

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



Transfuze krve u psů
Bakalářská práce

Autor práce: Krejzová Aneta
Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Transfuze krve u psů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce a cenné rady.

Transfuze krve u psů

Souhrn

Tato bakalářská práce má charakter kompilace. Pro získání informací bylo využito odborné literatury a vědeckých článků. Práce byla zaměřena na problematiku krevních transfuzí psů, jejího rozboru od historie vzniku po vývoj, metody aplikace, jejich výhod ale i nevýhod a možných komplikací. Dále se též práce zabývala popisem a rozбором jednotlivých složek krve, jakožto nezbytného atributu transfuzních praktik a v neposlední řadě její imunologií.

Krev má mnoho životně důležitých funkcí, ale ve spojitosti s transfuzemi má především funkci obrannou, kde sehrávají velice významnou roli leukocyty a imunoglobuliny, které mohou vyvolat imunologické reakce v důsledku jejich setkání s antigeny dárcovské krve. Aby se předešlo negativním reakcím, je nezbytná co nejvyšší antigenní shoda a inkompatibilita krevních skupin mezi dárcem a příjemcem. S těmito krevními skupinami psů se setkáváme poprvé v roce 1910, kdy byly definovány lékaři Emilem von Dungernem a Ludwigem Hirszfoldem. K ustálení názvosloví krevních skupin psa však došlo až roku 1974, kdy bylo klasifikováno jako DEA (dog erythrocyte antigen). Dnes již máme několik způsobů pro zjišťování typu a kompatibility krevních skupin, jako je například křížový test, aglutinační test, zkumavkový test či imunochromatografický test. Proto již nebývá tak velký výskyt inkompatibility, tedy neslučitelnosti, jako tomu bývalo v minulosti. První transfuzi mezi psy se uskutečnila roku 1666 anglickým anatomem Richardem Lowerem, ale jako běžně užívanou metodou se uplatňuje až od roku 1950. Od těchto počátků se vývoj transfuze značně posunul vpřed, technologie se zdokonalila a dnes je běžnou metodou. V dnešní době již využíváme i tzv. autotransfuzi uplatňující se zejména při plánovaných operačních zákrocích, jež se vyznačuje mnoha výhodami, jako je například zamezení infekčních onemocnění, vyloučení aloimunizace a imunosupresivních účinků. Často je však nutné použít krev od jiného dárce tzv. heterotransfuze. Tato metoda má široké uplatnění, i když s sebou nese i jistá rizika potransfuzních reakcí. Díky znalostem krevních skupin a novým technologiím je možné jim předcházet výše zmíněnými testy kompatibility, nebo jim alespoň následně zabránit.

Klíčová slova: transfuze, krev, krevní skupiny psa, rizika transfuze, aplikace, autotransfuze

Blood transfusion in dogs

Summary

This thesis has a character of a compilation. The used information was extracted from scientific and technical articles. The thesis was focused on canine blood transfusions, its development throughout history, application methods and their possible advantages or disadvantages and complications that may occur. The next aim of the thesis is an analysis and description of the individual blood components, as a necessary attribute of transfusion practices and ultimately its immunology.

Blood has many vital functions, but in the content of transfusions its main function is defense. An important role in this process play leukocytes and immunoglobulins, which can cause an immunological reactions due to their encounter with the antigens of donors blood. To avoid these negative reactions, it is necessary to have the highest antigenic match and blood group incompatibility between the donor and recipient. Canine blood groups were first defined in 1910 by doctor Emil Ludwig von Dungern and doctor Hirszfeld. However the terminology of canine blood groups was not used until 1974, when it was classified as DEA (dog erythrocyte antigen). Today there are several methods for detecting the type and compatibility of blood groups, such as the cross test, agglutination tube test or the immunoassay test. Therefore the occurrence of incompatibility is not as high as in the past. The first transfusion between dogs took place in 1666 by an English anatomist Richard Lower, however the method is commonly since 1950. Since then the development of transfusions took a significant leap forward, the technique was improved and became a commonly used method. Nowadays we use autotransfusion which is used especially during planned surgery. It has many advantages such as prevention of infectious diseases, exclusion of alloimmunization and immunosuppressive effects. Often it is necessary to use the blood of another donor. This method is widely used, although there is a certain risk of post transfusion reactions. Thanks to the knowledge of blood groups and new technologies, it is possible to prevent them by the mentioned compatibility tests, or at least subsequently avoid them.

Keywords: transfusion, blood, canine blood groups, threats of transfusion, application, autotransfusion

Obsah

3. Literární rešerše	7
3.1 Fyziologie krve.....	7
3.2 Krvetvorba a její složení.....	8
3.2.1 Krevní plazma.....	10
3.2.2 Erytrocyty	11
3.2.2.1 Hemoglobin	12
3.2.2.2 Erytropoeza.....	13
3.2.3 Trombocyty.....	15
3.2.4 Leukocyty	16
3.2.4.1 Granulocyty	16
3.2.4.2 Agranulocyty	18
3.3 Imunologie krve.....	21
3.3.1 Nespecifická imunita	21
3.3.2 Specifická imunita	22
3.3.3 Efektorové buňky.....	22
3.3.4 Protilátky.....	23
3.3.5 Antigen erytrocytu	24
3.4 Krevní skupiny psa	24
3.4.1 Určování krevních skupin.....	26
3.5 Krevní transfuze.....	29
3.5.1 Historie krevních transfuzí.....	29
3.5.2 Transfuzní přípravky.....	30
3.5.3 Požadavky na aplikace.....	33
3.5.4 Potransfuzní reakce.....	33
3.6 Autotransfuze	36
3.7 Krevní transfuze u anemických psů	37
4. Závěr.....	39
5. Seznam literatury	40
6. Seznam příloh	42

1. Úvod

Krevní transfuze je ve veterinární medicíně v dnešní době velmi rozšířenou, a to zejména jak již u zmíněných psů, tak i koček a v menším měřítku i u dalších zvířat. Díky těmto transfuzím se každý den zachrání na stovky psích životů po celém světě. Ať už jde o naše psí mazlíčky, či psy služební - v záchranářské, armádní, policejní, či jiné sféře. V létě roku 2015 jsem se na praxi u Armády České republiky seznámila s příběhem německého ovčáka Athose, který je speciálně vycvičen na vyhledávání výbušnin. Jeho příběh mě přesvědčil o tom, že transfuzní medicína ve veterinární oblasti má své veliké opodstatnění. Tohoto „válečného hrdinu“ zasáhla na misi v afghánském Lógaru povstalecká raketa. Měl silné krvácení v oblasti zad, porušenou močovou trubici a v sobě úlomky střepin. Těžce zraněného Athose zachránili američtí vojenští lékaři, kteří mu podávali nesčetné množství transfuzí od ostatních zdravých psů. Od roku 1950 se veterinární transfuze celosvětově rozrůstá, zdokonaluje se technika a dnes je běžně používanou metodou, proto bych ráda poukázala na její vývoj, aplikaci, rizika a též bych ráda rozebrala samotné složení krve, která je úzce spjata s tímto tématem zabývajícím se transfuzemi.

2. Cíl práce

Cílem práce bylo zpracovat ucelený přehled problematiky transfuze krve u psů, od základního přehledu fyziologie krve, přes imunologické zákonitosti a rizika, respektive nálezovou bezpečnost až po zásady použití metody v praxi.

3. Literární rešerše

Již v dávné minulosti si lidé všimli, že s krví unikající z těla odchází i život. Proto připisovali krvi životodárné účinky a nadpřirozenou moc. Primitivní národy pily krev nepřátel, aby získaly jejich sílu (Fábryová a kol., 2012). Staří Egypťané se domnívali, že krev koluje ze žaludku do celého těla a proměňuje se na krev v srdci a staří Hebrejci věřili, že v krvi se usídluje duše, a proto podle dávného židovského zákona musely být všechna masitá jídla zbavena veškeré krve (Doubek a kol., 2003). Krev je životně důležitou tělesnou tekutinou, odpovídající parenchymu dalších jiných orgánů. Hlavní úlohou krve je transport kyslíku, oxidu uhličitého, dalších metabolitů, vody a tepla (Svoboda a kol., 2001).

3.1 Fyziologie krve

Krev je životně důležitým orgánem, který má **regulační** funkci, jež je zajišťována různými informačními molekulami, nárazníkovými systémy apod. **Obranná** funkce je zajišťována leukocyty, imunoglobuliny, cytokiny, proteiny akutní fáze aj. A jak již bylo zmíněno výše, hlavní transportní funkcí je přenos kyslíku, oxidu uhličitého, dalších metabolitů, vody a tepla (Svoboda a kol., 2001). Krev je složena z celulárního kompartmentu, čili oddílu, tzn. **erytrocytů**, **leukocytů** a **trombocytů**. Tento kompartment zaujímá u dospělých zvířat přibližně 45% z celkového objemu krve. Dále je to oddíl extracelulární, jehož podíl na celkovém objemu krve činí asi 55%. Množství krve vyjádřené na 1 kg ž. hm. u dospělého psa kolísá v rozmezí 75-90ml krve/kg ž.hm. U mladých psů je objem krve na jednotku hmotnosti vyšší. Vlastnosti krve jsou hodnoceny těmito parametry:

Viskozita – vyplývá ze srovnání s H₂O, je závislá na počtu buněčných elementů a koncentraci plazmatických proteinů, také na teplotě, má význam pro hemodynamiku, čili proudový odpor.

Osmolalita – je dána počtem částic, jež jsou rozpuštěny v plazmě, je závislá na koncentraci solí, glukózy, dusíkatých a metabolitů. Proteiny ji příliš neovlivňují (činí kolem 300 nmol/kg vody).

Osmotický tlak – vyjadřuje rozdíl mezi plazmou a H₂O při ideálně semipermeabilní membráně, je závislý na osmolalitě (má hodnotu asi 750 kPa).

Tonicita – jedná se o osmotický tlak, ve srovnání s krevní plazmou (1 = izotonicita, hypertonicita > 1, hypotonicita < 1).

Onkotický tlak – znamená tlak proteinů plazmy proti intersticiu (stěny kapilár jsou pro proteiny nepropustné) – hodnota bývá kolem 3,5 kPa.

Poměrná hustota – je poměr specifické hmotnosti proti H₂O, závisí především na hodnotě hematokritu a koncentraci proteinů plazmy (Doubek a kol., 2003).

3.2 Krvetvorba a její složení

Během ontogeneze prochází **hematopoéza**, tedy tvorba krevních buněčných elementů, u savců třemi fázemi:

Mezoblastové období je první fází, kdy krvetvorba probíhá nejprve ve žlutkovém vaku nitroděložně v krevních ostrůvcích. Zde se některé buňky diferencují v buňky krevní, nazývané hemocytoblasty. Z těchto buněk se poté tvoří červené krvinky s jádrem. Vyžíváním pak vznikají tzv. megalocyty. Následně probíhá krvetvorba i v mezenchymu. V této fázi dochází tedy ke krvetvorbě erytroidní s velkými červenými krvinkami, jež obsahují fetální hemoglobin. Zaniká tedy krátce po narození.

Hepatolienálním obdobím se nazývá druhá fáze, kde k tvorbě buněčných elementů dochází opět nitroděložně, především v játrech a slezině. Začínají se tvořit jak megaloblasty, tak i normoblasty, které později vyžívají v normocyty. V tomto období dochází také k lymfopoeze v lymfatické tkáni. Hepatolienální fáze krvetvorby může přetrvávat ještě krátkou dobu po narození jedince.

Medulární fáze je poslední období začínající intrauterinně (Doubek a kol., 2003) a poté v krvetvorných orgánech. U dospělého jedince je to v lymfatických orgánech a kostní dřeni, kde se jedná o ploché kosti lebky, žebra, obratle, prsní kosti, lopatky a kyčelní kosti (Jelínek a kol., 2003), později pouze v plochých kostech. Kostní dřeň je orgánem krvetvorby, kde probíhá erytropoéza, granulopoeza, megakaryopoeza, resp. trombopoeza, a lymfopoeza (Doubek a kol., 2003). Podle stupně zralosti a místa výskytu se krevní buňky rozdělují do následujících kompartmentů neboli oddílů:

Kompartiment **kmenových** buněk (viz obr. 1): CFU-blast (colony forming unit-blast, mezenchymová buňka, ze které se tvoří všechny krevní elementy), dále CFU-GEMM (granulocyt, erytrocyt, megakaryocyt, monocyt) a lymfoidní kmenová buňka.

