durch die vielfältigen Adhäsionsmöglichkeiten ist eine konstante Proliferation und Differenzierung der erythroiden Zellen mit einer engen Verbindung zu zentralen Makrophagen, Stromazellen und extrazellulärer Matrix des Knochenmarks gegeben (Verfaillie, 1998; Verfaillie et al., 1994; Chasis and Mohandas, 2008; Rhodes et al., 2008; Weiss, 1976). Mit fortschreitendem Reifegrad findet eine Entkopplung der Vorläuferzellen statt und der Verlust der adhäsiven

Eigenschaften befähigt Reifestadien ab der Stufe der Retikulozyten das Knochenmark zu verlassen (Car, 2010).

### **2.3. Entwicklung und Reifung der Retikulozyten**

Nach Extrusion des Zellkernes eine orthochromatischen Normoblasten entwickelt sich der Retikulozyt als kernloser immaturer Erythrozytenvorläufer (Olver, 2010; Riley et al., 2001). Die Entstehung und Reifung der Retikulozyten ist dabei ein fortschreitender Prozess. Während ein Teil der retikulozytären Reifung noch innerhalb des Knochenmarkes beginnt, wird die vollständige Maturation im Anschluss in der Zirkulation des peripheren Blutes und der Milz vollzogen. Bis zur vollständigen Umwandlung in die mature Form des Erythrozyten vergehen speziesabhängig zwischen drei und vier Tage, wobei die Reifungszeit zu gleichen Anteilen in Knochenmark und Peripherie verläuft (Ney, 2011). Verglichen mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 120 Tagen maturer Erythrozyten ist dies ein sehr kurzer Zeitraum mit enormen Änderungen (Olver, 2010; Olver et al., 2010).

#### **2.3.1. Entwicklung und Reifung der Retikulozyten innerhalb des Knochenmarks**

Der erste Teil der graduellen Retikulozytenreifung verläuft noch innerhalb des Knochenmarks und dient der Vorbereitung auf die Zirkulation (Christian, 2010). Die Morphologie der Retikulozyten unterscheidet sich dabei deutlich maturer Erythrozyten. Nach dem Ausstoßen des Zellkernes sind Retikulozyten deutlich größer (10-15µm versus 6-8µm (Bessis, 1973)), besitzen eine runde bis mehrfach lobulierte Oberfläche sowie eine im Vergleich zu Erythrozyten signifikant herabgesetzte Membranstabilität und Deformierbarkeit (Christian, 2010; Mel et al., 1977). Junge, knochenmarkständige Retikulozyten werden auch als R<sub>1</sub>-Retikulozyten bezeichnet und weisen weiterhin eine Adhärenz zu zentralen Makrophagen über Adhäsionsmoleküle auf; ihr Vorkommen bleibt unter physiologischen Konditionen auf das Knochenmark beschränkt (Mel et al., 1977). Ihr Zytoplasma enthält Zellorganellen, die der weiteren Hämoglobinsynthese dienen wie Mitochondrien, Polyribosomen, Ribonukleinsäuren (RNA) und verbleibende Anteile des Golgi-Apparates. Etwa 20-30% der Gesamthämoglobinsynthese findet in diesem Maturationszeitraum statt. Mit

fortschreitender Entwicklung nimmt die Synthesekapazität durch den Verlust der zellulären Organellen und des Transferrin-Rezeptors zur Aufnahme von Eisen ab (Riley et al., 2001).

Im Verlauf der Reifung innerhalb des Knochenmarkes findet ein Prozess des morphologischen Umbaus und der physiologischen Eigenschaften statt und wird über Exozytose, proteolytische Enzyme, Mitoptose und RNAsen vermittelt (Ponka et al., 1998; Géminard et al., 2002; Christian, 2010). Resultat sind kleinere Zellen mit einer verbesserten Membranstabilität sowie verbesserten Verformbarkeit. Diese Population wird auch als R<sub>2</sub>-Retikulozyt angesehen und ist bereit für die Zirkulation (Mel et al., 1977).

Der Exozytose von Exosomen wird eine entscheidene Rolle im Prozess des Membranumbaus und Oberflächenverlustes der Retikulozyten zugeschrieben. Membrankomponenten und Oberflächenadhäsionsmoleküle die über diesen Mechanismus entfernt werden, umfassen den Transferrin-Rezeptor, den Fibronectin-Rezeptor sowie Transporter für Aminosäuren und Glukose. Bei Kaniden kommt es ebenfalls zu einem Abbau der Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (Christian, 2010).

Durch den Verlust der membranständigen Adhäsionsmoleküle kommt es zu einer verminderten fibronectin- und thrombospondin-vermittelten Bindung zur extrazellulären Matrix. Die R<sub>2</sub>-Retikulozyten sind nun in der Lage den extravaskulären Raum in die Knochenmarkssinusoide zu penetrieren (Mel et al., 1977; Waugh et al., 2001; Patel and Lodish, 1987; Vuillet-Gaugler et al., 1990). Beim Hund verlassen so recht unreife aggregierte Retikulozyten das Knochenmark in die periphere Zirkulation.

Unter Einwirkung von erythropoetischen Stressoren wie einer hochgradigen Anämie oder hochgradig hypoxischen Zuständen können unreifere Retikulozytenstadien das Knochenmark verlassen. Diese Zellen werden als Stressretikulozyten bezeichnet und weisen eine multilobuläre Form sowie eine Fähigkeit zur Motilität auf und sind unter physiologischen Bedingungen nicht in der Zirkulation zu finden (Coulombel et al., 1979; Noble et al., 1990).

### **2.3.2. Entwicklung und Reifung der Retikulozyten innerhalb der Milz**

Die weitere Reifung der immaturen Retikulozyten findet zu einem großen Teil in der Milz statt. So können in der Milz von Hunden erhöhte Konzentrationen von Retikulozyten vorgefunden werden (Berendes, 1959). Als mögliche Ursache der Sequestration in der Milz werden die Größe und adhäsiven Fähigkeiten der Retikulozyten im Vergleich zu den kleineren und nicht adherenten Erythrozyten diskutiert (Berendes, 1959; Sorbie and Valberg, 1970). Die Milz besitzt ausgeprägte Fähigkeiten zur Elimination und Reparation defekter Erythrozyten. Neben einer vollständigen Eliminierung von destruierten oder fehlerhaft ausgebildeten Erythrozyten ist auch eine Wiederherstellung ohne Zerstörung möglich. Ebenfalls können überschüssige Membranrückstände innerhalb der Milz entfernt werden (Lux and John, 1977). Die Zellverkleinerung und der Membranverlust gehören zu der physiologischen Reifung der Retikulozyten. An splenektomierten Tieren konnte der Anteil der Milz an dieser Reifung durch einen verminderten Membranverlust um bis zu 50% sowie weiterhin bei Erythrozyten bestehende membrangebundene Proteinaggregate und Fibronectinrezeptoren nachgewiesen werden (Lux and John, 1977; Crosby, 1977; Come et al., 1972). *Patel et al.* zeigten, dass bei etwa 50% der Retikulozyten die Fähigkeit der Fibronectin-Adhäsion im Verlauf der Milzpassage verloren geht (Patel et al., 1985), jedoch auch eine vollständige Ausreifung zur bikonkaven Erythrozytenform und voll funktionsfähigen Erythrozyten ohne Milz möglich ist (Patel et al., 1985; Gronowicz et al., 1984). Ein weiteres Anheften an Fibronectin ist jedoch in diesem Zuge auch bei adulten Erythrozyten gegeben (Patel et al., 1985).

In weiteren Studien konnten Hinweise auf die Lokalisation der Retikulozyten sowie deren Bindung innerhalb der Milz gefunden werden. So konnte eine Unterscheidung zwischen roten Blutzellen in den Milzgefäßen, den Milzsinusoiden sowie den an den Sinuswänden haftenden Zellen getroffen werden. Die Resultate zeigten durch Retikulozytendifferenzierung eine vermehrte Anheftung der Retikulozyten an den Sinuswänden (Song and Groom, 1971; 1974; 1972). Ein vermehrtes Auftreten von Retikulozyten bedingt durch Bildung im Rahmen einer extramedullären Hämatopoese erschien auf Grund eines Verhältnisses von Normoblasten zu Retikulozyten (1:75) unwahrscheinlich. Eine Akkumulation und

Sequestration von aus dem Knochenmark entlassener Retikulozyten ist wahrscheinlicher (Song and Groom, 1972).

Elektronenmikroskopisch konnte dieses Anheften unreifer Retikulozyten an retikuloendotheliale Zellen der Milz bestätigt werden (Song and Groom, 1974). Es ist zu vermuten, dass die Makrophagen der Milz eine ähnliche Rolle bei der Maturation der Retikulozyten einnehmen wie die Ammenzellen innerhalb des Knochenmarks (Blue and Weiss, 1981). Über einen Zeitraum von etwa zwei Tagen verlieren die reifenden Retikulozyten ihren Fibronectin-Rezeptor ( $\alpha 4\beta 1$ -integrin/VLA-4) über die Sekretion von Exosomen, was zu nicht adhärenen reifen Retikulozyten und maturaen Erythrozyten führt (Rieu et al., 2000). Dies befähigt noch unreife Retikulozyten zur Bindung an Fibronectin innerhalb der Milz. Ähnlich wie in den erythroblastischen Inseln des Knochenmarks ist eine Adhäsion zwischen Retikulozyten und Makrophagen mittels VLA-4 und VCAM-1 möglich. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien der Makrophagen.

Auf Grund der Fähigkeit zur Expression von VCAM-1 von Milzmakrophagen ist eine Adhäsion von hämatopoetischen Stammzellen über VLA-4 unter pathologischen Konditionen möglich. Während die Hämatopoese bei gesunden Hunden ausschließlich auf das Knochenmark beschränkt ist, kann es in einigen Fällen über diese Mechanismen zu einer extramedullären Hämatopoese innerhalb der Milz kommen (O'Keefe and Couto, 1987).

## **2.4. Retikulozytose**

Die physiologische Retikulozytenzahl von Hunden im peripheren Blut ist unter normalen Umständen gering. Im Verhältnis zu ausgereiften Erythrozyten finden sich so nur bis zu 1-1,5% Retikulozyten in der peripheren Zirkulation. Da der Prozentsatz an Retikulozyten immer in Verbindung mit der Gesamtzahl an Erythrozyten gesehen werden muss, kann hierfür kein Referenzbereich angegeben werden. Die Angabe der absoluten Retikulozytenzahl liefert dahingegen eine objektive Einschätzung (Riley et al., 2001). Als Referenzwerte werden, je nach Analyseverfahren, unter  $60-75 \times 10^9/l$  angegeben (Moritz et al., 2004; Goldmann et al., 2012). Die Erhöhung der Retikulozytenzahl über diesen Anteil wird als Retikulozytose definiert. Die Retikulozytose ist dabei im Normalfall als kompensatorische Antwort des Knochenmarkes auf eine gesteigerte

Erythropoetinausschüttung anzusehen. Gründe hierfür sind in der Regel neben einem verminderten Sauerstoffpartialdruck des Blutes, anämische Zustände, eine verminderte Oxygenierung des Blutes oder eine herabgesetzte Nierendurchblutung (Eckardt, 1996; Eckardt et al., 1993; Fisher et al., 1996; Fisher, 2003). Aus diesem Grund ist die Bestimmung der absoluten Retikulozytenzahl besonders bei anämischen Patienten zur Differenzierung einer aregenerativen von einer regenerativen Form essentiell (Hodges and Christopher, 2011).

Neben pathologischen Ursachen für eine gesteigerte Retikulozytenzahl werden einige physiologische Mechanismen diskutiert.

#### **2.4.1. Physiologische Ursachen einer Retikulozytose**

Als physiologische Retikulozytose wird die Erhöhung der absoluten Retikulozytenzahl ohne erkennbare pathologische Abnormalitäten bezeichnet. Ob und in welchem Ausmaß diese realistische physiologische Ursachen widerspiegelt oder okkulte pathologische Mechanismen verborgen liegen, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. *DeNicola et al.* konnten bei 5,1% aller Hunde ohne zugrundeliegende Anämie eine Retikulozytose feststellen. Als mögliche Ätiologien dieser wurde eine physiologische Erhöhung von in der Milz sequestrierten Retikulozyten nach Kontraktion sowie mögliche pathologische Gründe (Erholung von einer Blutungs- oder hämolytischen Anämie mit kompensierter Anzahl der Erythrozyten oder eine bestehende Erythrozytose) diskutiert (DeNicola et al., 2011). Ob und in welchem Ausmaß eine Kontraktion der Milz zu einem Anstieg der peripheren Retikulozytenzahl führen kann, wurde bereits ausgiebig untersucht. Während *Berendes* 1959 keinen Anstieg der Retikulozytenzahl nach epinephrininduzierter Milzkontraktion bei Hunden nachweisen konnte (Berendes, 1959), zeigten isolierte Rattenmilzen nach einer vorherigen Stimulation mit EPO unter Einfluss von Epinephrin eine Kontraktion. Ein folgender Anstieg der Retikulozytenzahl konnte nachgewiesen werden (Dornfest and Cooper, 1968). Ebenso konnte eine Reservoirfunktion der Milz von Katzen für Erythrozyten nachgewiesen werden, bei welchen unter Einfluss von Epinephrin die Erythrozytenzahl um etwa 66% innerhalb des Organs sank (Groom and Song, 1971). Eine Ausschüttung von an den Sinuswänden der roten Milzpulpa

adhärenten unreiferen Zellen in Folge einer Milzkontraktion konnte zusätzlich nachvollzogen werden (Geiger et al., 1976).

Gleiche Ergebnisse konnten bei Hunden gefunden werden. So besitzt die kanine Milz die Möglichkeit der Sequestration von bis zu 30% des Blutvolumens (Elenes et al., 1964). Über eine Kontraktion der Milz kann dieses sequestrierte Volumen freigesetzt werden, wobei neuronale und hormonelle Trigger für die Kontraktion verantwortlich sein können (Stewart and McKenzie, 2002). Die Milz ist zu einem sehr großen Anteil sympathisch innerviert, Katecholamine fungieren als Neurotransmitter und stimulieren Adrenozeptoren. Sowohl Adrenalin als auch Noradrenalin können über diesen Weg zu einer Kontraktion der Milz führen. (Stewart and McKenzie, 2002). Auslöser für eine Kontraktion der Milz von Hunden und nachfolgender Erhöhung des Hämatokrits können sowohl Aufregung als auch körperliche Anstrengung sein (Barcroft and Stephens, 1927; Barcroft, 1930). Die Untersuchungen zeigten, dass die neuronale Beeinflussung der Milzkontraktion der systemischen Wirkung von Katecholaminen überwiegt. *Horvath et al.* zeigten bei aktiv an Hunderennen teilnehmenden Greyhounds eine signifikante Erhöhung der Retikulozytenzahl der Hunde unmittelbar nach dem Rennen im Vergleich zu Ruhewerten vor der körperlichen Aktivität. Innerhalb von zwei Stunden nach der körperlichen Belastung kam es zu einem Abfalls dieser Retikulozytose bis hin zu den Basiswerten. Die Autoren diskutieren eine katecholamininduzierte Milzkontraktion in Folge der Anstrengung, wobei andere Faktoren wie die Hypoxie-induzierte frühzeitige Entlassung von Stressretikulozyten ebenfalls möglich sind. Letztere erscheint jedoch auf Grund des fortgeschrittenen Maturationsgrades der gefundenene Retikulozyten unwahrscheinlicher (Horvath et al., 2014).

Humanmedizinische Studien mit sehr unterschiedlichen Belastungsgraden konnten sowohl den Nachweis von hauptsächlich immaturren Retikulozyten (Theorie der vorzeitigen Hypoxie-bedingten Entlassung aus dem Knochenmark) bei maximaler körperlicher Belastung, als auch maturer Retikulozyten (Theorie der Milzkontraktion) bei kurzzeitiger, starker Belastung tätigen. Ob eine vorzeitige Entlassung oder alleinige Milzkontraktion mit Desequestration ursächlich für die gefundenen erhöhten Retikulozytenzahlen ist, bleibt ungeklärt (Morici, 2005; Schumacher et al., 2010; Cesari et al., 2009; Londeree and Allaire, 1969).

Zusammenfassend lassen sich der Einfluss von aufregungsbedingter Katecholaminausschüttung (zum Beispiel im Rahmen einer Blutentnahme), körperliche Anstrengung oder der Einfluss von bestimmten Arzneimitteln (Katecholamine) als Ursache für eine Kontraktion der Milz mit nachfolgender Erhöhung der Retikulozytenzahl diskutieren.

#### **2.4.2. Pathologische Ursachen einer Retikulozytose**

Eine Retikulozytose tritt normalerweise bei Patienten mit einer zugrundeliegenden Anämie auf und wird labordiagnostisch genutzt, um die Aktivität des Knochenmarkes einzuschätzen (Riley et al., 2001). Die Ätiologie der Anämie kann dabei vielfältig sein. Dabei sind overte oder okkulte Blutungen verursacht durch Traumata, gastrointestinale Ulzerationen, Koagulopathien sowie Neoplasien und parasitäre Erkrankungen zu nennen. Weiterhin sind eine Vielzahl von hämolytischen Störungen bekannt. Häufig sind in diesem Fall beim Hund immunvermittelte Erkrankungen (primäre oder sekundäre immunvermittelte Anämie), infektiöse Ursachen (besonders Blutparasiten), eine mechanische Schädigung sowie seltener oxidative Schäden, metabolische oder hereditäre Ursachen (Paltrinieri et al., 2016). Die labordiagnostisch nachweisbare Retikulozytose geht in diesen Fällen mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Anämie einher (Hodges and Christopher, 2011).

Neben regenerativen anämischen Zuständen kann es auch im Falle einer Erythrozytose zu einer Zunahme der absoluten Retikulozytenzahl kommen (Randolph et al., 2010). Eine Erythrozytose ist dabei definiert als über dem Referenzbereich liegenden Gesamterythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit. Während eine relative Erythrozytose als transient gilt und Folge einer ausgeprägten Dehydratation oder Ausschüttung von sequestrierten Erythrozyten in Folge einer Milzkontraktion ist, kommt es bei einer absoluten Erythrozytose zu einer tatsächlichen Erhöhung der genannten Parameter (Nitsche, 2004). Dabei kommt es bei der primären Form zu einer autonomen Proliferation der erythroiden Reihe unabhängig von dem bestehenden EPO-Spiegel (Nitsche, 2004). Die sekundäre Form ist dabei auf eine gesteigerte EPO-Bildung zurückzuführen (Cook and Lothrop, 1994). Diese wiederum kann Folge einer dauerhaften Gewebshypoxie (mannigfaltige kardiovaskuläre oder respiratorische

Erkrankungen), Folge einer neoplastisch gesteigerten EPO-Produktion (Neoplasie der Niere) oder Folge einer zugrundeliegenden Endokrinopathie (Hypercortisolismus, Hyperthyreose, Hyperandrogenismus) sein (Nitsche, 2004; Sato et al., 2002; Snead, 2005; Bennett, 2004; Durno et al., 2011; Gorse, 1988; Couto et al., 1989).

### **2.4.3. Vorkommenshäufigkeit und mögliche Ätiologien einer Retikulozytose ohne zugrundeliegende Anämie**

Eine Erhöhung der Retikulozytenzahl im peripheren Blut von Hunden ohne nachweisbare Anämie tritt in den vergangenen Jahren häufiger auf. Neben einer technischen Verbesserung der Hämatologiesystem sowie routinemäßiger Bestimmung der Retikulozytenzahl bei jeder hämatologischen Messung, werden mögliche Ätiologien diskutiert. Untersuchungen zu diesem Thema sind jedoch spärlich. *DeNicola et al.* zeigten 2011 bei 5,1% aller nicht-anämischen Tiere eine erhöhte Retikulozytenzahl. Eine Steigerung dieses Anteils auf 10-15% konnte während einer Entwicklungsphase des Hämatologiesystems in unterschiedlichen universitären Einrichtungen gesehen werden. Diese Steigerung wurde auf einen größeren Anteil an kritisch kranken Patienten in diesen Einrichtungen zurückgeführt. Eine weitere Eingrenzung der möglichen Ätiologien erfolgte nicht (*DeNicola et al.*, 2011). In einer deutlich größer angelegten Studie konnte eine steigende Prävalenz von initial unter 2% in den Jahren 2000 bis 2006 auf 7% im Jahr 2012 nachgewiesen werden. In einer detaillierteren Aufarbeitung von Patienten mit einer Retikulozytose ohne zugrundeliegende Anämie zeigte sich bei 50% der Tiere eine intermittierende Retikulozytose, bei 10% verlief diese fortschreitend (*Pattullo et al.*, 2014). Mittels detaillierter Krankenakte, medikamenteller Therapie und Ernährung sowie Angaben zur Nahrungsergänzung konnte eine Vielzahl möglicher prädisponierender Faktoren identifiziert werden. Mögliche zugrundeliegende Erkrankungen umfassen unter Anderem kardiovaskuläre und respiratorische Erkrankungen, Endokrinopathien, Neoplasien, entzündliche Veränderungen sowie Hepatopathien. Ebenso wird von den Autoren ein Zusammenhang mit einer medikamentellen Therapie (gehäufte Therapie mit nicht-steroidalen Antiphlogistika, Glukokortikoiden oder anderen Immunsuppressiva), diversen Nahrungsergänzungsmitteln (Glykosaminoglykane, Zink) in Kombination mit dem gehäuften Auftreten von orthopädischen

Erkrankungen diskutiert. Als mögliche Ursachen werden in diesem Zusammenhang gastrointestinale Ulzerationen sowie erythropoesesteigernde Effekte der Medikamente angesprochen (Pattullo et al., 2014). Untersuchungen aus dem eigenen Haus zeigen ähnliche Prävalenzen einer Retikulozytose ohne begleitende Anämie wie die obigen Autoren. In einer großen Multizenterstudie konnte eine Prävalenz von 5,1% an nicht anämische Tieren mit einer erhöhten Retikulozytenzahl gefunden werden. Nur 1,5% der nicht anämischen Tieren mit Retikulozytose zeigten keine zugrundeliegenden Erkrankungen und galten als gesund. Die erkrankten 3,6% wurden wie bei der vorherigen Studie in unterschiedliche Kategorien eingeteilt. Die Einteilung lehnte sich an die bereits bekannten Auswertungen an. Tiere mit Blutungen oder einer Erholung von einer Anämie sowie kardiovaskulär/respiratorisch erkrankte Tiere nahmen den größten Anteil ein. Insgesamt ging eine Retikulozytose ohne begleitende Anämie mit einer erhöhten Mortalität einher; die Gesamtmortalität der erkrankten Tiere lag bei 29,7%. Mit einer medianen Überlebenszeit von nur einem Tag, war das Überleben nach Stellung der Diagnose Retikulozytose ohne Anämie schlecht (Fuchs, 2017).

## **2.5. Möglichkeiten der Retikulozytenbestimmung**

### **2.5.1. Mikroskopische Untersuchung**

Die manuelle Auszählung von Retikulozyten durch supravitalgefärbte Ausstriche gilt seit Langem als Goldstandard zur Bestimmung der Retikulozytenzahl (Bessmann, 1949; Dameshek, 1932). Neben Neumethylen-Blau und Azur B, nutzt man sich bei der Anfärbung mit Brilliantkresyl-Blau die Darstellung der verbliebenen RNA- und Zellorganellen, die als *substantia retikulo-filamentosa* bezeichnet werden. Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-antikoaguliertes Vollblut wird zu diesem Zweck mit der genannten Färbung zu gleichen Anteilen über 15-20 Minuten inkubiert. Nach Luftrocknung eines adäquaten Ausstriches kann eine lichtmikroskopische Untersuchung und Auszählung zur prozentualen Bestimmung der Retikulozytenzahl im Verhältnis zu reifen Erythrozyten erfolgen. Durch die unterschiedliche Anzahl an reifen Erythrozyten, besonders im Rahmen einer Anämie oder Erythrozytose, wird die Regeneration in Bezug auf die Zahl der Retikulozytenzahl leicht missinterpretiert. Die Bestimmung der absoluten Retikulozytenzahl kann dabei durch die Multiplikation der prozentualen Anzahl mit

der Erythrozytenzahl erfolgen, was jedoch das Vorhandensein einer absoluten Erythrozytenzahl erfordert:

**Absolute Retikulozytenzahl ( $10^9/l$ ) = Erythrozytenzahl ( $10^{12}/l$ ) x Retikulozyten (%) x 10**

Die mikroskopische Untersuchung besitzt einige Einschränkungen im Hinblick auf Durchführbarkeit, Verarbeitung, Objektivität und Präzision (Riley et al., 2001). Der Variationskoeffizient der manuellen Differenzierung variiert intra- und interlaboratoriell zwischen 25 und 50% (Arkin et al., 2004). Die Missinterpretation von Howell-Jolly-Körperchen und Heinz-Körperchen ist durch die Anfärbbarkeit beider mittels Retikulozytenfärbungen gegeben (ICSH, 1992).

Hinweise auf eine bestehende Retikulozytose finden sich auch in standardgefärbten Blutaussstrichen. Eine gesteigerte Regeneration und dementsprechend erhöhte Anzahl an Retikulozyten ist durch eine erhöhte Anzahl an polychromatische Zellen (Polychromasie) sowie Zellen mit unterschiedlichem Durchmesser (Anisozytose) zu erkennen (Hodges and Christopher, 2011). Dabei sind die polychromatischen Zellen beim Hund als Retikulozyten anzusprechen, die sich auf Grund des verbleibenden RNA-Gehaltes bläulich anfärben. Zu beachten gilt, dass nicht jeder Retikulozyt auch polychromatisch ist, was eine Limitation in der adäquaten Beurteilung und expliziten Ermittlung der Zellzahl nicht speziell gefärbter Blutaustriebe gibt (Hodges and Christopher, 2011; Neiger et al., 2002; Paltrinieri et al., 2016). Als weitere Hinweise auf eine stattfindende Regeneration gelten, zusätzlich zur Polychromasie und Anisozytose, die Anwesenheit von Howell-Jolly-Körperchen (intrazytoplasmatisches, residuales Kernmaterial), kernhaltige erthroide Vorläuferzellen (Normoblasten) sowie Target-Zellen (Hodges and Christopher, 2011).

## **2.5.2. Automatisierte Messmethoden**

Automatisierte Messmethoden zur Bestimmung der Retikulozytenzahl haben in den letzten Jahren deutlich zugenommen und bieten mittlerweile eine erschwingliche und praxistaugliche Messmöglichkeit. Diese Messmethoden basieren auf einer durchflusszytometrischen Messung der Retikulozyten, die im Vorhinein mit fluoreszierenden (Auramin O, Thiazol orange, Polymethylen) sowie nicht fluoreszierenden Färbelösungen (Neumethylenblau, Oxazin 750) auf Grund der RNA-Bindung der eingesetzten Substanzen kenntlich gemacht wurden. Durch

die stark variablen Messverfahren und eingesetzten Färbelösungen ist keine Vereinheitlichung innerhalb der verschiedenen Geräte möglich. Dies ist bei der Interpretation der Retikulozytenzahl zu beachten, die immer streng gerätespezifisch betrachtet werden muss.

Vorteil der automatisierten Messung mittels Durchflusszytometrie ist eine reduzierte Variabilität der Resultate durch die Elimination der Unabhängigkeit der Untersuchenden, eine Erhöhung der Präzision durch die Messung einer großen Anzahl an Zellen sowie der zeitliche Faktor der Untersuchung. Der Variationskoeffizient ist dadurch nur noch etwa halb so groß. Zusätzliche Informationen zur reinen Zellzählung werden durch den bestimmbaren RNA-Gehalt sowie zelluläre Indizes wie Zellgröße und Hämoglobingehalt gewonnen (Piva et al., 2015).

## **2.6. Hämoglobingehalt der Erythrozyten**

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten besteht in einem Sauerstofftransport über die Blutzirkulation (Olver et al., 2010). Die Möglichkeit der Bindung, des Transports und der Abgabe von Sauerstoff wird den Erythrozyten durch das intrazellulär liegende Hämoglobin verliehen. Hierbei handelt es sich um einen Komplex aus Eisen, Porphyrin und dem Protein Globin (Braend, 1988; Kitchen, 1969). Neben Hämoglobin liegt der Eisen-Porphyrin-Protein-Komplex ebenfalls in Myoglobin sowie in Enzymen vor, die Häm enthalten (Catalase, Peroxidase, Cytochrome) (Olver et al., 2010). Die Proteinsynthese innerhalb der erythroiden Zellen ist bis zum muren Erythrozyten abgeschlossen, da die ausgereiften Zellen mit dem Verlust des Zellkerns und der Zellorganellen auch die Möglichkeit der Proteinsynthese verloren haben (Traugh, 1989). In den retikulozytären Stadien findet daher die hauptsächliche Bildung des Hämoglobins statt (Riley et al., 2001). Dabei ist die Synthese des Globinanteils in den retikulozytären Ribosomen und Polyribosomen lokalisiert. Unterschieden werden dabei zwei unterschiedliche Polypeptidketten, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (Braend, 1988). Die Synthese des Häms ist ein enzymatischer Prozess, der zytosomal und mitochondrial abläuft (Traugh, 1989). Als planares Molekül ist das Häm dabei aus einem zentral liegenden zweiwertigen Eisenion sowie vier substituierten Pyrrolringen, die einen Tetrapyrrol Protoporphyrinring um das Eisen bilden, aufgebaut. Das zentral

liegende Eisen besitzt insgesamt sechs Koordinationsstellen, von welchen vier durch das Protoporphyrinsystem, eine von einer Seitenkette des Globin und die verbleibende von Sauerstoff besetzt werden können (Olver et al., 2010). Im Gegenzug zu Myoglobin, welches als Monomer vorliegt, ist Hämoglobin demnach als Tetramer aufgebaut. Dabei sind jeweils zwei Untereinheiten identisch. Folglich besteht das Hämoglobin-Molekül aus je zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polypeptidketten, vier Protoporphyrinringen sowie vier verbleibenden Bindungsstellen für Sauerstoff (Braend, 1988).

Für die Hämoglobinsynthese ist Eisen ein wichtiger Bestandteil. Die Regulation der Aufnahme von Eisen richtet sich nach dem individuellen Bedarf und wird bei erhöhtem Bedarf (Hypoxie, Anämie) hochreguliert (Lawen and Lane, 2013; Aisen and Listowsky, 1980). Die Aufnahme des intestinal zur Verfügung stehenden Eisens findet im proximalen Duodenum über einen Divalenten-Metallionen-Transporter (DMT-1) statt (Mims and Prchal, 2005). Nur etwa 3% des benötigten Eisens werden intestinal absorbiert. Die restliche Menge wird aus den Abbauprodukten der Häm-tragenden Zellen wieder zur Verfügung gestellt (Lawen and Lane, 2013; Aisen and Listowsky, 1980). Als zellulärer Exporter der Enterozyten zum Übertritt des Eisens in die Zirkulation steht Ferroportin zur Verfügung (Donovan et al., 2005). In der Zirkulation befindet sich Eisen nicht frei, sondern an ein Carrier-Protein, das Ferritin, gebunden und kann zu den Zielorten der Speicherung, der Leber und den Makrophagen des Knochenmarks, transportiert werden (Harrison et al., 1986). Über den Transferrin-Rezeptor (TfR) wird Eisen über Internalisation von Endosomen in die Zellen verbracht und ist dort als Speicherform Ferritin und Hämosiderin (in der Leber) verfügbar (Harrison et al., 1986; Lawen and Lane, 2013; Crichton and Charloteaux-Wauters, 1987). Die Expression des TfR richtet sich ebenfalls nach dem Bedarf der Zellen nach Eisen und ist somit bei erythroiden Vorläuferzellen am größten (Lawen and Lane, 2013; Aisen and Listowsky, 1980). Der zelluläre Export aus Makrophagen und Enterozyten wird durch das Protein Heparin reguliert und eingedämmt (Ganz, 2006). So kommt es in Folge einer Eisenüberladung oder inflammatorischer Prozesse zu einer Steigerung der Heparin-Konzentration und folgend zu einer Minderung der Eisenbioverfügbarkeit. Im Gegenzug vermindern hypoxische oder anämische Zustände den nachweisbaren Heparin-Spiegel.

Die Hämoglobinsynthese hat einen entscheidenden Einfluss auf die Weiterentwicklung der Erythrozyten. So ist der steigende intrazelluläre Hämoglobingehalt ausschlaggebend für die Kernextrusion. Physiologischerweise führt dies zu normozytär und normochromen Erythrozyten. Ist die Hämoglobinsynthese gestört, wie es bei Hämoglobinopathien oder einem bestehenden Eisenmangel der Fall sein kann, fehlt dieser Stimulus für die Kernextrusion. Der Zellkern kann so in den Normoblasten verbleiben und es kommt zu weiteren Zellteilungen. Aus der gesteigerten Anzahl an Zellteilungen entstehen kleine Erythrozyten, die sich als mikrozytär-normochrom bis mikrozytär-hypochrom darstellen können (Stohlman et al., 1963). Ein möglicher Mechanismus für diese Tatsache ist die Funktion der Häm-regulierenden-eIF2 $\alpha$ -Kinase (HRI). Diese wird besonders von erythroiden Vorläuferzellen exprimiert und ist für die Regulation der Synthese der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polypeptidketten durch die Hemmung der eIF2 verantwortlich. Eine sinkende Hämsynthese, beispielsweise folgend aus einem Eisenmangel oder angesichts einer Pathologie in der Hämsynthese, ist für diese Hemmung verantwortlich (Muta and Krantz, 1995). Als Kompensation wird so eine Überladung der erythroiden Zellen mit Hämoglobin verhindert, da die resultierenden normozytär-hyperchromen Zellen einem beschleunigtem Abbau und kürzerer Lebensdauer unterliegen würden. Folge sind die beständigeren mikrozytären Formen.

## **2.7. Erythrozytenindizes**

Die Messungen des Hämoglobingehaltes, der Hämoglobinkonzentration in Verbindung mit der Bestimmung der Zellgröße sind seit der Etablierung der Wintrobe-Indizes ein wichtiger Bestandteil in der hämatologischen Diagnostik (Wintrobe, 1932). Besonderes Augenmerk wird bei der Interpretation der Indizes auf die nähere Klassifizierung und Ätiologie von Anämien gelegt, jedoch können wichtige Informationen im Hinblick auf jede hämatologische Erkrankung gewonnen werden (Wintrobe, 1934). Zu den genannten Wintrobe-Indizes zählen das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV, mean corpuscular volume), der mittlere Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH, mean corpuscular hemoglobin) sowie die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration) (Brugnara and Mohandas, 2013). Während die genannten Wintrobe-Indizes in früherer Zeit errechnete Werte darstellten, kann

über moderne laserbasierte und durchflusszytometrisch arbeitende Hämatologiesysteme eine Bestimmung der individuellen Größe und Hämoglobinkonzentration eines jeden Erythrozyten erreicht werden.

