

**Masarykova univerzita**  
Přírodovědecká fakulta  
Ústav experimentální biologie  
Oddělení fyziologie a imunologie živočichů

**Studium hematologických a biochemických parametrů  
krve koček (*Felis catus*)**

Bakalářská práce

2009

Autor: Petra Celá  
Vedoucí práce: Mgr. Jana Benešová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Brně dne:

Podpis:

### Poděkování

Děkuji Mgr. Janě Benešové, vedoucí mé bakalářské práce, za cenné rady, připomínky a podporu při zpracování daného tématu, a také za spolupráci Mgr. Monice Duškové, Ph.D.

# OBSAH

ABSTRAKT .....	6
1. ÚVOD.....	7
2. HEMATOPOÉZA .....	8
2.1. Vývoj hematopoézy .....	8
2.2. Tvorba erytrocytů .....	10
2.3. Tvorba granulocytů .....	10
2.4. Tvorba lymfocytů .....	11
2.5. Tvorba monocytů.....	12
2.6. Vznik megakaryocytů a tvorba trombocytů .....	12
3. KREV A JEJÍ SLOŽKY .....	13
3.1. Krevní buňky .....	13
3.1.1. Erytrocyty .....	13
3.1.1.1. Abnormality červených krvinek .....	14
3.1.2. Leukocyty .....	18
3.1.2.1. Granulocyty .....	18
3.1.2.1.1. Neutrofilní granulocyt .....	18
3.1.2.1.2. Eozinofilní granulocyt.....	19
3.1.2.1.3. Bazofilní granulocyt .....	19
3.1.2.2. Agranulocyty .....	20
3.1.2.2.1. Lymfocyty .....	20
3.1.2.2.2. Monocyty.....	21
3.1.2.3. Abnormality bílých krvinek .....	22
3.1.3. Trombocyty .....	23
3.2. Krevní plazma.....	25
3.2.1. Nízkomolekulární složky krve .....	25
3.2.1.1. Monosacharidy .....	25
3.2.1.2. Lipidy .....	26
3.2.1.2.1. Triacylglyceroly (TAG).....	26
3.2.1.2.2. Cholesterol a jeho estery .....	26
3.2.1.3. Dusíkaté látky .....	27
3.2.1.3.1. Amoniak a močovina.....	27
3.2.1.3.2. Kreatin a kreatinin .....	27
3.2.1.3.3. Kyselina močová .....	27
3.2.1.4. Bilirubin.....	27
3.2.2. Vysokomolekulární složky krevní plazmy .....	28
3.2.2.1. Proteiny.....	28
3.2.2.1.1. Albumin.....	28
3.2.2.1.2. Globuliny.....	28
3.2.2.2. Lipoproteiny .....	29

3.2.2.3.	Enzymy .....	29
3.2.2.3.1.	Aspartátaminotransferáza (AST) .....	29
3.2.2.3.2.	Alaninaminotransferáza (ALT) .....	30
3.2.2.3.3.	Alkalická fosfatáza (ALP) .....	30
3.2.2.3.4.	Další enzymy .....	30
4.	HEMATOLOGICKÉ PARAMETRY KRVE KOČEK .....	31
4.1.	Červený krevní obraz .....	31
4.1.1.	Hematokrit .....	31
4.1.2.	Množství hemoglobinu .....	31
4.1.3.	Počet erytrocytů .....	31
4.1.4.	Počet retikulocytů .....	32
4.1.5.	Morfologie erytrocytů .....	32
4.1.6.	Sedimentace erytrocytů .....	33
4.2.	Bílý krevní obraz .....	33
4.2.1.	Počet leukocytů .....	33
4.2.2.	Diferenciální krevní obraz .....	34
4.2.2.1.	Počet neutrofilů .....	34
4.2.2.2.	Počet eozinofilů .....	34
4.2.2.3.	Počet bazofilů .....	35
4.2.2.4.	Počet lymfocytů .....	35
4.2.2.5.	Počet monocytů .....	35
4.3.	Počet trombocytů .....	35
5.	BIOCHEMICKÉ PARAMETRY KRVE KOČEK .....	36
5.1.	Monosacharidy .....	36
5.2.	Lipidy .....	36
5.3.	Dusíkaté látky .....	37
5.4.	Bilirubin .....	37
5.5.	Celková bílkovina .....	37
5.6.	Enzymy .....	38
6.	VYŠETŘENÍ KRVE KOČEK .....	39
6.1.	Referenční hodnoty vybraných parametrů u kočky .....	41
7.	ZÁVĚR .....	42
	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....	43
	SEZNAM ZKRATEK .....	44
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	46

## **ABSTRAKT**

Kočka domácí (*Felis catus*) je jedno z nejčastěji chovaných domácích zvířat. Proto je důležitý rozvoj veterinárního lékařství, jehož znalosti se stále zdokonalují díky nejnovějším výzkumům. Je potřeba, aby v případě zhoršeného zdravotního stavu zvířete byla provedena správná diagnóza a poskytnuta účinná léčba. Kočka může být postižena nejrůznějšími chorobami, které lze většinou odhalit pomocí vyšetření krve. To je zaměřeno jak na krevní buňky, tak na biochemické složení plazmy. Stanovení vybraných parametrů a porovnání získaných a referenčních hodnot poukáže na odchylky, které značí určité onemocnění. Tato analýza pomůže zvolit pro kočku vhodnou léčbu.

## **ABSTRACT**

Domestic cat (*Felis catus*) is one of the mostly often kept domestic animals. Hence the development of veterinary medicine is highly important. The knowledge has been still improved by up-to-date research. In case of impaired health state is necessary to carry out an appropriate treatment. Cats may be affected by various diseases which are possible to be disclosed by blood examination. That is focused both on blood cells and plasma biochemical structure. Assessment of selected parameters and comparison of obtained and referential values point out any abnormality, which may mean a specific disease. This analysis can help to choose an appropriate treatment of a cat.

# 1. ÚVOD

Kočka domácí (*Felis catus*) se pro svou vysokou inteligenci a charakterové vlastnosti stává čím dál více přítelem a společníkem člověka. S oblibou kočky jako domácího mazlíčka roste i potřeba kvalitní veterinární péče. Stejně jako lidé, i kočky mohou trpět nejrůznějšími chorobami, které však většinou nejsou na první pohled zjevné. Často je proto potřeba provést důkladné vyšetření krve, zaměřené jak na krevní elementy tak na složení plazmy. Veškeré krevní složky jsou v krvi přítomné v určitém fyziologickém rozmezí, jehož překročení bývá známkou onemocnění. Ze souboru stanovených hematologických a biochemických parametrů lze určit jakou chorobou je zvíře postiženo.

Cílem této bakalářské práce je shrnutí dané problematiky se zaměřením na specifika u koček. První část je zaměřena na vznik a vývoj krevních buněk. Ve druhé kapitole jsou uvedeny druhy krevních buněk, jejich hlavní funkce a případné abnormality. Další část podává charakteristiku složek krevní plazmy. Následně jsou popsány hematologické a biochemické parametry s nečastějšími příčinami odchylek od fyziologických hodnot. Poslední kapitola popisuje vyšetření krve kočky a uvádí referenční rozmezí pro vybrané parametry.

## 2. HEMATOPOÉZA

### 2.1. Vývoj hematopoézy

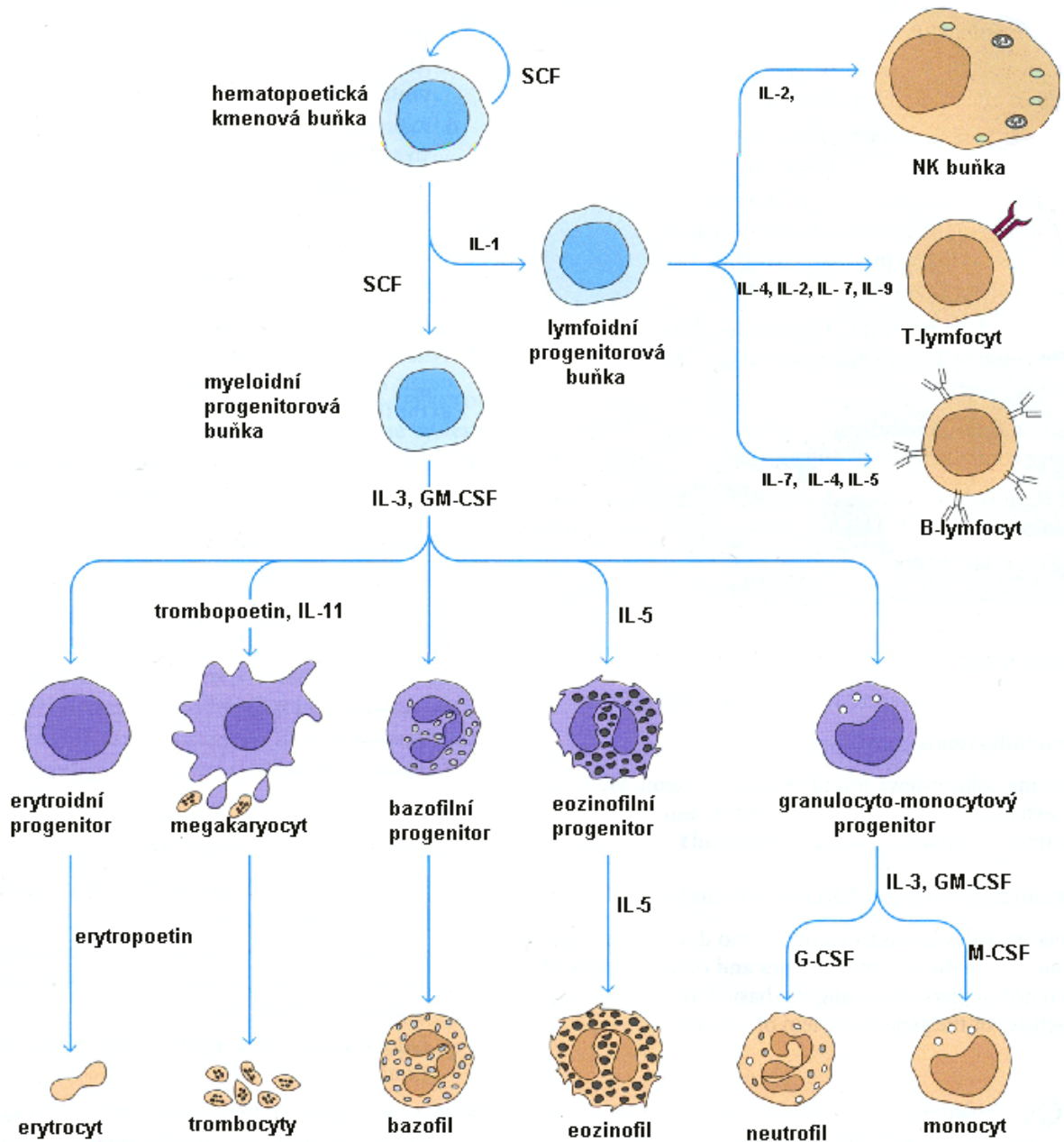
Hematopoéza je proces, při kterém se z prekurzorových buněk proliferací a diferenciací vyvíjejí krevní buňky (obr. 1). Místo a charakter tvorby těchto buněk jsou odlišné v době embryonální a v době postnatální. V raném embryonálním vývoji probíhá hematopoéza ve stěně žloutkového vaku. Primitivní krevní buňky, prvotně odvozené z mezenchymových buněk, jsou převážně erytroblastické (Dellmann et Eurell, 1998). Odlišná je skladba hemoglobinových řetězců: červené krvinky obsahují kromě hemoglobinu F a A i embryonální hemoglobiny typu Portland, Gower I a Gower II (Donner, 1985). Brzy dochází k migraci hematopoetických buněk do jater, které zde formují centra, kde probíhá erytropaéza. Postupně dochází i k osídlení sleziny embrya hematopoetickými kmenovými buňkami z jater. V té době zaniká hematopoéza ve žloutkovém vaku. Později se objevuje krvetvorba v kostní dřeni, lymfatických uzlinách a brzlíku. V posledním období nitroděložního života a po narození je hlavním místem krvetvorby kostní dřeň. Mimodřeňová hematopoéza přetrvává ještě několik týdnů po narození v játrech a slezině a postupně vyhasne. Tyto orgány si ale svůj hematopoetický potenciál udržují a v případě potřeby mohou tuto činnost obnovit. V mladém organismu je dřeň všech kostí červená a má hematopoetickou aktivitu. Postupem života je však červená dřeň nahrazována žlutou dření obsahující tuk. U dospělého jedince se aktivní dřeň vyskytuje pouze v kosti hrudní, v obratlích, žebrech, pánevních a lebečních kostech a v proximálních koncích kostí pažních a stehenních (Dellmann et Eurell., 1998).

Zachování hematopoetické aktivity závisí na schopnosti udržet rezervu kmenových buněk, které se mohou sebeobnovovat, proliferovat a diferencovat. Hematopoetická kmenová buňka dává vznik lymfoidní kmenové buňce a pluripotentní myeloidní kmenové buňce, ze které vznikají více diferencované progenitorové buňky. Progenitorové buňky pozorované *in vitro* tvoří kolonie, které obsahují morfologicky rozeznatelné prekurzory odpovídajících buněčných linií. Tyto progenitorové buňky jsou nazývány colony-forming unit (CFU).

Pro tvorbu krevních buněk je nezbytné speciální mikroprostředí. To je tvořeno komplexem stromálních buněk (endoteliální a retikulární buňky a makrofágy), přídatných buněk (lymfocyty), růstových faktorů a extracelulární matrix, díky nimž mohou kmenové buňky přežít, proliferovat a diferencovat se. Růstové faktory stimulují nebo potlačují proliferaci a diferenciaci jednotlivých buněčných linií (Kaneko et al., 1997). Významným



růstovým faktorem je například interleukin 3 (IL-3), který stimuluje proliferaci prekurzorů všech myeloidních linií (granulocytární, monocytární, megakaryocytické a erytroidní) (Ketley et Newland, 1997).