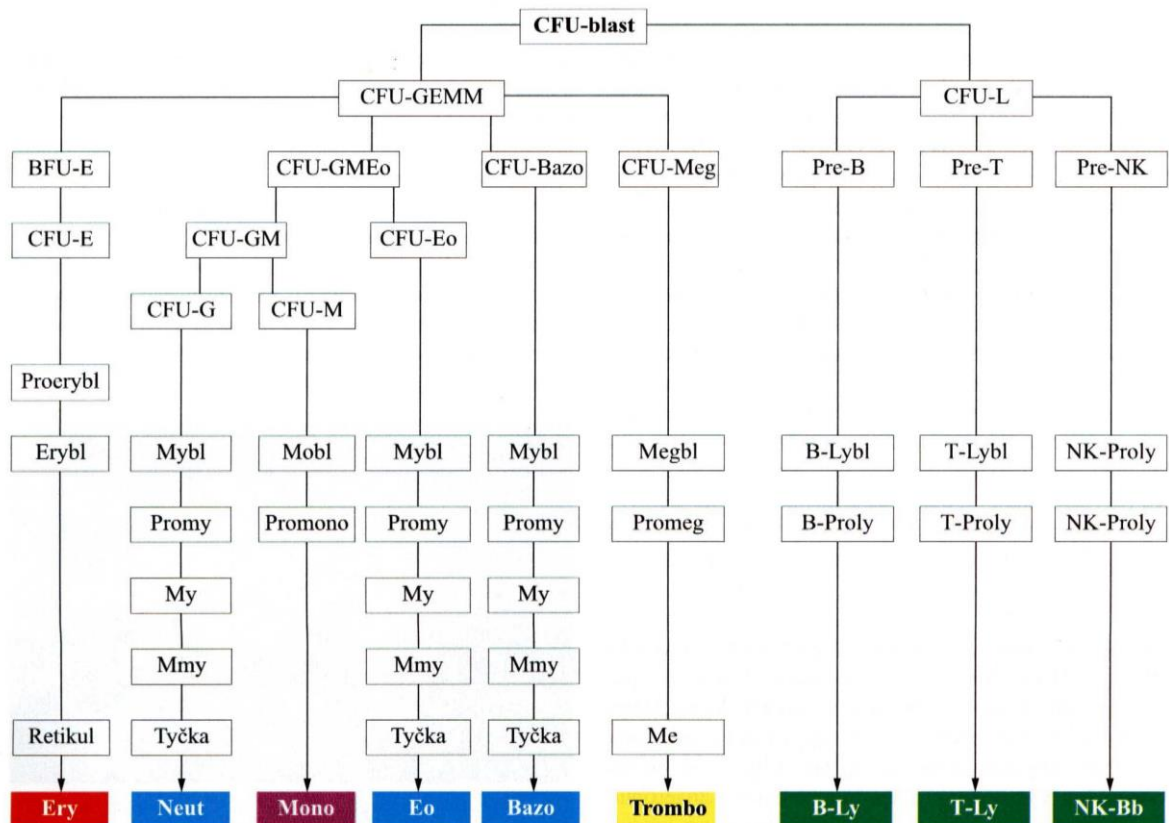
Kompartment **progenitorových** neboli determinovaných buněk: CFU-E pro erythrocyty (Svododa a kol., 2001). Progenitorové buňky erythrocytů nesou receptory pro hormon **erythropoetin**, jež má funkci řízení mitotického dělení a dozrávání vývojového stupně červených krvinek. Tento hormon se tvoří především v ledvinách a k jeho zvýšené produkci dochází při nedostatku O₂ ve tkáních. Dále je jeho produkce stimulována testosteronem, hormony štítné žlázy a růstovými hormony. Během vývoje erythrocytů probíhá nárůst hemoglobinu a vypuzení jádra. Poslední předstupeň erythrocytu se nazývá retikulocyt. (Jelínek a kol., 2003). CFU-G (granulocytární řada), CFU-M (monocyty), CFU-Meg (megakaryocytární řada).

Kompartment **prekurzorových** buněk:

- erythrocytární: patří sem proerythroblast, erythroblast a retikulocyt
- granulocytární: patří sem myeloblast, promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, monoblast, promonocyt
- megakaryocytární: sem patří megakaryoblast, promegakaryocyt, megakaryocyt

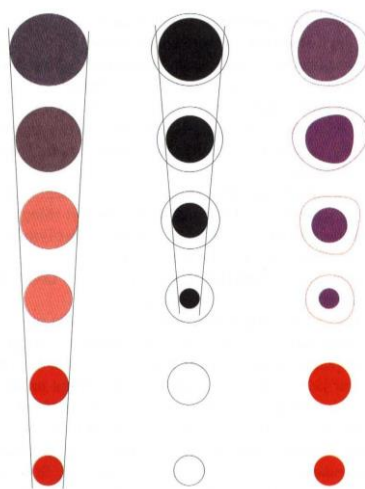
Kompartment **lymfocytární**: lymfoblast, polymfocyt, plazmoblast, proplazmocyt.

Kompartment **funkční**: krevní buňky v krvi, nebo buňky, které jsou sekundárně vycestované do tkání (Svododa a kol., 2001).



Obr. 1 Vývoj krevních elementů (Svododa a kol., 2001)

Při vývoji krevních buněk s výjimkou megakaryocytární řady dochází ke zmenšování těchto buněk. Jádérka se přeměňují na prstenčitá jádérka s menší aktivitou, poté na neaktivní jádérka, tj. mikronukleoly, až nakonec mizí. Ztrácí se bazofilie cytoplazmy a dochází k výskytu granulí – nejprve azurofilní, tj. primární, poté specifické, tj. sekundární. (Svoboda a kol., 2001). Azurofilní granule jsou červené barvy různých odstínů, specifické granule jsou různých tvarů (viz obr. 2). To tedy znamená, že celkově dochází ke snížení buněčné aktivity (Doubek a kol., 2003).



Obr. 2 *Morfologické znaky dozrávání krevních elementů (Svoboda a kol., 2001)*

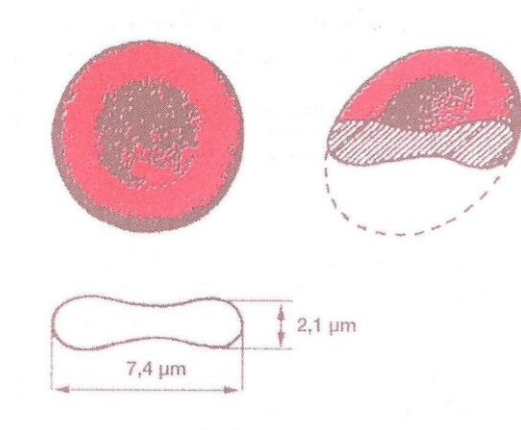
3.2.1 Krevní plazma

Když zabráníme srážení a necháme krev stát bez míchání, buňky se postupně začnou usazovat na dno nádoby, díky tomu navrchu zůstane tekutina, která se nazývá plazma. Claude Bernard ji popsal jako vnitřní prostředí, které nepřimo nebo přímo omývá všechny buňky těla a chrání je před vnějšími vlivy (Frandsen and Spurgeon, 1992). Jedná se o žlutavou, průhlednou, mírně alkalickou intravaskulární kapalinu, jež obsahuje vodu (80-90 ml ze 100 ml krve), anorganické a organické látky v relativně stálých koncentracích. Tato relativní stálost je pro funkci plazmy nezbytná. Anorganické látky, jako je Na, K, Ca, Mg, chloridy, fosfáty, hydrogenuhličitany atd., jsou důležité pro udržování osmotického tlaku, objemu a pH plazmy, pro srážení krve atd. Organické látky, především proteiny, mají význam pro udržování objemu a pH plazmy, transport látek, koagulaci, mají též funkci nutriční a obrannou (Svoboda a kol., 2001). Dále pak sacharidy, lipidy či lipoproteiny hrají významnou roli v udržování objemu a pH plazmy. Nejvíce zastoupenou bílkovinou je zde

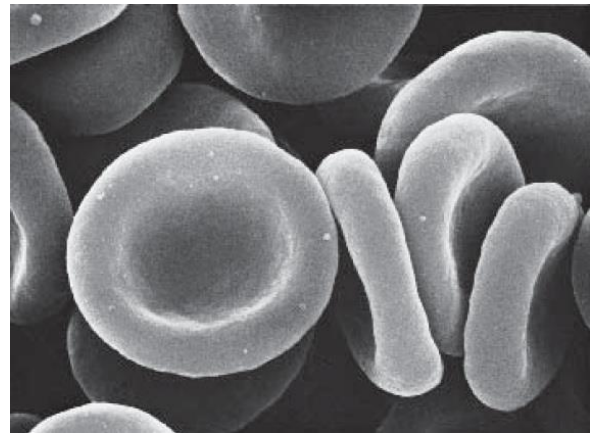
albumin, dále pak globuliny ($\alpha_{1,2}, \beta_{1,2}, \gamma$) a fibrinogen. Jejich úloha spočívá především v udržování objemu a pH plazmy, transportu látek, vliv mají na srážení krve, imunitní reakce a mají i nutriční funkci. Lipidy, jako např. triacylglyceroly, fosfolipidy a cholesterol, se významně podílejí na energetickém metabolismu. Na stavbě membrán se podílí lipoproteiny, které mají mimo jiné i funkci transportní. Mezi další organické látky plazmy se řadí např. močovina, kreatin, kreatinin, aminokyseliny, kyselina mléčná, mastné kyseliny, ketolátky aj. Plynnou částí plazmy jsou např. O_2 , CO_2 , N_2 aj. Nachází se v ní též hormony, vitaminy a enzymy. Barva krevní plazmy je ovlivněna mnoha látkami. Zbarvení může být žlutavé – hyperbilirubinemie, lehce zkalené – hyperlipidemie, či zbarvené do červena – hemolýza (Doubek a kol., 2003).

3.2.2 Erytrocyty

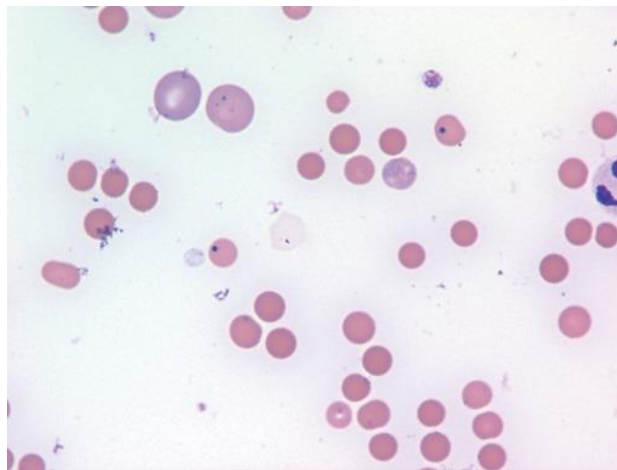
Červené krvinky (erytrocyty) jsou buňkami, které se řadí mezi nejspecializovanější a zároveň nejjednodušší. Jedná se o buňku bezjadernou, jež při svém postupném dozrávání ztratila i další cytoplazmatické organely (Trojan a kol., 2003). Psi erytrocyty se běžně zobrazují jako anisocytózní poikilocyty, v překladu tento název znamená, že buňky jsou nestejně velikosti a nepravidelných tvarů (Harvey, 2001). Tyto erytrocyty neboli červené krevní buňky jsou v průměru 7,4 μm velké buňky, tvaru bikonkávního disku, tzn. uprostřed ztenčené (Frandsen and Spurgeon, 1992). Povrch buňky činí asi 130-140 μm^2 s objemem zhruba 85 ± 10 fl (μm^3). Tloušťka se pohybuje kolem 2,5 μm (viz obr. 3), uprostřed zhruba 0,8 μm (Trojan a kol., 2003). Toto centrální ztenčení je více zřetelné právě u psů nežli u ostatních zvířat a zaujímá přibližně jednu třetinu až polovinu velikosti buňky, díky tomu umožňuje například rozpoznání **sférocytózy**. (viz obr. 5) Při této poruše dochází u sférických buněk ke změně bikonkávního tvaru na tvar kulovitý, či elipsoidní (Weiss and Wardrop, 2010). Erytrocyty se zaměřují na přenos kyslíku v těle a díky bikonkávnímu disku mají relativně velkou plochu pro výměnu kyslíku přes buněčnou membránu. Počet erytrocytů může být určen známým ředěním a počítáním počtu červených krvinek ve známém objemu pomocí počítací komory hemacytomtru s pomocí mikroskopu. Obvykle mívají psi kolem 7 000 000 RBC/ μl (červené krvinky/ μl). Výhodou diskovitěho tvaru erytrocytů je v první řadě poměr velkého povrchu k objemu, minimální difúzní vzdálenost a lepší osmotický tlak (Reece, 2009).