Über die Klassifizierung der zellulären Größe sowie des enthaltenen Hämoglobin sind die physiologischerweise normozytär-normochromen vorliegenden Kenngröße der Erythrozyten (MCV, MCH und MCHC innerhalb der Norm) von pathologischen mikrozytären, makrozytären, hypochromen oder hyperchromen Varianten abzugrenzen.

Die Wintrobe-Indizes können in der heutigen Zeit mit Hilfe einer automatisierten Messung um weitere Parameter ergänzt werden. Zu diesen zählt neben der Verteilungsbreite der mittleren Zellgröße der Erythrozyten (RDW, red cell distribution width) auch die Verteilungsbreite der zellulären Hämoglobinkonzentration (HDW, hemoglobin distribution width), die in Verbindung mit den klassischen Wintrobe-Indizes zu einer besseren ätiologischen Suche eingesetzt werden kann (Brugnara and Mohandas, 2013).

Über eine exakte maschinelle Trennung zwischen murenen Erythrozyten und Retikulozyten kann ein Teil der Wintrobe-Indizes, welche für mature Erythrozyten etabliert wurden, auch auf Retikulozyten angewendet werden. Diese Technik ist nur wenigen Hämatologiesystemen gegeben. Neben dem mittleren Retikulozytenvolumen (MCVr, mean reticulocyte volume) und der Verteilungsbreite der Größenverhältnisse der Retikulozyten (RDWr, reticulocyte distribution width), kann auch eine Bestimmung des mittleren Hämoglobingehaltes der Retikulozyten (CHCMr, reticulocyte corpuscular hemoglobin concentration mean) erfolgen (Brugnara, 1998).

## **2.8. Hämoglobingehalt von Retikulozyten**

Je nach Messmethodik und Hämatologieanalysegerät werden für den Hämoglobingehalt der Retikulozyten unterschiedliche Terminologien verwendet. Die von Siemens produzierten Analysegeräte ADVIA<sup>®</sup> 120/2120/2120i (Siemens Medical Solutions, Erlangen) geben den Hämoglobingehalt der Retikulozyten als errechneten Wert CHr an. Dabei wird die Hämoglobinkonzentration und Größe aller erythroider Zellen (mature Erythrozyten und Retikulozyten) gemessen und

der Hämoglobingehalt errechnet. Für die Berechnung des retikulozytären Hämoglobingehaltes CHR wird das mittlere Retikulozytenvolumen (MCVr) mit der gemessenen mittleren Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten (CHCMr) multipliziert (Thomas et al., 2005; Piva et al., 2015; Schaefer and Stokol, 2014; Steinberg and Olver, 2005). Als Ret-He wird ein ähnlicher Parameter der Sysmex-Geräte (XE 2100/5000) (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) angegeben. Diese Geräte nutzen den mittels Vorwärt-Streulicht gemessenen Hämoglobingehalt um ein Erythrozyten- und Retikulozyten-Hämoglobin-Äquivalent (RBC-He und RET-He) zu bestimmen. Die Werte CHR und Ret-He sind dabei nicht synonym zu verwenden, da unterschiedliche Messmethoden und Berechnungen vorliegen. Mit einer sehr guten Korrelation von  $r^2=0,92$  sind sie jedoch gleichwertig zu setzen und spiegeln die Messung des gleichen Phänomens wider (Thomas et al., 2005).

Die Etablierung eines CHR- und Ret-He analogen Parameters des ProCyte Dx<sup>®</sup> (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) ist Gegenstand einer weiteren Doktorarbeit aus unserer Arbeitsgruppe. Mit einer Korrelation von  $p=0,74$  ( $p<0,0001$ , CI 0,66 bis 0,8) im Vergleich zu dem CHR konnte eine angemessene Korrelation gefunden werden (Fuchs, 2017).

### **2.8.1. Diagnostischer Nutzen des CHR in der Humanmedizin**

Der Hämoglobingehalt von Retikulozyten ist ein anerkannter Parameter um die Eisenverfügbarkeit auf die Erythropoese sowie die Erythropoesekapazität des Knochenmarks auf stimulierende Agentien zu beleuchten. Das Augenmerk liegt dabei auf einer Erniedrigung des Hb-Gehaltes der Retikulozyten. Dabei ist der retikulozytäre Hämoglobingehalt ein adäquater Parameter zur Einschätzung der zytoplasmatischen Hämoglobinmenge in den erythroiden Vorläufern (Brugnara, 1998b). Im Hinblick auf die kurze Entwicklungsdauer der erythroiden Reihe spiegelt der Hämoglobingehalt der Retikulozyten so die unmittelbar zur Verfügung stehenden Eisenspeicher der letzten Tage wider, was auf die kurze Entwicklungsphase von Retikulozyten von etwa vier Tagen zurückzuführen ist. Veränderungen der retikulozytären Indizes sind damit deutlich früher zu erkennen als Änderungen der Erythrozytenindizes, die in Folge der längeren Lebensdauer und des damit verzögerten Turnovers von Erythrozyten erst sehr spät eine Änderung sichtbar werden lassen (Brugnara and Mohandas, 2013; Brugnara,

1998). Unterschieden werden müssen dabei unterschiedliche Zustände, die zu einer verminderten Hämoglobinsynthese führen können. Häufigste Ursache sind dabei restriktive Eisenvorräte, diese können entweder absolut oder funktionell vorliegen. Ein absoluter Eisenmangel spiegelt dabei eine vollständige Erschöpfung der körpereigenen Eisenspeicher wider. Dies ist in den meisten Fällen auf einen exzessiven Blutverlust (gastrointestinale Blutung, Monatsblutungen) oder einen nutritiven Mangel zurückzuführen. Der funktionelle Eisenmangel hingegen beschreibt adäquat vorliegende körpereigene Eisenspeicher mit einem Ungleichgewicht zwischen dem Bedarf an Eisen und der Rate der Eisenmobilisation. Ursächlich sind in diesem Fall starke erythropoetische Stimuli wie eine hochgradige Regeneration, unter anderem bei der Therapie mit Erythropoetin. Dem funktionellen Eisenmangel untergeordnet ist die hepcidin-induzierte Sequestration von Eisen in Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten. Diese ist zu einem großen Teil an der Ausbildung der Anämie chronischer Erkrankungen beteiligt und wird im Rahmen einer akuten Phase bei systemischen Inflammationen gesehen (Goodnough, 2012).

Viele humanmedizinische Studien haben den diagnostischen Zweck eines erniedrigten retikulozytären Hämoglobingehaltes im Bezug auf die Einschätzung der Eisenverfügbarkeit für die Hämatopoese sowie die Aussage über eine adäquate Knochenmarkantwort auf erythropoese-steigernde Stimuli gezeigt. So ist die Bestimmung des Hämoglobingehaltes von Retikulozyten im Rahmen eines Eisenmangels bei Kindern und Erwachsenen etabliert (Ullrich et al., 2005; Mast et al., 2002). Bei nachgewiesenen Eisenmangelzuständen können die retikulozytären Indizes ebenfalls als Therapiekontrolle einer normalisierten Erythropoese fungieren, die ein Ansprechen auf eine intravenöse Eisensupplementationstherapie innerhalb von zwei bis vier Tagen zeigen (Brugnara et al., 1994; Major et al., 1997). Zusätzlich zu der Detektion von frühen Eisenmangelzuständen, die bei fortschreitendem Bestehen zu ausgeprägten anämischen Zuständen führen können, hat sich die Bestimmung des genannten Parameters auch bei anderen erkrankungsspezifischen Anämien als zielführend erwiesen. Hierzu zählen Anämien im Rahmen von chronischen Nierenerkrankungen sowie neoplastischer Erkrankungen (Thomas and Thomas, 2002; Fishbane, 1999).

Zusätzlich ist ein erniedrigter CHr bei Hämoglobinopathien und besonders Formen der Thalassämie beschrieben, welche zu einer ausgeprägten Mikrozytose und folgend einem niedrigen CHr führen (Lafferty et al., 1996; Velasco-Rodríguez et al., 2016).

Zusammenfassend ist der CHr in der Humanmedizin ein zusätzlicher, aber sehr sensitiver Parameter zur Diagnostik einer durch einen funktionellen oder absoluten Eisenmangel geminderten Erythropoeseleistung. Eine Differenzierung oder exakte Diagnosestellung der Erkrankung in Folge eines erniedrigten Wertes ist nicht möglich. Zusätzliche Erkrankungen, die zu einer Mikrozytose oder Hypochromasie führen sind als mögliche Differentialdiagnosen zu nennen.

### **2.8.2. Diagnostischer Nutzen des CHr bei Hunden**

Mit Hinblick auf die sensitive Erfassung einer eisendefizitären Erythropoese in der Humanmedizin, wurden auch in der Tiermedizin Untersuchungen zu einer Erniedrigung des CHr als Hinweis auf einen bestehenden absoluten oder funktionellen Mangel an Eisen durchgeführt. Der erste Referenzbereich für Hunde wurde 2005 mit dem ADVIA 120 etabliert. Die Autoren geben einen Bereich von 22,3 bis 27,9 Pikogramm (pg) respektive 1,38 bis 1,73 Femtomol (fmol) für den CHr an (Steinberg and Olver, 2005). 7% der dabei analysierten Hunde zeigten einen CHr unterhalb des genannten Bereiches, 6% wiesen einen erniedrigten MCVr auf, nur 3,2% der Tiere hatten eine Erniedrigung beider Werte. Die Tiere mit erniedrigtem CHr zeigten zudem signifikant niedrigere Hämatokrit- und MCV-Messungen. So wiesen etwa 50% der CHr-erniedrigten Tiere eine Anämie auf, 37% zeigten eine mikrozytäre Ausbildung der Erythrozyten. Unter Zuhilfenahme der Serum Ferritin Konzentration, der totalen Eisenbindungskapazität (TIBC) sowie der prozentualen Sättigung des Transferrins (% Sat) wurde bei den Tieren mit niedrigem CHr eine gute Korrelation zur Detektion eines frühen Eisenmangels erkannt (Steinberg and Olver, 2005). Ein ähnlicher Referenzbereich mit 1,43fmol bis 1,71fmol konnte in einer weiteren Studie evaluiert werden, an welchen sich der hauseigene Referenzbereich des ADVIA® 2120 des Zentrallabors der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin der JLU Gießen anlehnt (Prins et al., 2009). Als Cut-Off für die zusätzliche Detektion eines Eisenmangels wird in dieser Arbeit ein Wert von 1,22fmol mit einer sehr guten Sensitivität und Spezifität von 95,2% sowie

90,5% angegeben. Eine Eignung des Parameters als ergänzender Marker zur Diagnose eines Eisenmangels wurde ebenfalls ausgesprochen (Prins et al., 2009).

Hunde dienten auch in einem Modell zur Evaluierung von Retikulozytenparametern in einem nutritiv herbeigeführten absoluten Eisenmangel als vergleichende Spezies für die Humanmedizin. In Verbindung mit klassischen hämatologischen und biochemischen Variablen (Anämie, Hypoferrämie, erhöhten TIBC, erniedrigter % Sat und erniedrigten Serum-Ferritin-Werten) waren die retikulozytären Indizes (CHr und MCVr) den genannten Werten sowohl in der Detektion als auch in der Therapiekontrolle sensitiv überlegen (Fry and Kirk, 2006). Den genannten Studien gemein ist, dass ein Parameter alleine als Hinweis auf einen bestehenden Eisenmangel nicht ausreicht und die Resultate in Kombination gesehen werden müssen, ein sehr niedriger CHr in diesem Rahmen jedoch einen vorliegenden Eisenmangel sehr wahrscheinlich macht (Fry and Kirk, 2006; Steinberg and Olver, 2005; Thomas and Thomas, 2002).

Aus der Humanmedizin sind neben einem Mangel an Eisen auch die Anämie der chronischen Erkrankungen, die normalerweise normozytär-normochrom auftritt, teilweise aber auch mikrozytär-normochrom vorkommen kann, sowie Thalassämien als Hämoglobinopathien für eine CHr-Erniedrigung bekannt. Letztere, die zur Ausbildung einer mikrozytären-hypochromen Anämie führen, sind in der Tiermedizin nicht beschrieben.

So sind tiermedizinisch neben einem absoluten oder funktionellen Eisenmangel, beispielsweise durch zugrundeliegende inflammatorische Erkrankungen (Anämie der chronischen Erkrankung) oder Lebererkrankungen (besonders der portosystemische Shunt), nur rassespezifische Veränderungen der Erythrozyten (Mikrozytose der japanischen Hunderassen) als Ursache für eine CHr-Erniedrigung bekannt (Gavazza et al., 2012; Degen, 1987; Simpson et al., 1997). Ein gastrointestinaler Blutverlust vielfältiger Ätiologien ist dabei die häufigste Ursache für einen Eisenverlust. Ein wie zuvor erwähnter ernährungsbedingter Eisenmangel stellt bei mit kommerziellen Diäten ernährten Tieren eine Ausnahme dar und ist eher im Hinblick auf unausgewogene selbstgekochte Diäten denkbar (Schaefer and Stokol, 2014)

In einer retrospektiv ausgelegten Studie wurde eine Vielzahl retikulozytärer Indizes, unter anderem der CHr, bei Tieren mit Hinweisen auf einen Eisenmangel, einer Anämie der chronischen Erkrankungen, einem diagnostizierten portosystemischen Shunts sowie einer rassebedingten Mikrozytose verglichen. Während die Tiere mit einer bestehenden Eisenmangelanämie sehr ausgeprägte Veränderungen (besonders erniedrigter CHr und CHCMr), waren die Veränderungen innerhalb der Vergleichsgruppen weniger stark ausgeprägt (Schaefer and Stokol, 2014). Auf Grund einer größeren Streuung und auch Überlappung der Ergebnisse zwischen den Gruppen wurde der CHr als alleiniger Marker für einen eindeutigen Eisenmangel verneint, jedoch als stark hinweisend erachtet. Die ebenfalls in der Studie etablierten Referenzintervalle des CHr befinden sich in einem ähnlichen Rahmen wie die zuvor genannten (24,5-28,6pg) (Schaefer and Stokol, 2014) .

Eine weitere Studie konnte einen Zusammenhang zwischen einer systemischen Inflammationsreaktion (erhöhtes C-reaktives Protein) sowie einer CHr-Erniedrigung bei anämischen und nicht anämischen Tieren nachweisen. Als Ursache hierfür wird eine Eisensequestration im Rahmen der inflammatorischen Zytokinausschüttung diskutiert (Meléndez-Lazo et al., 2015). Eine ähnliche Entdeckung führte zu der allgemeinen Annahme, dass erniedrigte CHr-Werte keine Trennung zwischen einem absoluten und funktionellen Eisenmangel erlauben (Radakovich et al., 2015). Bei 34% der Hunde mit einer diagnostizierten immunvermittelten Anämie fanden sich in einer kürzlich veröffentlichten Studie CHr-Werte unterhalb eines festgelegten Referenzbereichs von 1,53fmol; ebenfalls wiesen diese Tiere auch einen signifikant niedrigeren Hämatokrit auf. Die Resultate lassen auf eine eisendefiziente Erythropoese bei einigen Hunden mit immunvermittelter Anämie schließen. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang neben einer inflammationsvermittelten Eisensequestration ein funktioneller Eisenmangel durch die hochgradig gesteigerte Erythropoese. Ein absoluter Eisenmangel erschien den Autoren weniger wahrscheinlich (Schaefer and Stokol, 2016).

### 2.8.3. Erhöhung des CHr

Während einige pathologische Konditionen für eine Erniedrigung des retikulozytären Hämoglobingehaltes bekannt sind, ist im Gegenzug eine Erhöhung nur in wenigen Fällen beschrieben. In einer vergleichenden Untersuchung von retikulozytären Indizes konnte bei humanmedizinischen Patienten mit einer bestehenden Makrozytose ebenfalls eine Erhöhung des CHr gefunden werden. Dabei korrelierten die erythroiden und retikulozytären Indizes sehr gut, wobei die retikulozytären Indizes auf Grund des schnelleren Turnovers an Retikulozyten als sensitivere Marker angesehen wurden (d'Onofrio et al., 1995). Mit einem mittleren CHr von 2,17fmol wichen die Resultate der makrozytären Retikulozyten deutlich von dem zeitgleich angegebenen Referenzbereich gesunder Menschen ab (1,6 bis 1,9fmol). Als Ursache der Makrozytose wurde unter anderem eine megaloblastäre Anämie im Rahmen eines Cobalaminmangels genannt (d'Onofrio et al., 1995; Piva et al., 2015). Bei Menschen verursachen sowohl ein Vitamin-B12-Mangel, als auch ein Mangel an Folsäure eine megaloblastäre Anämie. Dies ist auf eine unzureichende DNA-Synthese zurückzuführen und zieht ausgeprägte Veränderungen der erythroiden Morphologie sowohl im Knochenmark als auch in der Peripherie nach sich. Cobalamin und Folsäure fungieren als Coenzyme in der Synthese von Thymidin. Durch eine Unterversorgung kommt es zu einer fehlerhaften DNA-Synthese und Verzögerung der Maturation der Zellen. Eine Makrozytose der erythroiden Vorläufer und maturen Erythrozyten ist die Folge. In der Tiermedizin sind neben erworbenen Hypocobalaminämien durch gastrointestinale Erkrankungen (chronisch-entzündliche Darmerkrankung, neoplastische Veränderungen, nach Enterektomie) auch kongenitale Cobalaminmangelzustände beschrieben. So findet sich ein gehäuftes Auftreten von einer Cobalaminabsorptionsstörung sowohl bei Australian Shepherds, Beagles, Border Collies und Riesenschnauzern (He et al., 2005; Fordyce et al., 2000; Barron and Wouda, 2008; Fyfe et al., 2014; Battersby et al., 2005). Diese hereditäre Absorptionsstörung ist dem Imerslund-Gräsbeck-Syndrom des Menschen gleichzustellen. Die häufig in der Humanmedizin beschriebene megaloblastäre Anämie und Makrozytose wird seltener gesehen (Lutz et al., 2013; Morgan and McConnell, 1999; Kook et al., 2015). In keinem der Fälle wurde zu dem erhöhten MCV eine Bestimmung der retikulozytären Indizes durchgeführt.

Bei der Evaluation von Referenzbereichen für den CHr bei Hunden wurde in keiner der Studien eine Angabe zu Tieren mit einem erhöhten Wert gemacht (Steinberg and Olver, 2005; Prins et al., 2009). Nach Kenntnis des Autors ist zum jetzigen Zeitpunkt keine Beschreibung der Vorkommenshäufigkeit oder Ätiologie eines erhöhten CHr in der Tiermedizin erfolgt.

### **2.8.3.1. Potentielle Ursachen für die Erhöhung des CHr**

Als errechneter Wert aus den beiden Faktoren MCVr und CHCMr ist der CHr von beiden Faktoren gleichermaßen abhängig. Eine rechnerische Erhöhung des Wertes kommt durch eine von der Norm abweichende Erhöhung eines oder beider Faktoren zustande.

Postuliert werden kann, dass ätiologische Umstände, die zu einer Makrozytose und oder Hyperchromasie der Erythrozyten führen, ebenfalls in einer Änderung der retikulozytären Indizes sichtbar werden. Abweichungen von der physiologischerweise makrozytär-normochromen oder makrozytär-hypochromen Morphologie der Retikulozyten, die zu einer Änderung des Verhältnisses von MCVr und CHCMr führen sind normozytär-hyperchrome, makrozytär-normochrome Retikulozyten. Ab einem gewissen Grad der Abweichung kann sich auch im Rahmen einer makrozytär-normo- und makrozytär-hypochromen Morphologie ein errechneter erhöhter CHr entwickeln.

Im Folgenden sollen mögliche Umstände für eine Hyperchromasie und Makrozytose der Erythrozyten als mögliche Ätiologien eines erhöhten CHr diskutiert werden.

#### **2.8.3.1.1. Hyperchromasie**

Eine echte Hyperchromasie ist physiologischerweise nicht möglich, da die Hämoglobinsynthese der Retikulozyten ab einem bestimmten Gehalt sistiert (Olver et al., 2010). In den meisten Fällen handelt es sich beim Auftreten einer hyperchromatischen Erscheinung um artifizielle Resultate. In der Humanmedizin sind als pathologische Ursachen für eine Hyperchromasie in 30% der Fälle hereditäre erythrozytäre Membranopathien beschrieben, unter welchen die hereditäre Sphärozytose am häufigsten vertreten ist. Seltener kommt es im Rahmen viraler Infektionen (HIV, Hepatitis) zu Veränderungen der

Membranstruktur und artifiziellen Messung eines erhöhten MCHC durch eine verminderte Durchlässigkeit der Zellen in der laserbasierten Durchflusszytometrie (Deuel et al., 2012). Ebenfalls zu einer artifiziellen Erhöhung durch Änderung der Zelldurchlässigkeit kann es im Rahmen einer Heinzkörperchenbildung kommen. Bei diesen handelt es sich um intrazytoplasmatische Präzipitate, die durch eine Globindenaturierung in Folge oxidativen Stress entstehen. Während beim Hund physiologischerweise keine Heinzkörperchen vorliegen, können bei den für oxidative Schädigung anfälligeren Katzenerythrozyten wenige Prozent physiologischerweise nachgewiesen werden. Oxidative Substanzen die bei beiden Tierarten zur Heinzkörperchenbildung führen sind Zwiebeln, Kupfer, Zink, sowie Acetaminophen, Methylenblau und weitere Medikamente. Während die Bildung von Heinzkörperchen zu einer Erhöhung des CHCM führen kann, ist eine Erhöhung des CHCMr nicht bekannt. Vielmehr kommt es auf Grund einer Fehlklassifizierung der Zellen mit Heinkörperinklusionen zu einer Retikulozytose (Christopher et al., 1990).

Bei einigen durchflusszytometrisch arbeitenden Hämatologiegeräten kann eine bestehende Hämoglobinämie zu einer artifiziell erhöhten Messung des MCHC, durch Doppelmessung des intrazytoplasmatischen und freien Hämoglobins, führen. Durch spektrale Interferenzen kann es zudem bei lipämischen und ikterischen Blutproben eine Interaktion mit Leukozyten oder Zellkernen in Blutproben mit einer hochgradigen Leukozytose sowie einer inkompletten Erythrolyse zu falsch erhöhten MCHC-Werten kommen. Selten kommt es im Rahmen von einer ausgeprägten Poikilozytose (Sphärozyten, Exzentrozyten, Pyknozyten) durch einen prozentualen Verlust des Zellvolumens, aber nicht des Hämoglobingehaltes zu ebenfalls falsch hohen MCHC.

### **2.8.3.1.2. Makrozytose**

Die Ausbildung von makrozytär-normochromen Erythrozyten ist ebenso wie die makrozytär-hypochrome Form als regenerative Antwort bei Anämien die Regel. Bei einer fehlenden regenerativen Anämie können makrozytäre Erythrozyten allerdings auch für einen Defekt in der erythroiden Entwicklung sprechen.

Eine Makrozytose tritt in der Humanmedizin häufiger auf als bei Hunden und ist mit spezifischen Erkrankungen oder falsch-erhöhten Werten (präanalytischer

Fehler) vergesellschaftet. Eine Unterscheidung wird in megaloblastische und nicht megaloblastische Ursachen vorgenommen (Kaferle and Strzoda, 2009). Wie bereits erwähnt stellt der Cobalamin- und Folsäuremangel einen der häufigsten Gründe für die Ausbildung einer megaloblastischen Anämie dar. Weniger häufig tritt diese in Folge einer primären Knochenmarkserkrankung, Dyserythropoese, oder angeborener Erkrankungen auf. Als Ursachen der nicht megaloblastischen Makrozytose werden am häufigsten Alkoholmissbrauch oder Nebenwirkungen diverser Medikamente (Inhibitoren der reversen Transkriptase, Antikonvulsiva, Folat-Antagonisten, Chemotherapeutika, Antibiotika) gesehen (Aslan et al., 2008; Linnebank et al., 2011; Petersen et al., 2005; Schallier et al., 2009). Seltener kommt es in Folge von Hepatopathien oder einer bestehenden Hypothyreose zur Ausbildung makrozytärer Erythrozyten (Maruyama et al., 2001; Kaferle and Strzoda, 2009).

Artifizielle Erhöhungen des MCV sind sowohl in der Humanmedizin als auch der Tiermedizin bekannt. Durch eine lagerungsbedingte Zellschwellung kann es bei gleichzeitig erniedrigtem MCHC zu einer Makrozytose kommen. Tiermedizinische Lagerungsstudien zeigen jedoch, dass eine Beeinflussung des CHCMr und MCVr und damit des errechneten Chr als nicht relevant angesehen werden können (Furlanello et al., 2006). Hyperosmolare Zustände, die beispielsweise bei einer bestehenden Hypernatriämie auftreten können, bedingen ebenfalls eine Zellschwellung durch eine gesteigerte intrazelluläre Osmolarität.

Im Rahmen einer Agglutination von Erythrozyten (immunvermittelte Anämie) kann eine Makrozytose durch Bildung von Erythrozyten- oder Retikulozyten-Duplets/Triplets vorgetäuscht werden. Dies ist hauptsächlich bei rein impedanz-basierten Analysegeräten der Fall. Laser-basierte Geräte sind in ihrer Messtechnik wesentlich genauer und nur wenige falsch hohe MCV-Messungen sind bekannt (Vap et al., 2001).

Neben dem bereits erwähnten hereditären Cobalamin-Mangel, der in seltenen Fällen zu einer Makrozytose führen kann, gilt die Makrozytose des Pudels als weitere kongenitale Dyserythropoese (Canfield and Watson, 1989; Watson and Canfield, 1988). Betroffene Tiere zeigen eine Makrozytose unterschiedlicher Ausprägung ohne begleitende Anämie. Häufig ist ebenfalls das Auftreten von Howell-Jolly-Körperchen sowie von orthochromatischen Normoblasten.

Knochenmarksuntersuchungen dieser Pudel zeigen eine ausgeprägte Dyserythropoese, die morphologisch mit den Veränderungen eines Cobalamin- und Folsäuremangels in Tier- und Humanmedizin übereinstimmt. Weiterhin findet sich eine Vielzahl abnormaler Erythrozyten, Megaloblasten und häufig Mitosefiguren (Canfield and Watson, 1989). Einzelberichte zeigen bei Greyhounds neben weiteren hämatologischen Veränderungen wie einer erhöhten Erythrozytenanzahl ebenso einen erhöhten MCV (Zaldívar-López et al., 2011). Bei der hereditären Stomatozytose, die besonders Zwergschnauzer, Drentse Patrijshond und Alaskan Malamute betrifft, werden vermehrt makrozytäre und hypochrome Erythrozyten gesehen. Bei dieser Form handelt es sich um rasseabhängige Membrandefekte der Lipide oder der Natrium-Kalium-Pumpe, die sich in einer osmotischen Instabilität der Erythrozytenmembran bemerkbar machen. Den Defekt tragende Tiere müssen nicht anämisch sein (Brown et al., 1994; Bonfanti et al., 2004; Paltrinieri et al., 2007).

Neben der kongenitalen Form der Dyserythropoese, die in einer Makrozytose münden kann, gelten Auslöser für eine sekundäre Dysmyelopoese ebenfalls als mögliche Trigger für die Ausbildung von makrozytären erythroiden Zellen (Weiss and Reidarson, 1989; Canfield and Watson, 1989; Watson and Canfield, 1988; Weiss, 2010a). Eine sekundäre Dysmyelopoese wird im Zusammenhang mit immunvermittelten, hämolytischen Anämien, Thrombopenien, Lymphosarkomen, multiplen Myelomen sowie unter medikamentellem Einfluss (Chemotherapeutika, Chloramphenicol, Cephalosporine) gesehen und ist auch bei entzündlichen Erkrankungen beschrieben (Alleman and Harvey, 1993; Blue, 2016; Warlick and Smith, 2007; Weiss and Aird, 2001; Weiss, 2010b). Eine Abgrenzung zu einem primären myelodysplastischen Syndrom, welches mit refraktären Zytopenien einhergeht, ist nicht immer möglich (Weiss, 2010b).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1. Der Einfluss von Kortisol auf die Retikulozytenzahl im peripheren Blut bei Hunden ohne zugrundeliegende Anämie**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der erste Teil der Arbeit in Form einer prospektiven Single-Center-Studie innerhalb eines Zeitraumes von drei Monaten durchgeführt. Hierbei wurde im Rahmen der Vorstellung während der internistischen Sprechstunde oder bei erkrankten stationären Patienten nach medizinischer Indikation ein ACTH-Stimulationstest zur Überprüfung der Hypophysen-Nebennieren-Achse durchgeführt. Sowohl vor als auch nach der Stimulation mittels ACTH wurde eine hämatologische Untersuchung samt Retikulozytenbestimmung durchgeführt. Die Arbeitshypothese lautete, dass nach Stimulation der adrenergen Kortisol-Ausschüttung durch eine systemische ACTH-Wirkung es in Folge eines Kurzzeiteffektes von Kortisol auf die Erythropoese zu einer Erhöhung der Retikulozytenzahl im peripheren Blut kommt.

#### **3.1.1. Patienten**

Im Zeitraum vom 01.06.2011 bis 30.11.2011 wurde bei 21 Hunden im Rahmen der Routinediagnostik der internistischen Aufarbeitung spezifischer Erkrankungen ein ACTH-Stimulationstest durchgeführt. Da bei den erkrankten Tieren die hämatologische Untersuchung Teil der internistischen Aufarbeitung war und die Studie selbst keine zusätzliche Entnahme von Blut benötigte, war nach Rücksprache mit dem ethischen Komitee keine Beantragung als Tierversuch nötig. Ausschlusskriterien stellten eine fehlerhafte Ausführung oder Abbruch des ACTH-Stimulationstests, ein unzureichendes Ansprechen auf das verabreichte ACTH-Präparat (Diagnose eines Hypoadrenokortizismus) sowie fehlende oder falsche hämatologische Parameter dar. Zur Beurteilung der Retikulozytenzahl von Hunden ohne zugrundeliegende Anämie wurden Hunden mit einem Hämatokrit unterhalb des Referenzbereiches des ProCyte Dx<sup>®</sup> ebenfalls ausgeschlossen.

### 3.1.2. Durchführung

Im Rahmen der internistischen Aufarbeitung und unter Berücksichtigung der spezifischen Vorstellungsgründe der jeweiligen Patienten wurden alle Hunde einer ausführlichen klinischen Untersuchung, einer vollständigen hämatologischen (inklusive Differentialblutbild und Bestimmung der Retikulozytenzahl) und klinisch-chemischen Untersuchung sowie, wenn nötig, weiterführenden bildgebenden Untersuchungen (Röntgen Thorax und Sonographie des Abdomens) unterzogen. Für die Durchführung des ACTH-Stimulationstests erhielten alle Hunde im Vorfeld einen Venenverweilkatheter in die *Vena saphena lateralis* oder *Vena cephalica antebrachii* (Kliniject – V, 18-20-22 G, Klinika Medical GmbH, Usingen).

Zur Überprüfung der Nebennieren-Hypophysen-Achse wurde Tetracosactrin, ein synthetisches ACTH-Analogon (Synacthen<sup>®</sup>, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) in einer Dosierung von 5µg/kg Körpergewicht streng intravenös über den Venenverweilkatheter injiziert. Vor der Injektion und 60 Minuten danach wurden die benötigten Blutproben über den Venenverweilkatheter entnommen. Die Blutproben zur hämatologischen Analyse wurden nach Verwerfung des Totraumvolumens des Katheters (0,5ml Vollblut) in ein Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-antikoagulierte Vollblutröhrchen (K3-EDTA Tube, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführt. Für die Messung des basalen und stimulierten Kortisolwertes wurden anschließend Vollblutproben der Hunde in Eppendorf-Probengefäße (Eppendorf Tube<sup>®</sup>, Eppendorf AG, Hamburg) entnommen. 30 Minuten nach Abnahme in die Eppendorf-Probengefäße wurde Serum von den Vollblutanteilen in einer Zentrifuge (Hettich EBA 20, Andreas Hettich GmbH, & Co. KG, Tuttlingen) bei 2.500 Umdrehungen pro Minute über drei Minuten getrennt, pipettiert und in einem Schraubverschlussgefäß (Mikro-Röhre 2ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) zur Messung in ein externes Labor versendet.

### **3.1.3. Untersuchung der gewonnenen Proben**

#### **3.1.3.1. Kortisol-Bestimmung**

Die Messung der basalen und stimulierten Kortisol-Werte erfolgte nach postalischem Standardversand in einem externen Labor (BioControl, Veterinärmedizinisches Labor, Bioscientia – Institut für Medizinische Diagnostik GmbH, Ingelheim). Die Messung der Kortisolwerte in  $\mu\text{g/dl}$  wird in diesem mittels Chemiluminiszenz-Immunoassay (CLIA) durchgeführt. Für die Interpretation der Testergebnisse nach Stimulation mit Tetracosactrin wurden die laboreigenen Referenzwerte verwendet. Kortisolwerte nach Stimulation größer/gleich 50% des Ausgangswertes sowie bis zu einem Wert von  $17\mu\text{g/dl}$  galten als physiologische Antwort auf eine Stimulation; Resultate oberhalb von  $20\mu\text{g/dl}$  in Verbindung mit der klinischen Symptomatik, spezifischen labordiagnostischen Veränderungen sowie weiteren Untersuchungen waren hinweisend auf einen vorliegenden Hyperadrenokortizismus.

#### **3.1.3.2. Hämatologische Untersuchung**

Eine vollständige hämatologische Untersuchung der Blutproben wurde innerhalb von drei Stunden nach Gewinnung der Proben durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem In-House-Hämatologie-Analysegerät ProCyte Dx<sup>®</sup> (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) durch den Doktoranden selbst. Dem ProCyte Dx<sup>®</sup> liegt die Technologie der Durchflusszytometrie zugrunde. Prinzipiell werden hierbei die zu analysierenden Zellen einzeln durch einen laserproduzierten Lichtsrahl geleitet. Die Streuung und Absorption des auftreffenden Laserlichtes wird zur Zellcharakterisierung genutzt (Anonym, 2012; Fujino et al., 2013).