**Obr. 1** Hematopóza s hlavními růstovými faktory (převzato a upraveno podle URL 1)

## 2.2. Tvorba erytrocytů

Tvorba erytrocytů (erytropoéza) je součástí myeloidní větve hematopoézy, na jejímž začátku stojí myeloidní progenitorová buňka společná pro granulocyty, erytrocyty, monocyty a megakaryocyty – CFU-GEMM. Samostatná erytrocytová řada je odvozena od progenitorů BFU-E (burst-forming unit-erythroid), které se dělí a diferencují v CFU-E (colony-forming unit-erythroid) (Day et al., 2000; Kaneko et al., 1997). Hlavním růstovým faktorem pro erytropoézu je erythropoetin, který vzniká především v ledvinách (Dellmann et Eurell, 1998). Vývoj progenitorů je ovlivněn i GM-CSF (faktor stimulující kolonie pro granulocyty a makrofágy) (Ketley et Newland, 1997).

První morfologicky rozeznatelná prekurzorová buňka je proerytroblast. Základní charakteristikou nezralých buněk je jejich jadernost. Specifitou buněk červené řady je syntéza hemoglobinu, který přibývá se zráním buněk. Současně s vývojem buněk dochází ke zmenšování jejich velikosti (Kozák et al., 2001). Červená krvinka se vyvíjí z proerytroblastu přes bazofilní normoblast, polychromatofilní normoblast, ortochromatofilní normoblast, který se ztrátou jádra (enukleací) mění na proerytrocyt, označovaný jako retikulocyt (Doubek et al., 2003). Retikulocyt je mladá červená krvinka obsahující zbytky organel (mitochondrie, ribozomy, Golgiho elementy). Retikulocyt má proteosyntetickou aktivitu, dokončuje se tvorba cytoskeletu a probíhá zde ještě syntéza hemoglobinu. Ztrátou organel se retikulocyt mění na zralou červenou krvinku - erytrocyt (Young et al., 2006).

Za fyziologických okolností jsou v periferní krvi jen erytrocyty a malé množství retikulocytů. Vyplavení jaderných krvinek pozorujeme u leukémií, polycytémií, hemolýz, zhoubných nádorů, těžkých anémií a při vážných intoxikacích.

V postnatálním vývoji se za patologických podmínek, u tzv. megaloblastových anémií, netvoří normální erytrocyty, ale megalocyty. Oproti erytrocytům se liší velikostí a jemným uspořádáním chromatinu (Donner, 1985; Kozák et al., 2001).

## 2.3. Tvorba granulocytů

Neutrofilním granulocytům dává vznik myeloidní progenitorová buňka CFU-GEMM. Z ní se diferencuje progenitorová buňka CFU-GM (granulocyt-makrofág), společná pro prekurzory neutrofilů a monocytů. Zde se tyto dvě linie rozdělují a prekurzory neutrofilního granulocytu se tvoří z progenitorové buňky pro granulocyty – CFU-G. Eozinofilní i bazofilní granulocyty mají svoje vlastní monopotentní progenitorové buňky, a to CFU-Eos (eozinofil), a CFU-Bas (bazofil) (Day et al., 2000; Kozák et al., 2001). Vývoj všech granulocytů je

ovlivněn růstovými faktory GM-CSF a IL-3. Proliferaci a diferenciaci neutrofilů stimuluje G-CSF (faktor stimulující kolonie pro granulocyty) (Ketley et Newland, 1997). Eozinofily jsou selektivně stimulovány interleukinem 5 (IL-5) (Young et al., 2006).

Prekurzorovou kmenovou buňkou všech granulocytů je z morfologického hlediska myeloblast, ve kterém se již objevují primární granula. Tvorba a zrání granulocytů probíhá dále přes promyelocyt, myelocyt a metamyelocyt. Postupně dochází ke kondenzaci chromatinu, změně tvaru jádra a celkovému zmenšování buňky. Ve stadiu myelocytu se začínají tvořit granula specifická pro každý typ granulocytů: neutrofilní, eozinofilní a bazofilní. Jádro granulocytů má nejprve tvar tyčky, většinou lehce zahnuté či stočené. S vyzářováním dochází k segmentaci jádra. Za fyziologických okolností se v periferní krvi nacházejí zralé leukocyty a v malé míře i jejich pozdní zrající stadia (Day et al., 2000; Kozák et al., 2001).

## 2.4. Tvorba lymfocytů

Lymfocyty vznikají diferenciací pluripotentní kmenové buňky na progenitorové lymfoidní buňky v kostní dřeni (Doubek et al., 2003). Z lymfoidní linie se diferencují T a B-lymfocyty a NK buňky (přírození zabijáci). Při vývoji T-lymfocytů se uplatňují především interleukiny IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 a IL-9, při vývoji B-lymfocytů jsou to IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 a na vývoj NK buněk působí zejména IL-2 a IL-12 (Hořejší et Bartůňková, 2005).

Podle nomenklatury užívané v klinické hematologii rozlišujeme jako prekurzorové buňky lymfoblasty, z nich další diferenciací a zráním vznikají prolymfocyty, které dávají vznik lymfocytům (Day et al., 2000). Vývoj B lymfocytů probíhá v kostní dřeni a po setkání s antigenem se dokončuje v sekundárních lymfatických orgánech (např. lymfatické uzliny, slezina). Konečným diferenciačním stadiem B-lymfocytů jsou plazmatické buňky produkující protilátky. Oproti tomu nezralé T-lymfocyty putují do brzlíku, kde probíhá hlavní část jejich vývoje. Brzlík opouštějí dvě hlavní subpopulace T-lymfocytů: prekurzory pomocných T-buněk ( $T_H$ ) a prekurzory cytotoxických T-buněk ( $T_C$ ), které se po setkání s antigenem na povrchu antigen prezentující buňky (APC) diferencují na zralé efektorové  $T_H$  a  $T_C$  buňky (Hořejší et Bartůňková, 2005).

## **2.5. Tvorba monocytů**

Buňky monocytové řady vznikají z prekurzorové kmenové buňky monoblastu. Ten je odvozován z progenitorových buněk společných pro neutrofilní granulocyty a monocyty CFU-GM. Z nich se diferencuje unipotentní progenitorová buňka pro monocytovou řadu CFU-M (Day et al., 2000). Proliferaci prekurzorů monocytů a jejich diferenciaci stimuluje kromě GM-CSF především M-CSF (faktor stimulující kolonie pro makrofágy) (Ketley et Newland, 1997). Z monoblastu vzniká mitózou promonocyt a z něj pak obdobně zralý monocyt. Ten je pak základem další diferenciaci na tkáňové makrofágy (Day et al., 2000).

## **2.6. Vznik megakaryocytů a tvorba trombocytů**

Destičkotvorná řada je odvozena od monopotentních progenitorových buněk CFU-Meg (megakaryocyt), ze kterých se diferencuje prekurzorová buňka megakaryoblast (Doubek et al., 2003). Proliferaci prekurzorů a později tvorbu destiček stimuluje především trombopoetin (Ketley et Newland, 1997). Endomitózou megakaryoblastu vzniká promegakaryocyt, z něž pak obdobně vzniká zralý megakaryocyt. Endomitózy vedou k vytvoření velkého polyploidního jádra. Megakaryocyt je obrovská buňka dosahující rozměrů 40-100  $\mu\text{m}$  v průměru (Dellmann et Eurell, 1998). Jádro obsahuje mnoho neaktivních jadérek a v cytoplazmě jsou četná azurofilní granula. Invaginací buněčné membrány vzniká síť tubulů (demarkační membránový systém). Vznikají štěrby a dochází k ohraničení budoucích destiček. Megakaryocyty vysunují pseudopodia do krevního řečiště a na jejich koncích se uvolňují části cytoplazmy, které se stávají krevními destičkami. Ke vzniku trombocytů může docházet i rozpadem megakaryocytu. Z jednoho megakaryocytu vzniká až několik tisíc destiček. (Doubek et al., 2003; Kozák et al., 2001). Megakaryocyty mohou pronikat do periferní krve a nacházejí se pak v plicních kapilárách. Proto se trombocyty mohou v malé míře tvořit i zde (Donner, 1985).

## 3. KREV A JEJÍ SLOŽKY

Krev je životně důležitá tělesná tekutina cirkulující v uzavřeném oběhu. Je to suspenze buněčných elementů: erytrocytů, leukocytů a trombocytů v krevní plazmě. Krev v těle zastává řadu funkcí (Doubek et al., 2003):

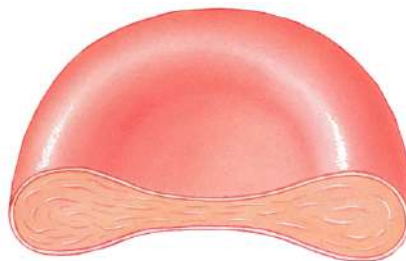
- ❖ **Transportní** - rozvádí dýchací plyny, živiny, hormony, vitaminy, odvádí zplodiny
- ❖ **Regulační** - má podíl na udržování stálé tělesné teploty, reguluje objem krve a má velký význam pro udržování homeostázy
- ❖ **Obranné** - podílí se na obraně proti infekci a zabraňuje ztrátě krve

### 3.1. Krevní buňky

Mezi krevní buňky řadíme červené krvinky (erytrocyty) a bílé krvinky (leukocyty). Subbuněčnou složkou jsou krevní destičky (trombocyty).

#### 3.1.1. Erytrocyty

Savčí erytrocyt je vysoce specializovanou buňkou. Je bezjaderný a má tvar plochého, bikonkávního disku (obr. 2). Tento tvar je významný tím, že zvětšuje plochu erytrocytu pro krevní plyny a společně s vlastnostmi membrány umožňuje deformovatelnost, která je důležitá pro jeho průchod kapilárami. Membrána erytrocytu se skládá z lipidové dvojvrstvy, ve níž jsou zabudovány různé proteiny. Těsně pod membránou je síť tvořící cytoskelet, jehož nejdůležitějším proteinem je spektrin (Young et al., 2006). Průměr erytrocytu savců se pohybuje v rozmezí 2,5-8  $\mu\text{m}$  s tloušťkou 2  $\mu\text{m}$  (Doubek et al., 2003).



**Obr. 2 Průřez erytrocytem savců (URL 2)**

Červené krvinky zodpovídají zejména za transport dýchacích plynů. Tato funkce je spojena s červeným krevním barvivem - hemoglobinem. Kromě přenosu plynů se hemoglobin podílí i na udržování pH krve (Donner, 1985). Podíl hemoglobinu na hmotnosti erytrocytu je asi 34 %. Hemoglobin se skládá z vlastního barviva hemu, a globinu. Globin je uspořádán do

4 řetězců ( $2\alpha$ ,  $2\beta$ ). Každý z nich je asociován s hemem, jehož základem je protoporfyrin a v centru molekuly je dvojmocné železo, na které se váže kyslík. Savčí hemoglobin je diferencován do několika typů, které mají odlišné řetězce a liší se i v některých vlastnostech. Nejvíce zastoupené jsou fetální hemoglobin a hemoglobiny dospělého typu (Doubek et al., 2003).

Průměrná životnost erytrocytů je druhově specifická, u koček je to 66-79 dní (Dellmann et Eurell, 1998). Zánik erytrocytů je spojen s oxidačním poškozením. Tím dochází k dezintegraci membrány, snížení deformability erytrocytu a jeho záchytu zejména ve slezině, kde je fagocytován (Doubek et al., 2003). K tomu dochází v menší míře také v kostní dřeni a v játrech. Degradace hemoglobinu probíhá v několika krocích. Nejprve vznikají globinové řetězce a hemové skupiny. Globin se stává součástí zásoby bílkovin a může být odbourán až na aminokyseliny, a pak znovu využit k syntézám. Hem podléhá oxidačnímu štěpení (za katalytického působení hemoxygenázy). Železnatý kation se oxiduje na železitý, a v této formě se uvolní z vazby. Dochází k otevření tetrapyrrolového kruhu a vzniká lineární, zeleně zbarvený biliverdin. Ten vstupuje do redukční reakce, jejímž produktem je žlutý bilirubin (Schneiderka et al., 2004). Většina železa je plazmě navázána na transferin, částečně se nachází v zásobní bílkovině feritinu. Železo je odváděno do kostní dřeni k nové syntéze hemoglobinu, nebo je ve formě feritinu či hemosiderinu ukládáno v kostní dřeni, játrech a slezině (Dürr et Kraft, 2001). Malá část erytrocytů zaniká přímo v cévách, jejich hemoglobin se rozpadá na  $\alpha$ - $\beta$ -dimery a váže se na glykoprotein haptoglobin. Tyto komplexy jsou vychytávány mononukleárním fagocytárním systémem a rozloženy (Doubek et al., 2003).

### 3.1.1.1. Abnormality červených krvinek

V periferní krvi se vždy necirkulují jen „normální“ erytrocyty, ale můžeme se také setkat s řadou abnormalit. Ty se rozlišují na odchylky ve velikosti, barvitosti, tvaru či přítomnosti inkluzí v erythrocytech. Většinou je jejich výskyt spojen s určitými chorobami, proto mohou být využity k diagnóze.