Obr. 3 Tvar a rozměry erytrocytu
(Trojan a kol., 2003)



Obr. 4 Erytrocyt (Kuehnel, 2003)

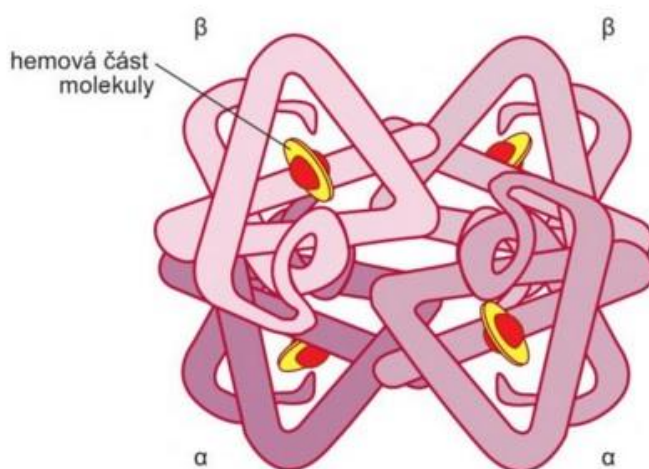


Obr. 5 Nátěr se sférickými erytrocyty (Weiss and Wardrop, 2010)

3.2.2.1 Hemoglobin

Základním komponentem erytrocytů je **hemoglobin** (červené krevní barvivo), který tvoří zhruba jednu třetinu erytrocytu. Zbytek tvoří voda a stroma (strukturální komponenty). Hemoglobinová molekula váží kolem 67 kDa a je složena ze 4 hemových skupin v kombinaci s jednou molekulou globinu (bílkovinný komponent). **Globin** je složen ze 4 polypeptidových řetězců, které obsahují jednu ze složek **hemu**. Každá tato hemová skupina obsahuje 4 atomy železa, které jsou volně a obousměrně spojitelné s jednou molekulou kyslíku (viz obr. 6). Tedy jedna molekula hemoglobinu obsahuje 4 atomy železa nesoucí 4 molekuly kyslíku (Reece, 2009). Globin tvoří přibližně 96 % molekuly hemoglobinu. Je schopen volného a reverzibilního vázání a uvolňování molekulárního kyslíku. Také se podílí na transportu oxidu uhličitého a má uplatnění i jako nárazníkový systém. **Nárazníkový systém** slouží ke

snížení vlivů kyselin a bází na acidobazickou rovnováhu. Jedná se o systém **hydrogenkarbonátový, hemoglobinový, proteinový a fosfátový**. Díky tomuto systému dochází k ovlivňování dýchacích procesů, vazeb a uvolňování O_2 z hemoglobinu (Trojan a kol., 2003). Tvorba hemoglobinu, ale i samotného erythrocytu je procesem, kdy dochází k náročnému příjmu a využití Fe, Cu, aminokyselin, vitamínu B_{12} a kyseliny listové. Při jejich nedostatku vznikají různé stupně anemií spojené s nízkým počtem erythrocytů nebo se sníženým obsahem hemoglobinu (Jelínek a kol., 2003). Přítomnost hemoglobinu v erythrocytech je zodpovědná, jak již bylo zmíněno, za jeho schopnost přenášet kyslík, tak ale i za typicky červenou barvu erythrocytů. Po chemické stránce, je hemoglobin organická sloučenina, která se skládá ze čtyř porfyrinových pigmentů (hemů), z nichž každý obsahuje atom železa s globinem. Globin je globulární protein, který tvoří řetězec skládající se ze čtyř aminokyselin. Hemoglobin se mísí s kyslíkem z plic a vytváří tzv. **oxyhemoglobin** (HbO_2), který snadno odevzdává tento kyslík tkáním v těle. Tento proces se nazývá okysličení. Koncentrace hemoglobinu v krvi se měří v gramech na 100ml krve. Běžné hodnoty u psa se pohybují kolem 13,5g/100ml krve (Frandsen and Spurgeon, 1992).

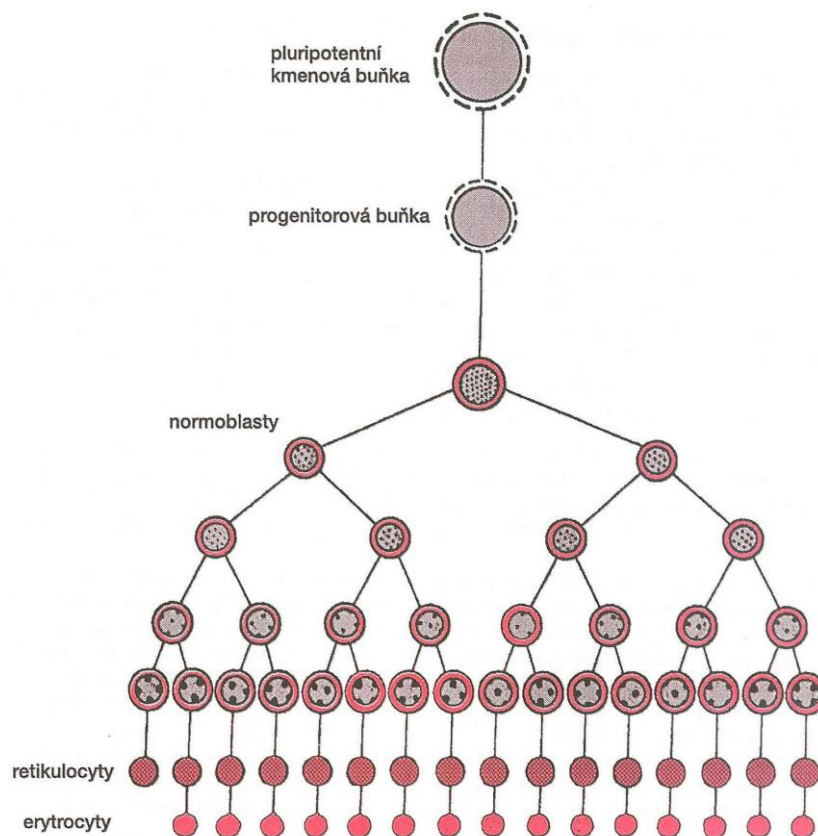


Obr. 6 Schéma struktury hemoglobinu (Kittnar a kol., 2011)

3.2.2.2 Erytropoeza

Erythrocyt se vyvíjí z nediferencovaných **pluri/totipotentních kmenových buněk**. Výrazem pluripotentní se označují nediferenciované buňky, jež umožňují vzniknutí více řad a v případě kmenové buňky, jako buňky výchozí, se jedná o označení totipotentní. Tento výraz je chápán jako výchozí bod všech buněk krve. Jedná se o buňky mezenchymu, jež jsou

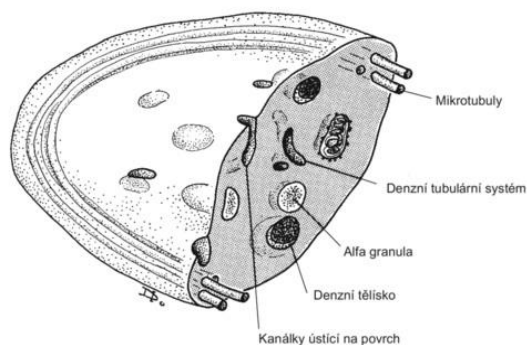
základem všech forem krevních buněk a jejich stádií (erytrocyt, granulocyt, monocyt, megakaryocyt a lymfocyt). Její schopností je sebeobnova a diferenciací vzniká progenitorová kmenová buňka. **Progenitorová kmenová buňka** se vyznačuje tím, že díky ní dochází k následné diferenciaci. Sebeobnova je zde nevýrazná. Vzhledově je tato buňka podobná lymfocytu. Její diferenciací vzniká **prekurzorová kmenová buňka**, jejíž diferenciací vzniká **proerythroblast** a dochází k úplnému dozrání buněk (Doubek a kol., 2003). Trojan (2003) uvádí: „první identifikovaný člen erytroidní řady, proerythroblast, je velká nezralá jaderná buňka o objemu asi 800 fl. Vývojová sekvence, která následuje, zahrnuje několik mitóz (viz obr. 7) a končí malým bezjaderným erytrocytem obsahujícím hemoglobin.“ Dalším stupněm jsou **erythroblasty** (normoblasty) vznikající v kostní dřeni v tzv. erythroblastových ostrůvcích - jsou tvořeny makrofágy a prstenci erythroblastů. Tyto makrofágy fungují jako zásobníky *Fe*, jež je základem tvorby hemoglobinu. K této syntéze červeného krevního barviva dochází ve stádiu bazofilního erythroblastu. Ke ztrátě jádra erythroblastů dochází díky fagocytóze ostrůvkovými makrofágy. Dalším stupněm vývoje je **retikulocyt**, který pobývá v kostní dřeni přibližně 2 až 3 dny a dochází v nich dokončení syntézy červeného krevního barviva (Doubek a kol., 2003).



Obr. 7 Schéma dělení a zrání buněk červené řady (Trojan a kol., 2003)

3.2.3 Trombocyty

Trombocyty neboli **krevní destičky**, jsou velké buňky, které se tvoří v kostní dřeni a mají velký význam pro srážení krve. Jejich velikost se pohybuje od 2 do 4 μm . Jsou ohraničeny plazmatickou membránou, obsahují mikrotubuly, lysozomy, mitochondrie a Golgiho aparát, nemají však jádro. Vzhled krevních destiček může být v barveném nátěru značně odlišný od destiček cirkulující krve, kde mají tvar oválného disku (Frandsen and Spurgeon, 1992). Ve struktuře trombocytu (viz obr. 8) se podle své funkce dělí trombocyt na **periferní zónu**, jež je tvořena třívrstvou membránou trombocytu; **zónu rozpustného gelu** obsahující soustavu vláken (mikrofilamenty) a mikrotubuly. Z chemické stránky jsou tyto soustavy složeny z proteinů, jako je aktin, myozin, profilin, protein, který váže aktin, ABP (actin binding protein), spektrin, tropomyozin aj. a poté tubulin. **Zónu organel**, s výskytem mitochondrií, azurofilních **alfa granulí**, delta granulí (**denzní tělíska**), lambda granulí (lysozomální), peroxizomů, glykogenu aj. Alfa granule obsahuje například vWf (von Willebrand factor), fibrinogen, albuminy, imunoglobuliny, destičkové růstové faktory (PDGF, platelet-derived growth factor), aj. Poslední zónou je **zóna membránových systémů**, která je tvořena otevřeným kanalikulárním a denzním tubulárním systémem. Díky otevřenému kanalikulárnímu systému může trombocyt komunikovat se svým povrchem. **Denzní tubulární systém** obsahující ionty Ca díky svým enzymům se podílí na tvorbě derivátů kyseliny arachidonové, jež ovlivňuje hemostázu. Povrch destiček nese i některé antigeny (Doubek a kol., 2003). Jedná se o velké a složité organické molekuly, jež se nesou na povrchu buněk (Hrubíško a kol., 1986). Hlavní funkcí krevních destiček je především ve snížení množství ztrát při poškození cév. Produkty vydané krevními destičkami stimulují tvorbu sraženiny a díky serotoninu jsou schopny zúžení poškozených cév (Frandsen and Spurgeon, 1992). Podílejí se na zástavě krvácení tvorbou primární krevní zátky (trombu) a v usnadnění srážení krve - koagulace (Doubek a kol., 2003).



Obr. 8 Schéma struktury trombocytu (Reece, 2011)

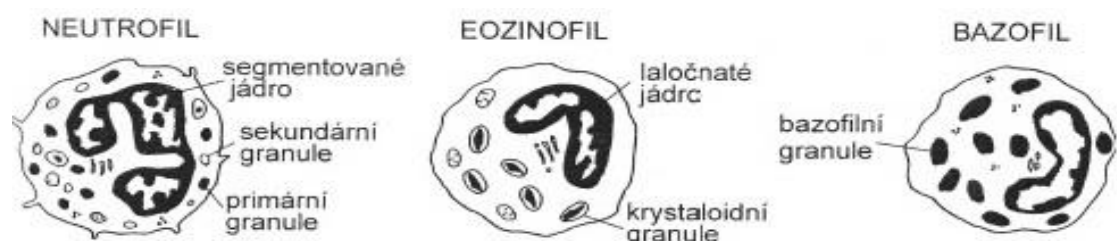
Pro tvorbu primární krevní zátky jsou nezbytné dvě reakce jako odpověď na narušení endotelu cév, a to adheze, tj. přilnutí destiček na jakýkoliv cizí povrch (nikoliv trombocytový) a facilitace koagulace, kde se uplatňuje prokoagulační povrch destiček a jejich samotná reakce. Destičky se též účastní hojení poranění díky fibrinu, který polymerizují, dále mají účast na odbourávání mikroorganismů atd. Životnost krevních destiček v periferní krvi se pohybuje zhruba kolem 10 dnů (Doubek a kol., 2003).

3.2.4 Leukocyty

Leukocyty neboli bílé krevní buňky se odlišují od erytrocytů tím, že jsou schopné samostatného pohybu. Hlavním úkolem těchto buněk je zabezpečení obranyschopnosti organismu. K tomu účelu jsou leukocyty vybavené mnoha enzymy, schopností produkovat cytokiny a další mediátory - některé z nich se ale uplatňují v patologických reakcích a procesech (Doubek a kol., 2003). Člení se na **granulocyty** (neutrofilny, eozinofily, bazofily) a **agranulocyty** (monocyty, lymfocyty). Životnost bílých krvinek se značně liší – od několika málo hodin u granulocytů, několik měsíců u monocytů až po několik let u lymfocytů. Většina bílých krvinek jsou inaktivní a až v případě potřeby jsou transportovány do tkání (Frandsen and Spurgeon, 1992).