Der ProCyte Dx<sup>®</sup> ermöglicht die Messung eines vollständigen Blutbildes, welches Erythrozyten- und Thrombozytenparameter, eine Retikulozytenmessung sowie ein Leukogramm mit Differenzierung enthält (Fujino et al., 2013). Zur Messung dieser komplexen Untereinheiten wird die Blutprobe in unterschiedliche Kanäle aufgeteilt. Im ersten Kanal werden neben Erythrozyten ebenfalls Thrombozyten über eine Impedanzmessung differenziert. Dabei werden die Zellen über eine hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und über ihren elektrischen Widerstand, der die Größe der Zelle widerspiegelt, erkannt und klassifiziert. Neben

der Gesamterthrozytenzahl und -thrombozytenzahl kann hierbei das MCV sowie das MPV gemessen werden. Die Impedanzmessung gilt im Hinblick auf eine Fehlklassifizierung von Thrombozytenaggregaten, Erythrozytenfragmenten sowie bei Blutproben von Katzen (große Thrombozyten, kleinere Erythrozyten) als fehlerbehaftet. Ein Korrekturmechanismus wird über eine zweite optische Messung in einem weiteren Kanal gewährleistet. In diesem werden die Zellen mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes (Polymethin), welcher an Nukleinsäuren bindet, angefärbt. Mittels Laserlicht sowie seitlichem Streulicht (SFL = side fluorescent light) und Vorwärts-Streulicht (FSC = forward scatter) kann eine Klassifizierung von Erythrozyten, Retikulozyten und Thrombozyten nach Größe und Fluoreszenz getroffen werden, wobei letztere Hinweise auf den Maturationsgrad der Zellen geben kann. Mittels FSC ist eine Messung des zellulären Hämoglobingehaltes möglich. Über diesen können die Wintrobe Indizes MCV, MCH und MCHC angegeben werden (Anonym, 2012; Fujino et al., 2013; Goldmann et al., 2012).

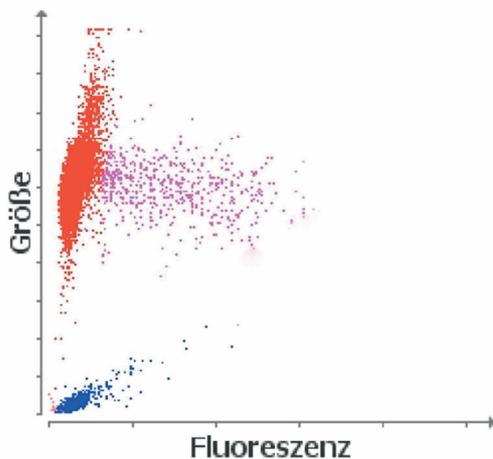


Abbildung 1: Erythrozyten- und Thrombozyten-Scattergramm eines gesunden Hundes.

Die Darstellung des FSC (Vorwärtsstreulicht) als Angabe der Zellgröße und des Hämoglobingehaltes erfolgt auf der y-Achse. Die jeweilige Fluoreszenz, die den RNA-Gehalt der Zellen anzeigt, ist auf der x-Achse dargestellt. Eine Klassifizierung der Zellreihen erfolgt in Punktwolken. Erythrozyten werden rot, Retikulozyten lila und Thrombozyten blau dargestellt.

Die Ermittlung der Leukozytenzahl und Differenzierung in neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten erfolgt ebenfalls über Durchflusszytometrie und Fluoreszenz. Ein Polymethin-Farbstoff kann, nachdem die Leukozyten durch einen Surfactant membrandurchlässig gemacht wurden, die Membran überwinden und an Nukleinsäuren und zytoplasmatische Organellen binden. Anhand des jeweiligen Aufbaus und RNA-Gehaltes werden die Leukozyten klassifiziert (Goldmann et al., 2012).

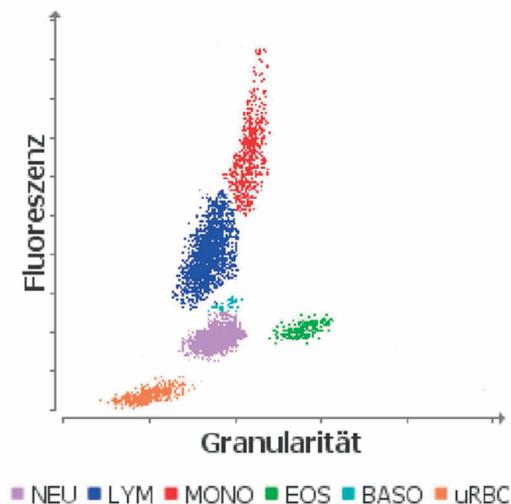


Abbildung 2: Leukozyten- Scattergramm eines gesunden Hundes.

Die Darstellung der Fluoreszenz, welche durch den DNA- und RNA-Gehalt charakterisiert ist, erfolgt auf der y-Achse. Die mittels Seitwärtsstreulicht dargestellte Granularität der Leukozyten wird auf der x-Achse angegeben. Eine Klassifizierung der Zellreihen erfolgt in Punktwolken. Neutrophile Granulozyten werden lila, Lymphozyten blau, Monozyten rot, Eosinophile Granulozyten grün, Basophile Granulozyten türkis dargestellt. Unlysierte Erythrozyten finden sich mit niedriger Fluoreszenz und Granularität als orange Punktwolke.

Parameter	Abkürzung	Einheit	Referenzbereich
Erythrozytenzahl	RBC	$\times 10^{12}$ Zellen/l	5,65-8,87
Hämatokrit	HCT	l/l	0,373-617
Hämoglobin	HB	g/dl	13,1-20,5
Mittleres Zellvolumen	MCV	fl	61,6-73,5
Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt	MCH	pg	21,2-25,9
Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration	MCHC	g/dl	32,0-37,9
Verteilungsbreite der Erythrozytengröße	RDW	%	13,6-21,7
Retikulozyten	RETIC <sub>abs</sub>	$\times 10^9$ Zellen/l	10,0-110,0
Relative Retikulozytenzahl	RETIC <sub>%</sub>	%	< 1,95%
Gesamtleukozyten	WBC	$\times 10^9$ Zellen/l	5,05-16,76
Neutrophile Granulozyten	NEU	$\times 10^9$ Zellen/l	2,95-11,64
Lymphozyten	LYM	$\times 10^9$ Zellen/l	1,05-5,10
Monozyten	MONO	$\times 10^9$ Zellen/l	0,16-1,12
Eosinophile Granulozyten	EOS	$\times 10^9$ Zellen/l	0,06-1,23
Basophile Granulozyten	BASO	$\times 10^9$ Zellen/l	0,00-0,10
Thrombozyten	PLT	$\times 10^9$ Zellen/l	148-484
Mittleres Thrombozytenvolumen	MPV	fl	8,7-13,2
Verteilungsbreite der Thrombozytengröße	PDW	%	9,1-19,4
Thrombokrit	PCT	%	0,14-0,46

Tabelle 1: Tierartsspezifische Referenzbereiche für Hunde des ProCyte Dx®.

### **3.1.3.3. Manuelle Zählung der Retikulozytenzahl**

Die Überprüfung der maschinell ermittelten Retikulozytenwerte wurde manuell kontrolliert. Für die spezielle Anfärbung der residualen Zellorganellen und RNA der Retikulozyten wurde die Färbelösung Brilliankresyl-Blau verwendet (Reticulocyte Stain Nr. R4132, SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>, Saint Louis, USA). Für die Färbung wurden gleiche Anteile EDTA-Vollblut und Färbelösung über einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert. Nach Ausstreichen und Lufttrocknung konnte eine Retikulozytendifferenzierung unter Ölimmersion (Vergrößerung: 1000) durchgeführt werden. Hierbei gelten Zellen mit mehr als zwei anfärbbaren Granula als Retikulozyten (Koepke et al., 1997). Unter Bezug auf die Anzahl der ausgezählten Erthrozyten konnte die Angabe der Retikulozytenzahl in Prozent erfolgen. Unter Zuhilfenahme der mittels ProCyte DX<sup>®</sup> ermittelten Gesamterthrozytenzahl wurde eine absolute Retikulozytenzahl errechnet. Die manuelle Differenzierung wurde durch den Doktoranden selbst durchgeführt.

### **3.1.4. Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte sowohl mit dem Programm Excel (Excel 2008, Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA98052-6399, USA), als auch mit dem Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA).

Eine Untersuchung auf Normalverteilung der Parameter wurde mittels Kolmogorov-Smirnow-Test durchgeführt. Im Falle einer vorliegenden Normalverteilung wurden die Parameter vor und nach der Stimulation mit Tetracosactrin mit einem gepaarten t-test verglichen. Datensätzen mit einer nachweisbaren Normalverteilung sind Kortisol, Erythrozytenzahl, Hämatokrit, MCV, MCH, RDW, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Anzahl der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Lymphozyten. Die nicht normalverteilten Parameter (Retikulozytenzahl, MCHC und Monozyten) wurden mit einem Wilcoxon-matched-pair-Test verglichen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt bei parametrischen Datensätzen als Mittelwert mit Standardabweichung, bei nicht-parametrischen Datensätzen als Median mit Range. Das Signifikanzlevel für alle statistischen Untersuchungen wurde mit  $p < 0,05$  angesetzt. Zur Korrelation der automatisierten und manuellen Retikulozytendifferenzierung wurden die beiden

Werte mittels Rangkoeffizient nach *Spearman* für nicht parametrische Werte untersucht. Die Korrelation wurde nach exzellent ( $r_s=0,93-0,99$ ), gut ( $r_s=0,8-0,92$ ), mittelmäßig ( $r_s=0,59-0,79$ ) und schlecht ( $r_s<0,59$ ) eingeteilt.

## **3.2. CHR-Erhöhung beim Hund: Vorkommenshäufigkeit und Ätiologie**

Der zweite Teil dieser Dissertation wurde als retrospektive Arbeit durchgeführt. Über einen Zeitraum von sechs Jahren wurden dabei die hämatologischen Untersuchungen der ambulanten und stationären Patienten der Klinik für Kleintiere – Innere Medizin des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen im Hinblick auf eine Bestimmung der Retikulozytenzahl sowie des retikulozytären Hämoglobingehaltes retrospektiv ausgewertet. Zielsetzung der Auswertung war eine Quantifizierung der Vorkommenshäufigkeit eines erhöhten CHR sowie die Angabe potentiell auslösender Ursachen.

### **3.2.1. Zeitraum, Patienten und Gruppierung der Tiere mit erhöhtem CHR**

Im Zeitraum vom 01.01.2008 bis 31.12.2013 wurden die Daten jeder hämatologischen Messung des Zentrallabors des Klinikums Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere - Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen retrospektiv ausgewertet. Hierbei handelte es sich um 33579 Analysen. Bei der Auswertung der Proben wurden ausschließlich die hämatologische Untersuchung von Hunden eingeschlossen, andere Spezies wurden exkludiert. Weiterhin wurde eine vollständige Messung aller hämatologischen Parameter inklusive Bestimmung der Retikulozytenzahl und CHR vorausgesetzt. Die Blutuntersuchungen der Tiere wurden mit dem Hämatologiesystem ADVIA® 2120 (Siemens Medical Solutions, Eschborn) im Rahmen der internistischen Diagnostik und Aufarbeitung stationärer und poliklinischer Patienten der Klinik für Kleintiere - Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Eine Gruppierung der Tiere erfolgte über die CHR-Messwerte des ADVIA® 2120 nach Modifikation bereits validierter Referenzbereiche (Prins et al., 2009; Bauer and Moritz, 2008; Steinberg and Olver, 2005). Bei der Bestimmung der Cut-Off-Werte lagen die etablierten Referenzintervalle zu Grunde. Im Hinblick auf Tiere mit Hinweis auf eine eisendefizitäre Erythropoese wurden die Cut-Off-Werte von *Prins et al.* an die zyanidfreie Messmethodik des ADVIA® 2120 angepasst (Bauer and Moritz, 2008; Prins et al., 2009). Die weitere Einteilung erfolgte auf gleichen

Anpassungsweg mit den etablierten Referenzwerten von *Steinberg* und *Olver* (Steinberg and Olver, 2005; Bauer and Moritz, 2008).

CHr in fmol/l	Interpretation
<b>&lt; 1,29</b>	Tiere mit einem stark erniedrigten CHr als Hinweis auf eine bestehende eisendefiziente Erythropoese
<b>1,29-1,46</b>	Tiere mit einem erniedrigten CHr
<b>1,47-1,84</b>	Tiere mit einem Messwert innerhalb sowie leicht oberhalb des Referenzbereich
<b>≥ 1,85</b>	Tiere mit einem deutlich erhöhten CHr

Tabelle 2: Gruppierung der Hunde nach CHr.

Tiere mit einem nachweislich erhöhten CHr wurden hinsichtlich Mehrfachmessungen im Rahmen einer internen Qualitätskontrolle oder Wiederholungsmessungen eines Patienten im Verlauf betrachtet. Eingeschlossen wurde jeweils nur die erste Messung eines erhöhten CHr pro Patient. In den weiteren Gruppen wurden Mehrfachmessungen oder Wiederholungsmessungen nicht betrachtet.

### 3.2.2. ADVIA<sup>®</sup> 2120

Bei dem ADVIA<sup>®</sup> 2120 handelt es sich um ein vollautomatisches Hämatologiesystem, dessen Messmethodik auf einer Doppelwinkel-Laser-Streulicht-Messung beruht (Siemens, 2005). Mittels einer spezifischen Multispezies-Software kann eine auf die jeweilige Tierart zugeschnittene hämatologische Untersuchung erfolgen. Eine Messung des vollständigen Blutbildes mit Leukozytendifferenzierung sowie Bestimmung der absoluten, prozentualen Retikulozytenzahl und Retikulozytenindex-Zahlen ist möglich (Siemens, 2005; 2009). Auf die Erläuterung der Leukozytendifferenzierung wird im Folgenden verzichtet, da sie für den weiteren Ablauf der Untersuchungen nicht relevant erscheint.

Die zu messende Blutprobe wird innerhalb des Gerätes anteilmäßig für die unterschiedlichen Untersuchungen aufgeteilt. Mittels hydrodynamischer

Fokussierung, die eine Vereinzelung der zellulären Bestandteile in einem umgebenden Mantelstrom bedeutet, kann eine fehlerfreie Messung der einzelnen Zellen in der Flusszelle erfolgen. Die Detektion der Zellen erfolgt in der Flusszelle über einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 670nm. Die durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt Zellen passieren in der Flusszelle diesen Laserstrahl. Es kommt zu einer Streuung und bei der Retikulozytenbestimmung auch zu einer Absorption des emittierten Lichtstrahls. Das Streulicht, welches durch Lichtbeugung, -brechung und Reflexion entsteht, wird ebenso wie die Absorption von Detektoren erfasst. Eine Unterscheidung wird hierbei in Kleinwinkelstreulicht (2-3°) und Großwinkelstreulicht (5-15°) vorgenommen. Ersteres gibt Hinweise auf die Zellgröße, letzteres erfasst die Granularität der Zellen.

Erythrozyten und Thrombozyten werden in einem gleichen Verfahren in der ERY-Reaktionskammer des ADVIA<sup>®</sup> 2120 analysiert. Um einen Einfluss der individuellen Erythrozytenform als Variabilitätsfaktor auszuschließen, werden die Erythrozyten vor der Analyse mit Hilfe von Laurylsulfat isovolumetrisch aufgekugelt. Eine Aufkuglung der Thrombozyten findet bereits durch das antikoagulierende EDTA statt. Der Hämoglobingehalt der Erythrozyten wird nach Lyse der Erythrozyten durch eine zyanidfreie colorimetrische Messung sowie eine zweite, zellbasierte Hämoglobinmessung bestimmt (Bauer and Moritz, 2008). Durch einen direkten Vergleich des pro Zelle gemessenen CHCM (corpuscular hemoglobin concentration mean) und des errechneten MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) ist eine interne Qualitätskontrolle gegeben. Weiterhin werden aus den direkt ermittelten Variablen Zellvolumen und CHCM die weiteren Parameter Hämatokrit (HCT), MCV, MCH, RDW und HDW errechnet. Die Ergebnisse der Messung können neben der numerischen Angabe ebenfalls graphisch dargestellt werden. Als RBC-Matrix oder Tic Tac Toe wird dabei die graphische Darstellung des gemessenen Erythrozytenvolumen und Hämoglobinkonzentration einer jeden Zelle dargestellt und erlaubt eine Aussage über die Morphologie und den Hämoglobingehalt einer jeden Zelle (Siemens, 2009; 2005; Grimes and Fry, 2014). Je nach graphischer Darstellung kann diese RBC-Matrix sowohl aus der Vogelperspektive als auch als seitliche Ansicht wie folgt dargestellt werden.

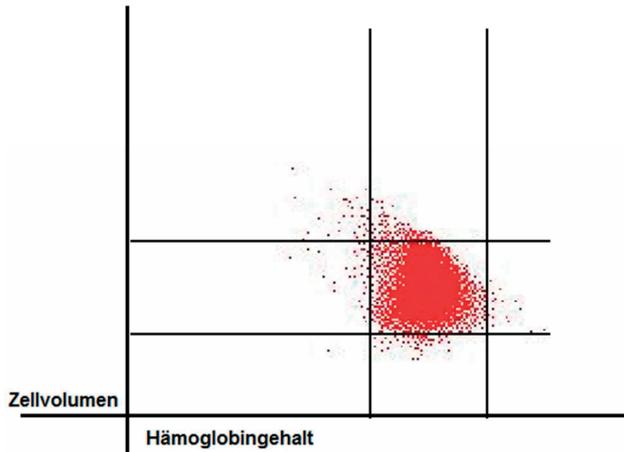


Abbildung 3: Erythrozyten-Punktwolken (Scattergramm) als RBC-Matrix oder Tic Tac Toe eines gesunden Hundes.

Jeder einzelne Erthrozyt wird hinsichtlich seines Zellvolumens und der enthaltenen Hämoglobinkonzentration gemessen und als roter Punkt graphisch dargestellt. Auf der x-Achse ist das Zellvolumen, auf der y-Achse der Hämoglobingehalt dargestellt. Zentral finden sich normozytär-normochrome Zellen. Oberhalb dieser normalen Population stellen sich makrozytäre Zellen dar, unterhalb mikrozytäre. Ausschläge auf die linke Seite geben hypochrome Zellen, Ausschläge nach rechts hyperchrome.

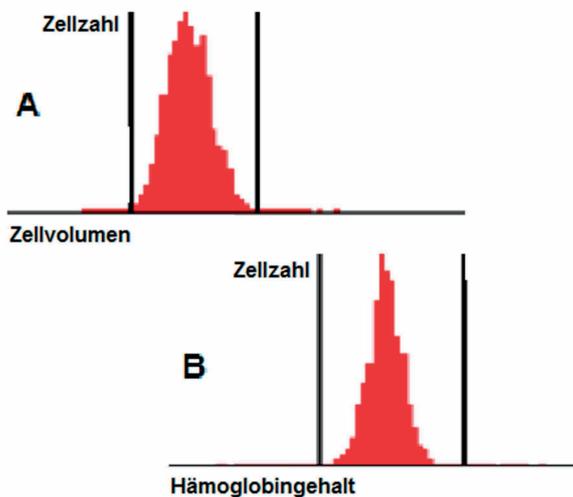


Abbildung 4: Histogramm zur Darstellung des Zellulären Volumens und des zellulären Hämoglobingehaltes bei einem gesunden Hund.

Jeder einzelne Erthrozyt wird hinsichtlich seines Zellvolumens und der enthaltenen Hämoglobinkonzentration gemessen und als roter Punkt graphisch dargestellt. Auf der x- und y-Achse werden die Zellen nach Anzahl in der Gaußschen Glockenkurve dargestellt. Abbildung A zeigt das mittlere zelluläre Volumen der Erythrozyten. Innerhalb der Grenzen liegen normozytäre Zellen, links stellen sich mikrozytäre, rechts makrozytäre Erythrozyten dar. Abbildung B zeigt den zellulären Hämoglobingehalt. Innerhalb der Grenzen finden sich normochrome Zellen, links hypochrome und rechts hyperchrome Zellen.

Ähnlich wie bei der Aufbereitung der Erythrozyten kommt es zu einer Aufkuglung der Retikulozyten vor der Messung. In einem folgenden Schritt wird die in den Retikulozyten enthaltene Rest-RNA mit dem kationischen Farbstoff Oxazin 750, welcher ein Neumethylen-Blau-Derivat ist, angefärbt. Auch diese vorbereitete Suspension fließt hydrodynamisch fokussiert durch die Flusszelle und wird über das Streulicht und die Absorption klassifiziert. Die Hämoglobinkonzentration wird dabei über den Großwinkeldetektor erfasst, während der Kleinwinkeldetektor das Zellvolumen angibt. Das absorbierte Licht gibt Aufschluss über den RNA-Gehalt der Zellen. Eine Trennung von Erythrozyten zu Retikulozyten wird dabei über Absorptionsgrad und Großwinkelstreulicht vorgenommen (Riley et al., 2001). Eine Trennung der Reifungsstadien der Retikulozyten ist auf Grund einer Graduierung des RNA-Gehaltes möglich. So werden niedrig-, mittel- und hochabsorbierende Retikulozyten (N-, M- und H-Retikulozyten) beim ADVIA<sup>®</sup> 2120 unterschieden. Als Retikulozytenparameter ergeben sich daher die absolute und relative Retikulozytenzahl (in  $10^9/l$  und %), absolute und relative Anzahlen der Retikulozytensubpopulationen (N-, M- und H-Retikulozyten in  $10^9/l$  und %) das MCVr in fl, der RDWr in %, der CHCMr in g/dl sowie der HDWr in g/dl (Moritz et al., 2004).

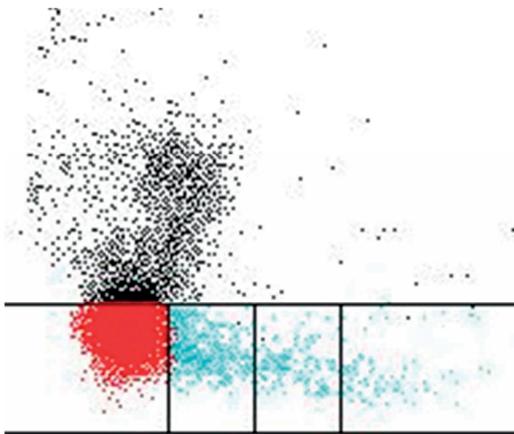


Abbildung 5: Darstellung der Erythrozyten und Retikulozyten hinsichtlich der unterschiedlichen Granularität (RNA-Gehalt).

Die x-Achse wird durch den Absorptionsgrad (RNA-Gehalt) charakterisiert, die y-Achse spiegelt das Zellvolumen wieder. Mature Erythrozyten finden sich als rotgefärbte Population, Retikulozyten klassifiziert nach Subpopulationen von links nach rechts (N-, M-, H-Retikulozyten) in hellblau.

Parameter	Abkürzung	Einheit	Referenzbereich
Erythrozytenzahl	RBC	$\times 10^{12}$ Zellen/l	5,5-8,5
Hämatokrit	HCT	l/l	0,39-0,56
Hämoglobin	HB	mmol/l	8,06-12,21
Mittleres Zellvolumen	MCV	fl	62,61-73,5
Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt	MCH	pg	1,35-1,62
Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration	MCHC	mmol/l	20,82-23,53
Verteilungsbreite der Erythrozytengröße	RDW	%	10,76-12,8
Retikulozyten	RETIC <sub>abs</sub>	$\times 10^9$ Zellen/l	10,0-110,0
Relative Retikulozytenzahl	RETIC%	%	< 1,95%
Mittleres Retikulozytenvolumen	MCVr	fl	keine Angabe
Gemessener Hämoglobingehalt eines Retikulozyten	CHCMr	g/dl	keine Angabe
Hämoglobingehalt der Retikulozyten	CHr	fL	1,43-1,71
Verteilungsbreite der Retikulozytengröße	RDWr	%	keine Angabe
Gesamtleukozyten	WBC	$\times 10^9$ Zellen/l	5,48-13,74
Neutrophile Granulozyten	NEU	$\times 10^9$ Zellen/l	2,78-8,73
Lymphozyten	LYM	$\times 10^9$ Zellen/l	0,72-4,71
Monozyten	MONO	$\times 10^9$ Zellen/l	0,06-0,83
Eosinophile Granulozyten	EOS	$\times 10^9$ Zellen/l	< 1,47
Basophile Granulozyten	BASO	$\times 10^9$ Zellen/l	0,00-0,11
Thrombozyten	PLT	$\times 10^9$ Zellen/l	150-500
Thrombokrit	PCT	%	0,14-0,43

Tabelle 3: Tierartsspezifische Referenzbereich für Hunde des ADVIA® 2120.

### 3.2.3. Auswertung der Daten

Nach Einteilung der Tiere anhand der CHr-Messwerte erfolgte eine weitere Untersuchung unter Einbeziehung der Retikulozytenzahl sowie Erythrozytenzahl und Erythrozytenindizes. Da eine Angabe des MCVr und CHCMr in den Routinemessungen nicht erfolgt und eine ausschließliche Angabe des errechneten CHr angegeben wird, erfolgte eine Beurteilung der Erythrozytenmorphologie anhand der Erythrozytenscattergramme des ADVIA® 2120. Eine Unterteilung der Tiere mit erhöhtem CHr erfolgte nach Erythrozytenmorphologie in: normozytär-normochrom, makrozytär-normochrom, makrozytär-hypochrom, makrozytär-hyperchrom, mikrozytär-normochrom, mikrozytär-hypochrom, mikrozytär-hyperchrom, sichtbare Artefakte.

Zusätzliche Daten wurden für die mit einem erhöhten CHr evaluierten Hunde im Hinblick auf Alter, Geschlecht, Rasse und Diagnose der Erkrankung erhoben. Ausschlaggebend für eine mögliche Diagnose war die Durchsicht der vorliegenden Krankenakten mit weiterführenden Untersuchungen. Anhand der Diagnose erfolgte eine Einteilung in spezifische Gruppen, die nach Durchsicht der Diagnosen erstellt wurden. Folgende Gruppeneinteilung findet Verwendung:

1. Erkrankungen mit overten Blutungen
2. Erkrankungen mit Hämolyse
3. Systemische Inflammationsreaktion
4. Neoplasien
5. Nierenerkrankungen
6. Erkrankungen ohne mögliche Einteilung in die obigen Kategorien

### **3.2.4. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte sowohl mit dem Programm Excel (Excel 2008, Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA98052-6399, USA), als auch mit dem Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA). Eine Untersuchung auf Normalverteilung der Parameter wurde mittels Kolmogorov-Smirnow-Test sowie Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Parametrische Datensätze wurden hinsichtlich des Median und Range, nicht-parametrische Datensätze hinsichtlich des Mittelwertes und Standardabweichung ausgewertet.

Nach Einteilung der Datensätze in krankheitsspezifische Gruppen wurde ein Gruppenvergleich aller hämatologischen Parameter durchgeführt. Auf Grund der niedrigen Probandenzahl der jeweiligen Gruppen wurden die Parameter als nicht normalverteilt angesehen und mittels Median und Range angegeben und ausgewertet. Eine Untersuchung auf signifikante Gruppenunterschiede wurde mittels Kruskal-Wallis-H-Test für nicht parametrische Datensätze vorgenommen. Das Signifikanzniveau wurde bei  $P < 0,05$  gesetzt. Bei einem signifikanten Gruppenunterschied wurde zur Bestimmung der signifikant unterschiedlichen Gruppen ein Post-hoc-Test (Tukey's honestly significant difference test) verwendet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1. Retikulozytose bei Hunden ohne zugrundeliegende Anämie**

#### **4.1.1. Allgemeine Auswertung**

Im Zeitraum vom 01.06.2011 bis 30.11.2011 wurde bei insgesamt 21 Hunden ein ACTH-Stimulationstest als zusätzliches Diagnostikum einer internistischen Aufarbeitung spezifischer Fragestellungen durchgeführt. Zwei dieser Hunde zeigten ein unzureichendes Ansprechen der Nebennieren-Hypophysen-Achse auf das verabreichte Tetracosactrin und erhielten die Diagnose eines Hypoadrenokortizismus. Bei diesen Tieren erfolgte der Ausschluss auf Grund eines nicht ausreichenden Kortisolanstiegs nach Stimulation. Drei weitere Tiere wurden auf Grund fehlender oder falscher Messwerte aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Ein Tier fiel mit einer mittelgradigen aregenerativen normozytär-normochromen Anämie auf. 15 Tiere erfüllten die gewünschten Kriterien und wurden in der weiteren Auswertung betrachtet.

Das mediane Alter der untersuchten Tiere lag bei drei Jahren mit einem Range von einem bis 16 Jahren. Vier der 15 Tiere waren unkastrierte Hündinnen, fünf weitere waren kastriert. Von den sechs männlichen Tieren der Studie war lediglich ein Rüde kastriert. Neben zwei Mischlingshunden waren jeweils zwei Golden Retriever und zwei Border Collie vertreten. Weitere Rassen mit jeweils einem vertretenen Tier stellten Beagle, Bernhardiner, Border Terrier, Collie, Coton de Tulear, Deutscher Pinscher, Havaneser, Jack Russell Terrier, West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier dar. Bei 73% der Tiere (11/15) wurde der ACTH-Stimulationstest zum Ausschluss eines möglichen Hypoadrenokortizismus durchgeführt. Bei den verbleibenden 27% (4/15) bestand der Verdacht auf eine hormonell aktive Nebennierenneoplasie (adreneger Hyperadrenokortizismus oder Phäochromozytom).

### 4.1.2. Ergebnisse Kortisol

Nach der intravenösen Verbreichung von Tetracosactrin induzierte das ACTH-Analogon einen signifikanten Anstieg der Kortisol-Serum-Konzentration innerhalb von 60 Minuten ( $P < 0,0001$ ). Im Vergleich zu den mittleren basalen Werten von  $3,91 \pm 2,66 \mu\text{g/dl}$  zeigte sich ein ACTH-bedingter Anstieg der Kortisolkonzentration auf  $11,41 \pm 3,94 \mu\text{g/dl}$ .

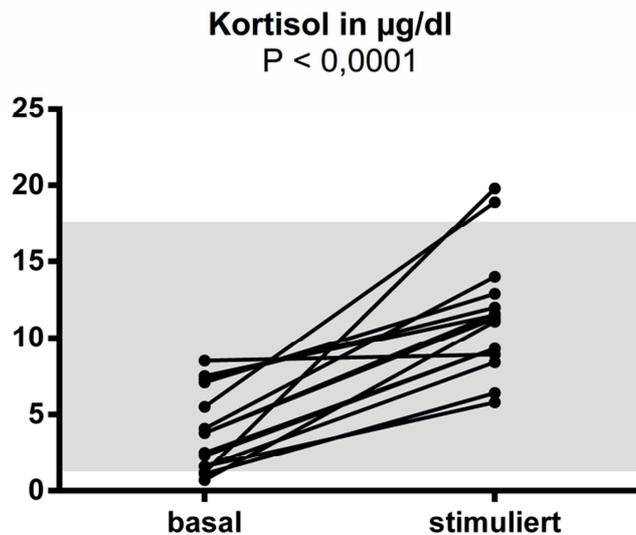


Abbildung 6: Darstellung des Serum-Kortisol-Spiegels vor und 60 Minuten nach Stimulation mit Tetracosactrin.

Auf der x-Achse sind die Werte vor und nach Stimulation vergleichend aufgetragen. Die y-Achse spiegelt die gemessene Kortisol-Konzentration in  $\mu\text{g/dl}$  wider. Grau hinterlegt ist der laboreigene Referenzbereich.

### 4.1.3. Ergebnisse Retikulozyten

Bei der Auswertung der Retikulozytenzahl im peripheren Blut konnte bei 87% der Tiere (13/15) eine Retikulozytenzahl innerhalb des Referenzbereiches gefunden werden, sowohl vor als auch nach Stimulation. 13% der Tiere (2/15) zeigten in den vergleichenden Messungen eine Retikulozytose. Die mittelgradig erhöhte Retikulozytenzahl belief sich dabei auf eine Zahl von 140,1 respektive 181,3 x 10<sup>9</sup>/L vor sowie 134,6 respektive 176,0 x 10<sup>9</sup>/l eine Stunde nach Gabe von Tetracosactrin. Die gefundene Retikulozytose konnte in beiden Fällen in der manuellen Differenzierung, wenn auch in geringerem Ausmaße, bestätigt werden. Sowohl der Hämatokrit als auch die Erythrozytenanzahl lagen bei beiden Vertretern im mittleren Referenzbereich. In beiden Fällen kam es zu einem Abfall der Retikulozytenzahl 60 Minuten nach Tetracosactringabe.

Insgesamt zeigte sich bei allen Tieren ein signifikantes Absinken der Retikulozytenzahl von  $58,53 \pm 47,1 \times 10^9/l$  auf  $47,32 \pm 46,1 \times 10^9/l$ . Die manuelle Differenzierung von Retikulozyten verlief im Einklang mit der maschinell erstellten Zellzahl. Eine gute Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten nach *Spearman* von  $r_s = 0,82$  ( $P < 0,0001$ ) wurde detektiert. Dabei lieferte die manuelle Differenzierung im Median signifikant niedrigere Werte als die automatisierte Methode mittels Impedanz- und Laserdurchflusszytometrie.

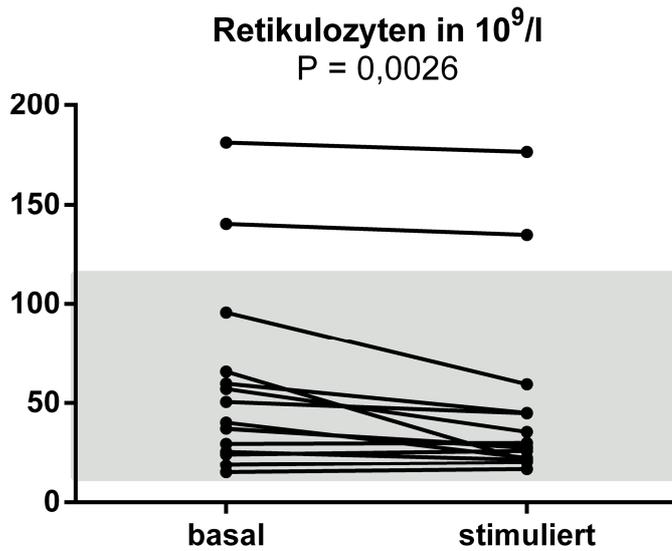


Abbildung 7: Darstellung der automatisierten Retikulozytenmessung mittels ProCyte Dx vor und 60 Minuten nach Stimulation mit Tetracosactrin.