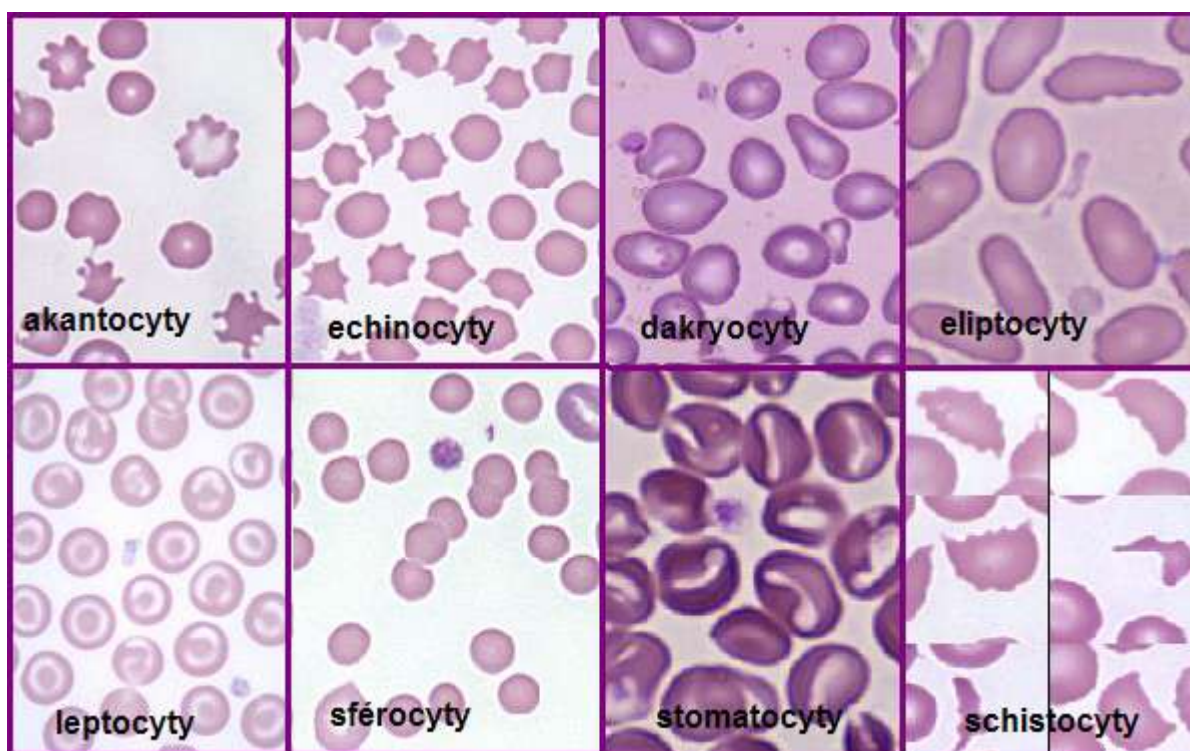
Z hlediska změny velikosti rozlišujeme **mikrocyty**, jejichž průměr je menší než u normálních erythrocytů. Často obsahují málo hemoglobinu a jsou bledé. Vyskytují se u anémií z nedostatku železa, kdy jeho nedostatek způsobuje sníženou syntézu hemoglobinu. Oproti tomu **makrocyty** mají průměr větší než normální erythrocyty. Jsou to nezralé polychromatofilní krvinky vyplavené při regeneračních procesech.

Dle změny barvitelnosti rozlišujeme **hypochromní erythrocyty** s nízkým obsahem hemoglobinu. Jsou světlé, a to především v centrální části (Thrall et al., 2006). **Achromocyty** mají zbarvenou jen membránu. Jejich příčinou jsou anémie. **Hyperchromní erythrocyty** jsou tmavě zbarvené, příčinou výskytu jsou regenerační anémie či malignity (Doubek et al., 2007).

Erythrocyty abnormálního tvaru jsou většinou označovány společným názvem poikilocyty. Pro přesnou charakteristiku se rozlišují následující tvary:

- ❖ **Akantocyty** mají několik nepravidelně rozmístěných výběžků různé délky (obr. 3). Tento tvar je způsoben zvýšením obsahu cholesterolu oproti množství fosfolipidů v membráně erythrocytu (Thrall et al., 2006). Jejich výskyt je spojen s hemolytickými anémiemi, onemocněním jater, hypercholesterolemií či hematologickými malignitami (Doubek et al., 2007)
- ❖ **Echinocyty** mají na povrchu krátké, rovnoměrně rozmístěné výběžky stejné velikosti a tvaru (obr. 3). Jejich vznik je vyvolán inhibicí membránového proteinu, který zodpovídá za transport aniontů (Wong, 1999). Echinocyty mohou být také artefakty z důsledku pomalého sušení krevního roztěru. Jsou asociovány s onemocněním ledvin či lymfomy (Thrall et al., 2006)
- ❖ **Anulocyty** se sníženým množstvím hemoglobinu uspořádaného do prstence, v centru nezabarvené, jsou charakteristické pro hemolytické a sideropenické anémie (Doubek et al., 2007)
- ❖ **Dakryocyty** ve tvaru kapek (obr. 3) můžeme najít v krvi při nedostatku železa či myelofibróze (Day et al., 2000)
- ❖ **Drepanocyty** jsou buňky srpkovitěho tvaru se zašpičatělými konci. K jejich výskytu dochází zřídka (Doubek et al., 2007)
- ❖ **Ecentrocyty** mají hemoglobin soustředěný na jednu stranu buňky a postrádají centrální projasnění. Naopak na druhé straně buňky je světlá zóna. Vznikají při oxidačním poškozením globinových řetězců (Thrall et al., 2006)
- ❖ **Eliptocyty** (obr. 3) mají elipsoidní nebo oválný tvar s centrálním projasněním. Výskyt může být dědičný nebo je spojen s megaloblastovými a sideropenickými anémiemi (Doubek et al., 2007)
- ❖ **Leptocyty** terčovitého tvaru (obr. 3) mají zvětšený povrch oproti buněčnému obsahu. Hustý hemoglobin ve střední oblasti je odlišen od světlé periferní části. Můžou vznikat sekundárně při kontaktu s nepřiměřeným množstvím EDTA (Thrall et al., 2006). Bývají známkou onemocnění jater a žlučových cest nebo hemolytických či sideropenických anémií (Doubek et al., 2007)

- ❖ **Sférocyty** jsou kulovité, tmavé a postrádají centrální projasnění. Jeví se jako malé buňky (obr. 3), ale jejich objem zůstává stejný. Jejich membrána je redukována v důsledku částečné fagocytózy, ke které dochází po navázání protilátek nebo komplementu na povrch erytrocytů. Sférocyty se objevují při imunitně zprostředkovaných hemolytických anémiích (Thrall et al., 2006)
- ❖ **Stomatocyty** ve tvaru pootevřených úst (obr. 3) mají poblíž středu buňky jasnou oblast (Thrall et al., 2006). Jejich vznik je podmíněn inhibicí membránového proteinu, který zodpovídá za transport aniontů (Wong, 1999). Vyskytují se u anémií z chronických onemocnění či hemolytických anémiích (Doubek et al., 2007)
- ❖ **Schistocyty** (obr. 3) jsou fragmenty erytrocytů nepravidelného tvaru vzniklé nejčastěji rozpadem erytrocytů průchodem skrz vlákna fibrinu v cévách (Thrall, 2006). Vyskytují se při hemolytické anémii, hypersplenismu, myelofibróze a diseminované intravaskulární koagulaci (DIC) (Doubek et al., 2003)



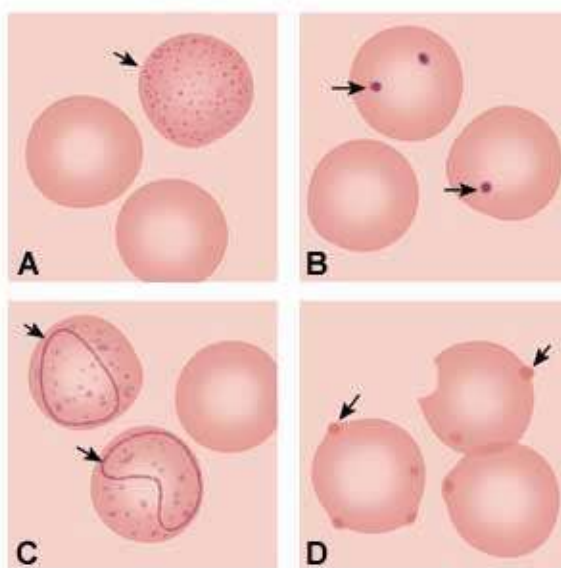
**Obr. 3 Vybrané abnormality erytrocytů** (převzato a upraveno podle URL 3 a URL 4)

Časté jsou různé inkluze v erytrocytech:

- ❖ **Bazofilní tečkování** (obr. 4,A), což jsou shluky ribozomů ve formě zrn, barví se modře. Vyskytují se při otravách a bývají znakem regenerace (Day et al., 2000)



- ❖ **Heinzova tělíska** (obr. 4,D) jsou shluky denaturovaného hemoglobinu pod membránou, které se barví vitálními barvivy, a poté se jeví jako modré útvary. Příčinou jejich vzniku je oxidační poškození. Oxidací sulfhydrylových skupin hemoglobinu se tvoří disulfidické vazby, které mění konformaci globinových řetězců a následně dochází k precipitaci molekuly hemoglobinu (Day et al., 2000; Thrall et al., 2006). Přítomnost Heinzových tělísek snižuje deformovatelnost erytrocytů, které jsou pak více náchylné k hemolýze (Hasegawa et al., 1993). Jejich výskyt je častý při intoxikacích, diabetes mellitus či hypertyreóze (Doubek et al., 2007)
- ❖ **Howell-Jollyho tělíska** (obr. 4,B) jsou zbytky jádra ve formě 1-3 malých kulatých útvarů, excentricky lokalizovaných, barvících se modře (Dellmann et Eurell, 1998). Výskyt je spojen s regenerativními anémiemi, splenektomií a s chorobami sleziny (Thrall et al., 2006)
- ❖ **Cabotovy prstence** (obr. 4,C) jsou zbytky jaderné membrány po patologické denukleari (Kozák et al., 2001). Příčinou jejich vzniku bývají těžké anémie a malignity (Doubek et al., 2007)
- ❖ Erytrocyty, obsahující trojmocné železo ve formě zrněk v mitochondriích a lysozomech, se označují jako **siderocyty** (popř. sideroblasty). Jejich přítomnost je zřejmě spojena se zhoršenou syntézou hemu (Thrall et al., 2006). Příčiny výskytu mohou být anémie, leukémie, myelodysplastický syndrom a splenektomie (Doubek et al., 2003)



**Obr. 4 Inkluze v erytrocytech (URL 5)**

**Penízkovatění (rouleaux):** Jde o překrývající se erythrocyty pozorované v nátěru, které tvoří dlouhé řetězce a podobají se sloupečkům mincí (Bacha et Bacha, 2000). Příčinou je zvýšené množství proteinů v plazmě, především fibrinogenu a imunoglobulinů (Thrall et al., 2006). Patologický výskyt je spojen s infekcemi, záněty či různými malignitami (Doubek et al., 2007).

### 3.1.2. Leukocyty

Leukocyty rozdělujeme v závislosti na výskytu granul v cytoplazmě na granulocyty (neutrofil, eozinofil a bazofil) a agranulocyty (monocyty a lymfocyty).

#### 3.1.2.1. Granulocyty

Hlavní morfolgickou charakteristikou granulocytů je různě členěné jádro, bývají proto označovány také jako polymorfonukleáry. V cytoplazmě se nacházejí specifická granula, podle jejichž barvitelnosti se granulocyty rozdělují na neutrofil, eozinofil a bazofil (Young et al., 2006).

##### 3.1.2.1.1. Neutrofilní granulocyt

Neutrofil má okrouhlý tvar a dosahuje velikosti 12 až 15  $\mu\text{m}$  v průměru. Podle stupně vyzrávání rozlišujeme mladou neutrofilní tyč s jádrem ve tvaru tyčinky, nebo segmentovaný neutrofil (obr. 5), jehož jaderné segmenty jsou oddělené nitkovitými spoji a bývá jich 3-5. Chromatin je tmavý, hutný, seskupený v hrudkách (Dellmann et Eurell, 1998). U samic savců je někdy na segmentu neutrofilu patrné paličkovité Barrovo tělísko, což je kondenzovaný chromozom X. Cytoplazma obsahuje malá, kulatá specifická granula. V menší míře jsou přítomna i větší granula primární. V neutrofilech se vyskytují také granula obsahující želatinázu a sekreční granula (Young et al., 2006). Organely přítomné v cytoplazmě jsou mitochondrie, polyribosomy, malé Golgiho komplexy a též glykogen (Dellmann et Eurell, 1998).

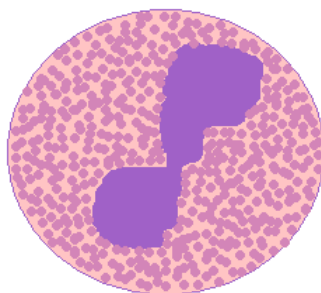


**Obr. 5 Segmentovaný neutrofil, schéma**

Neutrofilly se vyskytují v krvi asi 6-14 hodin, pak migrují do tkání, kde jejich životnost závisí na funkčním zapojení. Neutrofilly tvoří první linii obrany proti patogenům. Hrají důležitou roli při fagocytóze bakterií a modulaci zánětlivých procesů. Fagocytóza probíhá v několika krocích, kdy neutrofilly adherují na stěnu cév, pod vlivem chemotaktických látek pronikají do tkání, kde probíhá pohlcování částic. Ty jsou následně uzavřeny do fagozomu, který splývá s granuly ve fagolyzozom. Dochází k degranulaci (vylití obsahu granul), a tím k likvidaci pohlcené částice. Poté neutrofilly degenerují a tvoří hnis (Young et al., 2006; Dellmann et Eurell, 1998).