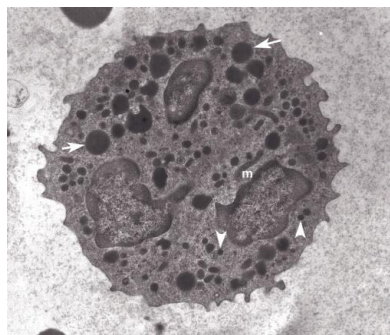
3.2.4.1 Granulocyty

Granulocyty jsou bílé krvinky, mezi jejichž hlavní morfologickou charakteristiku patří různorodý tvar jádra a přítomnost granulí (specifických, sekundárních) v cytoplazmě. Tyto granule představují enzymovou výzbroj granulocytů (viz obr. 9). Podle afinity k barvivům, tedy jak granulocyty reagují, se člení na neutrofilní, eozinofilní a bazofilní (Doubek a kol., 2003).



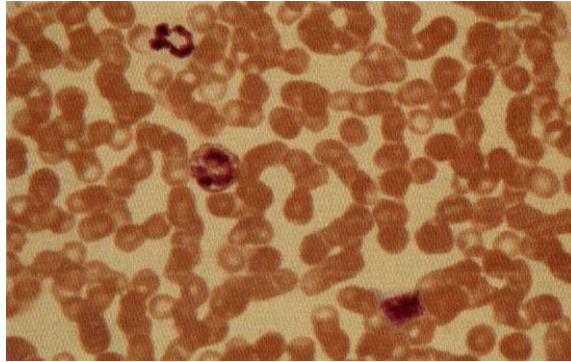
Obr. 9 *Struktury granulocytů (Toman a kol., 2009)*

Neutrofilní granulocyty (neutrofilly) jsou většinou okrouhlého tvaru (viz obr. 10) a velikosti zhruba 8 až 15 μm (Doubek a kol., 2003). Jejich funkce spočívá ve fagocytóze mikroorganismů, zvláště při zánětlivých procesech. V krvi přežívají neutrofilly zhruba 4-5 hodin (Jelínek a kol., 2003). Podle úrovně vyžrání hodnocené podle tvaru jádra se jedná o nesegmentovaný neutrofil (tyčka) či segmentovaný neutrofil (segment): Tyčka má tyčkovité jádro. Chromatin má hrubou strukturu a je ve shlucích. Segmentovaný neutrofil má jádro členěné na úseky (segmenty), jež se od sebe oddělují úzkými můstky. Chromatin je zde hrubé struktury a uspořádán do bloků. Segmentů bývá obvykle 2-5, může však být i více segmentů. Ke vzniku segmentovaných granulocytů dochází vyžráním. Z krve mohou přestupovat do tkání, kde mají různé funkce a dochází zde také k jejich zániku (Doubek a kol., 2003). U zdravých psů opouští náhodně cirkulující krev a migrují především do střev, plic a kůže, kde jsou nezbytné jako prevence bakteriální infekce. Pokud počet neutrofilů v krvi dosáhnou kriticky nízkých hodnot (obvykle méně než 500 neutrofilů/ μL), jsou psi vysoce citliví na bakteriální infekce (Weiss and Wardrop, 2010).



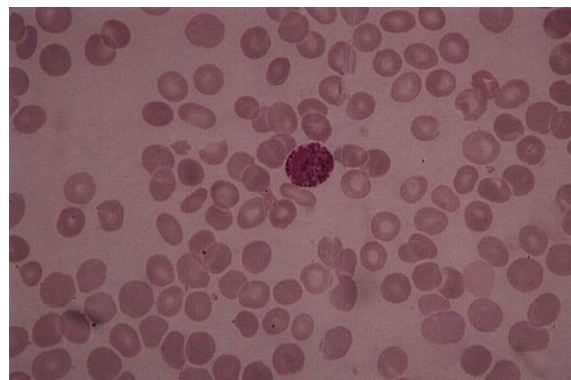
Obr. 10 *Neutrofilní granulocyt – (šipky) primární a sekundární granule, (m) mitochondrie (Weiss and Wardrop, 2010)*

Eozinofilní granulocyty (eozinofily) se v případě zdravého psa nacházejí v periferní krvi pouze v malém počtu (viz obr. 11). Počty a velikosti granulí v cytoplazmě eozinofilů se u psů velmi liší, pohybuje se však v rozmezí 10-16 μm . Eozinofily mají odlišení od neutrofilů v menší segmentaci jádra (Doubek a kol., 2003). Uplatňují se při alergických reakcích a parazitárních onemocněních (Jelínek a kol., 2003). Brání helmintózám, působí při zánětech a mají též uplatnění při poškozování hostitelské tkáně. Dozrávají v kostní dřeni kolem 2-6 dnů (Weiss and Wardrop, 2010).



Obr. 11 *Eozinofilní granulocyt psa (Svoboda a kol., 2001)*

Bazofilní granulocyty (bazofily) jsou v periferní krvi psů vzácností. Velikost těchto granulocytů bývá 8-18 μm , okrouhlého tvaru (viz obr. 12). Jejich jádro je stočené, ale může se vyskytnout i oválného tvaru, často členěné do dvou segmentů. V krevním oběhu přežívají bazofilní granulocyty maximálně týden (Doubek a kol., 2003). Uplatnění nacházejí při alergických reakcích, jejich granule obsahují heparin a histamin (Jelínek a kol., 2003).



Obr. 12 *Bazofilní granulocyt psa (Doubek a kol., 2003)*

3.2.4.2 Agranulocyty

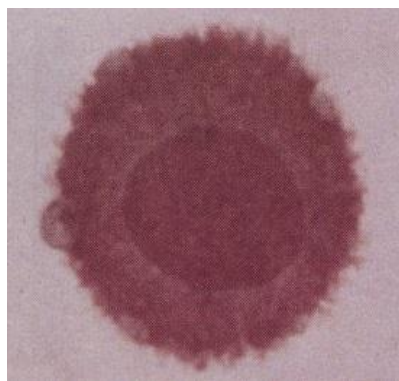
Agranulocyty jsou buňky různých tvarů s kompaktními jádry. V cytoplazmě mohou být přítomny primární (azurofilní) granule a vakuoly. Mezi agranulocyty patří monocyty a lymfocyty, jež jsou malé-klidové či velké (Svoboda a kol., 2001). Malé lymfocyty obsahují denzní kulatá či oválná jádra a po antigenní reakci se v krevním oběhu psů objevují velké reaktivní lymfocyty. Cytoplazma těchto velkých lymfocytů je pak bazofilní (Doubek a kol., 2003).

Lymfocyty jsou efektorovými buňkami specifické imunity i nespecifické imunity. Obsahují fosfatázy, lipidy aj. vznikají z pluri/totipotentních kmenových buněk, které se diferencují na

bipotentní progenitorové buňky. Ty dávají základ B lymfocytovým a T lymfocytovým řadám. Prekurzorovými kmenovými buňkami jsou lymfoblasty, které se diferencují a vyžívají v prolymfocyty a z nich pak vznikají lymfocyty (Doubek a kol., 2003). B lymfocyty získaly označení podle Fabriciovy burzy u ptáků, kde byly poprvé objeveny. U savců se však diferencují v kostní dřeni. Mají schopnost syntézy protilátek (imunoglobulinů). Propojují též buněčnou a humorální část imunitní reakce organismu. B lymfocyty žijí většinou 10-20 dní. T lymfocyty mají odvozený svůj název podle místa své diferenciace, tj. z brzlíku (thymus), proto tedy thymocyty. Jejich vznik probíhá v kostní dřeni a následně putují do tkáně thymu, kde pokračuje jejich vyžívání (Kittnar a kol., 2011). Poté vycestovávají lymfoidní buňky (stále nezralé) do sekundárních lymfopoetických orgánů (slezina, mízní uzliny, slizniční lymfatická tkáň respiračního a gastrointestinálního systému), kde dochází k lymfopoeze po celý život jedince. Zralé lymfocyty mají tvar obvykle okrouhlý. Velikost malých lymfocytů bývá kolem 10 μm, velkého lymfocytů 14-20 μm. Jádro mají velké, kulaté (u B lymfocytů může mít výběžky) s kondenzovaným chromatinem a obvykle jedním málo aktivním jadérkem. Malé lymfocyty jsou v klidovém stadiu, velké jsou aktivním stadiem. Při infekcích dochází k morfologickým změnám lymfocytů, buňka se zvětšuje, tvar jádra se stává nepravidelným – tvoří se výběžky, cytoplazma se stává bazofilnější, zvyšuje se počet azurofilních granulí. T lymfocyty přežívají v těle psa měsíce až roky – dlouho žijí zejména pak tzv. paměťové buňky (Doubek a kol., 2003). Tento typ lymfocytů neprodukuje protilátky, ale je schopen napadat přímo buňky, které jsou infikovány virem, či odstraňovat nádorové buňky (Kittnar a kol., 2011). B lymfocytů je v periferní krvi zhruba 25 %, T lymfocytů kolem 70 %. **NK (natural killer) buňky** jsou obrovské lymfocyty, jež mají velké azurofilní granule. V cytoplasmě NK buněk se trvale nachází cytotoxické granule (viz obr. 13), díky tomu byly NK-buňky popisovány jako velké granulární lymfocyty. Jejich výskyt je nejpatrnější ve slezině, periferní krvi, játrech, plicích a děloze, kde mají za úkol především likvidovat intracelulární patogeny (zejména viry) a nádorové buňky (metastáze). Bylo však u nich zjištěno několik dalších vlastností, například udržení březosti nebo regulace krvetvorby (Toman a kol., 2009). K jejich vývoji dochází na úrovni lymfoblastu, kdy stimulací lymfocytu s antigenem vzniká plazmoblast, z něhož se následně vytváří proplazmocyty a poté plazmocyty, tj. zralá plazmatická buňka obsahující imunoglobuliny. Tzv. **plaménkové buňky** (viz obr. 14) je označení pro plazmocyty, které díky přítomnosti imunoglobulinů získaly načervenalé okraje cytoplazmy (Doubek a kol., 2003).

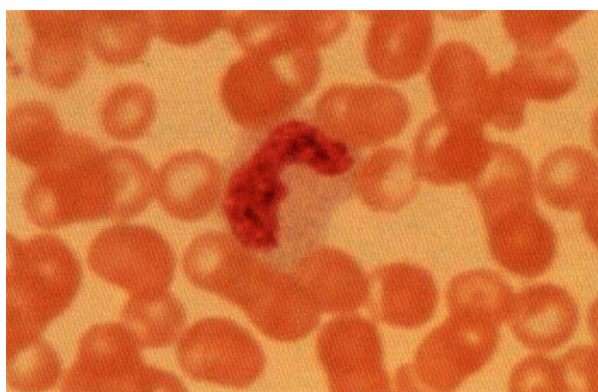


Obr. 13 *Struktura NK-buňky*
(Toman a kol., 2009)



Obr. 14 *Plaménková buňka*
(Doubek a kol., 2003)

Monocyty – jsou odvozeny stejně jako netrofilní granulocyty z bipotentních progenitorových buněk – CFU-GM (viz obr. 1). Dalším stupněm je CFU.M, z něhož se diferencují obrovské monoblasty (Mobl), z nich promonocyty (Promono) a nakonec monocyty (Mono). Monocyt, který je v krvi vlastně nevyzrálou buňkou, je po vstupu z krve do tkání dále transformován v tzv. tkáňové makrofágy. Ve tkáních může docházet k jeho dělení. Makrofágy se člení na fixní (nefagocitující), tzv. histiocyty a na putující (fagocytující) makrofágy. Zralý monocyt je charakteristický častým výskytem nepravidelných tvarů (výběžky – pseudopodie). Dosahuje velikosti 15-22 μm . Jádro bývá umístěno ve středu či excentricky. Monocyty krevní a především tkáňové plní roli makrofágů. Délka života monocytů v krevním oběhu je ohraničena pouze několika dny, poté vstupují do tkání (Doubek a kol., 2003).



Obr. 15 *Monocyt psa* (Svoboda a kol., 2001)

3.3 Imunologie krve

Hrubiško (1983) uvádí: „Jednou z podmínek vývoje živého organismu k jeho jedinečnosti a dále jeho existence ve vztahu k ostatnímu živému je také jeho schopnost bránit se proti organickým látkám těla cizím, škodlivým a s jeho existencí neslučitelným. Tato schopnost se nazývá **imunita**.“ Imunita sehraává v organismu významnou roli v rozpoznávání tělu vlastního a cizího, proto je nezbytné znát imunologii krve v této oblasti, kde antigeny erytrocytů vyvolávají imunitní odpověď (Toman a kol., 2009).