Auf der x-Achse sind die vergleichenden Werte vor und nach Stimulation dargestellt. Die Anzahl der Retikulozyten  $\times 10^9/l$  ist auf der y-Achse aufgetragen. Grau hinterlegt findet sich der Referenzbereich

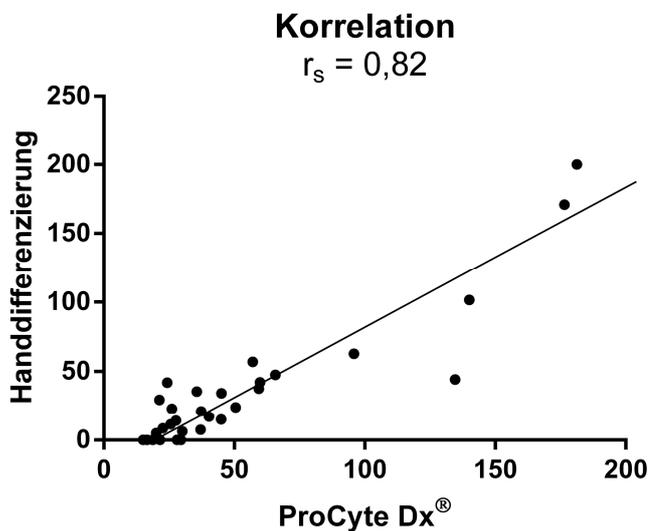


Abbildung 8: Vergleich der automatisierten Retikulozytenmessung mittels ProCyte Dx<sup>®</sup> und der Handdifferenzierung eines Neumethylen-Blau-gefärbten Blutausstrichs.

Auf der x-Achse sind die vergleichenden Werte des ProCyte Dx<sup>®</sup>, auf der y-Achse die manuell ausgezählten Retikulozytenzahlen aufgetragen.

#### 4.1.4. Ergebnisse Erythrozyten und Erythrozyten-Indizes

Im Bezug auf die Gesamterythrozytenzahl und Wintrobe-Indizes fanden sich ebenfalls signifikante Veränderungen. So zeigte sich neben dem signifikanten Abfall der Retikulozytenzahl auch ein signifikantes Absinken der Gesamterythrozytenzahl, des Hämatokrits, des MCV und RDW. Während der MCH keinen signifikanten Veränderungen unterlegen war, kam es bei dem MCHC 60 Minuten nach Stimulation zu einem signifikanten Anstieg.

Parameter	P-Wert		Median und Range	Mean und Standardabweichung	Signifikanz
Erythrozytenzahl( $\times 10^{12}/l$ )	0,0026	basal	7,03 (5,51-8,57)	<b>7,23 <math>\pm</math> 0,94</b>	ja
		stimuliert	7,08 (5,15-8,69)	<b>6,86 <math>\pm</math> 0,95</b>	
Hämatokrit (l/l)	<0,0001	basal	0,51 (0,41-0,62)	<b>0,52 <math>\pm</math> 0,62</b>	ja
		stimuliert	0,48 (0,37-0,61)	<b>0,49 <math>\pm</math> 0,63</b>	
RDW (%)	0,0039	basal	18,4 (14,2-19,7)	<b>17,54 <math>\pm</math> 1,79</b>	ja
		stimuliert	16,6 (14,1-19,6)	<b>16,85 <math>\pm</math> 1,81</b>	
MCV (fl)	0,006	basal	72,5 (62,8-81,9)	<b>72,24 <math>\pm</math> 4,83</b>	ja
		stimuliert	69,9 (62,2-81,4)	<b>70,81 <math>\pm</math> 5,05</b>	
MCH (pg)	0,2316	basal	23,5 (21,6-26,3)	<b>23,46 <math>\pm</math> 1,24</b>	nein
		stimuliert	23,2 (21,6-24,7)	<b>23,31 <math>\pm</math> 1,0</b>	
MCHC (g/dl)	0,049	basal	<b>33,3 (28,2-35,1)</b>	32,55 $\pm$ 1,99	ja
		stimuliert	<b>33,9 (28,4-35,4)</b>	33,01 $\pm$ 2,13	

Tabelle 4: Statistische Auswertung der Erythrozyten und Erythrozyten-Indizes.

Nach Prüfung auf Normalverteilung zeigte sich der MCHC als einzige nicht parametrische Gruppe. Hier erfolgt die Angabe des Median mit zugehörigem Range. Die parametrischen Datensätze (Erythrozytenzahl, Hämatokrit, RDW, MCV, MCH) werden mit ihrem Mittelwert und der Standardabweichung angegeben.

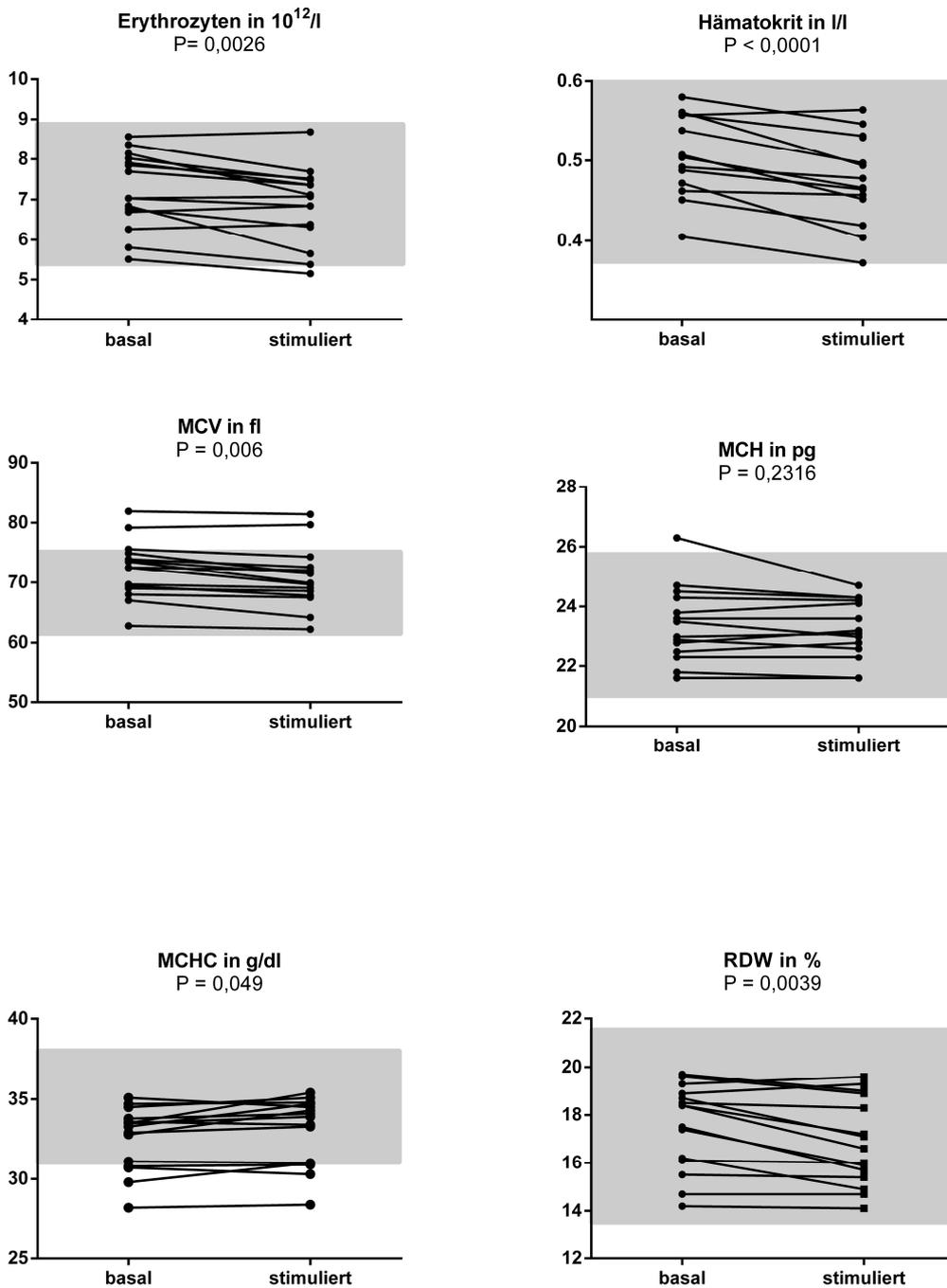


Abbildung 9: Darstellung der Erythrozyten und Erythrozytenindizes mittels ProCyte Dx<sup>®</sup> vor und 60 Minuten nach Stimulation mit Tetracosactrin.

Auf der x-Achse sind die vergleichenden Werte vor und nach Stimulation dargestellt. Auf der y-Achse sind die jeweiligen Messergebnisse aufgetragen. Grau hinterlegt findet sich der Referenzbereich.

#### 4.1.5. Ergebnisse Leukozyten und Thrombozyten

Bezogen auf die Leukozytenzahl und die Differenzierung der Leukozytenpopulationen konnte ein signifikanter Anstieg der Gesamtleukozytenzahl gefunden werden. Dieser war getragen von einem signifikanten Anstieg der Neutrophilen Granulozyten, während die Lymphozytenzahl und Messwerte der Eosinophilen Granulozyten signifikant abnahmen. Bezüglich der Monozytenzählung war keine signifikante Änderung nachweisbar.

Parameter	P-Wert		Median und Range	Mean und Standardabweichung	Signifikanz
Leukozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,029	basal	9,23 (5,9-13,8)	<b>9,61 ± 2,5</b>	ja
		stimuliert	9,5 (6,4-17,1)	<b>10,63 ± 3,16</b>	
Neutrophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,0165	basal	6,3 (3,4-12,0)	<b>6,7 ± 2,21</b>	ja
		stimuliert	7,34 (4,7-15,01)	<b>7,94 ± 3,0</b>	
Lymphozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,0034	basal	1,85 (0,8-3,6)	<b>1,96 ± 0,85</b>	ja
		stimuliert	1,7 (0,75-2,97)	<b>1,75 ± 0,7</b>	
Monozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,1307	basal	0,51 (0,36-1,28)	<b>0,58 ± 0,26</b>	nein
		stimuliert	0,59 (0,32-1,75)	<b>0,67 ± 0,34</b>	
Eosinophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,0077	basal	0,33 (0,04-0,61)	<b>0,35 ± 0,17</b>	ja
		stimuliert	0,24 (0,03-0,61)	<b>0,24 ± 0,15</b>	
Thrombozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,2638	basal	<b>222 (65,2-557)</b>	239 ± 149,7	nein
		stimuliert	<b>205 (32-612)</b>	225,6 ± 161,3	

Tabelle 5: Statistische Auswertung der Leukozyten sowie der Thrombozyten.

Nach Prüfung auf Normalverteilung zeigten sich die Thrombozyten als einzige nicht parametrische Gruppe. Hier erfolgt die Angabe des Median mit zugehörigem Range. Die parametrischen Datensätze (Leukozytenzahl, Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile Granulozyten) werden mit ihrem Mittelwert und der Standardabweichung angegeben.

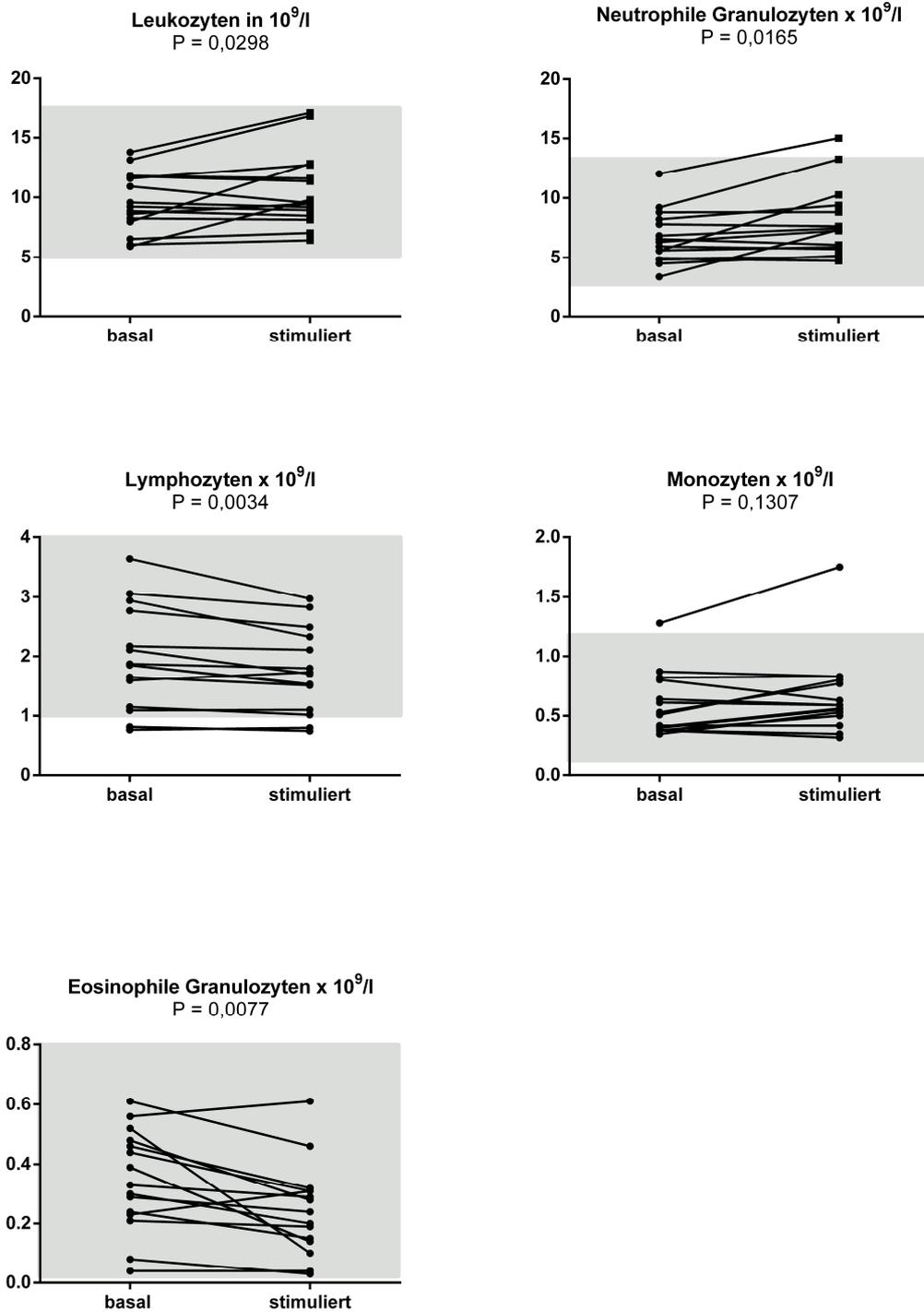


Abbildung 10: Darstellung der Leukozytenzahl und Leukozytenpopulationen mittels ProCyte Dx<sup>®</sup> vor und 60 Minuten nach Stimulation mit Tetracosactrin.

Auf der x-Achse sind die vergleichenden Werte vor und nach Stimulation dargestellt. Auf der y-Achse sind die jeweiligen Messergebnisse in Zellzahl x  $10^9/l$  aufgetragen. Grau hinterlegt findet sich der Referenzbereich.

## 4.2. Erhöhung des CHr: Vorkommenshäufigkeit und Ätiologie

### 4.2.1. Allgemeine Auswertung

Im Zeitraum vom 01.01.2008 bis 31.12.2013 wurden im Zentrallabor der Klinik für Kleintiere - Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen 33579 hämatologische Messungen von hausinternen Patienten mit dem Hämatologiesystem ADVIA® 2120 durchgeführt. Von diesen Messungen entfielen 26342 Messungen auf die Tierart Hund. 7236 Messungen wurden bei weiteren Spezies und Tierarten durchgeführt und im weiteren Verlauf exkludiert.

Von den 26342 hämatologischen Messungen von Hundebloodproben wurde neben einer kompletten hämatologischen Untersuchung bei 4005 Untersuchungen auch eine Bestimmung der Retikulozytenzahl und retikulozytären Indizes durchgeführt.

Insgesamt konnte bei 67 Messungen ein CHr deutlich oberhalb des Referenzbereiches von  $\geq 1,85$  fmol nachvollzogen werden. Dies entspricht einer Vorkommenshäufigkeit von 1,7% bei allen Messungen der untersuchten Klinikspopulation. Bei 10,7% der durchgeführten Messungen wurde ein CHr unterhalb von 1,29 fmol nachgewiesen. Der Großteil der Daten (87,6%) zeigte Werte innerhalb oder leicht oberhalb/unterhalb des Referenzbereiches.

CHr in fmol/l	Anzahl der Messungen	Anteil in %
<b>&lt; 1,29</b>	430	10,7
<b>1,29-1,46</b>	873	21,8
<b>1,47-1,84</b>	2636	65,8
<b><math>\geq 1,85</math></b>	67	1,7

Tabelle 6: Vorkommenshäufigkeit der gemessenen CHr-Werte nach jeweiligem Cut-Off.

Die 67 durchgeführten Messungen, die einen erhöhten CHr zeigten, wurden bei insgesamt 53 Hunden durchgeführt. Bei neun Tieren wurden Wiederholungsmessungen der selben Blutprobe oder Folgemessungen jeweils mit einem erhöhten CHr durchgeführt. Diese Mehrfachmessungen wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen und nur die Erstmessung eines erhöhten CHr bei einem spezifischen Hund betrachtet. Folglich sind 53 Tiere mit

unterschiedlichen Befunden und Erkrankungen in die weitere Analyse eingegangen.

Das mediane Alter der untersuchten Tiere lag bei sieben Jahren mit einem Range von einem bis 13 Jahren. 17 Tiere (zehn unkastrierte Rüden, sieben kastrierte Rüden) waren männlich sowie 36 weiblich (kastrierte und unkastrierte Hündinnen zu gleichen Anteilen).

Mit 15 Tieren stellten Mischlingshunde die häufigsten Vertreter dar, frei Tiere waren Berner Sennenhunde. Border Collie, Cocker Spaniel, Deutsch Drahthaar, Collie, Jack Russel Terrier, Labrador Retriever und Zwergschnauzer waren mit jeweils zwei Tieren vertreten. Jeweils ein Tier fand sich aus folgenden Rassen: African Boerboel, Airedale Terrier, Appenzeller Sennenhund, Australian Shepherd, Bayrischer Gebirgsschweißhund, Bearded Collie, Berger de Picardie, Bordeaux Dogge, Boxer, Briard, English Springer Spaniel, Französische Bulldogge, Großpudel, Irish Setter, Mops, Neufundländer, Rauhaardackel, Yorkshire Terrier, Zergpudel.

Hinsichtlich des Alters, des Geschlechts oder der Rasseverteilung ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

#### **4.2.2. CHr und Retikulozytenzahl**

Die Ergebnisse der CHr-Messungen stellten sich als nicht normalverteilt dar. Im Median lag der CHr bei 1,89fmol/l mit einem Range von 1,85-2,39fmol/l. Eine hochgradige Erhöhung des CHr über 2,0fmol/l konnte bei 11% der Tiere (6/53) nachgewiesen werden. Der Großteil der Resultate lag mit 89% zwischen 1,85 und 2,0fmol/l.

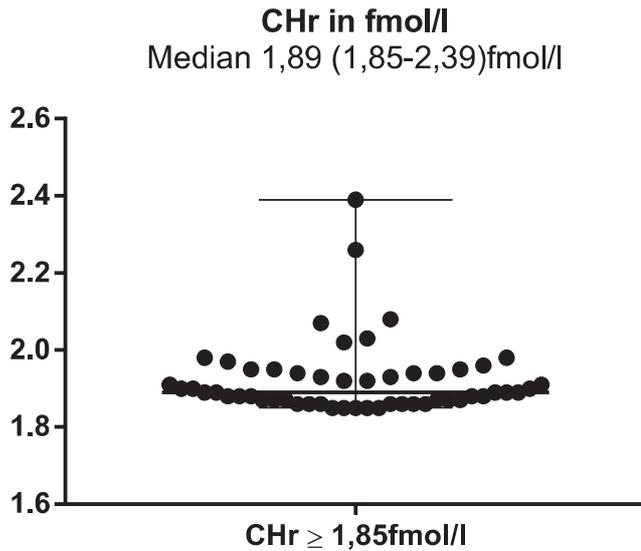


Abbildung 11: Darstellung der Hunde mit einem CHr oberhalb von 1,85fmol/l.

Bezogen auf die Ergebnisse der automatisierten Retikulozytenzählung konnte bei mehr als der Hälfte der Tiere (57%) eine Retikulozytose gesehen werden. Die Retikulozytenzahl stellte sich ebenso wie der CHr als nicht normalverteilt dar. Im Median waren die untersuchten Patienten mit einer Retikulozytenzählung von  $84,3 \times 10^9/l$  (Range von  $7,1-566,1 \times 10^9/l$ ) regenerativ, eine hochgradige Retikulozytose mit einer Zellzahl über  $150 \times 10^9/l$  lag bei 19 Tieren vor. 43% der untersuchten Hunde wiesen keine Erhöhung der Retikulozytenzahl auf.

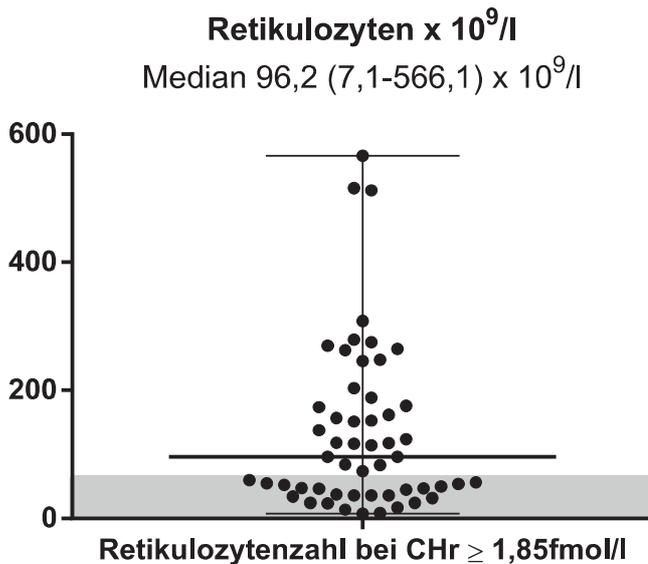


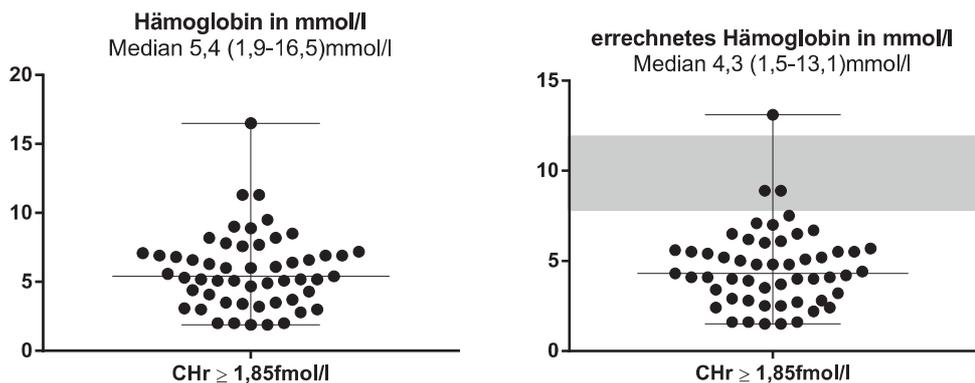
Abbildung 12: Darstellung der Retikulozytenzahl aller Hunde mit einem CHr  $\geq 1,85$ fmol/l.

In grau hinterlegt findet sich der Referenzbereich der Retikulozytenzahl ( $0-60 \times 10^9/l$ ).

### 4.2.3. Erythrozytenzahl und Erythrozyten-Indizes

Eine Normalverteilung konnte bei der Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobingehalt MCV und MCH nachgewiesen werden. Nicht parametrische Datensätze sind die des MCHC sowie des CHCM.

Mit einem medianen Hämatokrit von 22% (Range 8-59%) waren die Hunde mit einem erhöht gemessenen CHr deutlich anämisch. Nur bei 4% der Tiere (3/53) konnte ein physiologischer Hämatokrit nachgewiesen werden. Eine ähnliche Verteilung konnte bei der Erythrozytenzahl gesehen werden. Nur drei von 53 Tieren lagen innerhalb des Referenzbereiches. Auch der errechnete Hämoglobingehalt (Hb) der Erythrozyten lag lediglich bei drei Tieren innerhalb des Referenzbereiches. Der Großteil der Tiere zeigte eine Erniedrigung des errechneten Hg.



>Hr über

*In grau hinterlegt findet sich der Referenzbereich des errechneten HB (8,06-12,21mmol/l).*

Hinsichtlich der Wintrobe-Indizes konnte mit mittleren CHCM und MCHC von  $20,4 \pm 1,174$ mmol/l respektive  $19,99 \pm 1,49$ mmol/l eine Hypochromasie der Erythrozyten bei erhöhtem CHr gemessen werden. 22 Tiere lagen innerhalb des Referenzbereiches. Der MCH (Median 1,49fmol/l, Range 1,33-1,83fmol/l) lag im Median innerhalb des Referenzbereiches. Mit einem MCV von 73fl im Median (Range 66-96,6fl) lagen alle Tiere oberhalb des unteren Referenzbereiches von 62,6fl, bei keinem der Tiere lag eine gemessene Mikrozytose vor. 28 Tiere zeigten mit einem Wert oberhalb von 73,5fl eine Makrozytose.

Parameter	Referenzbereich	Median und Range	Mean und SD
CHr (fmol/l)	1,43-1,71fmol/l	<b>1,89 (1,85-2,39)</b>	1,924 ± 0,098
Retikulozytenzahl (x10 <sup>9</sup> /l)	0-60x10 <sup>9</sup> /l	<b>84,3 (7,1-566,1)</b>	134,9 ± 128,5
Erythrozytenzahl (x10 <sup>9</sup> /l)	5,5-8,5x10 <sup>9</sup> /l	<b>3,29 (0,96-8,15)</b>	3,18 ± 1,32
Hämatokrit (%)	39-56%	<b>22,0 (8-59)</b>	23,7 ± 9,5
MCV (fl)	62,61-73,50fl	<b>73,0 (66,4-96,6)</b>	75 ± 6,39
MCH (fmol/l)	1,35-1,62fmol/l	<b>1,49 (1,33-1,83)</b>	1,49 ± 0,09
MCHC (mmol/l)	20,82-23,53mmol/l	20,13 (16,01-22,7)	<b>19,99 ± 1,49</b>
CHCM (mmol/l)	20,82-23,53mmol/l	20,67 (17,55-22,83)	<b>20,53 ± 1,2</b>

Tabelle 7: Statistische Auswertung der erythrozytären und retikulozytären Indizes aller Tiere mit einem gemessenen CHr  $\geq 1,85$ fmol/l.

Nach Prüfung auf Normalverteilung zeigten sich MCHC, MCHCb und CHCM als parametrische Gruppe. Hier erfolgt die Angabe des Mittelwertes (Mean) mit Standardabweichung (standard deviation/SD). Die parametrischen Datensätze werden mit ihrem Median und dem zugehörigen Range angegeben.

#### 4.2.4. Einteilung nach zugrundeliegenden Erkrankungen

Jeder Patient wurde hinsichtlich des Vorstellungsgrundes, spezifischer Symptome sowie der ausgewerteten Befunde in eine der folgenden Kategorien eingeteilt:

Kategorie	Patientenzahl	Anteil in %
Erkrankungen mit overtren Blutungen	10	19
Hämolytische Erkrankungen	6	11
Systemische Inflammationsreaktion	8	15
Neoplasie	9	17
Nierenerkrankungen	11	21
Andere	9	17

Tabelle 8: Gruppeneinteilung.

Gruppeneinteilung der Patienten mit CHr  $\geq 1,85$ fmol/l nach spezifischer Erkrankung.

Während hämolytische Erkrankungen die kleinste Gruppe mit 11% der Tiere darstellten, waren die anderen Erkrankungen in etwa zu gleichen Teilen vertreten. In aufsteigender Reihenfolge zeigten Hunde mit systemischen Entzündungsreaktionen (15%), neoplastischen Erkrankungen (17%), Blutungsneigung (19%) sowie Nierenerkrankungen (21%) einen deutlich zu hohen CHr. 9 Tiere (17%) konnten in keine der genannten Kategorien eingeordnet werden.



#### 4.2.4.1. Erkrankungen mit overten Blutungen

Patient	Nummer	Diagnose
1	52385	Intraabdominale Blutung in Folge einer Coumarin-Intoxikation
2	16826	Urogenitale Blutung und Blutung aus dem Ohr in Folge einer primär immunvermittelten Thrombozytopenie
3	18111	Gastrointestinale Blutung in Folge einer Gastroenteropathie ungeklärter Genese
4	23082	Gastrointestinale, urogenitale Blutung und Hämatombildung in Folge einer primär immunvermittelten Thrombozytopenie
5	26346	Gastrointestinale Blutung ungeklärter Ätiologie
6	17207	Gastrointestinale Blutung in Folge einer primär immunvermittelten Thrombozytopenie
7	25119	Gastrointestinale Blutung in Folge einer ulzerativen Gastritis ungeklärter Ätiologie
8	109139	Gastrointestinale Blutung und Hämatombildung in Folge einer primär immunvermittelten Thrombozytopenie
9	92621	Gastrointestinale Blutung in Folge einer primär immunvermittelten Thrombozytopenie
10	119996	Gastrointestinale Blutung in Folge einer Gastritis ungeklärter Ätiologie

Tabelle 9: Patienten mit einer overten Blutung.

Bei 80% der Tiere war der Gastrointestinaltrakt der häufigste Ort der Blutung. In der Hälfte der Fälle stellte eine primär immunvermittelte Thrombozytopenie (primäre IMTP) die auslösende Ursache dar. Zweithäufigste Ursache war eine zugrundeliegende Gastroenteropathie. In einem Fall kam es in Folge einer Vitamin-K-defizienten Koagulopathie zu einer fulminanten gastrointestinalen Blutung.

Sechs Tiere zeigten den erhöhten CHr bereits in der Erstmessung (Patient 2,6,7,8,9,10), die weiteren Hunde (Patient 1,3,4,5) entwickelten im Verlauf des stationären Aufenthaltes eine Erhöhung des CHr, der initial gemessene CHr bei diesen Tieren lag im physiologischen Rahmen. Auf Grund des hochgradigen Blutverlustes erhielten diese Patienten vor der Messung des erhöhten CHr eine oder mehrere Bluttransfusionen.

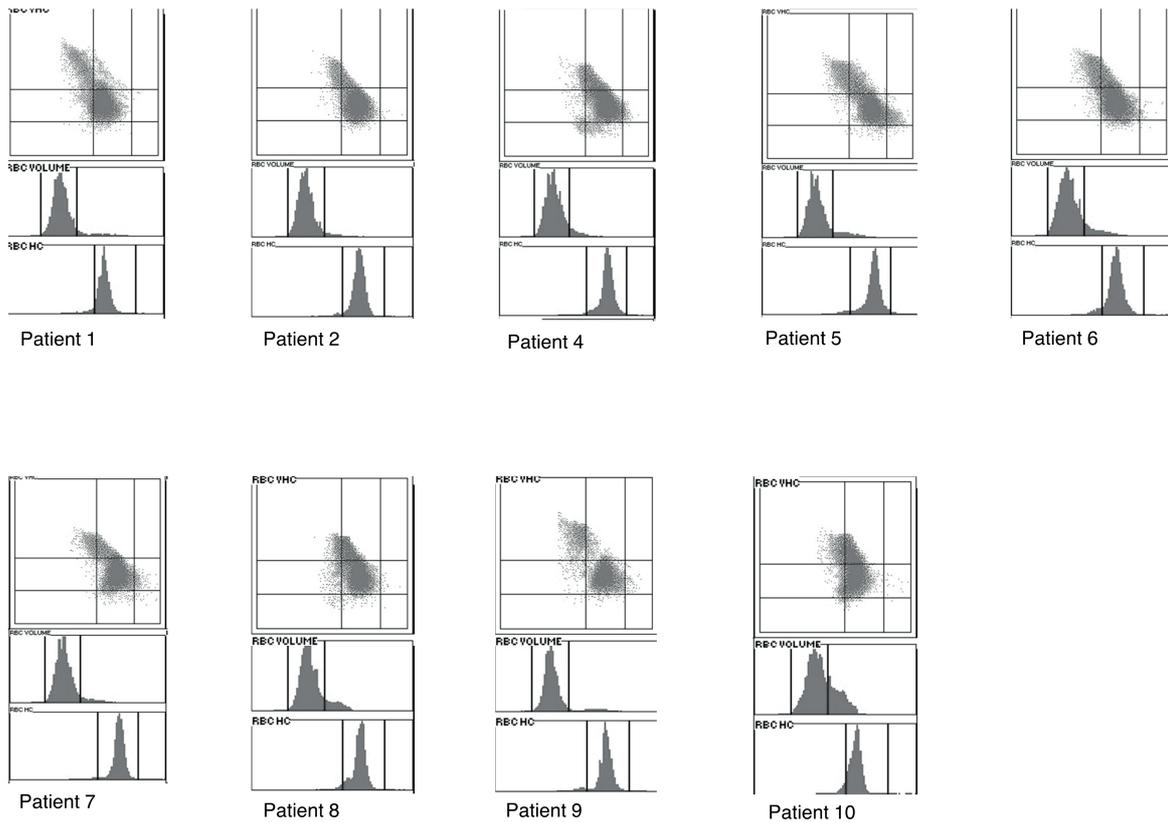


Abbildung 15: Patienten mit overten Blutungen.

Scattergramme des ADVIA® 2120 der Patienten mit overten Blutungen. Für Patient 3 war keine graphische Auswertung verfügbar.

Alle Tiere aus der Gruppe der Erkrankungen mit Blutungsneigung zeigten eine deutliche Retikulozytose unterschiedlicher Stärke. Hinsichtlich der erythrozytären Morphologie stimmen die Scattergramme des ADVIA 2120 mit einer Regeneration (makrozytär-hypochrome Morphologie) überein. Alle Tiere zeigen ebenfalls eine Erythrozytenpopulation innerhalb des makrozytär-normochromen Bereiches. Besonders bei Patient 10 ist eine deutliche normochrome Makrozytose zu erkennen. Patient 4, 5 und 7 weisen eine normozytär-hyperchrome Population als Hinweise auf Artefakte auf, welche in den durchgeführten Handdifferenzierungen nicht detektiert werden konnte.