#### **3.1.2.1.2. Eozinofilní granulocyt**

Eozinofily bývají oproti neutrofilům o něco větší, o průměru 12 až 17  $\mu\text{m}$ . Mají okrouhlý tvar a segmentované jádro, často brylovitého tvaru (obr. 6). Cytoplazma je světlá a obsahuje oranžovočerveně se barvící specifická granula, která jsou větší než granula neutrofilů (Young et al., 2006). Nachází se zde i granula primární, z organel pak mitochondrie, ribozomy, Golgiho komplex a endoplazmatické retikulum (Dellmann et Eurell, 1998).



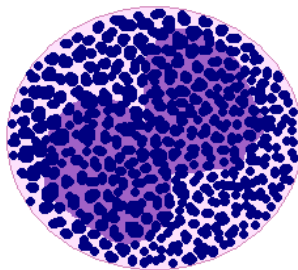
**Obr. 6 Eozinofilní granulocyt, schéma**

Eozinofily cirkulují v krvi asi 8-12 hodin, poté vstupují do tkání, kde přežívají několik dní (Young et al., 2006). Eozinofily jsou fagocytující buňky, i když v menší míře než neutrofilly. Hrají důležitou roli v obraně proti mnohobuněčným parazitům a v regulaci alergických a zánětlivých procesů. Patří také mezi APC (Day et al., 2000; Dellmann et Eurell, 1998).

#### **3.1.2.1.3. Bazofilní granulocyt**

Velikost bazofilů se pohybuje v rozmezí 14 až 16  $\mu\text{m}$  v průměru. Jádro může být nepravidelné, dvojlaločnaté nebo segmentované. Cytoplazma je šedofialová s tmavými,

modrými či fialovými granulemi, která často překrývají jádro (obr. 7). V cytoplazmě se dále nachází mitochondrie, Golgiho komplex a endoplazmatické retikulum (Young et al., 2006).



**Obr. 7 Bazofilní granulocyt, schéma**

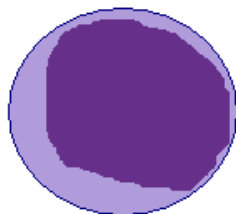
Bazofily jsou v omezené míře také fagocytujícími buňkami. Hrají hlavní roli v alergických a zánětlivých reakcích. Bazofily mají na svém povrchu vysokoafinní Fc-receptor pro imunoglobuliny typu IgE, jehož prostřednictvím jsou zde vázány molekuly IgE. Ty jsou schopné rozeznat určité antigeny (především povrchové molekuly mnohobuněčných parazitů). Jakmile se na povrch bazofilu naváže příslušný antigen, dojde k agregaci několika molekul receptoru, což má za následek vyjití obsahu granul z bazofilu. Uvolněné látky přímo poškozují parazita a přispívají k rozvoji dalších obranných mechanismů (Day et al., 2000; Dellmann et Eurell, 1998).

### **3.1.2.2. Agranulocyty**

Agranulocyty neobsahují v cytoplazmě specifická granula, ale mohou zde být přítomna granula azurofilní. Pro své kompaktní jádro bývají někdy označovány jako mononukleáry. Mezi agranulocyty patří monocyty a lymfocyty (Young et al., 2006).

#### **3.1.2.2.1. Lymfocyty**

Rozeznáváme lymfocyty malé, střední a velké. Jejich velikost se většinou pohybuje od 6 do 15  $\mu\text{m}$  v průměru. Lymfocyt je nejmenší bílá krvinka kolující v krvi. Tvar lymfocytu je okrouhlý, zřídka lehce nepravidelný. Jádro je velké, kulaté, oválné či na straně vpáčené. Bývá uloženo excentricky a cytoplazmatický lem při okraji buňky je pak různě široký (obr. 8). Chromatin má hrubou strukturu a můžeme zde najít jadérko. V lehce bazofilní cytoplazmě bývá několik azurofilních granul (Bacha et Bacha, 2000), dále mitochondrie, endoplazmatické retikulum a ribozomy (Dellmann et Eurell, 1998).



**Obr. 8 Lymfocyt, schéma**

Většina lymfocytů žije několik měsíců, paměťové buňky i po celý život jedince. Hlavní funkcí lymfocytů je účast na imunitních reakcích. Antigenní stimulací B-lymfocytů vznikají plazmatické buňky, které syntetizují a uvolňují imunoglobuliny. T-lymfocyty jsou důležité pro antigeně specifické buněčně zprostředkované i protilátkové imunitní reakce. T<sub>C</sub>-buňky mají schopnost cytotoxicky zabít jiné buňky (infikované či abnormální). T<sub>H</sub>-buňky se podle cytokinů, které produkují, rozdělují na T<sub>H1</sub> a T<sub>H2</sub>. T<sub>H1</sub>-buňky stimulují makrofágy k přeměně v aktivované makrofágy. Základní funkcí T<sub>H2</sub>-buněk je spolupráce s B-lymfocyty. Část B a T-lymfocytů se po setkání s antigenem diferencuje v paměťové buňky, zodpovědné za tzv. imunologickou paměť (Hořejší et Bartůňková, 2005). V krvi se nachází asi 70 % T-buněk, 20 % B-buněk a 10 % připadá na zbylé typy (Day et al., 2000).

#### **3.1.2.2.2. Monocyty**

Dospělé monocyty jsou velké 15 až 20  $\mu\text{m}$  v průměru a jsou to největší buňky v periferní krvi. Monocyt má kulatý nebo vejčitý tvar, často nepravidelný s výběžky, které svědčí o probíhající fagocytóze. Jádro je poměrně velké, excentricky uložené, většinou ledvinovité (obr. 9) či podkovovité. Chromatin je řídko uspořádán. V cytoplazmě mohou být vakuoly a jemná azurofilní granula (Bacha et Bacha, 2000). Mezi organely vyskytující se v monocytech patří ribozomy, polyribozomy, mitochondrie, endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát.



**Obr. 9 Monocyt, schéma**

V periferní krvi se monocyty vyskytují 3-4 dny, poté vstupují do tkání a diferencují se ve tkáňové makrofágy. To jsou dlouho žijící fagocytující buňky. Krevní monocyty a tkáňové makrofágy jsou společně označovány jako mononukleární fagocytární systém (Young et al., 2006). Hrají tedy důležitou roli v nespecifické imunitě, ale i v antigenně specifické části imunitního systému, protože působí jako důležité APC (Hořejší et Bartůňková, 2005). Monocyty a makrofágy také produkují množství biologicky aktivních látek, například některé cytokiny (Dellman et Eurell, 1998).

### 3.1.2.3. Abnormality bílých krvinek

Změny jádra leukocytů:

- ❖ **Hyposegmentace neutrofilů (Pelgerova-Huětova anomálie):** neutrofilní granulocyty mají jen dva segmenty (obr.10). Tato anomálie může být vrozená nebo je asociována s bakteriální infekcí, aplikací léků či virem kočičí leukémie (FeLV) (Day et al., 2000)
- ❖ **Hypersegmentace granulocytů:** granulocyty mají šest a více segmentů (obr. 10). Hypersegmentace naznačuje delší přežívání granulocytů v cirkulaci. V periferní krvi se mohou objevit v pozdní fázi chronického zánětlivého procesu (Day et al., 2000; Thrall et al., 2006)
- ❖ **Reaktivní lymfocyty:** jsou velké lymfocyty s jádrem podobným monocytům a silně bazofilní cytoplazmou. Ve zvýšeném množství se objevují u mladých zvířat. Jsou často pozorovány po vakcinaci nebo chronické antigenní stimulaci (Day et al., 2000)
- ❖ **Riederovy formy lymfocytů:** mají jádra se zářezy. Příčiny vzniku mohou být infekce a různé malignity
- ❖ **Gumprechtovy stíny:** k jejich vzniku někdy dochází při krevním roztěru, kdy jsou rozdrceny lymfocyty a pozorujeme jen zbytky jádra. Vyšší výskyt je spojen s lymfoproliferativním onemocněním
- ❖ **Prstenčitá jádra neutrofilů:** jádra jsou uspořádaná do prstence. Příčinami výskytu mohou být vážné infekce a intoxikace (Doubek et al., 2003)
- ❖ **Posuny jader neutrofilů:** posun k mladým formám (tyčkám či metamyelocytům). Příčiny výskytu jsou infekce, záněty, intoxikace a sepse.

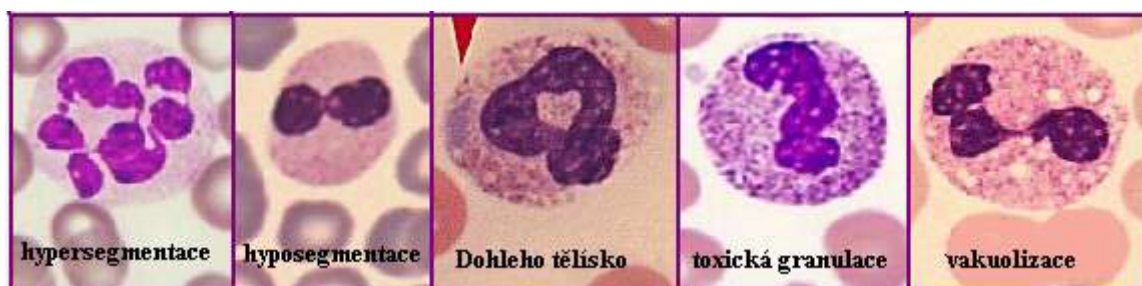
V případě většího množství zralých neutrofilů, než vyskytujících se nezralých forem, hovoříme o regenerativním posunu, který značí dobrou schopnost imunitního systému bojovat proti zánětlivému procesu v organismu. Oproti tomu degenerativní posun doleva označuje závažný stav s toxickým poškozením buněk (Day et al., 2000)

Změny cytoplazmy leukocytů:

- ❖ **Toxická granulace:** leukocyty mají zvětšená granula obsahující ribozomální RNA (obr. 10). Příčiny výskytu jsou těžké infekce a intoxikace (Doubek et al., 2007)
- ❖ **Döhleho tělíska:** 1-5 útvarů v neutrofilech modrošedé či modré barvy (obr. 10). Jedná se o destičkovité agregáty drsného endoplazmatického retikula v cytoplazmě. K výskytu dochází při těžkých infekcích a intoxikacích (Day et al., 2000)
- ❖ **Auerovy tyčky:** abnormální lysozomy v prekurzorech leukocytů formované do shluků nebo tyček. Příčiny vzniku bývají hematologická onemocnění

Jiné změny leukocytů:

- ❖ **Vakuolizace** cytoplazmy (obr. 10), případně jádra: světlá místa nacházející se v cytoplazmě nebo jádře neutrofilů, lymfocytů a monocytů. U starších monocytů a lymfocytů je výskyt fyziologický. Patologické příčiny výskytu jsou infekce a intoxikace
- ❖ **Jadérka v lymfocytech:** výskyt aktivních, prstenčitých jadérek. Objevují se při infekcích a hematologických malignitách (Doubek et al., 2003)



**Obr. 10** Vybrané abnormality leukocytů (převzato a upraveno podle URL 6)

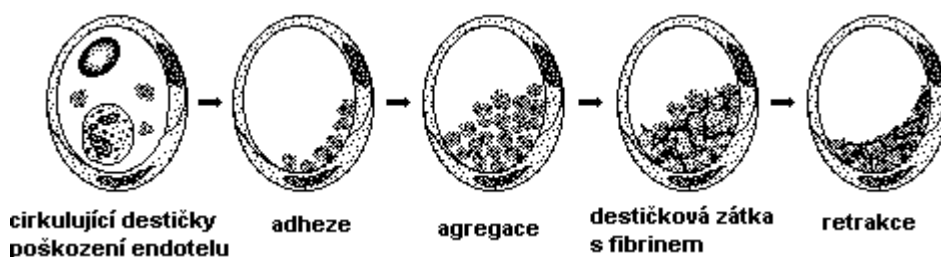
### 3.1.3. Trombocyty

Trombocyty jsou u savců bezjaderné útvary s nepravidelnými okraji a výběžky o průměru 1,5 až 3,5  $\mu\text{m}$  (Young et al., 2006). V krevní destičce se z hlediska funkce rozlišují čtyři zóny (Dellmann et Eurell, 1998; Kozák et al., 2001):

**Periferní zóna** zahrnuje trojvrstevný obal destičky (glykokalyx a dvě vrstvy fosfolipidů) a submembránové struktury, které jsou představovány kontraktálními vlákny. Vlákna udržují tvar destičky a přispívají k retrakci jejích výběžků při koagulaci. Periferní zóna je důležitá pro adhezi na porušený endotel i na ostatní trombocyty. **Zóna solubilního gelu** obsahuje systém

mikrofilament a mikrotubulů, který je těsně pod membránou. Tato zóna je důležitá pro zajištění tvarových změn destičky a sekreci granulí. V **zóně organel** se nacházejí mitochondrie, azurofilní  $\alpha$  granule, hutné  $\delta$  granule,  $\lambda$  granule, peroxizomy, glykogen atd. Probíhají zde metabolické děje. **Zóna membránových systémů** zahrnuje otevřený kanálkový systém a hustý tubulární systém, které jsou propojeny. Otevřený systém komunikuje s buněčným povrchem, zvětšuje jej a má význam pro transport obsahu granulí na povrch trombocytu. Granula trombocytů obsahují látky uvolňované při koagulačním procesu nebo při rozpadu destiček. Jsou to zejména proteiny specifické pro trombocyty, koagulační faktory, glykoproteiny a kationické látky.