3.3.1 Nespecifická imunita

Nespecifická (přirozená) imunita je vrozenou schopností organismu rychle reagovat na cizorodé mikroorganismy a materiály. Tyto mechanismy specificky nerozeznají antigen, nejsou závislé na jejich předešlém setkání a nevytvářejí imunologickou paměť. Této imunitě se účastní kůže, sliznice (představující bariéru proti pronikání cizích látek), fagocytóza, přirozená cytotoxicita, komplement, lysozym (rozrušující bakteriální stěnu) a další látky (Trojan a kol., 2009). Fagocytóza neboli pohlcování cizorodých látek je nástroj nespecifické imunity. Během fagocytózy dochází ke třem po sobě následujícím fázím, a to k vazbě fagocytující buňky na povrchu cílové částice, k pohlcení (ingesce) a spouštění mikrobicidních aktivit (Trojan a kol., 2009). Pohlcování cizorodých látek je se schopností přilnavosti k různým povrchům (adheze) a vycestováním z kapilár do okolí (diapedéza) na chemotaktický podnět (např. zánětlivý produkt tkáně) společnou vlastností granulocytů a monocytů. Přirozená cytotoxicita je dána funkcí části lymfocytů ničit pomocí perforinů (vyvolávají cytolýzu) zejména buňky napadené bakteriemi nebo viry (Langmeier a kol., 2009). Tato populace buněk se označuje NK-buňky (natural killer). Ty jsou schopny spontánně zabíjet cílové buňky, ať už se jedná o virové buňky, či buňky nádorové, bakterie, parazity, aj. (Trojan a kol., 2009). Komplement je souborem plazmatických proteinů a glykoproteinů. Zahrnuje více než 20 rozpustných složek a většina z nich jsou zde prekurzory enzymů (tzn., že se nacházejí v plazmě a tělesných tekutinách v nonaktivní formě). K aktivaci komplementu dochází kaskádovitě (Trojan a kol., 2009). Po jeho aktivaci se soubor těchto proteinů podílí na obraně organismu, např. tvorba opsoninů (látky, které označují buňky určené k fagocytóze), destrukce membrán označených buněk a mikroorganismů (Langmeier a kol., 2009).

3.3.2 Specifická imunita

Specifická imunita je z vývojového hlediska dokonalejší než imunita nespecifická. Jejich účel je však stejný, tj. likvidovat a eliminovat materiál, který je pro tělo cizí a naopak tolerovat struktury, které nesou znaky sobě vlastní. Navíc u buněk specifické imunity dochází k imunologické paměti setkání s daným antigenem (Jelínek a kol., 2003). Jako **antigeny** se označují látky, které jsou schopny vyvolat imunitní odpověď. Účinek specifické imunity se aktivuje s určitým zdržením, ale její účinek je cílený přesně na jednotlivé konkrétní patologické činitele, jako jsou bakterie, viry, toxiny, cizorodé tkáně (např. transplantace, infuze, atp.). Současně dochází ke vzájemnému působení přirozené imunity s imunitou získanou (specifickou). Průběh imunitní odpovědi s sebou nese účast mnoho různých typů buněk, které v přesně stanovených časových posloupnostech vstupují do vzájemných interakcí. Vedle antigenů, receptorů a mediátorů se uplatňují v těchto interakcích peptidy, které jsou produkovány zejména T-lymfocyty, makrofágy, ale i mnoha dalšími buňkami (uplatňující se při poškození, zánětech aj.). Souhrnně se tyto peptidy nazývají cytokiny. Za nejznámější cytokin je považován interleukin, jenž je produkován lymfocyty, makrofágy, endotelem, fibroblasty a dalšími buňkami. Uplatnění získává v procesu krve tvorby. Dále pak chemokiny, rozpustné peptidy s výrazným chemoatraktivním účinkem. Přitahují neutrofile a monocyty na místo poškození, či zánětu a ovlivňují i růst a diferenciaci buněk. Kromě toho, že se cytokiny uplatňují v imunitních reakcích a při krve tvorbě, uplatnění nacházejí i při regeneraci tkání, při embryonálním vývoji a mnoha dalších dějích.

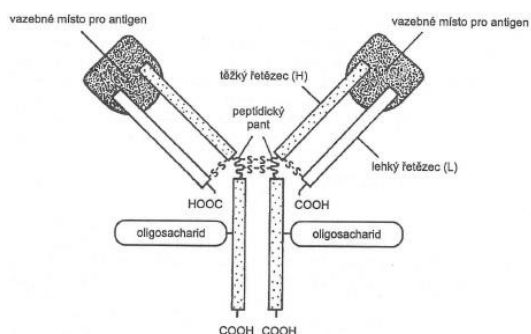
3.3.3 Efektorové buňky

Efektorovými buňkami specifické imunity jsou lymfocyty, které se dělí podle toho, zda jsou zprostředkovány imunitou humorální (B-lymfocyt) či buněčnou (T-lymfocyt). Lymfocyty disponují na svém povrchu antigenními receptory. Mezi receptory T- a B-lymfocytů jsou značné rozdíly. B-buněčné receptory jsou schopné rozpoznat antigen jako takový, T-buněčné receptory mají schopnost rozlišit antigenní determinanty – epitopy a zároveň glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu MHC, který má schopnost prezentovat antigen specifickému receptoru T-lymfocytů. Humorální imunita je založena na tvorbě protilátek (imunoglobulinů), které cirkulují v krvi a váží se specificky s antigenem. Tím, že se setkají B-lymfocyty s antigenem, dojde k jejich aktivaci. Aktivovaný lymfocyt se poté zvětšuje a následně se přemění na plazmatickou buňku, která je schopna velice rychle

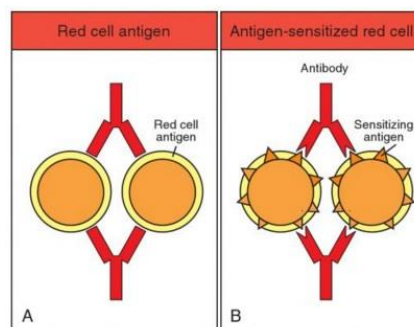
produkovat protilátky. Buněčná imunita spočívá ve vzniku specializovaných buněk, které mají regulační a cytotoxickou funkci (Trojan a kol., 2009). T-lymfocyty jsou zaměřeny na rozeznávání cizorodých antigenů na povrchu svých buněk napadených např. virem, nádorovou mutací, případně dalšími vlivy. Poté, co lymfocyty rozpoznají antigen pomocí receptorů, začnou se intenzivně dělit, tvořit klony a přecházet v buňky efektorové či paměťové (Jelínek a kol., 2003).

3.3.4 Protilátky

Protilátky, které jsou produkovány plazmatickými buňkami, jsou tvořeny glykoproteiny a řadí se mezi imunoglobuliny. Strukturu tvoří čtyři peptidové řetězce, které jsou spojeny díky disulfidickým vazbám. Tato struktura obsahuje 2 lehké (L) a 2 těžké (H) řetězce. Na dolní části těžkých řetězců se váží oligosacharidové řetězce různého počtu, velikosti a skladby (viz obr. 16). Těžké řetězce různých protilátek se od sebe odlišují a podle toho se dělí tyto protilátky na IgG, IgM, IgA, IgE a IgD (Trojan a kol., 2003). Přítomnost nevhodných protilátek je detekována pomocí **Coombsova testu (antiglobulinový test)**. K detekci protilátek, které napadají vlastní erythrocyty těla, se využívá **přímá coombsova reakce** (viz obr. 17). Pozitivní přímý coombsův test poskytuje např. informace o přítomnosti hemolytického onemocnění. Testování je založeno na inkubaci vzorku s antisérem, které reaguje s imunoglobuliny. V případě, že erythrocyty jsou ve vzorku potaženy imunoglobuliny, budou antiséra reagovat s těmito imunoglobuliny a bude tedy docházet k aglutinaci. **Nepřímé coombsovo testování** určuje cirkulující protilátky. Pozitivní nepřímé výsledky indikují přítomnost cirkulujících protilátek, které bojují proti vlastním tkáním těla psa. Sérum pacienta se inkubuje s erythrocyty potencionálního dárce (zvíře stejného druhu). Pokud se v séru pacienta vytvoří protilátky, budou se následně vázat na tyto erythrocyty (Sirois, 2015).



Obr. 16 *Struktura molekuly protilátky*
(Trojan a kol., 2003)



Obr. 17 *Coombsův test – (A) přímý; (B) nepřímý test* (Sirois, 2015)

3.3.5 Antigen erytrocytu

Antigen je strukturou membrán krevních buněk, je definován alopřilátkou, tedy protilátkou jež je produkována imunizovaným jedincem, kterému daný znak na membráně chybí (Řeháček a kol., 2013). Vzhledem k tomu, jak velká škála látek vyvolává v organismu imunitní reakci, lze antigeny definovat jen imunologicky. Jedná se o cizorodé látky především organického rázu. Většinou se jedná o makromolekuly – bílkoviny, lipoproteiny, glykoproteiny a polysacharidy. Antigeny však nerozeznává imunitní systém jako celek, ale jen jejich určité povrchové znaky, tzv. antigenní determinanty – epitopy (Trojan a kol., 2009). Podle antigenů, které jsou lokalizovány na membránách buněk, se rozlišují různé antigenní systémy, které jsou významné pro transplantace, či **transfuze** (Langmaier a kol., 2009). Při krevní transfuzi může docházet k imunologické reakci, která způsobí poškození transfundovaných dárcovských červených krvinek. Její příčinou je přítomnost rozpustných protilátek, které reagují s danými povrchovými strukturami erytrocytů, tzv. **krevněskupinové antigeny** (Koolman and Röhm, 2012). Pro přijetí cizorodé látky neboli cizí tkáně je nezbytná co nejvyšší antigenní shoda a z hlediska homeostázy je velmi významná schopnost rozpoznání cizího antigenu a za pomoci přirozených protilátek či jejich novotvorbou zlikvidování cizorodých antigenů. Právě specifická imunita má schopnost cíleně reagovat na cizorodý antigen, likviduje nositele tohoto antigenu a je schopna vytvořit antigenní paměť (Langmaier a kol., 2009).

3.4 Krevní skupiny psa

Objev lidské krevní skupiny AB0 uskutečněného Landsteinerem v roce 1900 podnítil k pátrání krevních skupin u domácích zvířat. Psí krev byla nejdříve prozkoumána **E. von Dungernem** a **L. Hirszfoldem** v roce 1910, kteří definovali čtyři různé krevní skupiny založené na imunitních izoaglutininech (protilátky vyvolávající aglutinaci). **Swisher** a jeho spolupracovníci z NY univerzity užili psy jako modely ke studiu mechanismů destrukce červených krvinek a později popsali antigeny A, B, C, D, E, F a G – v tomto pořadí, podle toho, jak byly objeveny. Dvě skupiny A buněk byly rozděleny do kategorií, a to silně reaktivní kategorie (A) a druhá méně reaktivní (A'), která mohla být detekována pouze přímým Coombsovým testem. Toto označení A a A' bylo později změněno na A1 a A2. V roce 1972 a 1974 došlo ke standardizaci názvosloví psích krevních skupin na

mezinárodních seminářích. První seminář učinil terminologii jako “canine erythrocyte antigen” (CEA), za kterým následuje číslo označující antigenní krevní skupinu. Na druhém semináři bylo přijato označení “dog erythrocyte antigen” (**DEA**) s následným číslem označujícím lokus a za tečkou další číslo vyjadřující alelu daného lokusu – např. DEA 1.1 (Weiss and Wardrop, 2010). V krevní plazmě jsou proti antigenům přirozeně přítomny protilátky, či se tvoří až po vpravení antigenu do krve – například při transfuzi. Reakce protilátek spočívá v aglutinaci erytrocytů a jejich následné hemolýze.

Krevní skupina je charakterizována souborem antigenních faktorů, které jsou kontrolovány jedním lokusem chromozomu (Jelínek a kol., 2003). Krevní skupiny jsou organického původu, většinou se jedná o glykoproteiny a glykolipidy. Glykoproteiny jsou tvořeny cukernou a bílkovinnou složkou, glykolipidy cukernou a lipidickou složkou. Antigenní reakce souvisí většinou s cukernou složkou molekuly, imunogenní reakce pak s celou molekulou. Některé krevní skupiny (většina) se nachází na povrchu buněk a jiné pak mohou být rozpuštěny v krevní plazmě, respektive v krevním séru či v tělesných sekretech, jako jsou např. sliny, žaludeční šťávy apod. (Hrubiško a kol., 1983).