#### 4.2.4.2. Hämolytische Erkrankungen

Patient	Nummer	Diagnose
1	27300	Immunmedierte, hämolytische Anämie (primär versus sekundär), bakterielle Zystitis, Umfangsvermehrung der Milz
2	9666	Immunmedierte, hämolytische Anämie (primär)
3	73965	Immunmedierte, hämolytische Anämie (primär)
4	79502	Immunmedierte, hämolytische Anämie (primär)
5	113566	Immunmedierte, hämolytische Anämie (primär)
6	120732	Immunmedierte, hämolytische Anämie (primär)

Tabelle 10: Patienten mit hämolytischen Erkrankungen.

Bei allen Tieren konnte eine immunvermittelte Anämie als Ursache für die Hämolyse festgestellt werden. Bis auf Patient 1 (aregenerative Anämie) waren alle Tiere dieser Gruppe hochgradig regenerativ und es konnte keine auslösende Ursache gefunden werden. Eine primär immunvermittelte, hämolytische Anämie wurde diagnostiziert. Patient 1 weist dabei eine dominierend normozytär-normochrome Morphologie auf, einige Zellen erscheinen aber makrozytär-normochrom bis hypochrom. Alle regenerativen Tiere weisen eine dominierend makrozytär-hypochrome Morphologie auf. Bei Patient 3, 4, 5 und 6 finden sich Hinweise auf Erythrozyten-Agglutinate, die weit in den makrozytär-normochromen Bereich ragen. Bei Patient 1,2,5 und 6 wurden vor der Messung des erhöhten CHR einzelne oder mehrfache Messungen eines physiologischen CHR durchgeführt. Auch diese Patienten erhielten vor der Messung des erhöhten CHR eine oder mehrere Bluttransfusionen.

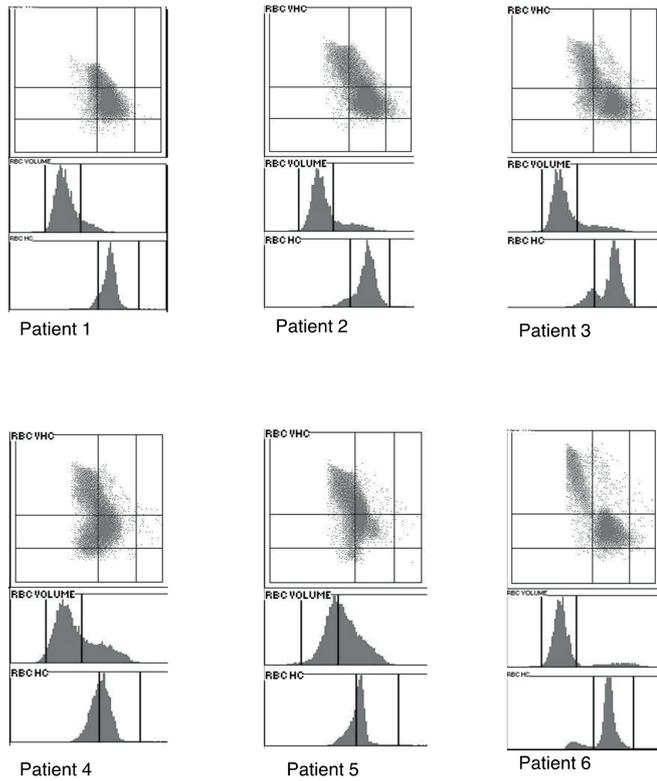


Abbildung 16: Patienten mit hämolytischen Erkrankungen.

Scattergramme des ADVIA® 2120 der Patienten mit overten Blutungen. Für Patient 3 war keine graphische Auswertung verfügbar.

#### 4.2.4.3. Systemische Inflammationsreaktion

Patient	Nummer	Diagnose
1	16364	Fettgewebsnekrose und Peritonitis nach Enterektomie
2	20324	Septische Perikarditis, septischer Perikarderguss
3	17470	Systemische Inflammationsreaktion nach Abszessspaltung
4	16810	Systemische Inflammationsreaktion vermutlich bakterieller Genese
5	89198	Septische Peritonitis
6	111345	Purulent-nekrotisierende Hepatitis und Perihepatitis, purulente Peritonitis, Sekundäre Uveitis
7	87325	Leukämoide Reaktion, Abszedierte intraabdominale Strukturen, Hepatopathie, Neoplasie der Milz
8	92200	Sterile neutrophile Dermatose, systemische immunvermittelte Erkrankung ohne weitere Diagnostik

Tabelle 11: Patienten mit einer systemischen Inflammationsreaktion.

Bei allen Tieren konnten hochgradige entzündliche Veränderungen gefunden werden. Bei Patient 2,3,4,5, 6 und 8 wurden im Vorfeld einzelne oder mehrere physiologische CHr-Werte bestimmt. Drei dieser Tiere erhielten vor der Messung des erhöhten CHr Blutprodukte (Bluttransfusion, Plasmatransfusion, humanes Albumin). Patient 1 und 7 fielen bereits bei der ersten Messung mit einem erhöhten CHr auf.

Nach Durchsicht der Erythrozytenmorphologie konnte bei Patient 2,3,5 und 7 eine makrozytär-hypochrome Morphologie im Einklang mit einer regenerativen Anämie (Retikulozytose) nachgewiesen werden. Patient 5 und 6 waren dominierend makrozytär-normochrom mit wenigen hypochromen Zellen. Normozytär-hyperchrome Zellen fanden sich bei Patient 1,2 und 3.

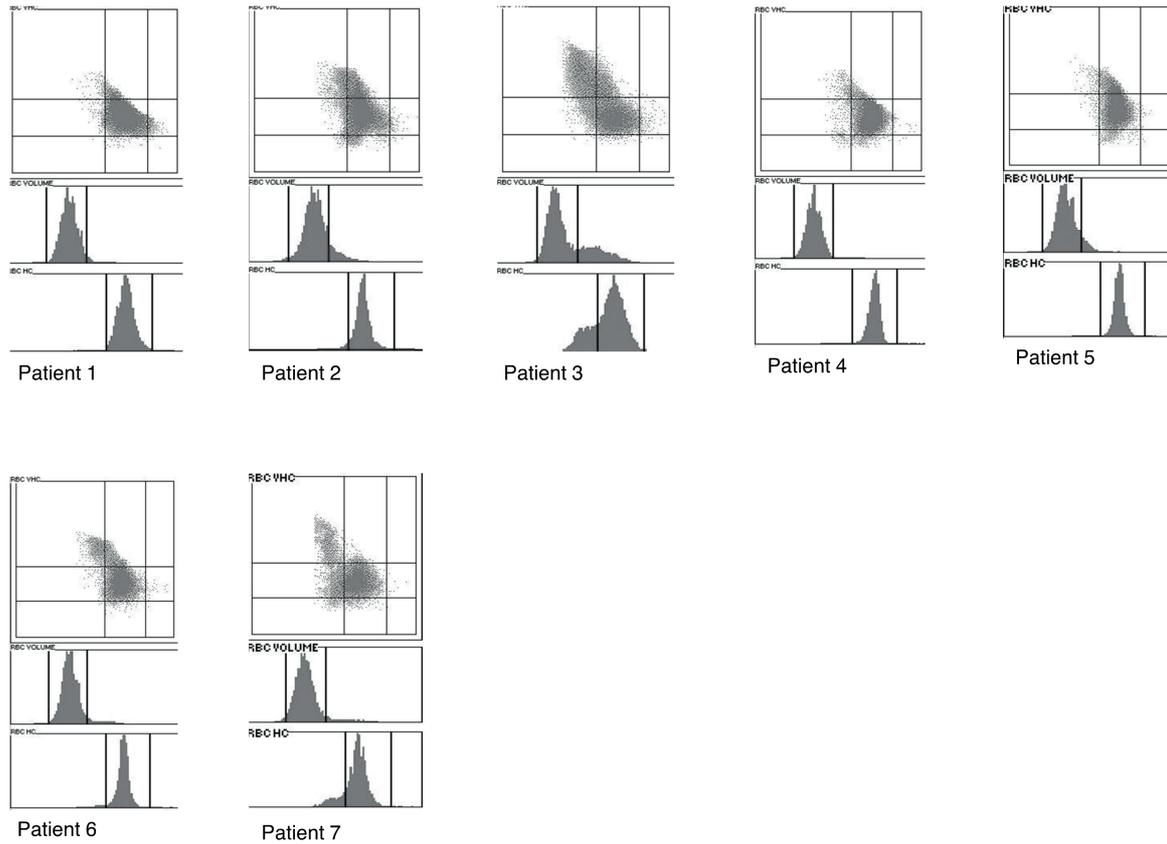


Abbildung 17: Patienten mit einer systemischen Inflammationsreaktion.

Scattergramme des ADVIA® 2120 der Patienten mit einer systemischen Inflammationsreaktion. Für Patient 8 war keine graphische Auswertung verfügbar.

#### 4.2.4.4. Neoplastische Erkrankungen

Patient	Nummer	Diagnose
1	27736	Akute lymphoblastische Leukämie im subleukämischen Stadium (Differentialdiagnose: Lymphosarkom Stadium V)
2	17959	Akute lymphoblastische Leukämie (Differentialdiagnose: Lymphosarkom Stadium V)
3	29520	Akute lymphoblastische Leukämie (Differentialdiagnose: Lymphosarkom Stadium V)
4	26246	Akute lymphoblastische Leukämie (Differentialdiagnose: Lymphosarkom Stadium V)
5	15750	Akute lymphoblastische Leukämie (Differentialdiagnose: Lymphosarkom Stadium V)
6	54594	Multizentrisches Lymphom (zytomorphologisch zentroblastisches B-Zell-Lymphosarkom)
7	103079	Akute lymphoblastische Leukämie (Differentialdiagnose: Lymphosarkom Stadium V)
8	63271	Akute lymphoblastische Leukämie (Differentialdiagnose: Lymphom Stadium V)
9	99315	Akute lymphoblastische Leukämie (Differentialdiagnose: Lymphosarkom Stadium V)

Tabelle 12: Patienten mit Neoplasien.

In 89% der vorliegenden neoplastischen Ursachen für eine Erhöhung des CHr lag eine maligne lymphoproliferative Erkrankung als akute lymphoblastische Leukämie (ALL) vor. Diese kann zytologisch und histologisch nicht von einer neoplastischen Infiltration des Knochenmarks im Rahmen einer Lymphosarkomerkrankung im Stadium V getrennt werden. In keinem der Fälle erfolgte, auf Grund fehlender klinischer Relevanz, eine weitere Charakterisierung mittels Immunphänotypisierung der Zelllinien. Ein Hund (11% der Neoplasien) erkrankte an einem multizentrischen Lymphom. Bei den Patienten 1 bis 8 konnte bereits in der ersten hämatologischen Messung eine Erhöhung des CHr festgestellt werden. Ein Großteil der Tiere wurde unmittelbar euthanasiert oder zur palliativen Therapie zur häuslichen Pflege entlassen. Bei Patient 9 wurde eine Chemotherapie durchgeführt und der erhöhte CHr fiel sieben Tage nach der ersten chemotherapeutischen Behandlung mit Vincristin auf.

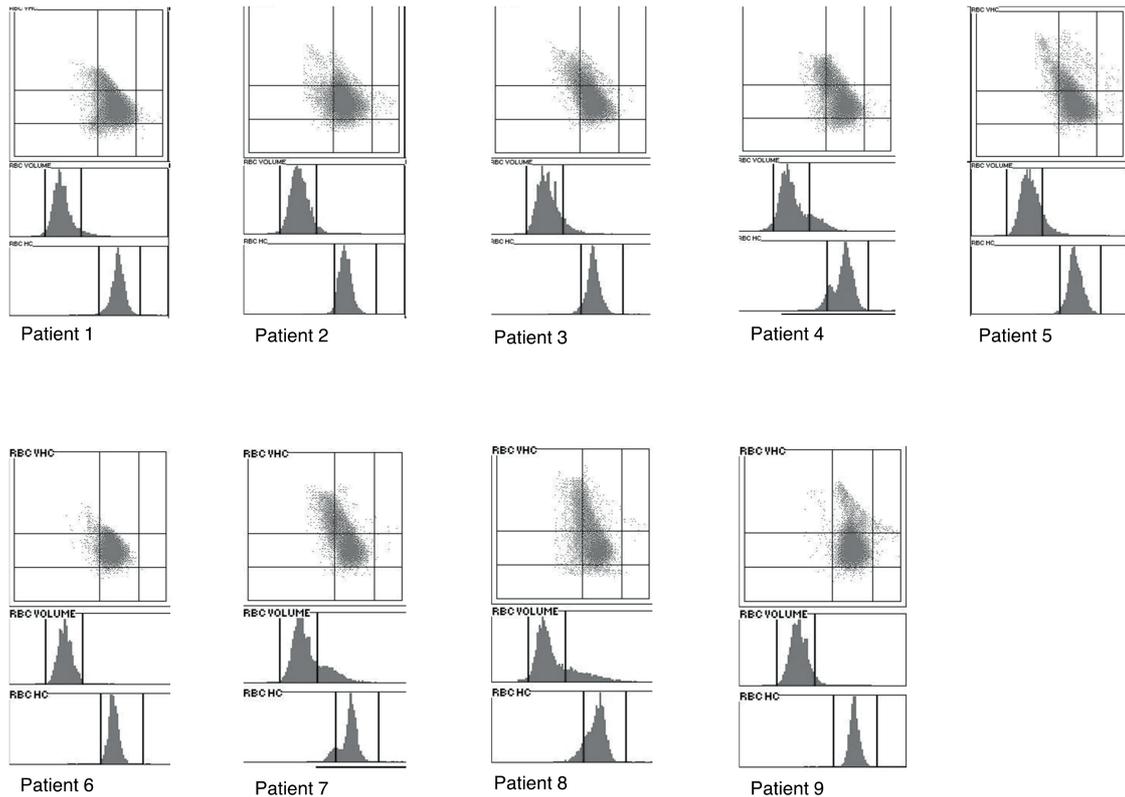


Abbildung 18: Patienten mit Neoplasien.

Scattergramme des ADVIA<sup>®</sup> 2120 der Patienten mit einer neoplastischen Grunderkrankung.

Alle Patienten mit der Diagnose einer ALL wiesen eine makrozytär-normochrome bis teilweise hypochrome Morphologie der Erythrozyten vor. In keinem der Fälle finden sich Populationen innerhalb des hyperchromen Bereiches. Patient 6 mit der Diagnose des multizentrischen Lymphosarkoms ist der einzige Patient mit einer normozytär-normochromen Morphologie der Erythrozyten mit ausschließlich vereinzelt makrozytär-hypochromen Erythrozyten. Bei den Patienten 2, 5 und 8 sind makrozytär-normochrome bis leicht hyperchrome Areale als Hinweise auf Agglutinatmessungen zu erkennen. Patient 9 zeigt eine Population makrozytär-normo bis hyperchromer Zellen. Dieser Patient weist im Rahmen der Grunderkrankung eine hochgradige Leukozytose ( $186,6 \times 10^{12}/l$ , Referenz:  $5,48-13,74 \times 10^{12}/l$ ) auf. Diese ist getragen von einer hochgradigen Lymphozytose, Monozytose sowie undifferenzierten Zellen.

#### 4.2.4.5. Nierenerkrankungen

Patient	Nummer	Diagnose
1	16603	Akute Nierenerkrankung ungeklärter Ätiologie
2	17525	Chronische Nierenerkrankung (kein weiteres Staging nach IRIS Guidelines)
3	16799	Chronische Nierenerkrankung Stage 4, hochgradige Proteinurie, hochgradige Hypertension
4	16506	Chronische Nierenerkrankung Stage 3, hochgradige Proteinurie und Ausbildung eines nephrotischen Syndroms
5	24584	Chronische Nierenerkrankung Stage 4, kongenitale renale Dysplasie, Mangel an Erythropoetin
6	27598	Chronische Nierenerkrankung Stage 4, kongenitale renale Dysplasie
7	21262	Chronische Nierenerkrankung Stage 3
8	20258	Chronische Nierenerkrankung Stage 3, hochgradiger Proteinverlust, familiäre Glomerulopathie der Berner Sennenhunde
9	95195	Chronische Nierenerkrankung (kein weiteres Staging nach IRIS Guidelines möglich)
10	98398	Nierenerkrankung (akut versus chronisch)
11	25735	Nierenerkrankung (akut versus chronisch)

Tabelle 13: Patienten mit Nierenerkrankungen.

In der Gruppe der Nierenerkrankungen überwiegen chronische Veränderungen. Eine Einteilung der Nierenerkrankung erfolgte nach den Guidelines der National Renal Interest Society (IRIS). Zwei von elf Tieren waren in dieser Gruppe mit einer Retikulozytose als regenerativ zu bezeichnen. Der Großteil der Hunde zeigte sich aregenerativ.

Bei Patient 1 findet sich eine dominierend normozytär-normochrome Population mit einigen normozytär-hyperchromen Erythrozyten. In einer durchgeführten Neumethylen-Blau-Färbung konnten als auslösende Ursache Heinz-Körperchen detektiert werden. Alle Tiere zeigen einige makrozytär-normochrome Erythrozyten. Bei den Tieren mit Retikulozytose finden sich auch makrozytär-hypochrome Populationen. Bei Patient 10 finden sich trotz fehlender Retikulozytenzahlerhöhung einige makrozytär-hypochrome Erythrozyten. Neben Patient 1 mit hyperchromen Zellen kann auch bei den Patienten 3, 6 und 9 eine Hyperchromasie anhand der Scattergramme nachgewiesen werden. Eine Neumethylen-Blau-Färbung zur Detektion von Heinz-Körperchen wurde bei diesen Hunden nicht durchgeführt. Hinweise auf eine andere auslösende Ursache fanden sich in den Handdifferenzierungen nicht.

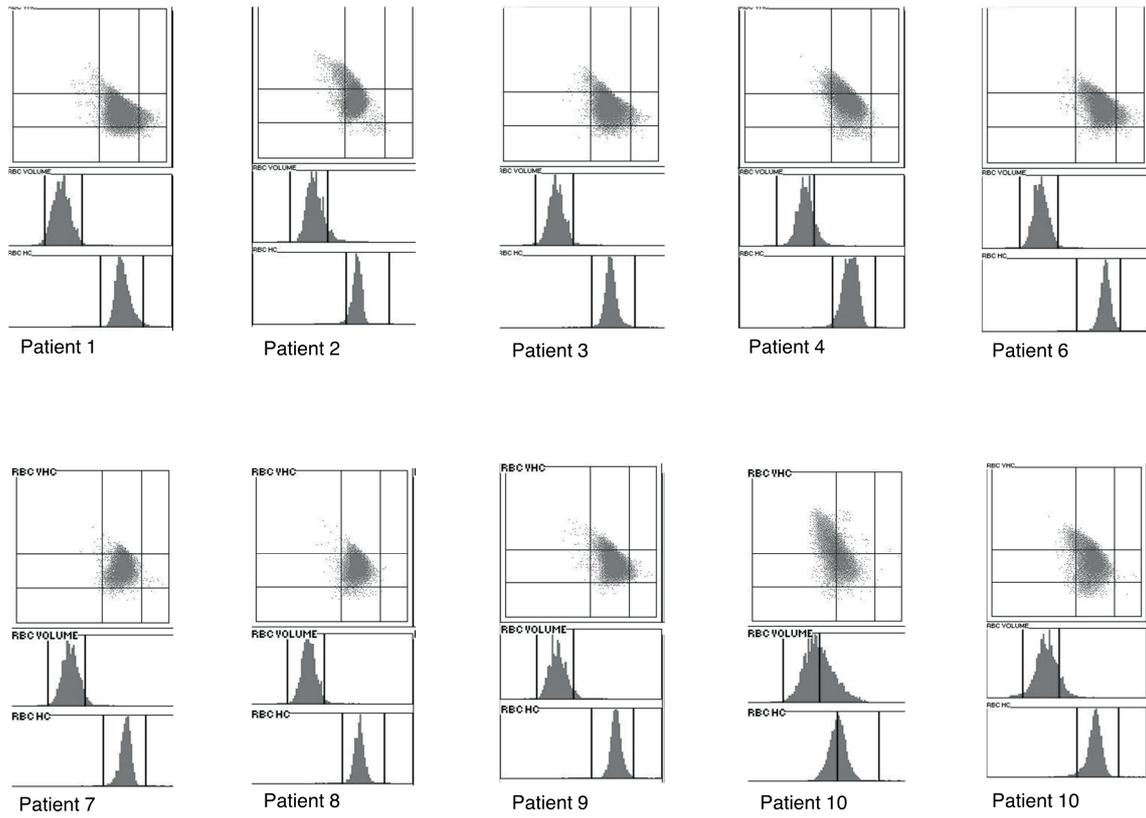


Abbildung 19: Patienten mit Nierenerkrankungen.

Scattergramme des ADVIA<sup>®</sup> 2120 der Patienten mit einer Nierenerkrankung. Bei Patient 5 lag keine graphische Darstellung der Erythrozytenmorphologie vor.

#### 4.2.4.6. Tiere ohne weitere Einteilung

Patient	Nummer	Diagnose
1	38870	Hochgradige aregenerative Anämie ohne weitere Diagnostik
2	27651	Bizytopenie (hochgradige aregenerative Anämie, mittelgradige Thrombozytopenie) ohne weitere Diagnostik
3	16036	Intrahepatischer portosystemischer Shunt nach Coilembolisation
4	15806	Thrombose der Arteria brachialis, Coumarin-Intoxikation mit intrathorakaler Blutung mehrere Tage zuvor
5	74136	Chronische gastrointestinale Symptome mit Verdacht auf Futtermittelhypersensitivität/-allergie. Kongenitale Makrozytose der Pudel
6	76436	Immunvermittelte Thrombozytopenie unter Therapie mit Prednisolon, lokale Abszessbildung am Rücken
7	20718	Hochgradige aregenerative Anämie ohne weitere Diagnostik
8	15042	AV-Block III. Grades
9	271	Tetralogie nach Fallot (Ventikelseptumdefekt, Pulmonalklappenstenose, Dextroposition Aorta und Rechtsherzyhypertrophie)

Tabelle 14: Patienten mit Erkrankungen ohne weitere Einteilung.

Die genannten Tiere wichen von den vorhergehenden Gruppen ab und ließen sich nicht einordnen. Allen Patienten gemein ist eine Makrozytose (normochrom bis hypochrom). Die Patienten 1,2 und 9 fielen mit einer hochgradigen Anämie auf. Während Patient 1 dabei eine normozytär-hypochrome Morphologie der Erythrozyten mit Hinweisen auf Agglutinate zeigt, zeigt Patient 2 eine deutlich makrozytär-hypochrome Anämie bei physiologischer Retikulozytenzahl. Patient 3, mit der Diagnose eines intrahepatischen portosystemischen Shunt, zeigt eine normozytär-normochrome Morphologie mit makrozytär-normochromen und hypochromen Arealen. Initiale CHR-Messungen lagen innerhalb des physiologischen Rahmens. Eine Bluttransfusion wurde diesem Patienten kurze Zeit vor der Messung des erhöhten Wertes verabreicht. Ebenfalls erhielt Patient 6 im Rahmen der initialen Coumarin-Intoxikation und intrathorakalen Blutung mehrere Blutprodukte (Erythrozytenkonzentrat und Plasmatransfusionen). Patient 5 zeigte, außer einer Makrozytose, keine hämatologischen und klinisch-chemischen Auffälligkeiten. Auf Grund der Rasseprädisposition ist von einer kongenitalen Makrozytose des Pudels auszugehen. Patient 1 zeigt mit einer mittelgradigen Retikulozytose eine makrozytär-hypochrome Morphologie der Erythrozyten. Patient 2 weist den höchsten Hämatokrit mit 59% (39-56%) der untersuchten Tiere auf. Neben einigen makrozytär-normochromen Erythrozyten

findet sich bei diesem Hund eine normozytär-hyperchrome Population als Hinweis auf eine artifizielle Hyperchromasie. Diese Hyperchromasie findet sich ebenfalls in den erythrozytären Indizes MCH und MCHC.

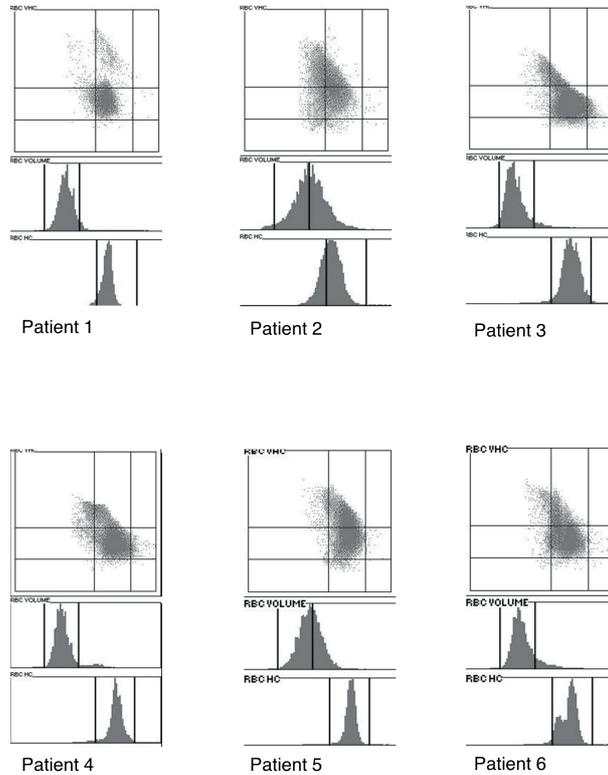


Abbildung 20: Patienten mit anderen Erkrankungen.

Scattergramme des ADVIA<sup>®</sup> 2120 der Patienten mit anderen Erkrankungen. Bei Patient 7 lag keine graphische Darstellung der Erythrozytenmorphologie vor.

#### 4.2.5. Gruppenvergleich

Der Vergleich der Gruppen hinsichtlich der Höhe des CHr ergab keine signifikanten Unterschiede, wenn auch der größere Anteil an sehr hoch gemessenen CHr in der Gruppe der Neoplasien gefunden werden konnte.

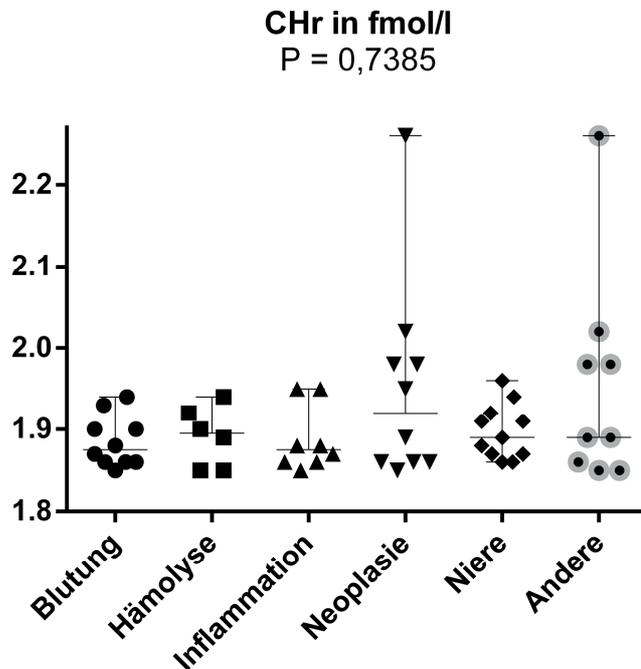


Abbildung 21: Gruppenvergleich.

Gruppenvergleich des CHr in fmo/l nach Einteilung in spezifische Erkrankungsgruppen

Hinsichtlich der Retikulozytenzahl konnte ein signifikanter Unterschied der hoch regenerativen Erkrankungen mit Blutverlust sowie einer Hämolyse im Vergleich zu den anderen Erkrankungen gesehen werden. Neoplasien, Nierenerkrankungen und Erkrankungen ohne eindeutige Einteilung zeigten signifikant niedrigere Retikulozytenzahlen. Eine intermediär liegende Gruppe stellten die Tiere mit einer systemischen Entzündung dar.



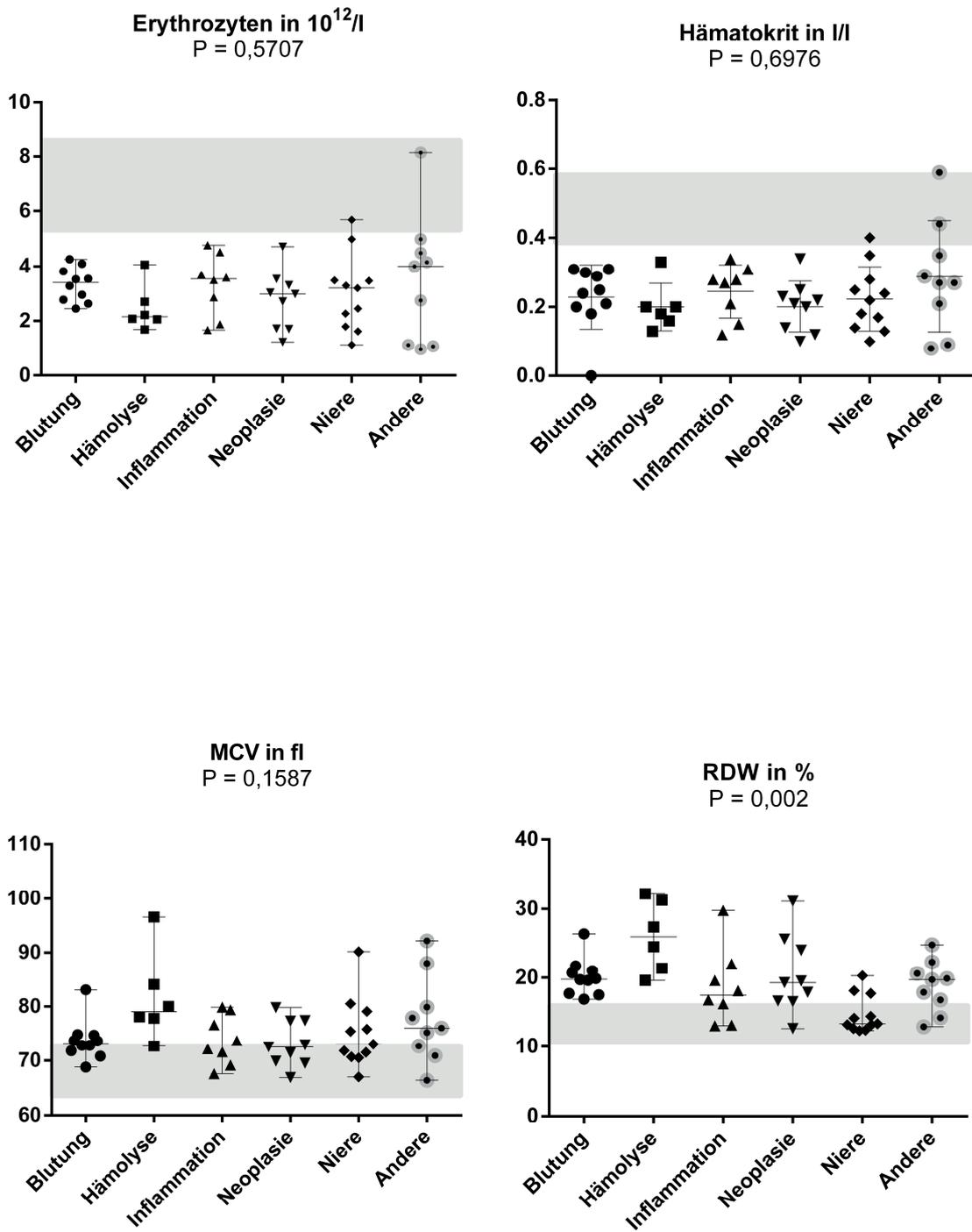


Abbildung 23: Erythrozytenzahl, Hämatokrit, MCV und RDW der Tiere mit erhöhtem CHr im Gruppenvergleich.

In grau hinterlegt findet sich der jeweilige Referenzbereich.

Hämoglobin, MCH, MCHC sowie der CHCM waren in der Gruppenstatistik nicht signifikant abweichend voneinander.

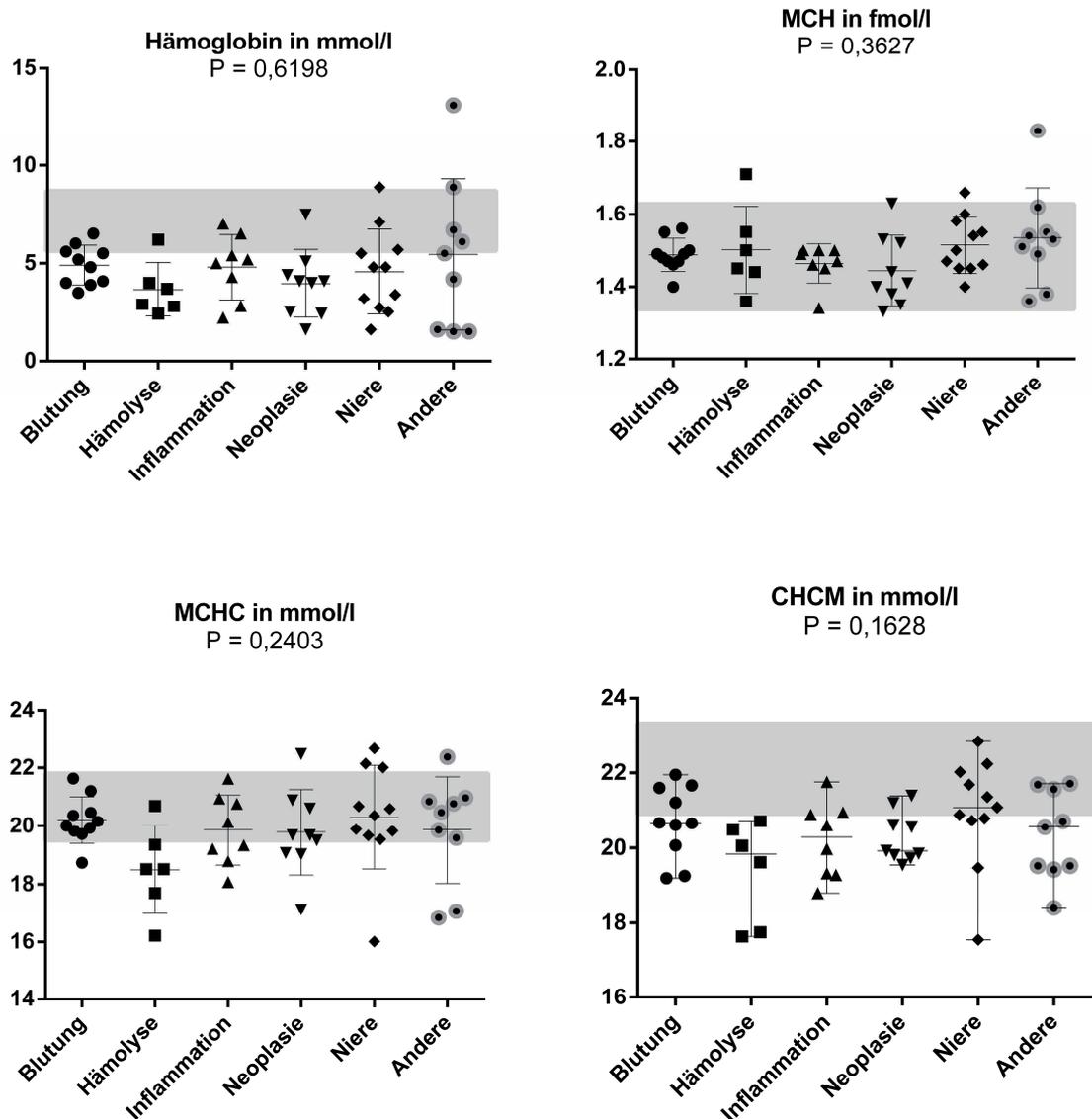


Abbildung 24: Hämoglobin, MCH, MCHC und CHCM der Tiere mit erhöhtem CHR im Gruppenvergleich.