Hlavní funkcí krevních destiček je účast na zástavě krvácení (hemostáze) (obr. 11). Předpokladem těchto reakcí je jejich aktivace, která je důsledkem interakce destiček s rozpustnými plazmatickými faktory a porušeným endotelem cév. Na povrchu destičky se vytvářejí pseudopodia a dochází k adhezi na struktury obnažené při poškození endotelu, zejména na kolagen. Destičky uvolňují obsah svých granulí, což podporuje adhezi dalších destiček a rozvoj celé obranné reakce. Trombocyty se propojují svými výběžky, přilnou těsně k sobě a vytvoří destičkovou zátku – trombus. Současně je aktivována koagulační kaskáda, jejímž výsledkem je vznik vláken fibrinu, které vytvoří síť zpevňující trombus. Po určité době dochází k retrakci – smršťování destičkového trombu.



**Obr. 11 Funkce trombocytů** (převzato a upraveno podle URL 7)

Životnost trombocytů je asi 10 dní. Velká část trombocytů je uložena ve slezině a v případě potřeby je její kontrakcí uvolněna do cirkulace. Staré destičky jsou odstraňovány makrofágy, a to především ve slezině, ale také v játrech a kostní dřeni (Doubek et al., 2003; Kozák et al., 2001).



## 3.2. Krevní plazma

Plazma je nažloutlá, průhledná, mírně alkalická kapalina. Podíl plazmy ku celkovému objemu krve činí asi 55 %. Přibližně 91 % krevní plazmy tvoří voda, 7 % bílkoviny a zbylé množství živiny, hormony, vitaminy, krevní plyny, anorganické ionty a odpadní látky. Z organických látek mají největší význam bílkoviny, především albumin a globuliny. Bílkoviny se podílejí na udržování pH krve, onkotického tlaku, mají transportní a obranné funkce. Mezi organické složky plazmy dále patří sacharidy, lipidy, močovina, kreatin, kreatinin, kyselina močová, ketolátky, kyselina mléčná atd. Sacharidy jsou hlavním zdrojem energie, lipidy jsou důležité jako její zásobárna v těle, jsou také základní složkou biomembrán a slouží jako polární rozpouštědlo např. pro některé vitaminy. Při metabolismu lipidů vznikají ketolátky. Kyselina mléčná je konečným produktem glykolýzy za anaerobních podmínek. Anorganické látky jsou zastoupeny zejména sodíkem, draslíkem, vápníkem, hořčíkem, chloridy, fosforečnany a hydrogenuhličitany. Jsou důležité pro udržování osmotického tlaku, objemu a pH plazmy, srážení krve atd.

Organické i anorganické látky jsou udržovány v relativně stálých koncentracích, které se za patologických podmínek mění (Doubek et al., 2003).

### 3.2.1. Nízkomolekulární složky krve

#### 3.2.1.1. Monosacharidy

Mezi monosacharidy obsažené v krvi patří fruktóza, galaktóza a glukóza. Galaktóza se ve větší míře vyskytuje v krvi mladých jedinců, protože podíl galaktózy ve výživě je díky příjmu laktózy z mateřského mléka mnohem vyšší. Fruktóza se v krvi nachází po vysokém příjmu potravou a rychle se vylučuje močí (Musil, 1994). Glukóza je monosacharidem, dosahujícím v krvi nejvyšší koncentrace a také významu. Představuje hlavní zdroj energie pro buňky. Jejím zdrojem v krvi je jednak glukóza z potravy absorbovaná ve střevě, či glukóza vzniklá štěpením jaterního glykogenu (glykogenolýzou) při hladovění. Jiným způsobem doplnění glukózy v krvi je glukoneogeneze (tvorba glukózy z nesacharidových zdrojů, nejčastěji z aminokyselin), která probíhá z 90 % v hepatocytech a z 10 % v ledvinách. Hladina glukózy v krvi (glykémie) je přísně regulována. Zhruba 2-4 hodiny po jídle dochází ke zvýšení její koncentrace, která se do 2 hodin vrací k výchozí hodnotě. Nadbytek glukózy je přeměňován v glykogen a tuk (Musil, 1994; Thrall et al., 2006). Na regulaci hladiny glukózy se podílí katecholaminy (adrenalin, noradrenalin), glukokortikoidy (kortizol), inzulín, glukagon, růstový hormon a pohlavní hormony (Doubek et al., 2007).

### **3.2.1.2. Lipidy**

Jako lipidy označujeme směs všech lipidových složek krevní plazmy: triacylglycerolů, fosfolipidů, sfingolipidů a glykosfingolipidů, nesterifikovaných mastných kyselin a eikosanoidů. K lipidům patří s ohledem na lipofilní povahu i cholesterol a jeho estery (Schneiderka et al., 2004). Hydrofobní charakter lipidů způsobuje, že se v hydrofilním prostředí organismu nemohou vyskytovat samostatně. Transport mastných kyselin v krvi se uskutečňuje vazbou na molekuly albuminu a v trávicím ústrojí ve formě micel (spolu s fosfolipidy, žlučovými kyselinami a směsí mono- a diacylglycerolů). V plazmě, lymfě a ostatních tělesných tekutinách se lipidy nachází ve formě lipoproteinů (Musil, 1994).

#### **3.2.1.2.1. Triacylglyceroly (TAG)**

Triacylglyceroly tvoří směs esterů glycerolu s různými mastnými kyselinami. Jsou to hlavní lipidy tukové tkáně a slouží jako zásobárna tuku v těle. Jejich syntéza probíhá především v tukové tkáni, játrech, tenkém střevě a mléčné žláze. TAG přijaté potravou jsou rozloženy na mastné kyseliny, monoacylglyceroly a glycerol v tenkém střevě působením pankreatické lipázy. Tyto molekuly jsou absorbovány epiteliálními střevními buňkami, kde jsou znovu spojeny do formy TAG. Ty jsou obaleny proteiny do globulárních, ve vodě rozpustných struktur, chylomikronů. V této podobě se TAG dostávají do krve a mohou být využity různými tkáněmi. Játra syntetizují TAG z mastných kyselin získaných z tukové tkáně. Takto vzniklé TAG jsou v krvi navázány na proteiny. Výsledkem jsou molekuly lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). Koncentrace TAG v krvi je ovlivněná množstvím tuku v potravě a hormony (inzulín, glukagon) (Thrall et al., 2006).

#### **3.2.1.2.2. Cholesterol a jeho estery**

Cholesterol je specifická forma lipidů, které jsou přítomny pouze ve živočišných buňkách. Je to tetracyklický steroidní alkohol s hydroxylovou skupinou na 3. uhlíku. V organismu se vyskytuje buď jako volný (neesterifikovaný) cholesterol, nebo esterifikovaný na hydroxylové skupině vyššími mastnými nenasycenými kyselinami. Zhruba 2/3 celkového cholesterolu jsou esterifikované (Schneiderka et al., 2004). Hlavní místo syntézy cholesterolu jsou játra. Cholesterol se sám tvoří v organismu (endogenní), převážně se však do těla dostává živočišnou potravou. Je základním substrátem pro tvorbu steroidních hormonů a je také důležitou součástí membrán. Z organismu se vylučuje žlučí, buď nezměněný nebo ve formě žlučových kyselin vzniklých jeho přeměnou (Thrall et al., 2006). Cholesterol a jeho estery

jsou v plazmě přítomny v největším množství ve frakcích lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) (Musil, 1994).

### **3.2.1.3. Dusíkaté látky**

Do této skupiny patří heterogenní produkty metabolismu: močovina, kreatinin, kreatin, kyselina močová, amoniak a aminokyseliny.

#### **3.2.1.3.1. Amoniak a močovina**

Amoniak je vysoce toxickou sloučeninou vznikající zejména deaminačními reakcemi při metabolismu aminokyselin a bílkovin. Za fyziologických okolností je v mitochondriích a cytoplazmě hepatocytů transformován na močovinu (Zima, 2002). Jaterní syntéza močoviny je závislá na obsahu bílkovin v potravě a na endogenním katabolismu proteinů. Z hepatocytů difunduje močovina do krve a její hladina je poměrně stálá. Z organismu vylučuje za normálních okolností močí ledvinami (Dürr et Kraft, 2001; Musil, 1994).

#### **3.2.1.3.2. Kreatin a kreatinin**

Kreatin vzniká z guanidinacetátu hlavně v hepatocytech a krví je transportován do buněk kosterních svalů a myokardu. Zde ve formě kreatinfosfátu slouží jako pohotová zásoba volné energie (ATP). Svalová buňka ji využívá především v počáteční fázi zvýšené svalové činnosti. Z kreatinu se spontánně (dehydratací) tvoří kreatinin. Jeho koncentrace v krvi závisí na velikosti svalové hmoty (Doubek et al., 2007; Musil, 1994).

#### **3.2.1.3.3. Kyselina močová**

Kyselina močová je konečným produktem odbourávání purinových bází pocházejících jak z degradovaných buněk a tkání, tak z potravy. Z krve je zcela odstraňována glomerulární filtrací, avšak více jak 90 % je resorbováno zpět tubulární resorpcí (Musil, 1994).

#### **3.2.1.4. Bilirubin**

Bilirubin je konečným produktem odbourávání hemu, především hemoglobinu erytrocytů. Malá část vzniká z myoglobinu, cytochromu, peroxidázy a katalázy (Thrall et al., 2006). Bilirubin může být zpracován výhradně v hepatocytech, tudíž bilirubin vzniklý v periferních tkáních musí být nejdříve transportován do jater. Jeho molekula je hydrofobní, proto se v krvi vyskytuje bilirubin vázaný na albumin - je nekonjugovaný. V hepatocytu je konjugován s kyselinou glukuronovou a v této formě je vylučován se žlučí do střeva (Schneiderka et al., 2004). Bilirubin je oranžovožluté barvivo, které v nadbytku zbavuje

krevní sérum, a pokud se dostane do intersticia, vyvolává žluté zbarvení sliznic a kůže (žloutenka) (Musil, 1994).

### **3.2.2. Vysokomolekulární složky krevní plazmy**

Krevní plazma je koloidní suspenze, která se skládá zhruba ze 200 rozlišitelných makromolekulových, převážně bílkovinných složek.

#### **3.2.2.1. Proteiny**

Jde o pestrou směs mnoha druhů bílkovin pocházejících z různých buněk. Hlavní místo syntézy plazmatických proteinů jsou játra. Výjimku tvoří imunoglobuliny a cytokiny (Kaneko et al., 1997). Tyto bílkoviny mají různý biologický poločas, přesto za fyziologických okolností je jejich koncentrace jako celku v plazmě relativně stálá (Musil, 1994).

##### **3.2.2.1.1. Albumin**

Albumin zaujímá mezi plazmatickými bílkovinami nejvýznamnější postavení pro své vlastnosti, tak i pro své množství. Jeho hlavní funkcí je udržování onkotického tlaku a transport řady látek: kovových iontů, bilirubinu, mastných kyselin, kyseliny močové, některých vitaminů a léčiv. To umožňuje více než 200 vazebných míst na povrchu jeho molekuly. Albumin vzniká z prekurzorů v hepatocytech, odkud se dostává do plazmy a je katabolizován v různých tkáních (Musil 1994; Thrall et al., 2006). Biologický poločas albuminu je 19-21 dní (Zima, 2002).

##### **3.2.2.1.2. Globuliny**

Globuliny jsou heterogenní skupinou proteinů různé velikosti. Globuliny rozdělujeme podle elektroforetické pohyblivosti na 3 hlavní frakce:  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -globulinů.

Frakce  $\alpha$ -globulinů je syntetizována v játrech a zahrnuje: tyroxin vázající globulin, transkortin (transport kortizolu), lipoproteiny (transport lipidů), ceruloplazmin (přenos mědi), haptoglobiny vážící hemoglobin, antitrombin III (inhibitor trombinu) a  $\alpha_1$  antitrypsin.

Frakce  $\beta$ -globulinů zahrnuje ostatní lipoproteiny, transferin (transport železa), hemopexin (váže hem), C- reaktivní protein, komplementové složky C3 a C4, plazminogen a fibrinogen. V této frakci se můžou vyskytovat i imunoglobuliny typu IgM a IgA.

Frakce  $\gamma$ -globulinů se skládá z imunoglobulinů přičemž zde můžeme najít všechny typy: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE (Kaneko et al., 1997; Thrall et al., 2006).

### **3.2.2.2. Lipoproteiny**

Podle současných představ jsou lipoproteiny částice sférického tvaru tvořené jádrem a obalem. Jednotlivé složky jsou v nich vázány hydrofobními reakcemi. Jádro lipoproteinové částice je vyplněno molekulami nejméně rozpustnými ve vodě: estery cholesterolu a triacylglyceroly. Obal je tvořen vrstvou fosfolipidů a volného cholesterolu, přičemž hydrofobní části jejich molekul jsou orientovány do nitra částice a hydrofilní části vyčnívají navenek. Na povrchu vrstvy fosfolipidů a cholesterolu jsou volně navázány molekuly apoproteinů, nebo jsou zanořeny do povrchu a vyčnívají jen jejich části (Musil, 1994; Schneiderka et al., 2004).

V současnosti se používá dělení lipoproteinů elektroforeticky, ultracentrifugací nebo podle přítomnosti apoproteinů jako antigenů (Musil, 1994). Ultracentrifugací se lipoproteiny rozdělí na chylomikrony, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), lipoproteiny o střední hustotě (IDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) (Thrall et al., 2006).

### **3.2.2.3. Enzymy**

Přítomnost buněčných enzymů v plazmě je příčinou přirozené obměny buněk ve tkáních. K normálním hodnotám enzymových aktivit tudíž nejvíce přispívají buňky orgánů s rychlým metabolickým obratem (játra) (Musil, 1994).