DEA 1.1 a **1.2** je označením pro alely genu krevní skupiny 1. Z genetického hlediska je se jedná o autozomální – dominantní dědičnost alel DEA 1.1 a DEA 1.2. Pes může nést krevní skupinu DEA 1.1 a 1.2 negativní, může mít pouze jednu z alel nebo i obě dohromady. Skupiny se mohou různit podle plemen – např. rotvajler či zlatý retrívr bývá většinou DEA 1.1 a 1.2 pozitivní, kdežto německý ovčák bývá negativní. Proti antigenům DEA 1.1 a 1.2 se nevyskytují přirozené protilátky, z toho důvodu nedochází k žádným reakcím v antigenech. Potransfuzní reakci je nutné očekávat při opakování transfuze krve s krevní skupinou DEA 1.1 či 1.2 pozitivní příjemci, který je DEA 1.1 nebo 1.2 negativní skupiny. Tato reakce může mít fatální následky. Obdobná situace nastává i v případě feny DEA 1.1 či 1.2 negativní, které se narodí štěně s krevní skupinou DEA 1.1 či 1.2 pozitivní. Přirozené protilátky se vyskytují u psů zejména proti antigenům krevní skupiny **DEA 3** či **5**, v případě **DEA 7** se u psů vyskytují přirozené protilátky u přibližně 15-20 %. Antigen **DEA 4** nemá v transfuzní medicíně velký význam, protože protilátky proti tomuto antigenu nezpůsobují hemolýzu. Univerzálním psím dárce je pes s krevní skupinou DEA 1.1, 1.2, 3, 5 a 7 negativní (Doubek a kol., 2003).

3.4.1 Určování krevních skupin

Určování krevních skupin je založeno na hemolytické nebo aglutinační reakci, ve které protilátky reagují s červenými krvinkami. Avšak **křížový test kompatibility (Crossmatching)** nám neurčuje přímo krevní skupinu, ale lze díky němu zjistit tzv. sérologický nesoulad mezi dárce a příjemcem. Důvodem, proč se těmito metodami zjišťují krevní skupiny, je předejít akutní hemolytické reakci, která nastane během nebo po transfuzi krve v případě, pokud krevní skupiny dárce a příjemce nejsou kompatibilní. Test kompatibility krevních skupin je velmi rychlý a snadný, již se prodávají testovací sady pro domácí zkoušku (viz obr. 18). Křížový test kompatibility vyžaduje odstředěné erytrocyty dárce či příjemce, které se několikrát promyjí ve fyziologickém roztoku a připraví se z nich 2% či 4% suspenze, které jsou následně inkubovány při teplotě 37°C (viz tab. 1) se sérem dárce nebo příjemce, které obsahuje protilátky. Následně se sleduje přítomnost aglutinace (Lanevski and Wardrop, 2001).



Obr. 18 *RapidVet H testovací křížová sada kompatibility pro zjišťování krevních skupin (Sirois, 2015)*

Zkumavková metoda pro určování krevních skupin vyžaduje použití antiséra, které je složeno ze specifických protilátek možného dárce. Tato metoda je založena na odběru vzorku plné krve za účinku kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), heparinu a antikoagulantů. Krev se odstředí po dobu 10 minut. Po sejmutí plazmy a buffy coatu jsou erytrocyty 3× promyty v solném roztoku a odstředěny. Suspenze červených krvinek jsou vloženy do několika zkumavek, do nichž se přidá i menší množství antiséra. Zkumavky jsou následně inkubovány po dobu 15 minut při pokojové teplotě a poté odstředěny po dobu 15 sekund. Každá zkumavka je vyšetřena makroskopicky i mikroskopicky - zjištění hemolýzy a aglutinace (Sirois, 2015). Aglutinace je metoda stanovující specifické protilátky, při níž dochází k reakci antigenu a protilátky v kapalně formě (Paulík, 2011).

Aglutinační testovací karta – krevní vzorky používané na testovací kartě nemusí již vykazovat známky autoaglutinace, kterou poznáme podle krevních shluků ve vzorku. Promytí červených krvinek s fosfáto-pufrovaným roztokem může pomoci zachránit vzorek, který vykazuje aglutinaci. RapidVet-H psí DEA 1.1 je test na určování krevních skupin, který se využívá pro určení DEA 1.1 negativní či DEA 1.1 pozitivní skupinu (viz obr. 19). Tato testovací karta obsahuje monoklonální protilátky specifické pro DEA 1.1. Na kartičce je smíchán vzorek plné krve obsahující EDTA – antikoagulantu s fosfáto-pufrovaným roztokem. V případě, že je výsledek pozitivní (pozitivní DEA 1.1), monoklonální protilátky vytvoří antisérum, které je poté přimícháno do plné krve příjemce. DEA 1.1 pozitivní erythrocyty reagují s antisérem, která vyvolá aglutinaci. Toto antisérum nereaguje, pokud se jedná o DEA 1.1 negativní skupinu (Sirois, 2015).



Obr. 19 *RapidVet-H aglutinační testovací karta psích krevních skupin (Sirois, 2015)*

Imunochromatografický test – Kontrolní testovací proužky rozpoznají a oddělí antigen červených krvinek. Psí imunochromatografický test užívá proužky, které jsou naimpregnovány monoclonálním anti-DEA 1.1 protilátkami a druhou protilátkou bývá univerzální antigen červených krvinek. Roztok se vsákne do proužku, a pokud buňky vykazují DEA 1.1 krevní skupinu, koncentrují se v oblasti, kde se impregnovali protilátky. Buňky se též koncentrují v oblasti kontrolních antigenů. Imunochromatografický test pro kočky (viz obr. 20) je na velmi podobném principu (Sirois, 2015).



Obr. 20 Imunochromatografický test pro kočky RapidVet H (Sirois, 2015)

Dále se u psů doporučuje provádět **screeningové testy** k detekci sérologické inkompatibility, a to i v případě první transfuze, kde je velmi nízké riziko závažné nežádoucí reakce. Toto testování bývá zásadní v případech, kdy není znám dárce krve a nevíme, zda se jedná o DEA-1,1 pozitivní či negativní (Lanevschi and Wardrop, 2001).

KŘÍŽOVÝ TEST KOMPATIBILITY
Centrifugace (1000 x g nebo 3400 otáček za minutu) plné krve za účelem získání séra dárce i příjemce, plná krev s antikoagulans (EDTA) za účelem získání erytrocytů od pacienta i dárce.
Promytí erytrocytů: promísení 0,25 ml červených krvinek v 2-4 ml fyziologického roztoku; v odstředivce po dobu 1 minuty, odstranit supernatant (tekutina nad sedimentem), a postup opakovat 2×; následně opětovné odstranění supernatantu.
Resuspendace 0,1 až 0,2 ml červených krvinek ve zhruba 4,8 ml fyziologického roztoku za účelem získání 2% až 4% suspenze buněk.
Velká křížová zkouška: 2 kapky séra příjemce + 1 kapku suspenze erytrocytů dárce, obsahujícího 2 až 4 % červených krvinek.
Malá křížová zkouška: 2 kapky séra dárce + 1 kapku suspenze erytrocytů příjemce, obsahujícího 2 až 4 % červených krvinek,
Kontrola: Dárce - 1 kapku suspenze erytrocytů od dárce + 2 kapky séra dárce Příjemce - 1 kapku suspenze erytrocytů od příjemce + 2 kapky séra příjemce
Odstředění po dobu 15 s.
Inkubace po dobu 15 minut při 37°C.

Tab. 1 Metodický postup křížového testu (Lanevschi and Wardrop, 2001)

3.5 Krevní transfuze

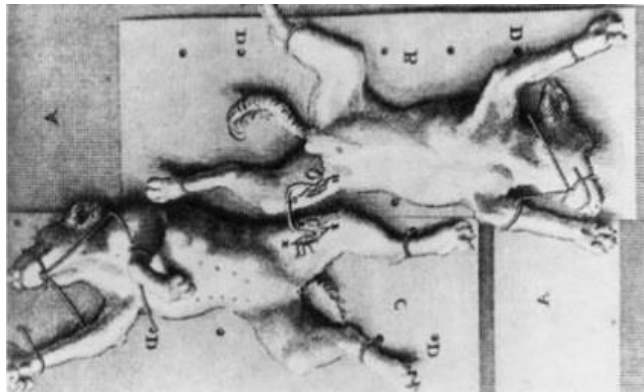
Doubek (2003) uvádí: „Transfuze je definována jako intravenózní terapie transfuzními přípravky nebo krevními deriváty. Transfuzním přípravkem může být například koncentrát erytrocytů nebo trombocytů a krevním derivátem například kryoprecipitát. Ve veterinární medicíně patří k nejčastěji prováděným transfuzím plné krve. Dárce krve může být získán z různých zdrojů: může jít o zvíře stejného chovu, zvíře léčené na stejném pracovišti, zvíře z různých důvodů před eutanazií nebo zvíře zapsané do dárcovských databází.“

3.5.1 Historie krevních transfuzí

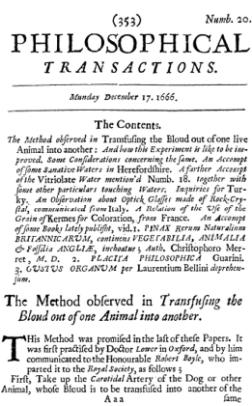
Historie transfuzní medicíny sahá až do raného novověku, bezprostředně po renesanci. Toto období se vyznačuje několika objevy a teoriemi týkajícími se krve, jako například teorie **Williama Harveyho** o krevním oběhu z roku 1628 (Lanevski and Wardrop, 2001). V roce 1666, anglický anatom **Richard Lower** (viz obr. 21) provedl první úspěšnou transfuzi mezi psy (viz obr. 22) a o rok později, tedy roku 1667, vydal **Robert Boyle** o tomto úspěšném zákroku článek (viz obr. 23) pod názvem „Úspěšný experiment transfuze krve z jednoho zvířete na druhé“ (Fastag et al., 2013). O transfuzi mezi dvěma odlišnými druhy zvířat, tzv. xenotransfuzi, se pokoušel téhož roku francouzský lékař **Jean Baptiste Denis** (viz obr. 24), kdy krev telety vpravil psovi. U lidských pacientů byla provedena transfuze od zvířecích dárců následující rok - Denis vpravil do krevního oběhu člověka jehněčí a telecí krev (Kisielewicz and Self, 2014). I Lower pokračoval dál ve svých pokusech a vpravil krev berana do krevního oběhu duchovního jménem Arthur Coga. Nicméně tento transfuzní pokus nebyl úspěšný (Fastag et al., 2013), ale naznačil směr, kterým se měla transfuzní medicína ubírat nadále. Tedy, že transfuze krve může být úspěšná jen tehdy, pokud se provádí s vhodným dárce. Avšak od dalšího vývoje transfuzní medicíny bylo po stovky let upuštěno (Hrubiško a kol., 1983). V 19. století se pak začaly transfuze používat především u žen, které krvácely po porodu. Těmito pokusy se zabýval profesor **James Blundel** a ve většině případů došlo k záchraně těchto žen. Během 20. století se lékařství prohlubovalo, došlo k objevu antikoagulačních a konzervačních látek krve, popsání lidských krevních skupin a díky tomu se krevní transfuze staly rozšířenějšími a zároveň bezpečnějšími. Během druhé světové války našla transfuzní medicína značné uplatnění - ve velkém rozsahu vznikaly krevní banky červeného kříže. Ve veterinární oblasti se transfuzní lékařství datuje od roku 1950 (Lanevski and Wardrop, 2001).



Obr. 21 *Portrét Richarda Lowera (Fastag et al., 2013)*



Obr. 22 *První transfuze mezi psy (Cruse and Lewis, 2010)*



Obr. 23 *Článek R. Boyla z roku 1666 (Fastag et al., 2013)*



Obr. 24 *Transfuze ze zvířete na člověka (Cruse and Lewis, 2010)*

3.5.2 Transfuzní přípravky

Transfuzními přípravky jsou složky krve, které jsou připraveny od maximálně deseti dárců a nebývají ošetřeny proti virům. Krevní deriváty již takto ošetřovány jsou a připravují se z plazmy mnoha dárců. Transfuzní přípravky je možné získat **odběrem plné krve**, nebo **hemaferetickými metodami**, kam se řadí plazmaferéza, leukocytaferéza, erythrocytaferéza a trombocytaferéza. Princip těchto metod spočívá v separaci krevních elementů díky speciálním přístrojům. Po odebrání množství krve dárce je, nejčastěji postupem centrifugace, oddělena požadovaná frakce krvinek nebo plazma a zbytek navrácen příjemci. Novodobé přístroje umožňují provádět hemaferézu kontinuálním způsobem (Doubek a kol., 2003). Tyto metody mají schopnost zlepšení kvality pacientova života a jsou schopny oddálit závažné komplikace. Uplatnění nacházejí při léčbě hematologického, nefrologického, neurologického, onkologického či metabolického onemocnění. Leukocytaferéza je indikována v případech,

kdy je nutno okamžitě snížit počet leukocytů pacienta. Erythrocytaferéza se využívá v případech, kdy je třeba snížit nadbytečný počet erytrocytů či nadbytečné množství železa v organismu. Tato metoda též snižuje hodnoty hematokritu, upravuje hyperviskozitu krve a zvyšuje její průtok. Trombocytaferéza je indikována u pacientů, jež mají zvýšený počet trombocytů. Hodnoty by se měly pohybovat v rozmezí $200-460 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Řeháček a kol., 2013).