In grau hinterlegt findet sich der jeweilige Referenzbereich.

## 5 Diskussion

### 5.1. Einfluss von Kortisol auf die Retikulozytenzahl von Hunden

Eine Retikulozytose gilt im Allgemeinen als eine kompensatorische Antwort der hämatopoetischen Leistung des Knochenmarkes auf einen Stimulus (Riley et al., 2001). In diesem Sinne ist die Retikulozytose als Zeichen einer ausgleichenden Regeneration bei hypoxischen Zuständen sowie einer bestehenden Anämie wohl bekannt. Während die Bestimmung der Retikulozytenzahl lange Zeit ausschließlich bei anämischen Tieren zur Beurteilung der Regenerationsfähigkeit des Knochenmarkes evaluiert wurde, ist eine Bestimmung der kernlosen erythroiden Vorläuferzellen durch die Fortentwicklung und Praxistauglichkeit automatisierter Hämatolgiegeräte zur Routine und wichtigem Bestandteil des Hämogramms geworden. Hierbei fällt eine Retikulozytose auch bei einigen Tieren ohne nachweisbare Anämie ins Auge und ist in den Fokus des allgemeinen Interesses gerückt. Die Frage nach der klinischen Relevanz für den einzelnen Patienten sowie die Frage nach auslösenden Ursachen ist ein wichtiger Punkt der aktuellen Forschung in der Veterinärhämatologie.

Die Prävalenz einer solchen Retikulozytose ohne begleitenden anämischen Zustand wird mit 5,1% (DeNicola et al., 2011), bis zu 7% (Pattullo et al., 2014) respektive 4,4% als Ergebnis einer Arbeit aus unserem Hause angegeben. Diverse auslösende Ursachen wie das Vorliegen einer Retikulozytose bedingt durch Aufregung oder körperliche Belastung (Epinephrin-Effekt und folgende Kontraktion der Milz), Erholung von anämischen Zuständen, kompensierte hämolytische Stadien, okkulte und latente Blutungen, chronisch hypoxische Zustände sowie andere Gründe für eine Erythrozytose werden diskutiert. Neben Erythropoetin haben auch Glukokortikoide eine stimulierende Wirkung auf die Erythropoese. Dieser Effekt ist auf Grund der Wirkung auf die BFUs und CFUs längerfristig zu sehen. Ob und in welchem Ausmaß die kurzfristige Erhöhung der endogenen Kortisolkonzentration auf die Retikulozytenzahl im peripheren Blut hat, ist nicht bekannt. Dies ist nicht nur im Hinblick auf den vielfältigen Einsatz von Glukokortikoiden in der veterinärmedizinischen Praxis, sondern auch für die Interpretation hämatologischer Ergebnisse bei mit Glukokortikoiden behandelten Tiere relevant. Die vorliegende Arbeit diene der Klärung der Frage, ob Kortisol

einen kurzfristigen Anstieg der Retikulozytenzahl bei nicht anämischen Tieren bewirken kann.

### **5.1.1. Kortisol**

Der ACTH-Stimulationstest ist ein gebräuchlicher Test zur Diagnose eines iatrogenen Hypoadrenokortizismus oder natürlich auftretenden Hypoadrenokortizismus. Zusätzlich kann er eine Hilfestellung bei der Diagnose eines spontanen Hyperadrenokortizismus oder der Therapie desselbigen mit Trilostan darstellen (Behrend et al., 2013). Bei dem Großteil der untersuchten Tiere wurde der Stimulationstest zum Ausschluss eines Hypoadrenokortizismus auf Grund chronischer gastrointestinaler Symptome durchgeführt. Bei der Minderheit (4/15 Hunden) wurde der Verdacht auf eine endokrin aktive Nebennierenneoplasie geäußert. Gebräuchliche Verabreichungsform ist die intravenöse Gabe von 5µg/kg Tetracosactrin (Synacthen) (Behrend et al., 2013; Frank et al., 2000; Kerl et al., 1999). Bei einer physiologisch arbeitenden Nebennieren-Hypophysen-Achse kommt es 60 Minuten nach Gabe von Tetracosactrin zu einem signifikanten Anstieg der Kortisolkonzentration (Frank et al., 2000). Dies war auch in den vorliegenden Untersuchungen hochsignifikant der Fall. Tiere mit einem durch den Stimulationstest diagnostizierten Hypoadrenokortizismus oder Tiere bei denen eine Kontrolle der medikamentellen Einstellung mit Trilostan durchgeführt wurde zeigten keine adäquate Erhöhung des Kortisolspiegels; von einem ausreichenden Glukokortikoid-Effekt war in diesen Fällen nicht auszugehen und die Tiere wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Bei den verbleibenden Tieren war der Anstieg des Kortisol als suffizient zu bewerten.

### **5.1.2. Retikulozytenzahl**

Entgegen der aufgestellten Hypothese und der allgemeinen Erwartungen kam es weder zu einem Anstieg der Retikulozytenzahl 60 Minuten nach der Gabe eines synthetischen ACTH-Analogons noch zu der Messung konstanter Retikulozytenzahlen. Vielmehr fand sich, überraschenderweise, ein milder, aber dennoch signifikanter Abfall der Retikulozyten trotz des signifikanten Einflusses von Kortisol.

Eine mögliche Erklärung für die Tatsache der basal höheren Retikulozytenzahlen ist der Einfluss von Aufregung und eines dadurch erhöhten Epinephrinspiegels im Blut. Die Durchführung des ACTH-Stimulationstests wurde während der internistischen Aufarbeitung der Patienten durchgeführt. In der Regel wurden die Tiere während der internistischen Sprechstunde vorgestellt und erhielten einen Venenverweilkatheter für die zu planenden hämatologischen Untersuchungen. Der Einfluss der Fahrt zur Vorstellung in der Klinik, die unbekannte Umgebung und der Umgang mit fremden Personen/Tierärzten sowie die Prozedur des Legens eines Venenverweilkatheters sind Gründe für eine Erhöhung des endogenen Epinephrinspiegels im Blut. Bedingt durch die verbleibenden Fibronectin-Rezeptoren auf der Oberfläche der sich weiter entwickelnden Retikulozyten ist eine Adhäsion an Makrophagen und Stroma der Milz möglich. Durch Kontraktion der Milz in Folge eines Einflusses von Epinephrin, kann es zu einer Entkopplung dieser interzellulären Verbindung und folgender Erhöhung der Zahl der Retikulozyten innerhalb des peripheren Blutes kommen. Neben der Katecholaminwirkung wird ebenfalls ein neuronaler Trigger durch Aufregung als Auslöser einer Kontraktion der Milz angesehen. Diese beiden Auslöser waren Bestandteil vielfältiger Untersuchungen in der Veterinärmedizin (Metzger et al., 2011; Barcroft and Stephens, 1927; Elenes et al., 1964; Stewart and McKenzie, 2002b). Mit einem Sequestrationsvolumen von 30% des Gesamtblutvolumens ist die Milz in der Lage einen nicht unwesentlichen Bestandteil an Erythrozyten und Retikulozyten sowie Blutplasma bei Kontraktion in die Zirkulation zu entlassen (Elenes et al., 1964; Stewart and McKenzie, 2002). Die Daten der durchgeführten Untersuchungen stützen die These eines Epinephrineffektes und folgender Milzkontraktion zum Zeitpunkt der Blutentnahme und Injektion des ACTH-Präparates durch die Abnahme der Retikulozytenzahl sowie Erythrozytenzahl bei der 60 Minuten später folgenden Blutentnahme. Erwiesenermaßen kommt es im Rahmen einer Milzkontraktion zu einer Erhöhung der Gesamterythrozytenzahl, des Hämatokrits und des Hämoglobins (Barcroft and Stephens, 1927; Barcroft, 1930). Eine Erhöhung der Retikulozyten ist ebenfalls beschrieben (Horvath et al., 2014). Durch den Abfall eben dieser Parameter in der Studienpopulation ist der Einfluss von Katecholaminen zu Beginn sehr wahrscheinlich. Limitierender Faktor in Bezug auf die durchgeführten Untersuchungen ist eine fehlende Messung von Epinephrin/Adrenalin zu beiden Zeitpunkten, die These bleibt spekulativ. Andere

pathophysiologische Erklärungen finden sich jedoch nicht. In der Studienpopulation konnte ein signifikanter Abfall des MCV und des RDW ebenso wie ein signifikanter Anstieg des MCHC nachgewiesen werden. Diese Tatsache begründet sich in dem signifikanten Abfall der Retikulozytenfraktion. Retikulozyten sind im Vergleich zu Erythrozyten größer und haben ein entsprechend höheres zelluläres Volumen (MCVr). Zusätzlich kommt es in Folge der Größenverhältnisse und des Hämoglobingehaltes zu einer Polychromasie, die sich in der Gesamtheit als niedriger MCHC abbilden kann. Durch das signifikante Absinken der Retikulozytenzahl nach Stimulation kam es zu einer dadurch bedingten Änderung der Erythrozytenindizes. Die Änderungen im MCH waren nicht signifikant im Vergleich.

Zur Überprüfung der maschinell ermittelten Retikulozytenzahl wurde eine manuelle Differenzierung mit Neumethylen-Blau-angefärbten Blutaussstrichen durchgeführt. Die manuelle Differenzierung mittels Supravitalfärbung gefärbter Blutaussstriche gilt nach wie vor als Goldstandard in der Bestimmung der Retikulozytenzahl (Cowgill et al., 2003). Zu beachten ist allerdings, dass die Methodik der manuellen und die der automatisierten Messung gravierende Unterschiede aufweisen. Während bei der automatisierten Retikulozytenbestimmung etwa 50.000 Zellen gemessen werden, sind es im Vergleich bei der manuellen Differenzierung nur 1000 Zellen. Dadurch ergibt sich für erstere eine präzisere Messung, eine niedrigere Variabilität der Messwerte und die Unabhängigkeit des Untersuchenden. Humanmedizinische Studien zeigen eine bis zu 50% abweichende Retikulozytenmessung bei der manuellen Differenzierung im Vergleich mehrerer Untersucher. Die maschinelle Messung kann als überlegene und einfachere Methode im Vergleich zu der manuellen Differenzierung gesehen werden. Messartefakte wie Heinz-Körperchen, Normoblasten, Riesenthrombozyten und Agglutinate die zu einer maschinellen Fehleinschätzung führen können, sind jedoch in der manuellen Methodik leichter zu differenzieren. In der vorliegenden Arbeit kann die bessere Präzision der automatisierten Messung nachvollzogen werden; mittels Handdifferenzierung kam es zu einer signifikanten Unterschätzung der Retikulozytenzahl, wenn auch die Korrelation mit  $r_s = 0,82$  als gut einzustufen war. Schlechtere Zahlen konnten in einem ähnlichen Vergleich mit einem  $r_s$  von 0,63 gefunden werden (Goldmann et al., 2014). Dennoch gilt die manuelle Differenzierung auch im Vergleich mit großen Analysegeräten als gut korrelierende Variante (Weissert, 2011).

In der kleinen Studienpopulation von 15 Tieren konnte bei nur insgesamt zwei Hunden sowohl manuell als auch maschinell eine Retikulozytose nachgewiesen werden. Interessanterweise bestand diese Retikulozytose bereits vor der Gabe von Tetracosactrin und die Retikulozytenzahl sank nach einer Stunde nur leichtgradig ab. Pathomechanismus für das Absinken ist die weiter oben diskutierte katecholaminbedingte Milzkontraktion. Dennoch zeigten beide Tiere auch bei der zweiten Blutentnahme eine mittelgradige Retikulozytose. Bei beiden Tieren waren sowohl anamnestisch als auch klinisch gravierende Anzeichen einer Hypoxie evident.

Der erste Hund, ein 13-Jahre alter weiblich-unkastrierter Beagle, wurde auf Grund chronischer Dyspnoe sowie zyanotischer Zustände zur internistischen Diagnostik vorgestellt. In der radiologischen Untersuchung des Thorax konnte eine hochgradige interstitielle bis fokal alveoläre Lungenzeichnung gefunden werden. Echokardiographisch bestätigte sich eine chronische respiratorische Symptomatik mit Anzeichen einer schweren pulmonalen Hypertension. Differentialdiagnostisch kamen neben einer hochgradigen interstitiellen Lungenerkrankung (Fibrose) ebenso thrombembolische Verschlüsse der Lungegefäße in Frage. Zusätzlich wurde mittels Dopplersonographie eine hochgradige systemische Hypertension detektiert (290mmHg bei einem oberen Referenzbereich von maximal 160mmHg). In Verbindung mit einem hyposthenurischen Urin (Urinspezifisches Gewicht: 1,006, Referenzwert Hund > 1,035) und einer sonographischen Vergrößerung der linken Nebenniere mit einem hypoechogenen Areal war das Vorliegen einer endokrin aktiven Nebennierenneoplasie möglich (Phäochromozytom versus Hyperkortisolismus). Eine weitere diagnostische Aufarbeitung wurde durch die Besitzer abgelehnt, eine ätiologische Diagnosestellung war bei diesem Tier nicht möglich. Der zweite Hund mit bestehender Retikulozytose vor und nach ACTH-Stimulationstest war ein 10-Jahre alter kastrierter Border Collie. Multiple Perioden mit Synkopen und phasenweise bestehender Dyspnoe waren der Vorstellungsgrund. Mittels eingehender Untersuchungen wurde ein AV-Block III. Grades ohne erkennbare auslösende Ursache diagnostiziert und ein Zweikammerschrittmacher zur Stabilisierung der Herzaktion implantiert. Hinweise auf eine zugrundeliegende respiratorische Symptomatik fanden sich nicht; der hypoxische Zustand ist vermutlich durch die bestehende Bradyarrhythmie zu erklären.

Bei beiden Patienten mit Retikulozytose sind hypoxische Zustände als Ursache für die Erhöhung der Retikulozytenzahl bei gleichzeitig physiologischer Erythrozytenwerte und einem Hämatokrit innerhalb des Referenzbereiches verantwortlich. Die schwerwiegende Erkrankung beider Hunde ist als auslösende Ursache für die Erhöhung der Retikulozytenzahl zu sehen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie fanden sich nur 1,5% der nicht anämischen Hunde mit einer Retikulozytose ohne zugrundeliegende Anämie als gesund. Bei 3,6% der Tiere konnte eine auslösende Erkrankung detektiert werden, insgesamt ging eine Retikulozytose ohne begleitende Anämie mit einer Mortalitätsrate von 29,7% und einer sehr kurzen medianen Überlebenszeit von einem Tag einher (Fuchs, 2017). Insgesamt wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass eine Retikulozytose bei nicht anämischen Tieren eine ernstzunehmende Laborwertveränderung darstellt und nicht selten mit schwerwiegenden zugrundeliegenden Erkrankungen vergesellschaftet ist.

### **5.1.3. Leukozytenzahl**

Im Vergleich zu den signifikanten erythrozytären und retikulozytären Zellerniedrigungen nach Stimulation mit dem ACTH-Analogen konnte bezüglich der Gesamtleukozytenzahl ein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Dieser wurde getragen von einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten bei einem gleichzeitig vorliegenden signifikanten Abfall der Lymphozyten und der eosinophilen Granulozyten. Bezogen auf die Monozytenzahl fand sich in den vorliegenden Ergebnissen keine signifikante Änderung; tendenziell war jedoch ein Anstieg zu vermerken. Insgesamt sind diese Befunde übereinstimmend mit einer kortikosteroid-induzierten Leukozytose (Latimer and Rakich, 1989; Guelfi et al., 1985). Die endogene Erhöhung von Kortisol, bedingt durch Stress oder das Bestehen eines Hyperadrenokortizismus, sind bei diesem Mechanismus ebenso möglich wie der Einfluss von exogenen Glukokortikoiden oder ACTH (Schultze, 2000). Bei den untersuchten Hunden ist die Verabreichung des ACTH-Analogons Tetracosactrin elementarer Bestandteil des diagnostisch Stimulationstests und als auslösende Ursache zu benennen. Typischerweise ist die kortikosteroid-induzierte Leukozytose, auch Stressleukogramm genannt, klassifiziert durch eine Neutrophilie, Lymphopenie, Monozytose und Eosinopenie (Latimer and Rakich, 1989). In der Regel kommt es nicht zu einer wesentlichen Erhöhung der

stabkernigen neutrophilen Granulozyten (Linksverschiebung). Die Ursachen der Neutrophilie sind vielfältig. Eine verminderte Marginalisierung der neutrophilen Granulozyten innerhalb des Gefäßsystems, ein vermehrter Austritt von Zellen aus dem Knochenmark sowie eine verminderte Emigration aus dem Gefäßsystem in die Gewebe werden diskutiert. Lymphopenie und Eosinopenie sind durch eine Umverteilung der zirkulierenden Zellen und einer verminderten Ausschüttung aus dem Knochenmark zu erklären. Eine Monozytose ist ähnlich wie die Neutrophilie durch eine Verminderung der Marginalisierung bedingt (Schultze, 2000).

Insgesamt waren die leukozytären Veränderungen zu erwarten. Verwunderlich ist die kurze Zeit, die zu der glukokortikoid-bedingten Leukozytose geführt hat. Beschrieben sind die Einflüsse von stimulierenden Substanzen erst nach etwa vier bis sechs Stunden (Schultze, 2000). Die Tatsache der Glukokortikoid-induzierten Leukozytose stützt die These des ausreichenden Glukokortikoid-Einflusses auf die zirkulierenden Zellen, auch auf die Retikulozyten, im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen. Eindeutig abzugrenzen sind die Änderungen des weißen Blutbildes von einem Epinephrin-Effekt, bei welchem eine Neutrophilie mit Lymphozytose, bei unveränderten Monozyten- und Eosinophilenzahlen, gesehen wird. Eine inflammatorische Leukozytose ist ebenfalls auf Grund der pathognomonischen Veränderungen ausgeschlossen (Latimer and Rakich, 1989).

#### **5.1.4. Limitationen der Studie**

Limitierende Faktoren der durchgeführten Studie sind in erster Linie die Untersuchungen an erkrankten Individuen. Die in der Klinik für Kleintiere - Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellten Hunde zeigten in der Regel mindestens ein Symptom, was die internistische Aufarbeitung in einer Klinik rechtfertigte. Eine gesunde Kontrollpopulation wäre wünschenswert. Ob und in welchem Ausmaß eine physiologische Reaktion dieser Tiere auf der erkrankten Glukokortikoidwirkung stattfand ist nicht zu evaluieren. Weiterhin ist eine Langzeiteinfluss von Glukokortikoiden auf die Erythropoese sowohl unter pathologischen Konditionen (Hyperadrenokortismus) als auch bei der Verabreichung von Glukokortikoiden bekannt. Eine Angabe über die Art, Dauer und Dosierung an Kortikosteroiden, die zu einer Erythrozytose respektive Retikulozytose führen kann, ist dabei nicht näher beschrieben. Die gewählte

Dauer des Blutentnahmeintervalls wurde hinsichtlich der Durchführung des ACTH-Stimulationstests gewählt. Nähere Angaben über einen später einsetzenden Effekt oder die Langzeitwirkung des Tetracosactrins und der folgenden Erhöhung des endogenen Kortisol können nicht gemacht werden.

### **5.1.5. Schlussfolgerung**

In den durchgeführten Untersuchungen konnte die Hypothese der Erhöhung der Retikulozytenzahl durch einen Einfluss von Kortisol nicht bestätigt werden. Vielmehr kam es nach Stimulation mit Tetracosactrin zu einem signifikanten Abfall der Retikulozyten. Die Änderungen der erythrozytären Indizes sind im Einklang mit der Erniedrigung der Retikulozytenzahl zu sehen. Eine initiale Milzkontraktion in Folge von Aufregung oder körperlicher Belastung, die zu einer Erhöhung der Retikulozytenzahl und der erythrozytären Parameter führt, ist zu diskutieren und beweisen. Bei den Tieren mit physiologischem Hämatokrit, aber einer nachweisbaren Retikulozytose, fanden sich gravierende auslösende Ursachen, die eine Erhöhung der Retikulozytenzahl nach sich ziehen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche Pathomechanismen unabhängig von prädisponierenden Erkrankungen auch bei scheinbar gesunden Tieren zu einer Retikulozytose führen können.

### 5.1.6. CHr-Erhöhung beim Hund: Vorkommenshäufigkeit und Ätiologie

Mit einer prozentualen Vorkommenshäufigkeit von 1,7% ist die Diagnose eines erhöhten CHr in der vorliegenden Population ein sehr rares Phänomen. Eine Beschreibung der Prävalenz dieses Phänomens in der Human- und Tiermedizin ist in der aktuellen Literatur nach Kenntnis des Autors nicht gegeben; ein Vergleich bleibt auf Grund der Erstbeschreibung unmöglich. Die Existenz sowie die klinische Relevanz eines erhöhten retikulozytären Hämoglobingehaltes ist in der Humanmedizin Bestandteil nur einer, die retikulozytären Indizes vergleichenden Arbeit (d'Onofrio et al., 1995). Bei Patienten mit einer diagnostizierten Makrozytose der Erythrozyten wurden die retikulozytären Indizes bestimmt und eine Erhöhung des MCVr als Ursache für den erhöhten CHr detektiert. Die Makrozytose war dabei mit einer Vielzahl von pathologischen Konditionen vergesellschaftet (Kaferle and Strzoda, 2009).

Parameter/Einheit	Gesund	Eisenmangel	Makrozytose
<b>MCV</b> (fL)	89,9 (4,03)	74,3 (4,89)	111,5 (5,5)
<b>MCVr</b> (fL)	111,7 (6,77)	100,1 (8,78)	139,0 (11,0)
<b>CHCM</b> (g/dl)	31,6 (1,02)	27,3 (1,48)	31,0 (1,12)
<b>CHCMr</b> (g/dl)	26,3 (1,5)	20,4 (2,09)	25,7 (1,19)
<b>CHr</b> (pg)	28,6 (1,6)	19,6 (2,46)	34,9 (3,87)

Tabelle 15: Humanmedizinische Patienten mit Makrozytose im Vergleich der erythroiden und retikulozytären Indizes.

In der vorliegenden Population konnte eine Makrozytose in mehr als der Hälfte der Fälle ebenfalls durch einen erhöhten MCV detektiert werden. Von diesen Tieren waren 60% mit einer erhöhten Retikulozytenzahl deutlich regenerativ. Dennoch fanden sich in etwa der Hälfte der Fälle normozytäre Erythrozyten, was ein Vorkommen eines erhöhten CHr ebenfalls bei einer Normozytose möglich macht.

Eine Erhöhung des CHCMr und damit einhergehend einer retikulozytären Hyperchromasie ist in der Humanmedizin ein seltenes Phänomen und tritt ausschließlich bei der Sichelzellanämie auf. Ein zwei- bis dreifach erhöhter Hämoglobingehalt der Retikulozyten im Vergleich zu gesunden Individuen wird beschrieben (Thomas, 2012b; Olver, 2010).

Dagegen liegt keine Beschreibung einer retikulozytären Hyperchromasie (Erhöhung des CHCMr) in der tiermedizinischen Literatur vor. Als Produkt der beiden retikulozytären Indizes ist der CHr proportional von der retikulozytären Größe und der Hämoglobinkonzentration abhängig (Thomas, 2012b). Variablen, die zu einer Erhöhung eines oder beider Parameter führen können, sind als mögliche Ätiologie eines erhöhten CHr zu diskutieren.

Während die Beschreibung eines erhöhten CHr in der Tiermedizin nicht existiert, ist der erniedrigte retikulozytäre Hämoglobingehalt ein etablierter und gängiger Parameter zur Diagnose einer eisendefizienten Hämatopoese. Eine Unterscheidung in absoluten oder funktionellen Eisenmangel ist durch den Parameter CHr nicht gegeben, jedoch kann eine Erniedrigung in Verbindung mit weiteren hämatologischen Parametern sowie der klinischen Einschätzung gute Hinweis auf die Ätiologie geben. In der vorliegenden Studienpopulation fanden sich im Hinblick auf eine drastische Erniedrigung des CHr ( $\text{Chr} < 1,29\text{fmol/l}$ ), die mit einer sehr guten Sensitivität und Spezifität, hinweisend auf eine absolute oder relative Eisendefizienz ist, annähernd 11% der Messungen unterhalb dieses Cut-Off-Wertes (siehe Tabelle 6). Diese Vorkommenshäufigkeit bezogen auf die Messwerte ist höher als die bereits beschriebene Zahl von 5% (Steinberg and Olver, 2005). Einen ähnlich hohen Anteil an Tieren mit Hinweisen auf eine eisendefizitäre Erythropoese (10,3%) fand unsere Arbeitsgruppe bei der Evaluation eines ähnlich zu interpretierenden Parameters Ret-He des ProCyt Dx<sup>®</sup> Analyse-Gerätes (Fuchs, 2017). Limitierend muss einbezogen werden, dass bei der vorliegenden Auswertung Mehrfachmessungen einer Probe sowie Kontrolluntersuchungen eines Tieres mit eingeschlossen wurden. Eine niedrigere Vorkommenshäufigkeit nach Ausschluss dieser ist denkbar.

Bezogen auf einen erniedrigten CHr kann es bei schweren und chronischen Fällen ebenfalls zu Veränderungen der erythrozytären Indizes kommen. Besonders im Falle einer chronischen Eisendefizienz ist die Ausbildung einer mikrozytär-normochromen bis mikrozytär-hypochromen Annämie möglich (Thomas and Thomas, 2002). Gute Hinweise zur Überprüfung der Erythrozytenmorphologie liefert in diesem Fall die Einzelerythrozytenanalyse des ADVIA<sup>®</sup> 2120. Folgend sind das Zytogramm und entsprechende Histogramme eines Patienten mit einem portosystemischen Shunt in der Erythrozytenanalyse dargestellt. Dieser Hund

zeigt einen hochgradig erniedrigten CHr von 0,9fmol/l (1,43-1,71fmol/l) bei einer physiologischen Retikulozytenzahl, sowie klassische morphologische Veränderungen eines Eisendefizites (Thomas and Thomas, 2002; Thomas, 2012a).

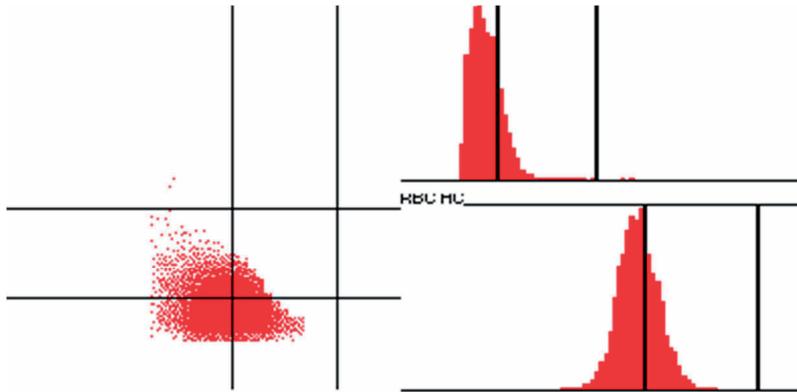


Abbildung 25: Scattergramm und Histogramm: Portosystemischer Shunt

*Mikrozytär-hypochrome Morphologie eines Hundes mit portosystemischem Shunt.*

Die Kombination aus Analyse der Erythrozytenmorphologie sowie CHr-Bestimmung kann in diesem Fall gute Hinweise auf den Ist-Zustand der Erythropoese sowie die Folgen auf die erythrozytären Indizes geben.

In Anlehnung an ein solches Phänomen wurde in der vorliegenden Studie die Diagnose der Tiere mit erhöht gemessenen CHr mit den Auswirkungen auf die Erythrozytenmorphologie sowie mögliche beeinflussende Faktoren und Messartefakte beleuchtet.

Der weitaus größte Teil der Tiere mit einem erhöhten CHr stellte sich anämisch dar. Lediglich bei zwei Tieren lag ein physiologischer Hämatkritwert vor. Ein Hund zeigte eine Polyzythämie in Folge einer chronischen Hypoxie (Fallot'sche Tetralogie) und ein Hund war ein Pudel mit chronischen gastrointestinalen Symptomen, die vereinbar mit einer Futtermittelhypersensitivität waren.

Bei den verbleibenden Tieren lag eine Anämie mit einem medianen Hämatokrit von 0,22/l (Range 0,8-0,59/l) vor. Zur näheren Klassifikation dieser Anämie eignet sich die Retikulozytenzahl, um zwischen regenerativen und aregenerativen Formen zu unterscheiden (Riley et al., 2001).

### 5.1.6.1. Retikulozytose

In der vorliegenden Population konnte eine Makrozytose in mehr als der Hälfte der Fälle ebenfalls durch einen erhöhten MCV detektiert werden. Von diesen Tieren waren 60% mit einer erhöhten Retikulozytenzahl deutlich regenerativ. Mit einer zeitgleich vorliegenden Normo- bis Hypochromasie ist hierbei die Makrozytose als Folge der Regeneration zu werten (Riley et al., 2001; Thomas, 2012b). Es handelt sich definitionsgemäß um eine nicht megaloblastäre Makrozytose. Die Tatsache der Entwicklung einer Makrozytose bei hochgradiger Regeneration ist darauf zurückzuführen, dass Retikulozyten bei der Bestimmung des MCV mit erfasst werden. Durch ein etwa 3-10% größeres Volumen der Retikulozyten kommt es zu einer verhältnismäßigen Verschiebung des MCV, die den oberen Referenzbereich überschreiten kann (Thomas, 2012b). Dies ist in der Regel ab einer relativen Retikulozytenzahl von 15% der Fall (Thomas, 2012b). Klassischerweise kommt es neben der numerischen Veränderungen des MCV und MCHC ebenfalls zu einer typischen graphischen Veränderung des Erythrogramms des ADVIA® 2120, die in der folgenden Graphik dargestellt ist.

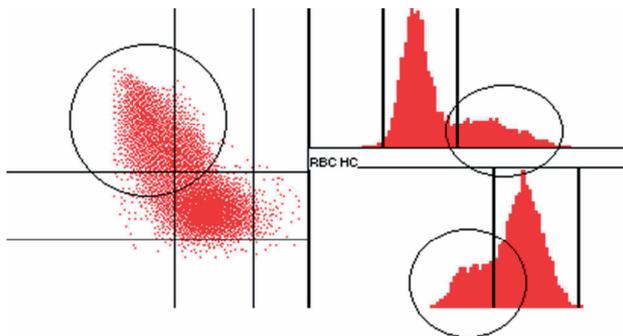


Abbildung 26: Scattergramm und Histogramm: Retikulozytose.

*Makrozytär-hypochrome bis makrozytär-normochrome Erythrozytenpopulation als Hinweis auf unreife Erythrozyten*

Die unter normalen Umständen in der Zirkulation vorkommenden Retikulozyten sind größer als reife Erythrozyten und aufgrund des größeren Volumens in der Lage, mehr Hämoglobin zu tragen, als die adulten Erythrozyten. Während ihrer zweitägigen Reifungsphase überwiegt der Verlust der Membranoberfläche den Verlust des Hämoglobins, was zu einem verhältnismäßig höheren Hämoglobingehalt der Retikulozyten führt (Gifford et al., 2006). Das Verhältnis der retikulozytären Indizes ist in diesem Fall ausgewogen und ergibt einen CHR

innerhalb des Referenzbereiches. Durch externe Stressoren, in der Regel hypoxische Zustände sowie Anämien, kann es zu einem vorzeitigen Entlassen von unreiferen Retikulozyten aus dem Knochenmark kommen. Diese Retikulozyten werden als Stressretikulozyten bezeichnet, besitzen ein höheres Volumen und enthalten weniger Hämoglobin. Die reifungsbedingte Membraninstabilität führt zu einer verkürzten Lebensdauer und Ausbildung zum Teil dysplastischer Erythrozyten (Noble et al., 1990; Come et al., 1972; Come and Shohet, 1971).

In der vorliegenden Patientenübersicht ist der Großteil der Tiere mit 57% regenerativ mit einer mitunter deutlichen Retikulozytose von median  $96,2 \times 10^9/l$  (Range 7,1-566,0). Besondere Beachtung gilt dabei den Untergruppen mit Hämolyse oder Blutung, die signifikant höhere Retikulozytenzahlen aufwiesen als die verbleibenden Gruppen. Ob und in welchem Ausmaß der Grad der Retikulozytose, das Vorhandensein von Stressretikulozyten oder weitere Faktoren eine Erhöhung des CHr bedingen, ist retrospektiv nicht ersichtlich. Diese Fragestellung ist in weiteren Studien zu beantworten; die Beurteilung der retikulozytären Indizes MCVr und CHCMr ist dabei ebenso wie die Maturationsform der Retikulozyten entscheidend.