Následující odstavce se budou zaměřovat na enzymy, které mají při vyšetření krve největší význam.

#### **3.2.2.3.1. Aspartátaminotransferáza (AST)**

AST je enzym přenášející aminoskupinu z aspartátu na oxoglutarát za vzniku glutamátu a oxalacetátu (Kaneko et al., 1997). V séru je AST přítomen jako holoenzym nebo apoenzym, které jsou závislé na asociaci s kofaktorem pyridoxal-5'-fosfátem (Zima, 2002). AST se vyskytuje v mnoha tkáních a orgánech, přičemž není specifická pro určitý orgán. Vysokou aktivitu má v srdeční a kosterní svalovině, ledvinách, játrech, pankreatu, slezině, plicích a erythrocytech (Schneiderka et al., 2004). Má dva izoenzymy, jeden se nachází v cytoplazmě a druhý je spojen s mitochondriální membránou (Kaneko et al., 1997). Oba izoenzymy přestupují za fyziologických okolností v malé míře do krve, přičemž poměr mitochondriální a cytoplazmatické AST je asi 1 : 8. Biologický poločas AST je zhruba 18 hodin (Schneiderka et al., 2004).

### 3.2.2.3.2. Alaninaminotransferáza (ALT)

ALT je cytoplazmatický enzym, jehož úlohou je přenos aminoskupiny z alaninu na oxoglutarát za vzniku glutamátu a pyruvátu. Jeho kofaktorem je také pyridoxal-5'-fosfát. ALT se nachází ve stejných tkáních jako AST, ale nejvyšší aktivity dosahuje v játrech (Kaneko et al., 1997). I když je aktivita ALT v svalch mnohem nižší, jejich celkový objem oproti játrům je větší, a tak jsou svaly významným zdrojem ALT v krvi (Thrall et al., 2006). Z buněk, v nichž je tento enzym obsažen, se uvolňuje do cirkulace, kde jeho poločas činí asi 48 hodin (Schneiderka et al., 2004).

### 3.2.2.3.3. Alkalická fosfatáza (ALP)

ALP je skupina zinkových metaloenzymů (Kaneko et al., 1997), které katalyzují hydrolýzu fosfátových esterů v alkalickém prostředí (Zima, 2002). Reakční optimum leží v oblasti pH 9-10 (Dürr et Kraft, 2001). ALP byla prokázána téměř ve všech tkáních organismu v různých aktivitách. V krevním séru jde o směs izoenzymů pocházejících z kostí, jater, ledvin, trávicího traktu a v těhotenství také z placenty. Nejvyšší aktivitu v séru má však ALP pocházející z hepatocytů a v menší míře také z kostí. Ostatní izoenzymy mají biologický poločas velmi krátký (Thrall et al., 2006). Enzymy jsou lokalizovány v membráně a jsou odpovědné za transport některých látek. Důvodem vyšších hodnot ALP u mladých jedinců je větší aktivita kostního izoenzymu, který odráží činnost osteoblastů (Kaneko et al., 1997).

### 3.2.2.3.4. Další enzymy

**Glutamátdehydrogenáza** je mitochondriální enzym dosahující nejvyšší aktivity v játrech, je přítomná i v buňkách myokardu, ledvin, mozku, kosterním svalstvu a leukocytech. **Laktátdehydrogenáza** je cytoplazmatický enzym vyskytující se ve všech buňkách organismu. V krvi jsou nejvíce zastoupeny izoenzymy pocházející z jater a myokardu.  **$\gamma$ -glutamyltransferáza** je enzym exprimovaný v apikálních membránách epitelových buněk žlučových cest, vývodů pankreatu, hepatocytů, tubulárních buněk ledvin, enterocytů a dalších epitelů (Schneiderka et al., 2004). **Kreatinkináza (CK)** je enzym lokalizovaný v cytoplazmě buněk kosterního, srdečního i hladkého svalstva, mozku a nervech. **Sorbitoldehydrogenáza** se nachází volně v cytoplazmě buněk. Je přítomna ve vysokých koncentracích v hepatocytech, ale v ostatních tkáních je její aktivita nízká (Thrall et al., 2006).

## **4. HEMATOLOGICKÉ PARAMETRY KRVE KOČEK**

### **4.1. Červený krevní obraz**

Stav červeného krevního obrazu zjišťujeme z několika parametrů. Z funkčního hlediska je nejvýznamnějším parametrem množství hemoglobinu (Zima, 2002). Snadno získáme hematokritovou hodnotu. Dále počítáme erytrocyty a hodnotíme jejich morfologii. Významným ukazatelem je sedimentace červených krvinek.

Bylo prokázáno, že počet erytrocytů, hematokrit a množství hemoglobinu jsou u kočky dědičné (Lawler et al., 2006).

#### **4.1.1. Hematokrit**

Hematokrit udává podíl korpuskulárních složek k celkovému množství krve. Vzhledem k nízkému počtu leukocytů a trombocytů, které se nacházejí v tenkých vrstvičkách nad sloupcem červených krvinek, je tento ukazatel vnímán pouze jako podíl erytrocytů. Hematokrit závisí na počtu a objemu erytrocytů a na objemu plazmy.

Zvýšení hematokritu značí polyglobulii, která může být jak absolutní, a to v důsledku hypoxie, nebo relativní, z důvodu dehydratace. Další příčinou může být FeLV. Snížení hematokritové hodnoty znamená ve většině případů anémii či urémii (Doubek et al., 2007; Dürr et Kraft, 2001).

#### **4.1.2. Množství hemoglobinu**

Určením množství hemoglobinu zjistíme, jak jsou erytrocyty zásobeny krevním barvivem. Stanovené množství hemoglobinu pak umožňuje posoudit případný druh anémie. Hodnocení odchylek od normálních hodnot je stejné jako při počítání erytrocytů (viz dále) (Dürr et Kraft, 2001).

#### **4.1.3. Počet erytrocytů**

Změny počtu červených krvinek jsou způsobeny snížením či zvýšením krvetvorby, náhradní krvetvorbou (slezina, játra), zvýšeným rozpadem erytrocytů nebo ztrátami krve. U kočky může dojít k rychlému nárůstu množství erytrocytů díky silně kontraktilní slezině. Samotný počet erytrocytů má omezenou výpovědní hodnotu (Doubek et al., 2003).

Příčiny zvýšení počtu erytrocytů mohou být různé: dehydratace (relativní), vzrušení, šok, strach, hypoxie, hypertyreóza a onemocnění srdce nebo plic. Snížení počtu červených krvinek je způsobeno nejčastěji anémiemi (Doubek et al., 2007; Dürr et Kraft, 2001).

#### **4.1.4. Počet retikulocytů**

Vývojová stadia erytrocytů, retikulocyty, se v krvi koček nacházejí fyziologicky. Rozdělují se podle míry agregace bazofilního materiálu v buňkách, která v průběhu zrání retikulocytů klesá. Retikulocyty III s výraznými shluky tohoto materiálu tvoří u zdravých koček až 0,4 % erytrocytů. Retikulocyty I a II s mírnou až střední agregací pozorujeme až u 10 % erytrocytů.

Retikulocyty s ribozomální RNA ve formě zrněk a vláken se znázorní vitálním barvením. Stanovení jejich počtu má význam, pokud zjišťujeme regenerativní proces v kostní dřeni, např. při ztrátě krve. Tehdy se jako první v krvi koček objevují retikulocyty a jejich počet se zvyšuje (retikulocytóza). (Day et al., 2000; Doubek et al., 2003).

#### **4.1.5. Morfologie erytrocytů**

V tenkém, dobře zbarveném krevním nátěru se dá určit tvar, velikost a zbarvení erytrocytů. Červené krvinky koček mají nevýrazné centrální projasnění, které je způsobeno tím, že krvinky nejsou tak vyduté jako u jiných živočichů (Dellmann et Eurell, 1998). Erytrocyty se vyznačují střední anizocytózou (odchylky v průměru) (Doubek et al., 2003). Narozdíl od jiných zvířat se některé abnormality erytrocytů vyskytují v krvi koček do určité míry fyziologicky. Nejčastěji jsou to inkluze v erytrocytech: Heinzova a Howell-Jollyho tělíska. Heinzova tělíska se v červených krvinkách koček jeví jako velké, samostatné struktury. U koček se nacházejí běžně až u 5 % erytrocytů (Doubek et al., 2003). Je to způsobeno tím, že hemoglobin koček obsahuje 8 sulfhydrylových skupin na jeden tetramer hemoglobinu (ostatní zvířata mají 2-3), proto je zvýšená i náchylnost k tvorbě Heinzových tělísek. Howell-Jollyho tělíska se u koček pozorují až u 1% erytrocytů bez chorobných příznaků (Day et al., 2000). Příčinou vyššího výskytu inkluzí u koček je skutečnost, že slezina koček neobsahuje sinusové struktury, a tak není schopná tyto buňky odstranit, a ty pak přežívají déle v oběhu (Christopher et al., 1990). U koček často vyskytuje i penízkovatění (rouleaux) (Dellmann et Eurell, 1998). Kromě inkluzí můžeme v erytrocytech pozorovat také parazity, u koček to nejčastěji bývá *Mycoplasma haemofelis* či *Cytauxzoon felis* (Thrall et al., 2006).



### **4.1.6.Sedimentace erytrocytů**

Schopnost sedimentace závisí na mnohých faktorech: počet a velikost buněk, povrchové napětí, obsah fibrinogenu a také druh a koncentrace antikoagulantia. Sedimentace se vyjadřuje v mm za časovou jednotku.

Zrychlená sedimentace provází infekční choroby, záněty, urémii a anémii. Snížení může znamenat polyglobulii nebo dehydrataci (Doubek et al., 2007; Dürr et Kraft, 2001).

## **4.2. Bílý krevní obraz**

Počet a zastoupení leukocytů podléhá stálým změnám dle potřeb organismu. Bílé krvinky využívají krevní plazmu jako transportní médium, v němž se víceméně zdržují na cestě z místa svého vzniku k místu působení a zániku. Určité množství neutrofilních granulocytů je zachyceno na endotel cév a tvoří zde tzv. marginální pool. Ten je u koček dvojnásobný až trojnásobný oproti cirkulujícímu množství neutrofilů. Neutrofil marginálního poolu mohou být v případě fyziologického (stres, námaha, vzrušení) nebo patologického stimulu (infekce, zánět) rychle mobilizovány (Day et al., 2000). Proto každý výsledek při počítání a diferenciaci leukocytů vyžaduje okamžitou interpretaci.

### **4.2.1.Počet leukocytů**

Odchytky v počtu leukocytů mohou zahrnovat změnu v rychlosti jejich produkce, uvolňování z kostní dřeně, distribuce mezi marginálním a cirkulujícím poolem a míru odchodu leukocytů do tkání.

Zvýšení celkového počtu leukocytů nad horní hranici referenčních hodnot se nazývá leukocytóza. Fyziologická leukocytóza je u koček velmi častá a bývá způsobena vzrušením a strachem. Patologická leukocytóza má spoustu příčin: infekční choroby (především bakteriálního původu), urémie, diabetes mellitus, intoxikace (olovo, rtuť), cizí proteiny (sérová injekce, transfúze), choroby centrální nervové soustavy (tumory, encefalitidy) atd. (Dürr et Kraft, 2001).

Snížení počtu leukocytů pod spodní hranici referenčních hodnot značíme jako leukocytopenii (leukopénii). Její příčiny mohou být virové infekční choroby (Wexler – Mitchell, 2004), šok, zvýšená potřeba leukocytů (peritonitida, pleuritida, endometritida) a buněčné jedy (cytostatika, chloramfenikol) (Dürr et Kraft, 2001).

## 4.2.2. Diferenciální krevní obraz

Diferenciální rozpočet leukocytů může být vyjádřen jako procentuální zastoupení, jehož pomocí pak vypočítáme celkový počet jednotlivých druhů leukocytů. Společně s počítáním leukocytů hodnotíme jejich morfolonii (Day et al., 2000). Leukocyty koček oproti jiným zvířatům vykazují určité odlišnosti. U neutrofilů až u 10 % koček na jádře pozorujeme paličky sexchromatinu (Doubek et al., 2003). Eozinofily mají šedooranžově zbarvená, delší až tyčinkovitá granula. Bazofilní granula jsou světlejší, barvicí se růžově až oranžovošedě, proto jsou bazofily často těžko rozpoznatelné od eozinofilů (Bacha et Bacha, 2000; Dellmann et Eurell, 1998). Lymfocyty mohou mít kapkovitý tvar (Doubek et al., 2003). Také některé abnormality leukocytů se u koček nacházejí fyziologicky. Až u 30 % neutrofilů můžeme pozorovat Döhleho tělíska (Day et al., 2000).

Jak celkový počet leukocytů, tak jejich diferenciální rozpočet jsou užitečné k posouzení příčiny, závažnosti, trvání a prognóze chorobného procesu.

### 4.2.2.1. Počet neutrofilů

**Neutrofilie:** počet neutrofilů přesahující referenční hodnoty. Příčiny mohou být různé: stres, strach, zánětlivé procesy, infekce, hemolytické stavy, nekrózy, hypertyreóza a mnoho dalších (Day et al., 2000). Velký počet neutrofilů mohou mít kočky s rakovinou (Wexler – Mitchell, 2004).

**Neutropenie** nastává v důsledku zkráceného přežívání neutrofilů při bakteriální infekci nebo jsou její příčinou poruchy granulopoézy při akutní virové infekci - u koček zejména virem kočičí imunodeficiencie (FIV) či myelodysplastickým syndromu (vyvolaném nejčastěji FeLV) (Day et al., 2000).