Plná krev (WB, whole blood) se používá jak k přípravě transfuzních přípravků, tak ale i k terapii závažných anemických syndromů a koagulačních poruch. Plná krev se většinou neskladuje, slouží spíše k okamžitému užití (Doubek a kol., 2003). Takto odebraná plná krev běžně slouží jako zdrojová složka k výrobě transfuzních přípravků, tím jsou erytrocyty, plazma a trombocyty. V případě, že plná krev slouží pro transfuze, podávání je bez dalšího zpracování či je možné ji deleukotizovat. Deleukotizace filtrací probíhá pomocí speciálních filtrů. Velká výhoda tohoto postupu spočívá v relativní jednoduchosti, avšak nevýhodou je, že dojde ke ztrátě trombocytů (krevních destiček). Další možností je centrifugace. Při ní se jednotlivé krevní složky rozdělují podle specifické hmotnosti (Řeháček a kol., 2013).

Ve veterinární medicíně patří k nejpoužívanějším tyto transfuzní přípravky:

Erytrocytární koncentrát – je o tzv. krevní konzervu s téměř úplně odstraněnou plazmou; ke snížení viskozity koncentrátu se docílí díky resuspendaci; odstranění buffy coat (leukocyty a trombocyty) nebo deleukotizace pomocí filtrů zapříčiňuje, že koncentrát se stane chudým na leukocyty či je deleukotizován; tato deleukotizace snižuje riziko potransfuzních reakcí; promytí snižuje dále obsah plazmatických bílkovin v koncentrátu a poté je promyté erytrocyty možné bezpečně aplikovat.

Čerstvá plazma – obsahující množství plazmatických bílkovin a koagulačních faktorů, se podává zejména při koagulopatiím a dále při trombotické trombocytopenické purpuře; k jejímu získání se využívá centrifugace plné krve nebo plazmaferézou; plazmu lze uchovávat zmrazenou; zmrzí-li se do 8 hodin po odběru, označujeme ji jako čerstvá zmražená plazma (FFP, fresh frozen plasma), která obsahuje nestabilní plazmatické bílkoviny (FF V a VIII krevního sražení), dojde-li ke zmrazení za více jak 8 hodin po odběru, nazývá se jen zmražená plazma (FP, frozen plasma), která se skladuje kolem 1 roku (Doubek a kol., 2003). Může však být skladována až po dobu 4 let. Dříve se odborníci domnívali, že po takto dlouhém uskladnění dojde ke ztrátě, či nefunkčnosti srážecích faktorů, ale nedávná studie ukázala, že tyto srážecí faktory VIII a X jsou stále přítomny, ačkoli je jejich funkčnost snížena ve srovnání s (FFP) čerstvě zmrazenou plazmou (Kisielewicz and Self, 2014).

Kryoprecipitát – získá se při rozmrazování čerstvé zmražené plazmy, především se jedná o její bílkoviny, které rozmrazí nejpozději; kryoprecipitát obsahuje faktor VIII (FVIII) krevního srážení, fibrinogen a von Willebrandův faktor (vWF); podává se u hemofilie nebo (vWD) von Willebrandovy nemoci (Doubek a kol., 2003). Jedná se o vrozené krvácivé onemocnění, jehož příčinou je nedostatek, nefunkčnost či strukturní porucha von Willebrandova faktoru (vWf), díky tomu dochází k porušení jeho funkce – hemostáza, neschopnost vázat FVIII (Penka a kol., 2009).

Kryosupernatant (cryopoor plasma) – vznikne rozdělením kryoprecipitátu od čerstvé zmrzlé plazmy; lze jej využít k terapii trombotické trombocytopenické purpury.

Koncentrát trombocytů – dnes se připravuje především trombocytaferézou; krevní destičky mohou skladovat pouze za pokojové teploty a pouze několik málo dnů; koncentrát destiček se podává u symptomatických trombocytopenií.

Koncentrát granulocytů – podává se u neutropenií a sepse; příprava probíhá leukaferézou. Dávkování a indikace vybraných přípravků pro transfuzi jsou uvedeny v tabulce níže - viz tab. 2 (Doubek a kol., 2003).

PŘÍPRAVEK	PODÁVANÝ OBJEM	FREKVENCE PODÁVÁNÍ	VYBRANÉ INDIKACE
Čerstvá plazma a čerstvá zmražená plazma (FFP)	6-12ml/kg ž. hm.	Každých 8-12 hodin	Defekty koagulačních faktorů, von Willebrandova nemoc, DIC, hypoproteinemie, hypogamaglobulinemie
Zmražená plazma (FP)	6-12 ml/kg ž. hm.	Každých 8-12 hodin	Hypoproteinemie, hypogamaglobulinemie
Kryoprecipitát	1 jednotka (z 200 ml FFP)/10 kg ž. hm.	Každých 4-12 hodin	Hemofilie A, dysfibrinogenemie, hypofibrinogenemie, von Willebrandova nemoc
Kryosupernatant	6-12 ml/ kg ž. hm.	Každých 8-12 hodin	Hemofilie B, defekty FF II, VII, X a XI, hypoproteinemie, hypogamaglobulinemie

Tab. 2 Dávkování a indikace některých transfuzních přípravků (Doubek a kol., 2009)

3.5.3 Požadavky na aplikace

Ideální psí dárce se vyznačuje následující charakteristikou: váží nejméně 30 kg, napnutá kůže na krku umožňující snadný přístup do krční žíly, hodnota hematokritu nejméně 0,40 L/L, dobrá fyzická kondice, bez předchozí zkušenosti s transfuzí, bez prodělané gravidity, dárce musí být DEA 1,1 nebo DEA 1,2, provedené testování na nepřítomnost či nedostatek von Willebrandova faktoru (vWF) musí být negativní. Pro správnou, účinnou a nezávadnou transfuzi je pak důležité dodržovat několik zásad: Pes jako dárce musí být pravidelně kontrolován a preventivně očkován; každých 6 měsíců je nutno provést fekální flotaci v případě, že pes přichází do kontaktu s jinými zvířaty; dále jednou ročně provádět hemogram – krevní obraz, prověřit infekční choroby a v určitých regionech je vhodné provést i testy na *Dirofilaria immitis* (vlasovec psi); v neposlední řadě je samozřejmostí při každém odběru měření teploty, váhy a zjišťování objemu hematokritu (Lanevski and Wardrop, 2001). Psí dárce by neměl prodělat vakcinaci čtrnáct dní před plánovaným dárcovstvím a krev může darovat jednou za 3 týdny. Při opakovaném dárcovství krve by měl dárce dostávat substituční preparáty železa (1 ml krve obsahuje 0,5 mg železa). Krev je odebírána do antikoagulačního roztoku, kterým může být citrát (1 ml 3,8% roztoku na 9 ml krve), či heparin (5-12 jednotek na 1 ml krve). Ten je vhodnější, pokud je krev příjemci podána do dvou dnů, citrát je vhodný pro dlouhodobější skladování krve. Do krve je možné přidávat energetické roztoky, které poskytují červeným krvinkám energii. V dnešní době se již používají roztoky, které obsahují glukózu, ale i adenin, manitol, fosfát nebo chlorid sodný. Pes, ale i kočka mohou maximálně darovat 15-20% krve z vypočítaného krevního objemu, což bývá zhruba 16-18 ml krve/kg ž. hm. psa (Doubek a kol., 2003).

3.5.4 Potransfuzní reakce

Proti antigenům DEA 1.1 a 1.2 se nevyskytují přirozené protilátky, z toho důvodu nedochází k žádným reakcím v antigenech. Potransfuzní reakci je nutné očekávat při opakování transfuze krve s krevní skupinou DEA 1.1 či 1.2 pozitivní příjemci, který je DEA 1.1 nebo 1.2 negativní skupiny. Tato reakce může mít fatální následky. Obdobná situace nastává i v případě feny DEA 1.1 či 1.2 negativní, které se narodí štěně s krevní skupinou DEA 1.1 či 1.2 pozitivní. Potransfuzní reakce může nastat po podání jakéhokoliv transfuzního

přípravku či krevního derivátu. Reakce může být **akutní** formy - např. hemolýza v důsledku inkompatibilních krevních skupin a protilátek zejména v krvi příjemce, nebo **opožděná** forma - např. pozdní hemolýza transfundovaných krvinek v důsledku jimi vyvolané tvorby aloprotilátek. Kromě potransfuzních hemolytických reakcí se vyskytuje i mnoho reakcí nehemolytických. Potransfuzní reakce jsou uvedeny v tabulkách níže - viz tab. 3 a 4 (Doubek a kol., 2003).

IMUNOLOGICKY ZPROSTŘEDKOVANÉ REAKCE	
Inkompatibilita krevních skupin	Inkompatibilita plazmatických proteinů
Inkompatibilita bílých krvinek a krevních destiček	Potransfuzní nemoc štěpu proti hostiteli (u imunokompromitovaných příjemců)

Tab. 3 Příklady imunologicky zprostředkovaných reakcí (Doubek a kol., 2003)

NEIMUNOLOGICKY ZPROSTŘEDKOVANÉ REAKCE	
Objemové přetížení po transfuzi	Hypotermie
Hypokalcemie při intoxikaci citrátem	Krvácivé projevy (heparin)
Mikrobiální kontaminace	Koagulopatie a trombóza
Acidóza	Hyperkalemie
Hypofosfatemie	Hyperamonemie
Hemosideróza	Pretransfuzní hemolýza
Leukocytóza – zvýšení počtu leukocytů	

Tab. 4 Příklady neimunologicky zprostředkovaných reakcí (Doubek a kol., 2003)

Terapie reakcí, které jsou imunitně zprostředkované, spočívá v okamžitém přerušení transfuze a v rychlé aplikaci kortikoidů (3 mg/kg ž. hm. Hydrokortizonu intravenózně, 1-2 mg/kg ž. hm. prednizonu perorálně nebo adekvátní dávka jiného kortikoidu), antihistaminik intravenózně, kalcia (intravenózně *Calcium gluconicum 10%* 50-100 mg/kg ž. hm.), furosemidu (intravenózně 2-4 mg/kg ž. hm.) a léčba případného šokového stavu.

Neimunologická potransfuzní reakce je léčena podle příčiny a manifestace (Doubek a kol., 2003). Např. v případě koagulopatie či trombózy je možné podávat heparin, naopak

u krvácivých případů jsou vhodnými přípravky krystaloidy a koloidy. Zvýšený počet leukocytů může být snížen leukocytaferézou. Hyperkalemie vznikající abnormálně zvýšenou hladinou draslíku může způsobit srdeční arytmii či dysfunkci. Vzniká v důsledku skladované krve, ze které se postupně uvolňuje draslík (Řeháček a kol., 2009). Léčba probíhá podáváním kalcia, glukózy s inzulinem s následnou hemolýzou a hemofiltrací (Muntau, 2009). Abychom předešli nežádoucím reakcím, je nutné produkty řádně shromáždit, zpracovat a uložit; dárci musí být zdravá zvířata, u kterých je známa krevní skupina a lze u nich spolehlivě provádět screeningové testy. Nejzávažnější transfúzní reakcí, které může lékař zabránit, je akutní hemolytická reakce. Jedná se o imunologickou reakci, která se vyskytne v případě, že pacient má přirozené nebo získané protilátky na antigeny.

Mezi klinické příznaky akutní hemolytické reakce u psů se řadí horečka; tachykardie nebo bradykardie; hypotenze; dušnost; cyanóza; nadměrné slinění; močení, kálení a zvracení; kolaps, srdeční zástava a v neposlední řadě hemoglobinurie. Pokud dojde k hemolytické reakci, je nutné okamžitě transfuzi přerušit. Následně je nutný návrat ke křížovému testu kompatibility a dalším postupům, které předcházely transfuzi (Lanevski and Wardrop, 2001).

Komplikace, které mohou dále nastat během transfuze či bezprostředně po ní, jsou například **anafylaxe** – vzniká v případě nekompatibility antigenů, které se vážou na membránu, nebo v případě, že dojde k nesnášenlivosti antikoagulačního prostředku. Jejimi příznaky jsou kopřivka, horečka a šok (Schrey, 2010). Pokud dojde k této reakci, je nutné zastavení transfuze, provést endotracheální intubace, dále podávat Ringerův roztok (roztok izotonický) v dlouhodobé infuzi, adrenalin v poměru 1:10 000 – 0,1 ml/kg intravenózně, intratracheální a dexamethason podávat v množství 1 mg/kg intravenózně;

diseminovaná intravaskulární koagulopatie (DIC) – při této komplikaci týkající se srážlivosti krve je žádoucí podávat heparin v množství 50-100 j/kg 3× denně subkutánně;

septikemie - v případě, že dojde k napadení krve bakteriemi, je nutné podat enroflaxin v množství 5 mg/kg 1× denně intravenózně, subkutánně, per os + klindamycin v množství 10 mg/kg 2× denně intravenózně, subkutánně, per os;

hypokalcemická tetanie - 10% kalciumglukonát (glukonan vápenatý) v množství 0,5-1,5 mg/kg pomalu intravenózně - po dobu asi 30 min (Schrey, 2006). Toto onemocnění vzniká při nedostatku parathormonu, který následně vyvolá zvýšenou nervosvalovou dráždivost (Kittnar a kol., 2011).