#### **5.1.6.2. Artefakt**

Das vollautomatische Hämatologiesystem ADVIA<sup>®</sup> 2120 unterliegt dem Prinzip der Doppelwinkel-Laser-Streulicht-Messung und arbeitet durchflusszytometrisch (Siemens, 2009). Technische Gegebenheiten können dabei unter bestimmten Umständen zu artifiziellen Falschmessungen führen. Folge sind Änderungen der wahrhaft gemessenen Erythrozytenindizes und aller rechnerisch ermittelten Werte. Eine Messvarianz kann demnach eine Vielzahl an Folgefehlern bedingen, was in der Vorspiegelung pathologischer Ursachen münden kann. Hinweise auf artifizielle Messwerte finden sich in den Erythrozytenscattergrammen des ADVIA<sup>®</sup> 2120 und sind von den reellen Erythrozyten abzugrenzen. Im Weiteren sollen bekannte und häufige Fehlerquellen anhand der Studienpopulation diskutiert werden, die zu einer maschinellen und mathematischen Fehleinschätzung der erythrozytären und retikulozytären Indizes und somit auch des CHr führen können.

### 5.1.6.2.1. Lagerungsartefakt

Eine Zellschwellung der Erythrozyten und folgende Makrozytose ist besonders bei Lagerungszeiten über sechs Stunden beschrieben. Der CHr stellt sich in Lagerungsstudien als sehr stabiler Parameter dar (Prins et al., 2009). Eine lagerungsbedingte Makrozytose wurde in der vorliegenden Population ausgeschlossen, da eine Messung in der Regel innerhalb von Minuten bis maximal drei Stunden vollzogen worden ist.

Hinsichtlich der Tiere, die eine Bluttransfusion erhalten haben, sind Artefakte dennoch möglich, da es sich um gelagerte Blutprodukte handelt. Lagerungszeiten von bis zu vier Wochen sind bei Erythrozytenkonzentraten möglich. Eine Vergleichsmessung eines vier Wochen alten Erythrozytenkonzentrates ergab folgendes Ergebnis im Scatter- und Histogramm:

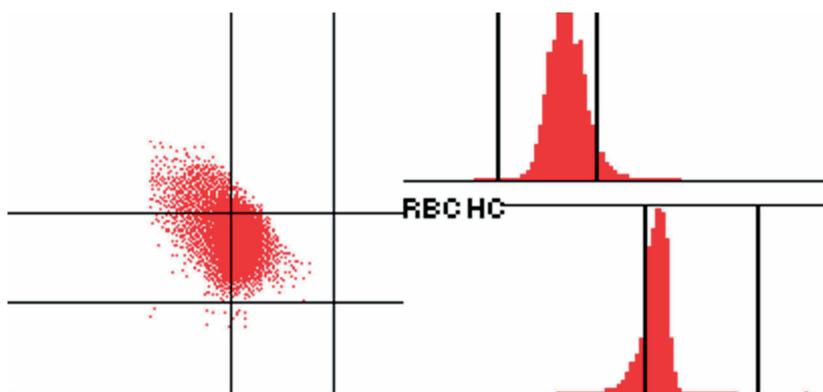


Abbildung 27: Scattergramm und Histogramm: Artefakt durch Lagerung.

*Makrozytär-hypochrome Erythrozytenpopulation bei einem vier Wochen alten Erythrozytenkonzentrat*

Insgesamt erhielten neun Tiere mit einem zuvor im physiologischen Rahmen liegenden CHr eine Bluttransfusion. Der Einfluss der makrozytär veränderten Spendererythrozyten und -retikulozyten ist zu diskutieren und in weiteren Untersuchungen zu belegen.

### 5.1.6.2.2. Erythrozytenagglutinate

Bei einer Agglutination von Erythrozyten kann es im Ablauf der hydrodynamischen Fokussierung zu einer fehlerhaften Vereinzelung der Zellen und Messung von Erythrozytenagglutinaten als „Einzelerthrozyt“ kommen. Resultat ist ein erhöhtes Zellvolumen, was sich als erhöhter MCV darlegt, sowie in einigen Fällen eine falsch hohe Hämoglobinkonzentration, die wiederum eine Erhöhung von CHCM, MCH und MCHC nach sich ziehen kann. Hinweise auf eine bestehende Autoagglutination können die Durchführung eines Blutausstriches oder die Objektträgerschnellagglutination geben. Pathologische Ursachen für die Ausbildung von Erythrozytenagglutinaten sind dabei als immunologische Reaktionen im Rahmen von immunvermittelten Anämien oder malignen lymphoproliferativen Erkrankungen (besonders Lymphosarkome) sowie diverse immunstimulierende weitere Erkrankungen zu benennen (Thomas, 2012b; a). Eine Auswirkung auf die retikulozytären Indizes und letztlich eine Erhöhung des CHR durch Agglutinatmessung ist möglich, wenn auch weder humanmedizinisch noch tiermedizinisch beschrieben. In der vorliegenden Studienpopulation fielen Agglutinatmessungen besonders bei den immunhämolytischen Erkrankungen auf, was auf die Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen zurückzuführen ist. Weiterhin konnten Agglutinate ebenfalls bei neoplastischen und inflammatorischen Erkrankungen gesehen werden.

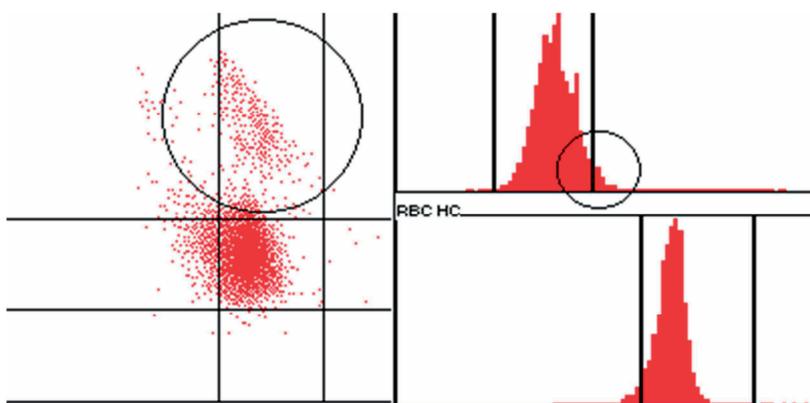


Abbildung 28: Scattergramm und Histogramm: Artefakt durch Erythrozytenagglutinate.

*Erythrozytenagglutinate als makrozytär-normochrome Population. Deutlich zu erkennen ist die Trennung zu der wahrhaftigen Erythrozytenwolke*

### 5.1.6.2.3. Hyperchromasie

Die artifizielle Klassifizierung von hyperchromen Erythrozyten ist bei unterschiedlichen Ausgangssituationen möglich. Eine wahrhafte Erhöhung des MCH, MCHC und CHCM ist selten und in der Humanmedizin bei hereditären Sphärozytosen, Sichelzellanämien, Agglutinationen sowie im Rahmen makrozytärer Anämien beschrieben (Thomas, 2012a; Deuel et al., 2012). Diese Konditionen sind in der Tiermedizin bis auf die Messung von Agglutinaten nicht relevant. Als artifizielle Fehleinschätzung des erythrozytären und retikulozytären Hämoglobingehaltes kann es durch zelluläre Inklusionen (Heinz-Körperchen, eine Vielzahl an Howell-Jolly-Körperchen) kommen. Ebenso kann freies Hämoglobin bedingt durch Hämolyse durch Lichtabsorption und Streuung die durchflusszytometrische Klassifizierung beeinflussen (Thomas, 2012a; Weissert, 2011).

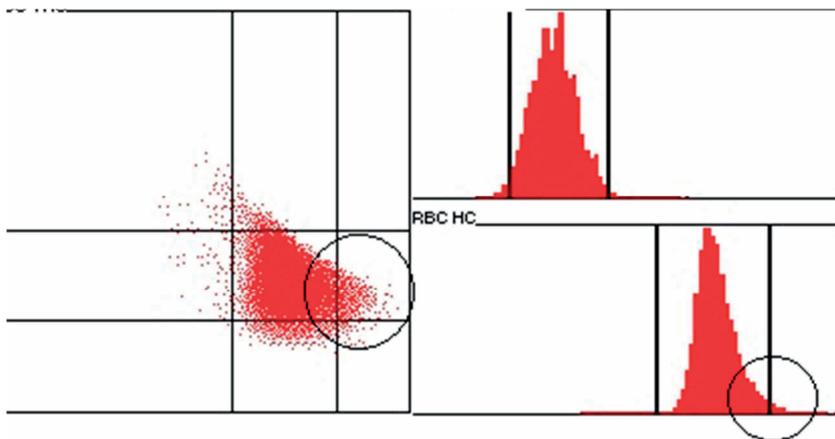


Abbildung 29: Scattergramm und Histogramm: Artefakt durch Hyperchromasie

*Normozytär-hyperchrome Population bei einem Hund mit Heinz-Körperchen*

In der vorliegenden Population fand sich ein Hund mit einer nachgewiesenen hochgradigen Heinz-Körperchenbildung und einer dadurch bedingten Hyperchromasie. Zu beachten gilt, dass nicht bei allen Tieren mit einer gemessenen Hyperchromasie eine Neumethylen-Blau-Färbung zum Ausschluss von Heinz-Körperchen erfolgte und demnach die Vorkommenshäufigkeit unterschätzt werden kann. Zu diskutieren wäre, ob eine Hämolyse nach Bluttransfusion in der Gruppe der Hunde mit Hämolyse und Blutungen zu einer artifiziellen Fehleinschätzung geführt haben kann, besonders da im Vorhinein ein

physiologischer CHr bei einigen Tieren gemessen werden konnte. Diese Konditionen sind retrospektiv nicht zu klären.

#### 5.1.6.2.4. Leukozyten

Leukozyten können bei abnorm hohen Zellzahlen ebenso wie bei einer Schwellenwertverstellung der Erythrozytendifferenzierung als Erythrozyten gezählt werden (Thomas, 2012a). Dies führt nicht nur zu einer falsch hohen Erythrozytenzahl, sondern auch zu einer Fehleinschätzung des Hämoglobingehaltes durch Messung der hyperchromen Leukozyten. Dies kann besonders auf die große Anzahl an akuten lymphatischen Leukämien in der Studienpopulation zurückgeführt werden, wenn auch nur ein Tier in der Scattergramm-Analyse Hinweise auf eine Fehlklassifizierung zeigte.

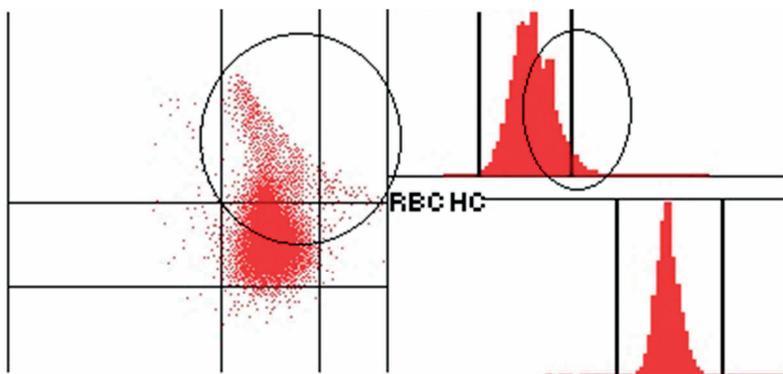


Abbildung 30: Scattergramm und Histogramm: Artefakt durch Leukozyten

*Makrozytär-hypochrome bis makrozytär-hyperchrome Population als Leukozytenartefakt bei einem Hund mit akuter lymphoblastischer Leukämie und hochgradiger Lymphozytose.*

#### 5.1.6.3. Makrozytose

Nach Ausschluss von Artefakten und nicht megaloblastären Zuständen (Retikulozytose) für eine Makrozytose (Agglutinate, Leukozyten, Lagerung oder Hyperosmolarität) und Verifizierung mittels Blutausstrich kann die Diagnose einer wahren Makrozytose gestellt werden. Retrospektiv kann in den meisten Fällen auf Grund einer fehlenden Knochenmarksuntersuchung keine ätiologische Ursache für diese gefunden werden und die möglichen Ursachen sind pro Patient zu diskutieren. Allen gemein ist eine zugrundeliegende Dyserythropoese, die zur Ausbildung von megaloblastären (makrozytär-normochromen) Erythrozyten führen kann. Kongenitale Ursachen stehen dabei erworbenen Dyserythropoesen

entgegen (Weiss, 2010b; a). Eine weitere Unterscheidung muss zwischen einem primären myelodysplastischen Syndrom sowie der sekundären Dysmyelopoese getroffen werden (Weiss, 2010b).

Häufigste Ursache einer Makrozytose in der Humanmedizin ist das Vorliegen eines Cobalamin- und oder Folsäuremangels; eine megaloblastäre Anämie mit Makroretikulozyten und makrozytischen Erythrozyten ist die Folge (d'Onofrio et al., 1995; Kaferle and Strzoda, 2009). Eine Cobalamin- oder Folsäurebestimmung wurde bei nur wenigen der untersuchten Patienten durchgeführt. Die Aussage über eine mögliche Koinzidenz ist nicht möglich. Weiterhin sind verschiedenste Therapeutika aus der Humanmedizin als Auslöser für eine Makrozytose bekannt. Hierzu zählen besonders antiretrovirale Medikamente zur Behandlung einer HIV-Infektion, Immunsuppressiva, Antikonvulsiva, Chemotherapeutika sowie einige Antibiotika (Chloramphenicol, Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Cephalosporine) und Östrogene (Thomas, 2012a; Kaferle and Strzoda, 2009; Linnebank et al., 2011b; Petersen et al., 2005).

In der vorliegenden Studienpopulation ist in diesem Rahmen besonders die Gruppe der immunhämolytischen Anämien anzusprechen. Neben einer Therapie mit Prednisolon von allen Patienten wurden einige Patienten ebenfalls mit Azathioprin behandelt. Azathioprin ist als medikamenteller Stimulus für die Ausbildung einer megaloblastären Anämie bekannt (Sjogren et al., 1981; Blue, 2016). Nebst der häufigen Artefaktbildung in dieser Gruppe ist dies als weitere Ursache zu diskutieren. Ein Nachweis wurde bei keinem der Patienten mittels Knochenmarksuntersuchung durchgeführt. Weiterhin ist der Einfluss immunvermittelter Zytopenien auf das Knochenmark und der Ausbildung einer sekundären Dyserythropoese bekannt (Weiss, 2010b).

In der Gruppe der Hunde mit Neoplasien wurde ein Hund mit ALL mit einem Kombinationschemotherapieprotokoll behandelt. Dieser Hund zeigte vor Behandlung einen physiologischen CHr und im Anschluss an die Gabe von Vincristin, einem zytostatisch wirksamen Vincaalkaloid, eine Erhöhung desselbigen. Ein potentieller Einfluss ist hier durchaus denkbar (Alleman and Harvey, 1993). Neben dem Einfluss von Chemotherapeutika ist jedoch in der Gruppe der Neoplasien der Einfluss oder Ursprung der Neoplasie selbst als

Auslöser zu nennen. Hämatopoetische Tumoren führen nicht selten zur Ausbildung einer sekundären Dysmyelopoese (Blue, 2016).

Leber- und Nierenerkrankungen werden im Gegenzug zu den obigen Gründen seltener genannt, führen aber ebenfalls zu dyserythropoetischen Zuständen und sind auch für die Ausbildung von megaloblastären Anämien beschrieben (Weiss, 2010b). Die große Gruppe der Nierenerkrankungen in dem vorliegenden Patientengut kann hierbei genannt werden. Bis auf einen Patienten in dieser Gruppe mit nachweisbaren Heinzkörperchen und vermutlich artifizieller Messung des erhöhten CHr ist bei den weiteren Tieren kein spezifischer Grund ersichtlich. Mit einer deutlich niedrigeren Retikulozytenzahl und fehlender Regeneration bleibt in dieser Gruppe allein der Einfluss der Nierenerkrankung auf die Hämatopoeseleistung. Eine Dyserythropoese in Folge eines potentiellen Erythropoetinmangels ist denkbar. Chronische Nierenerkrankungen bedingen in der Regel die Ausbildung einer normozytär-normochromen Anämie (King et al., 1992). Neben der Verminderung der Erythropoetin-Produktion kommt es ebenfalls zu einer geringeren Lebensdauer der Erythrozyten und eines schlechteren Ansprechens des Knochenmarkes aus Erythropoetin (Fry, 2010). Andere Faktoren wie gastrointestinale Blutungen in Folge der Azotämie, Thrombozytopathien und der Einfluss von Parathormon (sekundärer Hyperparathyreoidismus) sind ebenfalls zu nennen (Nangaku and Eckardt, 2006; Fry, 2010).

Der geringere Anteil an Patienten mit systemischen Inflammationserkrankungen ohne Regenerationsanzeichen unter den Patienten mit erhöhtem CHr ist vermutlich ebenfalls auf eine sekundäre Dysmyelopoese auf Grund der akuten Inflammationsreaktion zurückzuführen (Warlick and Smith, 2007; Weiss and Aird, 2001; Weiss, 2010b).

Eine kongenitale Form der Dysmyelopoese/Dyserythropoese konnte nur bei einem Patienten aus der Studienpopulation nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um einen Pudel mit chronischen gastrointestinalen Symptomen. Nach Ausschluss eines Cobalaminmangels ist das Vorliegen einer hereditären Makrozytose (kongenitale Dysmyelopoese des Pudels) sehr wahrscheinlich. Diese ist für Zwerg- und Mittelpudel als kongenitale Dyserythropoese beschrieben (Watson and Canfield, 1988; Canfield and Watson, 1989). Der genannte Patient zeigt dabei eine klassische makrozytär-normochrome Morphologie der

Erythrozyten. Die Erhöhung des CHR ist vermutlich auf eine bestehende Makroretikulozytose zurückzuführen. Hinweise auf eine zeitgleich vorliegende Hyperchromasie oder Artefakte finden sich nicht.

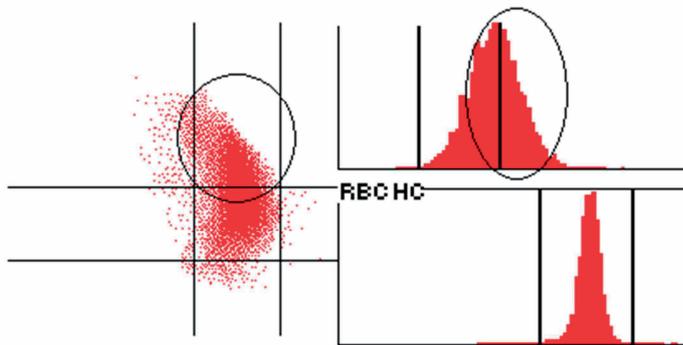


Abbildung 31: Scattergramm und Histogramm: Makrozytose des Pudels

*Makrozytär-normochrome Erythrozyten bei einem Pudel mit kongenitaler Dyserythropoese.*

#### 5.1.6.4. Limitationen der Studie

Da der CHR einen errechneten Parameter aus den retikulozytären Indizes darstellt, ist zur exakten Aussage über die den Messwert beeinflussenden Faktoren die Kenntnis des MCVr und des CHCMr nötig. Diese Parameter standen auf Grund der retrospektiven Herangehensweise der Arbeit nicht routinemäßig zur Verfügung. Eine Aussage über MCVr und CHCMr ist in der Studienpopulation daher nicht möglich. Ziel weiterer Studien sollte die Aussage über genannte retikulozytäre Parameter bei einer Erhöhung des CHR sein, um eine retikulozytäre Makrozytose von einer Hyperchromasie zu unterscheiden.

Eine weitere Limitation ergibt sich aus der beabsichtigten und erfolgten näheren Beleuchtung der retrospektiven und rein deskriptiven Daten der Patienten. Anhand der klinischen Vorstellung, der erhobenen Befunde sowie der durchgeführten Therapie lässt sich in nur wenigen Fällen eine Aussage über die Ursache der Retikulozyten- und Erythrozytenmorphologie treffen. Im optimalen Falle ist eine Kombination aus hämatologischer (maschinelle und manuelle Differenzierung) nebst einer Knochenmarksuntersuchung verfügbar. Auch dies traf nur in wenigen Fällen auf die untersuchten Tiere zu.

### **5.1.6.5. Schlussfolgerung**

Die Messung eines deutlich erhöhten CHr ist ein seltenes Phänomen und betrifft besonders anämische Tiere. Eine häufige Ursache kann dabei eine zugrundeliegende hochgradige Retikulozytose oder eine artifizielle Messung von falsch-hohen retikulozytären Indizes darstellen. Nach Ausschluss beider die Messung beeinflussenden Faktoren bleiben wahre Makrozytosen, sowohl erythrozytär als auch retikulozytär. Eine die Makrozytose bedingende Dyserythropoese ist in diesen Fällen sehr wahrscheinlich. Dabei ist die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Dysmyelopoesen wichtig; eine Abgrenzung zu einem myelodysplastischen Syndrom ist für die weitere Therapie und Prognose relevant. Mit hochgradigen Blutungsanämien, immunmedierten hämolytischen Anämien, systemischen Inflammationserkrankungen, Neoplasien und Nierenerkrankungen sind einige Gruppen von schwerwiegenden systemischen Erkrankungen als mögliche Ursache (artifiziell und wahrhafte Messung) im Rahmen einer CHr-Erhöhung zu nennen. Klinische Maßgabe sollte daher bei Messung eines erhöhten CHr der Ausschluss von Artefakten sein. Sollte keine artifizielle Messung zu Grunde liegen, muss anhand der vorliegenden Ergebnisse von einer schwerwiegenden zugrundeliegenden Erkrankung ausgegangen werden. Eine rare Ausnahme stellen hereditäre, meist asymptomatische, Dyserythropoesen dar.

## **6 Zusammenfassung**

### **6.1. Der Einfluss von Kortisol auf die Retikulozytenzahl von Hunden**

#### **Hintergrund**

Der Nachweis einer Retikulozytose ohne begleitende Anämie gelingt in den letzten Jahren durch geeignete Hämatologie-Analyse-Geräte häufiger. Die Suche nach auslösenden Ursache ist von wachsendem Interesse. Das Vorliegen von schweren zugrundeliegenden Erkrankungen wird ebenso wie der Einfluss von Katecholaminen und einer katecholaminbedingten Milzkontraktion sowie Glukokortikoiden diskutiert.

#### **Ziele der Studie**

Ziel dieser prospektiven Studie war der Nachweis des stimulierenden Einflusses von Kortisol auf die Retikulozytenzahl im peripheren Blut von erkrankten Hunden.

#### **Material und Methoden**

Zur Evaluation des Kurzzeiteffektes von Kortisol wurden hämatologische Untersuchungen bei Hunden durchgeführt, die einen ACTH-Stimulationstest als zusätzliches Diagnostikum während einer internistischen Aufarbeitung spezifischer Fragestellungen an der Klinik für Kleintiere – Innere Medizin der JLU Gießen erhielten. Den Tiere wurde zu diesem Zweck Tetracosactrin, ein synthetisches ACTH-Analogon, in der Dosierung von 5µg/kg intravenös verabreicht. Vor und 60 Minuten nach Stimulation wurden Blutproben zur Bestimmung einer vollständigen Hämatologie samt Retikulozytenzahl sowie zur Kortisolbestimmung entnommen. Die hämatologische Untersuchung erfolgte mit dem Hämatologie-Analysegerät ProCyte Dx<sup>®</sup>. Eine manuelle Kontrolle der Retikulozytenzählung erfolgte an Neumethylen-Blau-gefärbten Ausstrichen. Ausschlusskriterien waren ein unzureichendes Ansprechen auf das verabreichte Tetracosactrin und eine vorliegende Anämie.

## **Ergebnisse**

Nach Stimulation mit Tetracosactrin kam es zu einem signifikanten Anstieg des Plasma-Kortisol-Spiegels von  $3.91 \pm 2,66$  mg/dl bis  $11.41 \pm 3,94$  mg/dl ( $P < 0.0001$ ).

Erstaunlicherweise kam es zu einem signifikanten Abfall der peripheren Retikulozytenzahl von  $58.53 \times 10^9/l$  to  $47,32 \times 10^9/l$  ( $P = 0.0029$ ). Ein weiterer signifikanter Abfall konnte im Hinblick auf die Erthrozytenzahl ( $P = 0,0026$ ), den Hämatokrit ( $P < 0,0001$ ), das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) ( $P = 0,006$ ) sowie die Verteilungsbreite der erythrozytären Größe (RDW) ( $P = 0,006$ ) nachgewiesen werden. Die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) sank signifikant ab ( $P = 0,049$ ). Bezogen auf die Leukozyten kam es zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtleukozytenzahl ( $P = 0,029$ ) getragen von einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten ( $P = 0,0165$ ). Lymphozyten ( $P = 0,0034$ ) und eosinophile Granulozyten ( $P = 0,0077$ ) fielen signifikant ab. Die Leukozytenveränderungen stehen im Einklang mit einem Stressleukogramm. Zwei Hunden mit Synkopen und Dyspnoe im Vorbericht zeigten eine Retikulozytose ohne begleitende Anämie, die in beiden Fällen keine Beeinflussung durch Tetracosactrin zeigte.

## **Schlussfolgerung**

Ein Kurzzeiteffekt von Kortisol auf die periphere Retikulozytenzahl bei kranken, nicht anämischen Hunden konnte nicht nachgewiesen werden. Die basal höheren Retikulozytenzahlen sind möglicherweise einer Milzkontraktion in Folge von Aufregung oder körperlicher Belastung geschuldet.

## **6.2. CHr-Erhöhung: Vorkommenshäufigkeit und Ätiologie**

### **Hintergrund**

Der retikulozytäre Hämoglobingehalt (CHr) des Hämatologiegerätes ADVIA® 2120 von Siemens ist human- und tiermedizinisch ein etablierter Marker zur Diagnose einer eisendefizitären Hämatopoese und dementsprechend eines Eisenmangels; deutlich erniedrigte Werte unterhalb des Referenzbereiches sind bekannt. Wissenschaftliche Erkenntnisse zu der Vorkommenshäufigkeit, Ätiologie und klinischen Relevanz eines erhöhten CHr sind nicht existent.

### **Ziele der Studie**

Das Ziel des retrospektiven Teils der Arbeit war die Erstbeschreibung der Erhöhung des CHr bei Hunden. Augenmerk wurde auf die Vorkommenshäufigkeit und mögliche Ätiologien gelegt.

### **Material und Methoden**

Im Rahmen der retrospektiven Arbeit wurden die hämatologischen Untersuchungen von 26342 Hunden der Klinik für Kleintiere – Innere Medizin der JLU Gießen des Zeitraumes 2008-2013 hinsichtlich Retikulozytenzahl und CHr ausgewertet. Die hämatologische Untersuchung erfolgte bei allen Tieren mit dem Hämatologiegerät ADVIA® 2120 von Siemens. Eine Einteilung des CHr erfolgte nach Cut-Off-Werten in Tiere mit einem erhöhten CHr ( $>1,85\text{fmol/l}$ ), Tiere mit Hinweisen auf einen Eisenmangel ( $<1,29\text{fmol/l}$ ) sowie Tiere im intermediären Bereich ( $1,29\text{-}1,46$  und  $1,47\text{-}1,84\text{fmol/l}$ ). Eine exakte Begutachtung erfolgte bei den Hunden mit erhöhtem CHr im Hinblick auf zugrundeliegende Erkrankungen sowie Erythrozytenmorphologie anhand der maschinell erstellten Erythrogramme zur Detektion möglicher Artefakte und Erythromorphologie.

### **Ergebnisse**

Ein erhöhter CHr wurde bei nur 1,7% aller Messungen detektiert, hingegen war die Vorkommenshäufigkeit eines erniedrigten CHr mit 10,7% ähnlich der bisher beschriebenen Prävalenzen. Der Großteil dieser Tiere lag innerhalb des Referenzbereiches. Insgesamt wurde bei 53 Tieren ein CHr von  $>1,85\text{fmol/l}$  gefunden. Der mediane CHr dieser Hunde lag bei  $1,89\text{fmol/l}$  (Range  $1,85\text{-}2,39$ ).

Sehr hohe Werte über 2,0fmol/l waren selten. Der Großteil der Tiere zeigte eine regenerative Anämie mit einer medianen Retikulozytose von  $96,2 \times 10^9/l$  (Range 7,1-566,1). Nur bei 4% der Tiere konnte ein physiologischer Hämatokrit nachgewiesen werden. Im Median waren die Erythrozyten dieser Hunde grenzwertig makrozytär mit 73fl (Range 66,4-96,6) und im Mittel hypochrom (MCHCb  $19,99 \pm 1,49$ mmol/l). Eine Einteilung der Tiere erfolgte in Erkrankungen mit offensichtlichen Blutungen (19%), hämolytische Erkrankungen (11%), systemische Inflammationsreaktionen (15%), Neoplasien (17%), Nierenerkrankungen (21%) sowie andere Erkrankungen (17%). Hunde mit Neoplasien zeigten dabei die höchsten CHr-Werte. Bei Hunden mit Blutungsanämien und Hämolyse fanden sich signifikant höhere Retikulozytenwerte. Als Ursache der CHr-Erhöhung konnten hochgradige Retikulozytosen mit Makroretikulozyten, Artefakte (Agglutinatmessung, Fehlklassifizierung von Leukozyten, Heinz-Körperchen und weitere) sowie echte Makrozytosen auf Grund einer Dyserythropoese detektiert werden.

### **Schlussfolgerung**

Eine CHr-Erhöhung ist ein rares Phänomen und häufig mit gravierenden Grunderkrankungen vergesellschaftet. Bei Messung eines erhöhten CHr-Wertes sollten die Retikulozytenzahl, die erythrozytären Indizes und, wenn möglich graphische Darstellung der Erythrogramme bei der Interpretation mit einbezogen werden. Nach Ausschluss einer Retikulozytose und Artefaktmessung bleiben Makrozytosen in Folge einer möglichen Dyserythropoese als Ursache. Weitere Untersuchungen müssen die Eignung des erhöhten CHr als Parameter für eine mögliche Dyserythropoese bestätigen.

## 7 Summary

### 7.1. The influence of cortisol on the reticulocyte count in dogs

#### Background

Reticulocytosis in absence of anemia is of increasing interest in veterinary hematology and it has been attributed to often severe underlying diseases, whereby increased catecholamines and glucocorticoids are thought to trigger reticulocyte release.

#### Objectives

Our prospective study aimed at elucidating the impact of cortisol on reticulocyte counts in diseased dogs.

#### Methods

For evaluation of a short term cortisol effect, 15 client-owned and diseased dogs were enrolled undergoing an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation test with tetracosactrin, a synthetic ACTH analogue (5 µg/kg intravenously). Exclusion criteria were anemic states and the absence of an adequate cortisol response (i.e., presence of hypoadrenocorticism). Prior to and 60 minutes after stimulation, blood samples were taken for assessment of cortisol serum concentration as well as complete blood count (CBC) and reticulocyte count. CBC and reticulocytes were analyzed by the laser based hematology analyzer ProCyte Dx®. Reticulocyte measurements were confirmed by manual reticulocyte count.

#### Results

After stimulation with tetracosactrin, a significant increase in cortisol serum concentration from  $3.91 \pm 2,66$  mg/dL to  $11.41 \pm 3,94$  mg/dl ( $P < 0.0001$ ) was detected. Surprisingly, median reticulocyte count decreased significantly from  $58.53 \times 10^9/l$  to  $47,32 \times 10^9/l$  ( $P = 0.0029$ ) as well as values of red blood cells (RBC) ( $P = 0,0026$ ), hematocrit (Htc) ( $P < 0,0001$ ), mean corpuscular volume (MCV) ( $P = 0,006$ ), and red cell distribution width (RDW) ( $P = 0,0039$ ). Correlation of manual reticulocyte differentiation and automated counting was good ( $r_s = 0,82$ ). There was a mild increase in neutrophil ( $P = 0.0165$ ) as well as a decrease in

lymphocyte ( $P = 0.0034$ ) and eosinophil count ( $P = 0.0077$ ) consistent with a corticosteroid response. Two dogs with a history of syncope and dyspnea showed a reticulocytosis which was not influenced by the tetracosactrin-induced corticosteroid release.

### **Conclusion**

Short term release of reticulocytes in diseased and non anemic dogs is not triggered by glucocorticoids. The influence of excitement or intense exercise might lead to the increased reticulocyte counts due to splenic contraction pre tetracosactrin stimulation.

## 7.2. Elevated values of CHr: prevalence and etiology

### Background

The reticulocyte hemoglobin content (CHr) provided by the Siemens ADVIA® 2120 hematology analyzer is a well established parameter for detection of iron deficient hematopoiesis in humans and dogs characterized by decreased values. Information about the occurrence, interpretation and clinical utility of elevated values are scarce.

### Objectives

Our retrospective study aimed at elucidating the prevalence and potential etiologies of CHr above cut-off values in dogs. By this work, these conditions are now described for the first time in veterinary medicine.

### Methods

During retrospective workup hematology analyses of 26342 measurements of dogs evaluated in the Small Animal Clinic, Internal Medicine of JLU Giessen were elucidated with special regards to reticulocyte counts and CHr-values. Hematological investigations were performed using Siemens ADVIA® 2120. Classification of CHr was made by cut-off values, including dogs with high values of CHr ( $\geq 1.85\text{fmol/l}$ ), dogs with CHr values consistent with iron-deficient hematopoiesis ( $< 1.29\text{fmol/l}$ ), and dogs with intermediar values ( $1.29-1.46$  respective  $1.47-1.84\text{fmol/l}$ ). Dogs with elevated CHr's were evaluated for underlying diseases and morphology of mature erythrocytes for detection of artifacts and erythromorphology.

### Results

Elevated CHr values were detected in only 1.7% of cases, whereas declined measurements were seen in at least 10.7%, consistent with published prevalences. Majority of values lied inside the reference ranges. 53 dogs were diagnosed with a CHr  $\geq 1.85\text{fmol/l}$  with a median of  $1.89\text{fmol/l}$  (range  $1.85-2.39\text{fmol/l}$ ). Values above  $2.0\text{fmol/l}$  were uncommon. All but 3 patients showed anemia with reticulocytosis in median of  $96.2 \times 10^9/l$  (range  $7,1-566,1$ ). Median MCV was macrocytic ( $73\text{fl}$ , range  $66.4-96.6\text{fl}$ ), mean MCHC showed

hypochromasia ( $19,99 \pm 1,49\text{mmol/l}$ ). Classification of dogs was done with regards to underlying diseases: bleeding abnormalities (19%), hemolysis (11%), systemical inflammation (15%), neoplasia (17%), nephropathy (21%) and other conditions (17%). Dogs suffering from neoplasia showed highest values of CHr. A significant higher reticulocyte count was found in bleeding abnormalities and hemolysis. Possible causes for CHr values above cut-off were severe reticulocytosis due to macroreticulocytes, artifactual measurements (agglutination of erythrocytes, misclassification of leucocytes, Heinz-bodies and others) followed by primary and secondary dyserythropoiesis leading to macrocytosis.