### 4.2.2.2. Počet eozinofilů

**Eozinofilie:** Primární příčinou je zvýšená produkce či uvolňování eozinofilů z kostní dřeně. Zvýšený počet eozinofilů je nejčastějším znakem mnohých hypersenzitivit či parazitárních infekcí (Day et al., 2000; Wexler – Mitchell, 2004).

**Eozinopenie:** Vzniká v důsledku akutního stresu či infekce, nebo po aplikaci glukokortikoidů. Snížený počet eozinofilů je znakem různých akutních infekcí, zánětů a metabolických poruch (Day et al., 2000).

#### 4.2.2.3. Počet bazofilů

Bazofily se v krvi zdravých koček vyskytují výjimečně, proto každý jejich nález bývá známkou onemocnění. **Bazofilie** má podobné příčiny jako eozinofilie. Zvýšení počtu bazofilů v krvi způsobují také chronické myeloidní leukémie, hyperlipoproteinemie a některé parazitózy (Day et al., 2000).

#### 4.2.2.4. Počet lymfocytů

**Lymfocytóza** může být fyziologická, se stejnými příčinami jako neutrofilie. Lymfocytóza je častá u mláďat. Patologickou příčinou zvýšení počtu lymfocytů bývají chronické infekce nebo lymfocytární leukémie. (Day et al., 2000).

**Lymfopenie** bývá způsobena stresem, působením glukokortikoidů nebo akutními virovými infekcemi (FeLV, FIV) (Day et al., 2000; Doubek et al., 2007).

#### 4.2.2.5. Počet monocytů

Mononukleární fagocyty se hromadí v místě zánětu, **monocytóza** je tedy znakem probíhající zánětlivé reakce. Monocytóza je u koček jednou z hematologických abnormalit při FIV infekci. Monocytózu způsobují také autoimunitní onemocnění, tumory, myelomonocytární leukémie atd.

**Monocytopenie** nastává jako odpověď na akutní infekce a záněty, ale má malou klinickou významnost (Day et al., 2000).

### 4.3. Počet trombocytů

Příčinou změn počtu trombocytů může být jejich nedostatečná tvorba v kostní dřeni, vysoké ztráty (spotřebou při koagulacích), zvýšené odbourávání ve tkáních a redistribuce ve slezině (Doubek et al., 2003).

Ke zvýšení počtu trombocytů může dojít po operaci, ztrátě krve, odstranění sleziny, chronických zánětech, deficitu železa, stresu nebo při myeloproliferativních syndromech. **Trombocytopenie** je zapříčiněna buď poruchami tvorby trombocytů (důsledkem ionizačního záření, infekcí, deficitem vitaminů, poruchami imunity), poruchami oběhu, ztrátami krve nebo poruchami distribuce trombocytů. Při nedostatku krevních destiček může dojít k život ohrožujícímu krvácení (Doubek et al., 2007; Dürr et Kraft, 2001).

## **5. BIOCHEMICKÉ PARAMETRY KRVE KOČEK**

Diagnostický význam biochemických parametrů je odvozen z fyziologické, resp. patofyziologické role daného ukazatele. Pro správnou interpretaci je proto nezbytná znalost této úlohy, vzájemné souvislosti mezi jednotlivými parametry a znalost referenčních hodnot (Doubek et al., 2007).

Existuje celá řada biochemických parametrů, které lze stanovovat. Jejich odchylka od normálních hodnot poukazuje na určité onemocnění. Následující odstavce pojednávají o nejčastěji měřeným parametrech u koček.

### **5.1. Monosacharidy**

Nejčastěji stanovovaným monosacharidem je glukóza. Kočky mají hladinu glukózy v plazmě oproti plné krvi vyšší až o 1,2 mmol/l. Příčiny hyperglykémie jsou stresové situace, u koček zejména emocionálního původu. Velmi významné jsou hormonálně podmíněné poruchy jako je diabetes mellitus, nadbytek růstového hormonu, glukokortikoidů, adrenalinu, nadprodukce testosteronu a hypertyreóza. K dalším příčinám hyperglykémie patří renální insuficience a pankreatitida. Hypoglykémie je způsobena buď jaterní insuficiencí, deficitem jaterních enzymů zúčastněných v metabolismu sacharidů, hladověním, nadprodukcí inzulínu či sníženou glukoneogenezí. Její příčinou můžou být také šokové a septické stavy nebo dlouhotrvající křeče, kdy je zvýšená spotřeba glukózy. (Doubek et al., 2007; Thrall et al., 2006).

### **5.2. Lipidy**

U zdravého jedince mají celkové lipidy relativně široký rozsah normálních hodnot. Jejich koncentrace závisí především na způsobu stravy. Pro zjištění stavu lipidového metabolismu a jeho poruch je stanovení lipémie jen orientační (Musil, 1994). Vyšší výpovědní hodnotu má stanovení triacylglycerolů a cholesterolu. Hodnoty těchto parametrů jsou u kočky dědičné (Lawler et al., 2006). Příčiny zvýšení koncentrace triacylglycerolů jsou nejčastěji hypotyreóza, diabetes mellitus, hyperadrenokorticismus, cholestáza nebo akutní pankreatitidy. Snížení jejich hladiny způsobuje steatóza jater či jiná jaterní onemocnění. Hypercholesterolemie má podobné příčiny jako zvýšená koncentrace triacylglycerolů (viz výše). Hypocholesterolemie bývá způsobena hypertyreózou, jaterní nebo exokrinní pankreatickou insuficiencí (Doubek et al., 2007).

### **5.3. Dusíkaté látky**

Nejčastěji se provádí stanovení koncentrace močoviny v plazmě. Příčiny zvýšení její hladiny lze podle jejich lokalizace rozdělit jako prerenální, renální a postrenální. Prerenální příčiny jsou především dehydratace, krvácení do tkání nebo tělních dutin (především v zažívacím traktu), zvýšený katabolismus (horečka), hypertyreóza, šokové stavy a nekrózy tkání. Z renálních příčin jmenujme glomerulonefritidu, nefropatie, tumor ledvin a další choroby. Postrenálně významné příčiny jsou ruptury močových cest, tumory a kočičí urologický syndrom. Snížení koncentrace močoviny může být zapříčiněno potravou chudou na proteiny, hladověním, selháním činnosti jater, portosystémovými zkraty atd. (Doubek et al, 2007; Dürr et Kraft, 2001).

Často se společně s koncentrací močoviny stanovuje hladina kreatininu, která je pro posouzení funkce ledvin citlivějším ukazatelem než stanovení močoviny. Zvýšená koncentrace kreatininu je způsobena renálním selháním, rupturou močového měchýře, šokem či dehydratací (Doubek et al., 2007).

### **5.4. Bilirubin**

Metabolismus bilirubinu může být porušen na různých úrovních, což má vždy za následek vzrůst jeho koncentrace. V důsledku hemolýzy (při hemolytických anémiích) se zvyšuje odbourávání hemoglobinu a tím i množství bilirubinu (Wexler – Mitchell, 2004). V hepatocytech může dojít k poruše transportu, konjugace nebo sekrece bilirubinu do žlučových kanálků. Další porucha spojená se vzrůstem hladiny bilirubinu je přerušení transportu ve žlučovodech, kdy žluč nemůže volně odtékat (Dürr et Kraft, 2001).

### **5.5. Celková bílkovina**

Celková bílkovina zahrnuje všechny proteiny obsažené v plazmě. Její hladina je u koček dědičná (Lawler et al., 2006). Příčiny hyperproteinemie jsou chronické infekce a záněty, mnohočetný myelom, lymfomy, hypersenzitivity či autoimunitní onemocnění. Naopak hypoproteinemii způsobují poruchy vstřebávání či nedostatek proteinů ve výživě, poruchy funkcí jater, septické stavy, ztráty proteinů střevem nebo ledvinami (Doubek et al., 2007).

## 5.6. Enzymy

Změny aktivit enzymů slouží jako citlivý indikátor poruch buněčné integrity a viability, které jsou vyvolané chorobnými procesy. U koček jsou nejčastěji stanovovány AST, ALT, ALP a CK. Další enzymy se nevyužívají především pro malou specifitu, nízkou aktivitu a její rychlý pokles v séru.

Alaninotransferáza je u kočky jaterně specifický enzym, který se hodí ke stanovení, zda jsou játra postižena, či nikoli. Při těžkém poškození jaterního parenchymu (nekrózy, tumory) však může zůstat aktivita ALT nezměněná, nebo být dokonce snižena (Doubek et al., 2007). Sérová aktivita ALT se zvyšuje zhruba 12 hodin po poškození buněk a maxima dosahuje 1. až 2. den. Zvýšení ALT doprovází také vážné poškození svaloviny.

I když je aktivita aspartátaminotransferázy při poškození jater nižší než ALT, AST je u koček více citlivý enzym pro posouzení stavu jater. Jeho biologický poločas u kočky je však jen 1-2 hodiny. K rozlišení, zda jde o vzrůst AST (případně ALT) způsoben poškozením jater či svaloviny slouží měření kreatinkinázy, jejíž koncentrace je v případě poškození svaloviny zvýšena. Problémem je ale rychlý návrat hodnot CK do původního stavu. Poškození jater spojené se zvýšením aktivity ALT a/nebo AST může nastat v důsledku infekcí, intoxikací, traumat, šoku, lipidózy nebo portosystémových zkratů (Kaneko et al., 1997; Thrall et al., 2006).

Hodnota aktivity alkalické fosfatázy, stejně jako aktivita ALT, jsou u kočky dědičné (Lawler et al., 2006). Aktivita ALP je závislá na věku, proto jsou pro jednotlivé věkové kategorie u kočky stanovena referenční rozmezí (tab. 5). Jaterní potenciál tvorby ALP je nižší než u jiných zvířat, stejně tak je kratší i její biologický poločas, který činí asi 6 hodin. V důsledku to znamená, že při stejném jaterním poškození bude mít kočka nižší aktivitu ALP než ostatní zvířata. I malé zvýšení aktivity ALP je tedy podstatné a může nastat z různých příčin, nejčastěji jsou to onemocnění jater, žlučníku a žlučových cest. Pro zjištění cholestázy se u koček doporučuje jako alternativní stanovení  $\gamma$ -glutamyltransferázy. Zvýšení aktivity ALP způsobuje také osteosarkom nebo jiné kostní nádory v důsledku proliferace osteoblastů (Thrall et al., 2006).

## 6. VYŠETŘENÍ KRVE KOČEK

Profil krve poskytuje důležitý klíč k možným chorobám, proto je krev nejčastěji hodnoceným biologickým materiálem při zhoršeném zdravotním stavu jedince. Výskyt různých chorobných stavů také souvisí s přibývajícím věkem, proto by se měla starší zvířata nechávat pravidelně preventivně vyšetřit.

Při vyšetření krve je velmi důležitá preanalytická fáze, která rozhoduje o správnosti výsledků více jak z 50 %. Kočka je extrémně citlivá na rozrušení. Některé hematologické a biochemické parametry (počet erytrocytů, hematokrit, hemoglobin, počet leukocytů, dále koncentrace glukózy, laktátu, celkové bílkoviny, močoviny a enzymů) mohou být vlivem nevhodného zacházení se zvířetem značně ovlivněny. Při těsném sevření zvířete v průběhu vyšetření hrozí poškození tkání a zvýšení hladiny proteinů a některých enzymů. Krev by tedy měla být odebrána co nejdříve po začátku vyšetření nebo až po zklidnění jedince. U koček je krev nejčastěji odebírána z *vena cephalica* (obr. 12) na přední končetině, *vena saphena* na zadní končetině nebo *vena jugularis* na krku. Doba odběru bývá zpravidla ráno nalačno (12 hodin hladovka) bez předchozího přijímání léků a jiných preparátů. Nedávné krmení zvyšuje především hodnoty krevní glukózy, lipidů a močoviny. Pro analýzu se používá dle potřeby buď plná krev, častěji však krevní plazma nebo sérum (Doubek et al., 2007; Dürr et Kraft, 2001).



Obr. 12 Venepunkce na přední končetině (URL 8)

Při všeobecném vyšetření, i při zdravotních potížích nebo známkách určitého onemocnění se provádějí analýzy související s předběžnou diagnózou. V zájmu racionality jsou stanoveny různé skupiny vyšetření (tab. 1 a 2).

preventivní vyšetření	hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet (diferenciál)
předoperační vyšetření	hematokrit, hemoglobin, počet leukocytů a trombocytů, diferenciál
šokové stavy	hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet
nechutenství	hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet
zvracení	hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet
průjem	hematokrit, hemoglobin, počet leukocytů, diferenciální rozpočet
polyurie, polydipsie	hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet
slabost, únava	hematokrit, hemoglobin, počet leukocytů, diferenciální rozpočet
projevy onemocnění kůže	počet leukocytů, diferenciální rozpočet
projevy onemocnění GIT	hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet
projevy onemocnění jater	počet erytrocytů, leukocytů, trombocytů
projevy onemocnění ledvin	hematokrit, hemoglobin, počet retikulocytů a leukocytů

**Tab. 1 Indikace k hematologickému vyšetření (podle Doubek et al., 2007)**

všeobecné vyšetření	glukóza, močovina, kreatinin, celková bílkovina, transferázy, ALP
předoperační vyšetření	celková bílkovina, glukóza, kreatinin, transferázy, ALP
šokové stavy	celková bílkovina, glukóza, kreatinin, laktát
nechutenství	močovina, kreatinin, glukóza, celková bílkovina, transferázy, ALP
zvracení	celková bílkovina, močovina, kreatinin, transferázy, K, Na, Cl
průjem	celková bílkovina, močovina, kreatinin, transferázy, ALP, K, Na, Cl
polyurie, polydipsie	celková bílkovina, glukóza, močovina, kreatinin, ALP
slabost, poruchy růstu a vývoje	kreatinkináza, laktát, transferázy, ALP
onemocnění kůže	ALP, transferázy, cholesterol, glukóza
onemocnění trávicího systému	Na, K, Cl, amyláza, lipáza, vitamin B <sub>12</sub> , kyselina listová
onemocnění jater	transferázy, ALP, bilirubin, žlučové kyseliny, amoniak
onemocnění ledvin	močovina, kreatinin, celková bílkovina, Na, K, Ca, P

**Tab. 2 Indikace k biochemickému vyšetření krve (podle Doubek et al., 2007)**

Získané výsledky změřených parametrů se porovnávají s referenčními hodnotami (tab. 3 a 4), případně se hodnotí i klinický nález. Referenční hodnoty jsou hodnoty laboratorního vyšetření získané za definovaných podmínek, mezi nimiž leží 95 % naměřených hodnot daného souboru zdravých jedinců. Jsou ohraničeny dolní a horní mezí, mezi kterými je referenční rozmezí (Doubek et al., 2007). Různí autoři uvádějí mírně odlišná referenční rozmezí pro dané parametry. Tato nejednotnost je způsobena především nestejnými podmínkami odběru a zpracováním vzorků, použitou metodikou a jejím provedením.