### **Conclusion**

An increased CHr is a rare phenomenon and reflects serious underlying conditions. In case of measurement of elevated values, reticulocytosis, erythrocyte indices and the graphical RBC-/Retic-Report of the hematology analyzer have to be included in the assessment. When reticulocytosis and artifactual misclassifications are ruled out, primary or secondary macrocytosis due to dyserythropoiesis remains. Suitability of elevated CHr-counts for detection of dyserythropoiesis should be confirmed by further studies.

## 8 Literaturverzeichnis

Adams, G.B. and Scadden, D.T. 2006. The hematopoietic stem cell in its place. *Nature Immunology*, 7(4), pp.333–337.

Aglietta, M. et al. 1993. Interleukin-3 in-Vivo - Kinetic of Response of Target-Cells. *Blood*, 82(7), pp.2054–2061.

Aisen, P. and Listowsky, I. 1980. Iron Transport and Storage Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), pp.357–393.

Alleman, A.R. and Harvey, J.W. 1993. The morphological effects of vincristine sulfate on canine bone marrow cells. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 22(2), pp.36–41.

Amylon, M.D., Perrine, S.P. and Glader, B.E. 1986. Prednisone stimulation of erythropoiesis in leukemic children during remission. *American Journal of Hematology*, 23(2), pp.179–181.

An, X. and Mohandas, N. 2011. Erythroblastic islands, terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation. *International journal of hematology*, 93(2), pp.139–143.

Anonym 2012. *IDEXX ProCyte Dx\* Hematology Analyzer Operator`s Guide*. IDEXX.

Arkin, C.F. et al. 2004. *Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline - Second Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Aslan, K., Bozdemir, H., Unsal, C. and Güvenc, B. 2008. The effect of antiepileptic drugs on vitamin B12 metabolism. *International Journal of Laboratory Hematology*, 30(1), pp.26–35.

Barcroft, J. 1930. Some effects of emotion on the volume of the spleen. *The Journal of physiology*, 68(4), pp.375–382.

Barcroft, J. and Stephens, J.G. 1927. Observations upon the size of the spleen. *The Journal of physiology*, 64(1), pp.1–22.

Barron, P.M. and Wouda, R.M. 2008. Congenital Cobalamin Deficiency in Seven Beagle Puppies. *Australian Veterinary Practitioner*, 38(4), pp.126–132.

Battersby, I.A., Giger, U. and Hall, E.J. 2005. Hyperammonaemic encephalopathy secondary to selective cobalamin deficiency in a juvenile Border collie. *Journal of Small Animal Practice*, 46(7), pp.339–344.

Bauer, N. and Moritz, A. 2008. Evaluation of three methods for measurement of hemoglobin and calculated hemoglobin parameters with the ADVIA 2120 and ADVIA 120 in dogs, cats, and horses. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(2), pp.173–179.

- Behrend, E.N. et al. 2013. Diagnosis of Spontaneous Canine Hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), pp.1292–1304.
- Bennett, F. 2004. Unilateral renal cell carcinoma in a labrador retriever. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, 45(10), pp.860–862.
- Berendes, M. 1959. The proportion of reticulocytes in the erythrocytes of the spleen as compared with those of circulating blood, with special reference to hemolytic states. *Blood*, 14(5), pp.558–563.
- Bessis, M. 1973. *Living blood cells and their ultrastructure*. Springer Verlag.
- Bessmann, J.D. 1949. New methylene blue as a reticulocyte stain. *American Journal of Clinical Pathology*, 19(9), pp.895–895.
- Blue, J. and Weiss, L. 1981. Electron microscopy of the red pulp of the dog spleen including vascular arrangements, periarterial macrophage sheaths (ellipsoids), and the contractile, innervated reticular meshwork. *The American journal of anatomy*, 161(2), pp.189–218.
- Blue, J.T. 2016. Myelodysplasia: Differentiating Neoplastic from Nonneoplastic Syndromes of Ineffective Hematopoiesis in Dogs. *Toxicologic pathology*, 31(1), pp.44–48.
- Bondurant, M.C. and Koury, M.J. 1986. Anemia Induces Accumulation of Erythropoietin Messenger-Rna in the Kidney and Liver. *Molecular and Cellular Biology*, 6(7), pp.2731–2733.
- Bonfanti, U., Comazzi, S., Paltrinieri, S. and Bertazzolo, W. 2004. Stomatocytosis in 7 related Standard Schnauzers. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(4), pp.234–239.
- Braend, M. 1988. Hemoglobin Polymorphism in the Domestic Dog. *Journal of Heredity*, 79(3), pp.211–212.
- Broudy, V.C. et al. 1991. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*, 77(12), pp.2583–2590.
- Brown, D.E., Weiser, M.G. and Thrall, M.A. 1994. Erythrocyte indices and volume distribution in a dog with stomatocytosis. *Veterinary Pathology*, 34, pp.247–250.
- Brugnara, C. 1998. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *International journal of clinical & laboratory research*, 28(1), pp.1–11.
- Brugnara, C. and Mohandas, N. 2013. Red cell indices in classification and treatment of anemias. *Current Opinion in Hematology*, 20(3), pp.222–230.
- Brugnara, C. et al. 1994. Reticulocyte hemoglobin content (CHR): early indicator of iron deficiency and response to therapy. *Blood*, 83(10), pp.3100–3101.
- Canfield, P.J. and Watson, A.D. 1989. Investigations of bone marrow dyscrasia in

a poodle with macrocytosis. *Journal of Comparative Pathology*, 101(3), pp.269–278.

Car, B.D. 2010. The Hematopoietic System. In: K.J.W. Douglass Weiss, ed., *Schalm`s Veterinary Hematology*, 6 ed. pp.27–35.

Cesari, F., Sofi, F., Capalbo, A. and Pucci, N. 2009. Modifications of reticulocytes and reticulated platelets in sedentary healthy men after an acute episode of strenuous exercise. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7, p.261.

Chasis, J.A. 2006. Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 13(3), pp.137–141.

Chasis, J.A. and Mohandas, N. 2008. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*, 112(3), pp.470–478.

Chasis, J.A., Prenant, M., Leung, A. and Mohandas, N. 1989. Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. *Blood*, 74(3), pp.1112–1120.

Christian, J.A. 2010. Erythrokinetics and Erythrocyte Destruction. In: K.J.W. Douglass Weiss, ed., *Schalm`s Veterinary Hematology*, 6 ed. Wiley-Blackwell, pp.136–142.

Christopher, M.M., White, J.G. and Eaton, J.W. 1990. Erythrocyte Pathology and Mechanisms of Heinz Body-Mediated Hemolysis in Cats. *Veterinary pathology*, 27(5), pp.299–310.

Come, S.E. and Shoheit, S.B. 1971. Fate of stress reticulocytes - hemolysis or fragmentation. *The journal of clinical investigation*. JOURNAL OF ..., p.21a.

Come, S.E., Shoheit, S.B. and Robinson, S.H. 1972. Surface remodelling of reticulocytes produced in response to erythroid stress. *Nature New Biology*, 236, pp.157–158.

Cook, S.M. and Lothrop, C.D. 1994. Serum Erythropoietin Concentrations Measured by Radioimmunoassay in Normal, Polycythemic, and Anemic Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(1), pp.18–25.

Coulombel, L., Tchernia, G. and Mohandas, N. 1979. Human Reticulocyte Maturation and Its Relevance to Erythropoietic Stress. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 94(3), pp.467–474.

Couto, C.G., Boudrieau, R.J. and Zanjani, E.D. 1989. Tumor-Associated Erythrocytosis in a Dog With Nasal Fibrosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3(3), pp.183–185.

Cowgill, E.S., Neel, J.A. and Grindem, C.B. 2003. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*, 33(6), pp.1223–1244.

Crichton, R.R. and Charlotheaux-Wauters, M. 1987. Iron transport and storage. *European journal of biochemistry*, 164(3), pp.485–506.

- Crosby, W.H. 1977. Splenic remodeling of red cell surfaces. *Blood*, 50(4), pp.643–645.
- d'Onofrio, G. et al. 1995. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood*, 85(3), pp.818–823.
- Dameshek, W. 1932. A method for the simultaneous enumeration of blood platelets and reticulocytes: with consideration of the normal blood platelet count in men and in women. *Archives of Internal Medicine*, 50(4), pp.579–589.
- Degen, M. 1987. Pseudohyperkalemia in Akitas. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190(5), pp.541–543.
- DeNicola, D.B., Russell, J. and Burger, S. 2011. Automated Reticulocyte Counts From Anemic And Nonanemic Dogs On The Idexx Procyte Dx Hematology Analyzer. *Veterinary Clinical Pathology*, 40 (4), pp.576–577.
- Deuel, J.W., Lutz, H.U., Misselwitz, B. and Goede, J.S. 2012. Asymptomatic elevation of the hyperchromic red blood cell subpopulation is associated with decreased red cell deformability. *Annals of Hematology*, 91(9), pp.1427–1434.
- Donovan, A. et al. 2005. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism*, 1(3), pp.191–200.
- Dornfest, B.S. and Cooper, G.W. 1968. Effect of erythropoietin on reticulocyte release from the isolated perfused rat spleen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 149(1), pp.249–256.
- Durno, A.S., Webb, J.A., Gauthier, M.J. and Bienzle, D. 2011. Polycythemia and Inappropriate Erythropoietin Concentrations in Two Dogs with Renal T-cell Lymphoma. *dx.doi.org*, 47(2), pp.122–128.
- Eckardt, K.U. 1996. Erythropoietin production in liver and kidneys. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 5(1), p.28.
- Eckardt, K.U. et al. 1993. Distribution of Erythropoietin (Epo) Producing Cells in Rat Kidneys During Hypoxic Hypoxia. *Kidney International*, 44(1), pp.238–238.
- Elenes, N.A., Ewald, R.A. and Crosby, W.H. 1964. The reservoir function of the spleen and its relation to postsplenectomy anemia in the dog. *Blood*, 24, pp.299–304.
- Eshghi, S. et al. 2007.  $\alpha 4\beta 1$  integrin and erythropoietin mediate temporally distinct steps in erythropoiesis: integrins in red cell development. *The Journal of Cell Biology*, 177(5), pp.871–880.
- Felli, N. et al. 2005. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *Journal of Immunology*, 175(3), pp.1464–1472.
- Fishbane, S. 1999. Is there material hazard to treatment with intravenous iron? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14(11), pp.2595–2598.

- Fisher, J.W. 2003. Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update. *Experimental Biology and Medicine*, 228(1), pp.1–14.
- Fisher, J.W., Koury, S., Ducey, T. and Mendel, S. 1996. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *British Journal of Haematology*, 95(1), pp.27–32.
- Flygare, J. et al. 2011. HIF1 synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal. *Blood*, 117(12), pp.3435–3444.
- Fordyce, H.H., Callan, M.B. and Giger, U. 2000. Persistent cobalamin deficiency causing failure to thrive in a juvenile beagle. *Journal of Small Animal Practice*, 41(9), pp.407–410.
- Frank, L.A., DeNovo, R.C., Kraje, A.C. and Oliver, J.W. 2000. Cortisol concentrations following stimulation of healthy and adrenergic dogs with two doses of tetracosactin. *The Journal of small animal practice*, 41(7), pp.308–311.
- Fry, M.M. 2010. Anemia of inflammatory, neoplastic, renal, and endocrine diseases. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 6 ed. Wiley-Blackwell, pp.246–250.
- Fry, M.M. and Kirk, C.A. 2006. Reticulocyte indices in a canine model of nutritional iron deficiency. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(2), pp.172–181.
- Fuchs, J. 2017. *Reticulocytosis in non-anemic patients and reticulocyte hemoglobin content (Ret-He) - a new diagnostic parameter in dogs*. Inaugural Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, ISBN: 978-3-8359-6558-4 .
- Fujino, Y. et al. 2013. Development and Evaluation of a Novel In-Clinic Automated Hematology Analyzer, ProCyte Dx, for Canine Erythrocyte Indices, Leukogram, Platelet Counts and Reticulocyte Counts. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(11), pp.1519–1524.
- Furlanello, T. et al. 2006. Artfactual changes in canine blood following storage, detected using the ADVIA 120 hematology analyzer. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), pp.42–46.
- Fyfe, J.C. et al. 2014. Selective Intestinal Cobalamin Malabsorption with Proteinuria (Imerslund-Gräsbeck Syndrome) in Juvenile Beagles. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), pp.356–362.
- Ganz, T. 2006. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2006(1), pp.29–35– 507.
- Gavazza, A., Rispoli, D., Bernabò, N. and Lubas, G. 2012. Retrospective and observational investigation of canine microcytosis in relationship to sex, breed, diseases, and other complete blood count parameters. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5), pp.545–553.
- Geiger, H.B., Song, S.H. and Groom, A.C. 1976. Release of red cells from the

- slowly-exchanging splenic pool after noradrenaline administration. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(4), pp.477–484.
- Géminard, C., de Gassart, A. and Vidal, M. 2002. Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release. *Biocell*, 26(2), pp.205–215.
- Gifford, S.C. et al. 2006. A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: from reticulocyte maturation to erythrocyte senescence. *British Journal of Haematology*, 135(3), pp.395–404.
- Giger, U. 1992. Erythropoietin and Its Clinical Use. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 14(1), pp.25–34.
- Goldmann, F., Bauer, N. and Moritz, A. 2014. Evaluation of the IDEXX ProCyte Dx analyzer for dogs and cats compared to the Siemens ADVIA 2120 and manual differential. *Comparative Clinical Pathology*, 23(2), pp.283–296.
- Goodnough, L.T. 2012. Iron deficiency syndromes and iron-restricted erythropoiesis (CME). *Transfusion*, 52(7), pp.1584–1592.
- Gorse, M.J. 1988. Polycythemia associated with renal fibrosarcoma in a dog. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(6), pp.793–794.
- Grimes, C.N. and Fry, M.M. 2014. Customization of Advia 120 thresholds for canine erythrocyte volume and hemoglobin concentration, and effects on morphology flagging results. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, 55(12), pp.1173–1179.
- Gronowicz, G., Swift, H. and Steck, T.L. 1984. Maturation of the reticulocyte in vitro. *Journal of cell science*, 71, pp.177–197.
- Groom, A.C. and Song, S.H. 1971. Effects of norepinephrine on washout of red cells from the spleen. *The American journal of physiology*, 221(1), pp.255–258.
- Guelfi, J.F., Courdouhji, M.K. and Alvinerie, M. 1985. In vivo and in vitro effects of three glucocorticoids on blood leukocyte chemotaxis in the dog. *Veterinary immunology and immunopathology*, 10(2-3), pp.245–252.
- Guenechea, G., Gan, O.I., Dorrell, C. and Dick, J.E. 2001. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nature Immunology*, 2(1), pp.75–82.
- Haase, V.H. 2013. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews*, 27(1), pp.41–53.
- Harrison, P.M., Treffry, A. and Lilley, T.H. 1986. Ferritin as an Iron-Storage Protein - Mechanisms of Iron Uptake. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 27(4), pp.287–293.
- Harvey, J.W. 2012. *Veterinary Hematology - A diagnostic guide and color atlas*. Elsevier Saunders.

- He, Q. et al. 2005. Amnionless function is required for cubilin brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B12) absorption in vivo. *Blood*, 106(4), pp.1447–1453.
- Hodges, J. and Christopher, M.M. 2011a. Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(11), pp.1452–1458.
- Hodges, J. and Christopher, M.M. 2011b. Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(11), pp.1452–1458.
- Horvath, S.J. et al. 2014a. Effects of racing on reticulocyte concentrations in Greyhounds. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 43(1), pp.15–23.
- Horvath, S.J. et al. 2014b. Effects of racing on reticulocyte concentrations in Greyhounds. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(1), pp.15–23.
- ICSH, C.F.S.I.H. 1992. *ICSH guidelines for reticulocyte counting by microscopy on supravivally stained preparations*.
- Kaferle, J. and Strzoda, C.E. 2009. Evaluation of Macrocytosis. *American Family Physician*, 79(3), pp.203–208.
- Kaushansky, K. et al. 1995. Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 96(3), pp.1683–1687.
- Kerl, M.E. et al. 1999. Evaluation of a low-dose synthetic adrenocorticotrophic hormone stimulation test in clinically normal dogs and dogs with naturally developing hyperadrenocorticism. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214(10), pp.1497–1501.
- King, L.G., Giger, U., Diserens, D. and Nagode, L.A. 1992. Anemia of chronic renal failure in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6(5), pp.264–270.
- Kitchen, H. 1969. Heterogeneity of animal hemoglobins. *Advances in veterinary science and comparative medicine*, 13, pp.247–330.
- Koepke, J.A. et al. 1997. *Methods for reticulocyte counting (flow cytometry and supravital dyes): approved guideline*. NCCLS document H44-A.
- Kook, P.H. et al. 2015. Hepatic fungal infection in a young beagle with unrecognised hereditary cobalamin deficiency (Imerslund-Gräsbeck syndrome). *The Journal of small animal practice*, 56(2), pp.138–141.
- Lafferty, J.D., Crowther, M.A., Ali, M.A. and Levine, M. 1996. The Evaluation of Various Mathematical RBC Indices and Their Efficacy in Discriminating Between Thalassemic and Non-Thalassemic Microcytosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 106(2), pp.201–205.
- Latimer, K.S. and Rakich, P.M. 1989. Clinical interpretation of leukocyte

- responses. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*, 19(4), pp.637–668.
- Lawen, A. and Lane, D.J.R. 2013. Mammalian Iron Homeostasis in Health and Disease: Uptake, Storage, Transport, and Molecular Mechanisms of Action. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(18), pp.2473–2507.
- Leberbauer, C. 2005. Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood*, 105(1), pp.85–94.
- Lee, G. 2002. Novel secreted isoform of adhesion molecule ICAM-4: potential regulator of membrane-associated ICAM-4 interactions. *Blood*, 101(5), pp.1790–1797.
- Lindern, von, M. et al. 1999. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood*, 94(2), pp.550–559.
- Linnebank, M. et al. 2011. Antiepileptic drugs interact with folate and vitamin B12 serum levels. *Annals of Neurology*, 69(2), pp.352–359.
- Liu, Q., Davidoff, O., Niss, K. and Haase, V.H. 2012. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *Journal of Clinical Investigation*, 122(12), pp.4635–4644.
- Londeree, B.R. and Allaire, T. 1969. Reticulocyte counts before and after exercise: trained vs. sedentary. *Internationale Zeitschrift für angewandte Physiologie, einschliesslich Arbeitsphysiologie*, 27(3), pp.226–229.
- Lutz, S., Sewell, A.C., Reusch, C.E. and Kook, P.H. 2013. Clinical and Laboratory Findings in Border Collies with Presumed Hereditary Juvenile Cobalamin Deficiency. *dx.doi.org*, 49(3), pp.197–203.
- Lux, S.E. and John, K.M. 1977. Isolation and partial characterization of a high molecular weight red cell membrane protein complex normally removed by the spleen. *Blood*, 50(4), pp.625–641.
- Majka, M. et al. 2001. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*, 97(10), pp.3075–3085.
- Major, A. et al. 1997. The effect of intravenous iron on the reticulocyte response to recombinant human erythropoietin. *British Journal of Haematology*, 98(2), pp.292–294.
- Marković, M., Majkić-Singh, N., Subota, V. and Mijusković, Z. 2004. Reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency anemia. *Clinical laboratory*, 50(7-8), pp.431–436.
- Maruyama, S. et al. 2001. Red blood cell status in alcoholic and non-alcoholic liver disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 138(5), pp.332–337.

- Mast, A.E. et al. 2002. Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*, 99(4), pp.1489–1491.
- Mast, A.E., Blinder, M.A. and Dietzen, D.J. 2008. Reticulocyte hemoglobin content. *American Journal of Hematology*, 83(4), pp.307–310.
- Mel, H.C., Prenant, M. and Mohandas, N. 1977. Reticulocyte motility and form: studies on maturation and classification. *Blood*, 49(6), pp.1001–1009.
- Meléndez-Lazo, A. et al. 2015. Evaluation of the Relationship between Selected Reticulocyte Parameters and Inflammation determined by Plasma C-reactive Protein in Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 152(4), pp.304–312.
- Metzger, F., Christian, J.A. and DeNicola, D.B. 2011. Canine Reticulocyte Dynamics Surrounding Anesthetic Events. *Veterinary Clinical Pathology*. *Veterinary Clinical ...*, p.582.
- Mims, M.P. and Prchal, J.T. 2005. Divalent metal transporter 1. *Hematology*, 10(4), pp.339–345.
- Miyagawa, S.-I. et al. 2000. Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. *British Journal of Haematology*, 109(3), pp.555–562.
- Morgan, L.W. and McConnell, J. 1999. Cobalamin deficiency associated with erythroblastic anemia and methylmalonic aciduria in a border collie. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(5), pp.392–395.
- Morici, G. 2005. Supramaximal exercise mobilizes hematopoietic progenitors and reticulocytes in athletes. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(5), pp.R1496–R1503.
- Moritz, A. et al. 2004. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), pp.32–38.
- Morley, A. and Stohlman, F. 1969. Erythropoiesis in the Dog: The Periodic Nature of the Steady State. *Science*, 165(3897), pp.1025–1027.
- Munugalavadla, V. and Kapur, R. 2005. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 54(1), pp.63–75.
- Muta, K. and Krantz, S.B. 1995. Inhibition of heme synthesis induces apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, 163(1), pp.38–50.
- Muta, K., Krantz, S.B., Bondurant, M.C. and Wickrema, A. 1994. Distinct Roles of Erythropoietin, Insulin-Like Growth-Factor-I, and Stem-Cell Factor in the Development of Erythroid Progenitor Cells. *Journal of Clinical Investigation*, 94(1), pp.34–43.
- Nangaku, M. and Eckardt, K.-U. 2006. Pathogenesis of renal anemia. *Seminars in Nephrology*, 26(4), pp.261–268.
- Neiger, R., Hadley, J. and Pfeiffer, D.U. 2002. Differentiation of dogs with

- regenerative and non-regenerative anaemia on the basis of their red cell distribution width and mean corpuscular volume. *The Veterinary record*, 150(14), pp.431–434.
- Ney, P.A. 2011. Normal and disordered reticulocyte maturation. *Current Opinion in Hematology*, 18(3), pp.152–157.
- Nitsche, E.K. 2004. Erythrocytosis in dogs and cats: diagnosis and management. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 26(2), pp.104–118.
- Noble, N.A., Xu, Q.P. and Hoge, L.L. 1990. Reticulocytes II: Reexamination of the in vivo survival of stress reticulocytes. *Blood*, 75(9), pp.1877–1882.
- O'Keefe, D.A. and Couto, C.G. 1987. Fine-needle aspiration of the spleen as an aid in the diagnosis of splenomegaly. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1(3), pp.102–109.
- Olver, C.S. 2010. Erythropoiesis. In: K.J.W. Douglass Weiss, ed., *Schalm's Veterinary Hematology*, 6 ed. Wiley-Blackwell, pp.36–42.
- Olver, C.S., Andrews, G.A., Smith, J.E. and Kaneko, J. 2010. Erythrocyte Structure and Function. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 6 ed. Wiley-Blackwell, pp.123–130.
- Paltrinieri, S. et al. 2007. Stomatocytosis of Standard Schnauzers is not associated with stomatin deficiency. *The Veterinary Journal*, 173(1), pp.200–203.
- Paltrinieri, S. et al. 2016. Sensitivity and specificity of manual and automated measurements of reticulocyte parameters for classification of anemia in dogs: 174 cases (1993-2013). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 249(7), pp.776–786.
- Patel, V.P. and Lodish, H.F. 1987. A fibronectin matrix is required for differentiation of murine erythroleukemia cells into reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 2), pp.3105–3118.
- Patel, V.P., Ciechanover, A., Platt, O. and Lodish, H.F. 1985. Mammalian Reticulocytes Lose Adhesion to Fibronectin During Maturation to Erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(2), pp.440–444.
- Pattullo, K.M., Kidney, B.A., Taylor, S.M. and Jackson, M.L. 2014. Reticulocytosis in nonanemic dogs: increasing prevalence and potential etiologies. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(1), pp.26–36.
- Pattullo, K.M., Kidney, B.A., Taylor, S.M. and Jackson, M.L. 2015. Reticulocytosis in nonanemic dogs: increasing prevalence and potential etiologies. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 44(1), pp.26–36.
- Perkins, P.C., Grindem, C.B. and Cullins, L.D. 1995. Flow cytometric analysis of punctate and aggregate reticulocyte responses in phlebotomized cats. *American*

*Journal of Veterinary Research*, 56(12), pp.1564–1569.

Petersen, K., Hale, B.R. and Wallace, M.R. 2005. Macrocytosis After Nucleoside-Containing HIV Treatment Regimens. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 13(2), p.65.

Piva, E., Brugnara, C., Chiandetti, L. and Plebani, M. 2015. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(10), pp.1–12.

Ponka, P., Beaumont, C. and Richardson, D.R. 1998. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Seminars in hematology*, 35(1), pp.35–54.

Prins, M., van Leeuwen, M.W. and Teske, E. 2009. Stability and reproducibility of ADVIA 120-measured red blood cell and platelet parameters in dogs, cats, and horses, and the use of reticulocyte haemoglobin content (CHR) in the diagnosis of iron deficiency. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 134(7), pp.272–278.

Radakovich, L.B., Santangelo, K.S. and Olver, C.S. 2015. Reticulocyte hemoglobin content does not differentiate true from functional iron deficiency in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(4), pp.511–518.

Randolph, J.F., Peterson, M.E. and Stokol, T. 2010. Erythrocytosis and Polycythemia. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. Wiley-Blackwell, pp.162–166.

Reagan, W.J., Vap, L.M. and Weiser, M.G. 2016. Flow Cytometric Analysis of Feline Reticulocytes. *Veterinary pathology*, 29(6), pp.503–508.

Rhodes, M.M. et al. 2008. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood*, 111(3), pp.1700–1708.

Rieu, S. et al. 2000. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin  $\alpha 4\beta 1$ . *The FEBS Journal*, 267(2), pp.583–590.

Riley, R.S., Ben-Ezra, J.M., Goel, R. and Tidwell, A. 2001. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 15(5), pp.267–294.

Roy, C.N. 2010. Anemia of inflammation. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2010(1), pp.276–280.

Rusten, L.S. and Jacobsen, S.E. 1995. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*, 85(4), pp.989–996.

Sato, K., Hikasa, Y., Morita, T. and Shimada, A. 2002. Secondary erythrocytosis associated with high plasma erythropoietin concentrations in a dog with cecal leiomyosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(4), pp.486–490.

Sato, T. et al. 2000. Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin. *Journal of Clinical Investigation*, 106(2), pp.263–270.

- Schaefer, D.M.W. and Stokol, T. 2014. 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), pp.109–119.
- Schaefer, D.M.W. and Stokol, T. 2016. Retrospective study of reticulocyte indices as indicators of iron-restricted erythropoiesis in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 28(3), pp.304–308.
- Schallier, D. et al. 2009. Tyrosine Kinase Inhibitor-induced Macrocytosis. *Anticancer Research*, 29(12), pp.5225–5228.
- Schultze, A.E. 2000. Interpretation of canine leukocyte responses. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 6 ed. Wiley-Blackwell, pp.321–334.
- Schumacher, Y. et al. 2010. Diurnal and Exercise-Related Variability of Haemoglobin and Reticulocytes in Athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 31(04), pp.225–230.
- Siemens 2005. *ADVIA® Hematology System Bedienungsanleitung*. Siemens Healthcare.
- Siemens 2009. *ADVIA® 2120i/2120/120 Trainingshandbuch*. Siemens Healthcare.
- Simpson, K.W. et al. 1997. Iron Status and Erythrocyte Volume in Dogs With Congenital Portosystemic Vascular Anomalies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(1), pp.14–19.
- Sjogren, U., Thysell, H. and Lindholm, T. 1981. Bone Marrow Morphology in Patients in Long-Term Treatment with Azathioprine. *European Journal of ...*
- Snead, E.C. 2005. A case of bilateral renal lymphosarcoma with secondary polycythaemia and paraneoplastic syndromes of hypoglycaemia and uveitis in an English Springer Spaniel. *Veterinary and comparative oncology*, 3(3), pp.139–144.
- Song, S.H. and Groom, A.C. 1971. Immature and abnormal erythrocytes present in the normal, healthy spleen. *Scandinavian journal of haematology*, 8(6), pp.487–493.
- Song, S.H. and Groom, A.C. 1972. Sequestration and possible maturation of reticulocytes in the normal spleen. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, (50), pp.400–406.
- Song, S.H. and Groom, A.C. 1974. Scanning electron microscope study of the splenic red pulp in relation to the sequestration of immature and abnormal red cells. *Journal of morphology*, 144(4), pp.439–451.
- Sorbie, J. and Valberg, L.S. 1970. Splenic sequestration of stress erythrocytes in the rabbit. *The American journal of physiology*, 218(3), pp.647–653.
- Spring, F.A. et al. 2001. Intercellular adhesion molecule-4 binds alpha(4)beta(1)

and alpha(V)-family integrins through novel integrin-binding mechanisms. *Blood*, 98(2), pp.458–466.

Stein, R.S., Abels, R.I. and Krantz, S.B. 1991. Pharmacologic doses of recombinant human erythropoietin in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Blood*, 78(7), pp.1658–1663.

Steinberg, J.D. and 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), pp.23–27.

Stewart, I.B. and McKenzie, D.C. 2002. The human spleen during physiological stress. *Sports Medicine*, 32(6), pp.361–369.

Stohlman, F., Howard, D. and Beland, A. 1963. Humoral regulation of the erythropoiesis. XII. Effect of the erythropoietin and iron on cell size in iron deficiency anemia. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 113, pp.986–988.

Telen, M.J. 2005. Erythrocyte Adhesion Receptors: Blood Group Antigens and Related Molecules. *Transfusion medicine reviews*, 19(1), pp.32–44.

Thomas, C. and Thomas, L. 2002. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clinical chemistry*, 48(7), pp.1066–1076.

Thomas, C. and Thomas, L. 2005. Anemia of Chronic Disease: Pathophysiology and Laboratory Diagnosis. *Laboratory Hematology*, 11(1), pp.14–23.

Thomas, L. 2012a. Erythrozyten. In: *Labor und Diagnose*, 8 ed. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, pp.818–826.

Thomas, L. 2012b. Retikulozytenzahl und -indices. In: *Labor und Diagnose*, 8 ed. pp.852–861.

Thomas, L. et al. 2005. Reticulocyte hemoglobin measurement – comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 43(11), pp.1193–1202.

Traugh, J.A. 1989. Heme Regulation of Hemoglobin-Synthesis. *Seminars in hematology*, 26(1), pp.54–62.

Ullrich, C. et al. 2005. Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content. *JAMA*, 294(8), pp.924–930.

Vap, L.M., Thrall, M.A. and Weiser, M.G. 2001. *Artifactual macrocytosis in dogs and cats*. Vet. Clin. Pathol.

Velasco-Rodríguez, D. et al. 2016. Reticulocyte parameters of delta beta thalassaemia trait, beta thalassaemia trait and iron deficiency anaemia. *Journal of clinical pathology*, 69(2), pp.149–154.

Verfaillie, C., Hurley, R., Bhatia, R. and McCarthy, J.B. 1994. Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 16(3), pp.201–224.

Verfaillie, C.M. 1998. Adhesion Receptors as Regulators of the Hematopoietic Process. *Blood*, 92(8), pp.2609–2612.

Vuillet-Gaugler, M.H. et al. 1990. Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation. *Blood*, 75(4), pp.865–873.

Warlick, E.D. and Smith, B.D. 2007. Myelodysplastic syndromes: Review of pathophysiology and current novel treatment approaches. *Current Cancer Drug Targets*, 7(6), pp.541–558.

Watson, A.D. and Canfield, P.J. 1988. Macrocytosis in poodles--appeal for cases. *Australian veterinary journal*, 65(8), p.260.

Waugh, R.E. et al. 2001. Membrane instability in late-stage erythropoiesis. *Blood*, 97(6), pp.1869–1875.

Weiss, D.J. 2010a. Congenital Dyserythropoiesis. In: *Schalm`s Veterinary Hematology*, 6 ed. Wiley-Blackwell, pp.196–198.

Weiss, D.J. 2010b. Myelodysplastic Syndromes. In: *Schalm`s Veterinary Hematology*, 6 ed. Wiley-Blackwell, pp.467–474.

Weiss, D.J. and Aird, B. 2001. Cytologic evaluation of primary and secondary myelodysplastic syndromes in the dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 30(2), pp.67–75.

Weiss, D.J. and Reidarson, T.H. 1989. Idiopathic Dyserythropoiesis in a Dog. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 18(2), pp.43–46.

Weiss, L. 1976. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *The Anatomical record*, 186(2), pp.161–184.

Weissert, D. 2011. *Lasergestützte Erythrozytenanalyse (ADVIA® 120 und LaserCyte®) bei Hund und Katze mit Auswertung der Erythrozytenmorphologie*. Inaugural Dissertation, pp.1–183. Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, ISBN: 978-3-8359-5779-4

Wessely, O., Deiner, E.M., Beug, H. and vonLindern, M. 1997. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *Embo Journal*, 16(2), pp.267–280.

Wintrobe, M.M. 1934. Anemia: Classification and treatment on the basis of differences in the average volume and hemoglobin content of the red corpuscles. *Archives of Internal Medicine*, 54(2), pp.256–280.

Wintrobe, M.M. 1932. *The size and hemoglobin content of the erythrocyte. Methods of determination and clinical application. The Journal of laboratory and*

*clinical medicine*, The Journal of laboratory and clinical medicine, 17, pp.899–912.

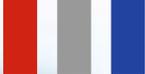
Zaldívar-López, S. et al. 2011. Clinical pathology of Greyhounds and other sighthounds. *Veterinary Clinical Pathology*, 40 (4), pp.414-425.

## 9 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde 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.



Arne Güssow



*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: 978-3-8359-6579-9



9 783835 196579 9