## 6.1. Referenční hodnoty vybraných parametrů u kočky

parametr	jednotka	rozmezí
Hematokrit	%	24 - 45
Hemoglobin	g/l	80 - 150
Erytrocyty	*10 <sup>12</sup> /l	5,0 - 10,0
Retikulocyty	*10 <sup>12</sup> /l	0,002 - 0,016
Leukocyty	*10 <sup>9</sup> /l	7,0 - 17,0
Neutrofily - tyčky	*10 <sup>9</sup> /l	0 - 0,3
Neutrofily - segmenty	*10 <sup>9</sup> /l	3,6 - 12
Eozinofily	*10 <sup>9</sup> /l	0 - 0,9
Bazofily	*10 <sup>9</sup> /l	0 - 0,1
Lymfocyty	*10 <sup>9</sup> /l	1,0 - 6,0
Monocyty	*10 <sup>9</sup> /l	0 - 0,6
Trombocyty	*10 <sup>9</sup> /l	300 - 600

Tab. 3 Referenční rozmezí hematologických parametrů (podle Doubek et al., 2007)

parametr	jednotka	rozmezí
celková bílkovina	g/l	57 - 95
glukóza	mmol/l	3,1 - 6,9
močovina	mmol/l	5 - 11,3
kreatinin	μmol/l	50 - 170
bilirubin	μmol/l	0 - 7,0
triacylglyceroly	mmol/l	0,5 - 2,6
cholesterol	mmol/l	2,0 - 5,2
ALT	μkat/l	0,1 - 1,0
AST	μkat/l	0,1 - 1,0
kreatinkináza	μkat/l	0,1 - 4,0

Tab. 4 Referenční rozmezí biochemických parametrů (podle Doubek et al., 2007)

věk kočky	ALP (nkat/l)
do 3 měsíců	do 9 402
do 6 měsíců	do 5 551
do 12 měsíců	do 3 300
do 2 let	do 2 517
do 3 let	do 1 667
do 5 let	do 1 417
do 7 let	do 1 267
do 10 let	do 1 517
nad 10 let	do 1 534

Tab. 5 Závislost referenčního rozmezí aktivity ALP na věku (podle Dürr et Kraft, 2001)

## 7. ZÁVĚR

Kočka domácí se stala jedním z nejoblíbenějších domácích zvířat, s čímž souvisí i vyšší nároky na veterinární péči. Kočky mohou trpět nejrůznějšími chorobami, které lze většinou odhalit pomocí vyšetření krve. Velmi záleží na samotném odběru a zpracování vzorku. Kočka je nesmírně citlivé zvíře a již stres z vyšetření způsobuje významné odchylky řady parametrů, které pak mohou být důsledkem jejich nesprávné interpretace. Proto je potřeba šetrné zacházení se zvířetem, aby měřené hodnoty byly co nejméně (nebo ideálně vůbec) ovlivněny.

Všechny krevní složky se za fyziologických okolností pohybují v referenčním rozmezí hodnot specifických pro tento druh. Krevní buňky koček se oproti jiným zvířatům vyznačují určitými zvláštnostmi. Je to především menší vydutost erytrocytů, charakteristický vzhled granul leukocytů a některé abnormality krvinek, vyskytující se i u zdravých koček. Patří sem Heinzova a Howell-Jollyho tělíska erytrocytů a Döhleho tělíska neutrofilů. Také retikulocyty se u koček do určité míry nacházejí fyziologicky.

Většina odchylek, ať už kvalitativních či kvantitativních, je způsobena chorobnými procesy, ale jejich vznik může být podmíněn i podáním některých látek, které jsou přidávány do krmiv pro zvířata nebo do léčiv. Podrobný výzkum v tomto směru postupně odhaluje všechny souvislosti, aby mohly být nežádoucí účinky eliminovány.

Tato práce shrnuje poznatky o hematologických a biochemických parametrech krve koček a měla by sloužit jako přehledný materiál, jenž může být využit jako základ pro navazující diplomové práce a výzkum v této oblasti.

# SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

## OBRÁZKY:

Obr. 1 Hematopoéza s hlavními růstovými faktory .....	9
Obr. 2 Průřez erytrocytem savců .....	13
Obr. 3 Vybrané abnormality erytrocytů .....	16
Obr. 4 Inkluze v erytrocytech .....	17
Obr. 5 Segmentovaný neutrofil, schéma .....	18
Obr. 6 Eozinofilní granulocyt, schéma .....	19
Obr. 7 Bazofilní granulocyt, schéma .....	20
Obr. 8 Lymfocyt, schéma .....	21
Obr. 9 Monocyt, schéma .....	21
Obr. 10 Vybrané abnormality leukocytů .....	23
Obr. 11 Funkce trombocytů .....	24
Obr. 12 Venepunkce na přední končetině .....	39

## TABULKY:

Tab. 1 Indikace k hematologickému vyšetření .....	40
Tab. 2 Indikace k biochemickému vyšetření krve .....	40
Tab. 3 Referenční rozmezí hematologických parametrů .....	41
Tab. 4 Referenční rozmezí biochemických parametrů .....	41
Tab. 5 Závislost referenčního rozmezí aktivity ALP na věku .....	41

## SEZNAM ZKRATEK

**ALP** – alkaline phosphatase – alkalická fosfatáza

**ALT** – alanine aminotransferase – alaninaminontransferáza

**APC** – antigen presenting cell – buňka prezentující antigen

**AST** – aspartate aminotransferase – aspartátaminotrasferáza

**ATP** – adenosine triphosphate – adenosintrifosfát

**BFU-E** – burst-forming unit-erythroid – jednotka tvořící „kolonie“ pro erytrocyty

**CFU** – colony-forming unit – jednotka tvořící kolonie

**CFU-Bas** – colony-forming unit-basophil – jednotka tvořící kolonie pro bazofily

**CFU-E** – colony-forming unit-erythroid – jednotka tvořící kolonie pro erytrocyty

**CFU-Eos** – colony-forming unit-eosinophil – jednotka tvořící kolonie pro eozinofily

**CFU-G** – colony-forming unit-granulocyte – jednotka tvořící kolonie pro granulocyty

**CFU-GEMM** – colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte – jednotka tvořící kolonie pro granulocyty, erytrocyty, makrofágy, megakaryocyty

**CFU-GM** – colony-forming unit-granulocyte-macrophage – jednotka tvořící kolonie pro granulocyty a makrofágy

**CFU-M** – colony-forming unit-macrophage – jednotka tvořící kolonie pro makrofágy

**CFU-Meg** – colony-forming unit-megakaryocyte – jednotka tvořící kolonie pro megakaryocyty

**CK** – creatin kinase – kreatinkináza

**DIC** – disseminated intravascular coagulation – diseminovaná intravaskulární koagulace

**EDTA** – ethylenediaminetetraacetic acid – kyselina ethylendiamintetraoctová

**FeLV** – feline leukaemia virus – virus kočičí leukémie

**FIV** – feline immunodeficiency virus – virus kočičí imunodeficiency

**G-CSF** – granulocyte colony-stimulating factor – faktor stimulující kolonie pro granulocyty

**GM-CSF** – granulocyte macrophage colony-stimulating factor – faktor stimulující kolonie pro granulocyty a makrofágy

**HDL** – high density lipoproteins – lipoproteiny o vysoké hustotě

**IDL** – intermediate density lipoproteins – lipoproteiny o střední hustotě

**IgA** – imunoglobulin A

**IgD** – imunoglobulin D

**IgE** – imunoglobulin E

**IgG** – imunoglobulin G

**IgM** – imunoglobulin M

**IL-2** – interleukin 2

**IL-3** – interleukin 3

**IL-4** – interleukin 4

**IL-5** – interleukin 5

**IL-6** – interleukin 6

**IL-7** – interleukin 7

**IL-9** – interleukin 9

**IL-12** – interleukin 12

**LDL** – low density lipoproteins – lipoproteiny o nízké hustotě

**M-CSF** – macrophage colony-stimulating factor – faktor stimulující kolonie pro makrofágy

**NK** – natural killer – přirození zabíječi

**RNA** – ribonucleic acid – ribonukleová kyselina

**TAG** – triacylglyceroly

**T<sub>C</sub>** – cytotoxic T-cell – cytotoxický T-lymfocyt

**T<sub>H</sub>** – helper T-cell – pomocný T-lymfocyt

**VLDL** – very low density lipoproteins – lipoproteiny o velmi nízké hustotě

# SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Bacha, W. J., Bacha, L. M.** 2000. *Color atlas of veterinary histology*. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. 318 p.
- Day, M. J., Mackin, A., Littlewood, J. D.** 2000. *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. British Small Animal Veterinary Association. 328 p.
- Dellmann, H. D., Eurell, J. A.** 1998. *Textbook of veterinary histology*. Fifth edition. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. 380 p.
- Donner, L.** 1985. *Klinická hematologie*. 1. vyd. Praha : Avicenum. 448 s.
- Doubek, J.; Bouda, J., Doubek, M., Fürll, M., Knotková, Z., Pejřilová, S., Pravda, D., Scheer, P., Svobodová, Z., Vodička, R.** 2003. *Veterinární hematologie*. Brno : Noviko, a.s. 464 s.
- Doubek, J., Šlosárková, S., Řeháková, K., Scheer, P., Beránková, J.** 2007. *Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat*. Brno : Noviko, a.s. 78 s.
- Dürr, U. M., Kraft, W.** 2001. *Klinická laboratorna diagnostika vo veterinárnej medicíne*. Bratislava : Hajko & Hajková. 365 s.
- Hasegawa, S., Rodgers G. P., Shio, H., Schechter, A. N., Uyesaka, N.** 1993. Impaired deformability of Heinz body-forming red cells. *Biorheology*, May-Aug; 30(3-4), p. 275-86.
- Hořejší, V., Bartůňková, J.** 2005. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha : Triton, s.r.o. 279 s.
- Christopher, M. M., White, J. G., Eaton, J.W.** 1990. Erythrocyte pathology and mechanism of Heinz body-mediated hemolysis in cats. *Veterinary pathology*, Sep; 27(5), p. 299-310.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L.** 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Fifth edition. Academic press. 932 p.
- Ketley, N. J., Newland, A. C.** 1997. Haemopoietic growth factors. *Postgraduate medical journal*, 73, p. 215–221.
- Kozák, T.** 2001. *Vnitřní lékařství, díl IIIb : Hematologie*. 1. vyd. Praha : Galén, Karolinum. 230 s.

**Lawler, D. F., Chase, K., Teckenbrock, R., Lark, K. G.** 2006. Heritable components of feline hematology, clinical chemistry, and acid-base profiles. *Journal of heredity*, Nov-Dec; 97(6), p. 549-54.

**Musil, J.** 1994. *Molekulové základy klinické biochemie*. Praha : Grada Avicenum. 384 s.

**Schneiderka, P., Jirsa, M., Kazda, A., Kocna, P., Mašek, Z., Nekulová, M. Pick, P., Šebesta, I., Šimíčková, M., Štern, P., Zima, T.** 2004. *Kapitoly z klinické biochemie*. 2. vyd. Karolinum. 356 s.

**Thrall, M. A., Baker, D. C., Campbell, T. W., DeNicola, D., Fettman, M. J., Lassen, E. D., Rebar, A., Weiser, G.** 2006. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Blackwell Publishing. 518 p.

**Wexler – Mitchell E.** 2004. *Guide to a healthy cat*. New Jersey : Wiley Publishing. 272 p.

**Wong, P.** 1999. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. *Journal of theoretical biology*, Feb 7; 196(3), p. 343-61

**Young, B., Lowe, J. S., Stevens, A., Health, J. W.** 2006. *Wheater's functional histology : A text and colour atlas*. Fifth edition. Elsevier Limited. 437 p.

**Zima, T.** 2002. *Laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Praha : Galén.

#### **INTERNETOVÉ ZDROJE:**

##### **URL 1:**

<http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/CytAnt/Cytokines/HematopoieticAgents.html>

**URL 2:** <http://sikoczan.scholaris.pl/fiz.html>

**URL 3:** <http://www.hematologyatlas.com/alteraerytro.htm>

**URL 4:** <http://diaglab.vet.cornell.edu/clinpath/modules/rbcmorph/poikf.htm>

**URL 5:** <http://www.aafp.org/afp/20011015/1379.html>

**URL 6:** <http://www.hematologica.pl/Atlas3/Angielska/SpisG.htm>

**URL 7:** <http://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/nh/function.cfm>

**URL 8:** <http://www.iacuc.arizona.edu/training/cats/inject.html>