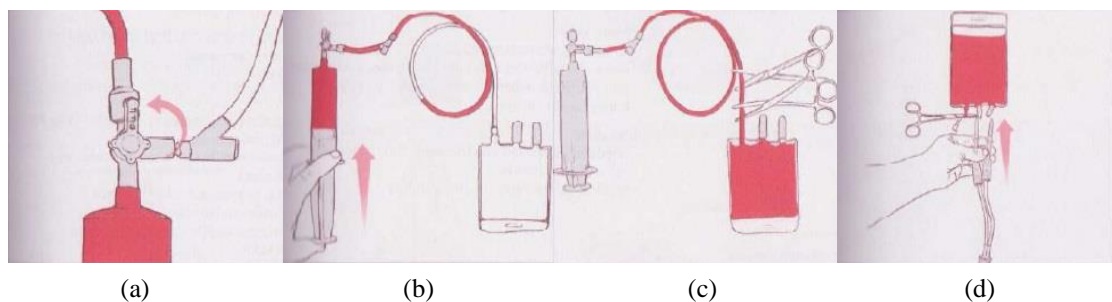
3.6 Autotransfuze

Autotransfuze (autologní transfuze) je krevní transfuzí či transfuzí krevních komponent pocházejících z vlastní cirkulace příjemce (Řeháček a kol., 2013). Autologní krev je odebrána především před plánovaným operačním zákrokem či z operační rány během chirurgických operací. Jedná se tedy o alternativu podání krve od dárce. Autologní krev se před operačními výkony odebírá totožným způsobem jako krev jiných dárců (Doubek a kol., 2003).

Postupuje se následovně - v prvním kroku dochází k přípravě pacienta spočívající v polohování vleže či v poloze ve stoje, poté se oholí a vydezinfikuje místo vpichu. Odebere se krev a poté se uzavře trojcestný ventil = umožní průchod krve směrem do transfuzního vaku, jehla se vytáhne a krev přeteče do transfuzního vaku, který se zasvorkuje, odstříhne a odstraní se set použitý k odběru krve (vedoucího od stříkačky k transfuznímu vaku – viz obr. 25). Poslední fází je samotná transfuze, která započne připojením transfuzního setu (obsahuje filtr) na transfuzní vak a nitrožilní kanylu. Rychlost autotransfuze se pohybuje kolem 10-20 ml/kg/hod. Tato metoda se transfuze se uplatňuje například i u urgentních případů otravy antikoagulačními roenticidy, hemotoraxu, či anemie (Schrey, 2006).



Obr. 25 Autotransfuzní set (Drobatz et al., 2011)



Obr. 26 Postup při autotransfuzi – (a) uzavření trojcestného ventilu, (b) průchod krve do transfuzního vaku, (c) zasvorkování, (d) odstříhnutí (Schrey, 2006)

Autologní transfuze má řadu výhod, mezi něž patří například zamezení přenosu infekčních onemocnění, vyloučení rizika aloimunizace a imunosupresivního účinku, je možné okamžité použití krve během operačního zákroku, atd. (Řeháček a kol., 2013). Avšak tento způsob podání krve s sebou nese i jistá rizika a nevýhody, mezi něž patří například indikační omezení (vhodnost jen pro určité druhy operačních zákroků), hemolytická, alergická, či bakteriálně-toxická rizika (Řeháček a kol., 2013). Může také dojít k tromboembolii, perforaci plic, poranění cév hrudní stěny, pneumotoraxu, infekci atp. (Doubek a kol, 2003).

3.7 Krevní transfuze u anemických psů

Anemie neboli **chudokrevnost** je chorobný stav, který je charakterizován snížením hemoglobinu pod fyziologickou mez pro daný věk a pohlaví zvířete. Počet erytrocytů má pro definování anemie menší význam, neboť u některých typů anemií nemusí být počet erytrocytů snížen a u jiných mohou být erytrocyty dokonce zmnoženy. Hemoglobin a hematokrit mohou být pozměněny také při odchylkách v množství cirkulující plazmy (například během gravidity, atd.). Naopak pokud klesne objem plazmy, například při dehydrataci, nebo u nedostatku funkčnosti nadledvinek (Addisonova choroba), hodnoty se mohou zdát v normě, i přesto, že je jedinec chudokrevný. U lidí se jedná o jeden z nejčastějších chorobných stavů a to v důsledku chybějící správné výživy (Penka a kol, 2009). Cílem léčby anémie je zlepšení zásobování tkání kyslíkem. Stav, kdy dochází k nedostatku kyslíku v krvi, se nazývá hypoxemie. Ta spouští kaskádu reakcí, které mohou vést až k buněčné smrti, pokud se včas neléčí. Dehydratace zvyšuje krevní viskozitu, což znesnadňuje tok červených krvinek, tedy i kyslíku, do tkání. Ke zlepšení průtoku krve do tkání může pomoci podání krystaloidů nebo koloidů. Před zahájením transfuze je důležité zvážit několik faktorů. Krevní složky jsou drahé, a proto by se transfuzní léčba neměla používat jako objemový expandér. Rozpoznání klinických příznaků spojených s anémií je klíčem k vyhodnocení pacientů, kteří vyžadují tuto léčbu. Hodnoty reprezentované parametry červených krvinek (např. hodnoty hematokritu), nejsou nejdůležitějšími faktory, které hodnotí, zda pacient vyžaduje transfuzní léčbu. Tyto hodnoty mohou být v normě například v důsledku zmenšení sleziny, i přesto však tento pacient může selhávat díky hemoragickému šoku. Chronicky anemický pacient může mít abnormálně nízké hodnoty hematokritu, i když je schopen normálního pohybu, přijímající potravu, atd., jelikož jeho buňky se přizpůsobí na snížený přívod kyslíku. Výsledky

lékařského vyšetření a laboratorní výsledky je třeba hodnotit souběžně a na jejich základě vyhodnotit, zda pacient vyžaduje transfuzní léčbu. Počáteční léčebný plán anemických pacientů by měl zahrnovat následující kroky:

Podávání doplňkového O₂ anemickým pacientům – dokud se krevní tlak, dechová frekvence a srdeční frekvence nenormalizují; minimalizování šoku (např. díky krystaloidům, koloidům, či lékům); zabránění dalšímu krvácení (např. podvázáním, břišními zábaly); minimalizování stresu (např. udržovat pacienta v klidovém stavu, vyhnout se bolestivým procedurám, jako je podkožní injekce, odběr krve pouze v případě potřeby) a v neposlední řadě monitorování barvy sliznice, dechové frekvence, neurologického stavu a hematokritu (Rutan, 2007).

4. Závěr

Díky zpracování této bakalářské práce jsem zjistila, že transfuzní medicína ve veterinární oblasti, jež se datuje od roku 1950, se značně posunula vpřed, technologie se zdokonalila a dnes je již běžně využívanou metodou. Její prvopočátky sahají až do roku 1666, kdy první transfuzi mezi psy uskutečnil anglický anatom Richard Lower. Ten však v té době ještě neměl zdaleka tak rozsáhlou představu o imunologii krve, samotných transfuzích a krevních skupinách jako máme dnes.

Krev má ve spojitosti s transfuzemi především funkci obrannou, kde hrají významnou roli antigeny, leukocyty a imunoglobuliny. Dnes víme, že proti antigenům krevních skupin DEA 1.1 a 1.2 se přirozeně protilátky nevyskytují, proto jejich podáním při první transfuzi nehrozí žádné riziko vzniku negativních reakcí. K těmto nežádoucím reakcím ale může dojít při opakované transfuzi odlišných skupin. V dnešní době máme několik způsobů pro zjišťování typu a kompatibility krevních skupin, jako je například křížový test, aglutinační test, zkumavkový test či test imunochromatografický, díky nimž minimalizujeme inkompatibilitu.

Běžně užívanou transfuzní metodou je heterotransfuze (odlišný dárce a příjemce), která je nutná zejména v akutních případech, či v případech anemických pacientů, kterým je tímto způsobem zlepšeno zásobování tkání kyslíkem a dodáváno potřebné množství hemoglobinu. Tato metoda má široké uplatnění, avšak má i jistá potransfuzní rizika nehemolytického či hemolytického charakteru. Těm se snažíme předcházet, zejména pak výše zmíněnými testy kompatibility. I přesto ale může k nežádoucí reakci dojít, pak je nutné okamžitě transfuzi přerušit a následně zahájit vhodnou léčbu, ať už jde např. o hemaferézu či podávání léků – např. heparin při koagulačních poruchách či trombóze, krystaloidy a koloidy při krvácivých stavech, nebo antibiotika v případě bakteriální nákazy, atd. Alternativou této transfuzní metody může být i tzv. autotransfuze, u které se například minimalizuje přenos infekčních onemocnění, je zde vyloučena aloimunizace a imunosupresivní účinek.

Vzhledem k tomu, kolik dnes máme znalostí, ať už jde o krevní skupiny psa, imunologii či samotnou transfuzi, není pochyb o tom, že se toto odvětví v budoucnu ještě zdokonalí, dojde k prohloubení znalostí a zamezí se ve větším měřítku nežádoucím komplikacím, jako jsou již zmíněné potransfuzní reakce.

5. Seznam literatury

Cruse, J., M., Lewis, R., E. 2010. Atlas of immunology. Third edition. Taylor & Francis group. New York. p. 940. ISBN: 139781439802694.

Doubek, J. 2003. Veterinární hematologie. Noviko. Brno. 464 s. ISBN: 8086542025.

Drobatz, J., K., Beal, M., W., Syring, S., R. 2011. Manual of trauma management in the dog and cat. Wiley-Blackwell. United Kingdom. p. 392. ISBN: 9780470958315.

Fastag, E., Varon, J., Sternbach, G. 2013. Richard Lower: the origins of blood transfusion. Elsevier. USA. 6. 1146-1150.

Fábryová, V., Cupaníková, D., Grmanová, J., Hrubíško, M., Paulíny, M., Sládečková, S., Staneková, D., Striežencová, Laluhová, Z., Svitekova, K. 2012. Imunohepatológia a transfúzna medicína pre prax. Grada Publishing, a.s. Bratislava. 232 s. ISBN: 9788080900021.

Frandsen, R. D., Spurgeon, T. L. 1992. Anatomy and physiology of farm animals. Lea & Febiger. Philadelphia. p. 572. ISBN: 0812114353.

Harvey, J. W. 2001. Atlas of veterinary hematology: Blood and bone marrow of domestic animals. Saunders. Philadelphia. p. 240. ISBN: 0721663346.

Hrubíško, M. (ed.). 1983. Hematologie a krevní transfúze: 2. díl krevní transfúze. Avicenum. Brno. 208 s.

Jelínek, P., Koudela, K. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 414 s. ISBN: 8071576441.

Kisielewicz, C., Self, I., A. 2014. Canine and feline blood transfusion: controversies and recent advances in administration practices. Formerly the Journal of Veterinary Anesthesia. UK. 41. 233-242.

Kittnar, O., Jandová, K., Kuriščák, E., Langmeier, M., Marešová, D., Mlček, M., Mysliveček, J., Pokorný, J., Ríjla, V., Trojan, S. 2011. Lékařská fyziologie. Grada Publishing, a.s. Praha. 800 s. ISBN: 97824730684.

Koolman, J., Röhm, K., H. 2012. Barevný atlas biochemie. Grada Publishing, a.s. Praha. 515 s. ISBN: 9788024729770.

Kuehnel, W. 2003. Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. p. 542. ISBN: 3135624048.

- Lanevski, A., Wardrop, K. J. 2001. Principles of transfusion medicine in small animals. Canadian Veterinary Journal. 42. 447–454.
- Langmeier, M., Kittnar, O., Marešová, D., Pokorný, J. 2009. Základy lékařské fyziologie. Grada Publishing, a.s. Praha. 320 s. ISBN: 9788024725260.
- Muntau, A., C. 2009. Pediatrie. Grada Publishing, a.s. Praha. 608 s. 9788024725253.
- Paulík, M., Bartůňková, J., Hrušák, O., Smetana, K., Šedivá, A., Špišek, R., Šprongl, L., Vernerová, E. 2011. Vyšetřovací metody v imunologii. Grada Publishing, a.s. Praha. 172 s. ISBN: 9788024735337.
- Penka, M., Buliková, A., Matýšková, M., Novotný, J., Kořístek, Z., Bourková, L., Zavřelová, J., Čech, Z., Snopková, S. 2009. Neonkologická hematologie. Grada Publishing, a.s. Praha. 248 s. ISBN: 9788024722993.
- Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada Publishing, a.s. Praha. 480 s. ISBN: 9788024732824.
- Reece, W. O. 2009. Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals. Blackwell Publishing. p. 592. ISBN: 0813814510.
- Rutan, J. 2007. Blood transfusion in anemic pet. Banfield. USA. 807. 38-56.
- Řeháček, V., Masopust J. (eds.). 2013. Transfuzní lékařství. Grada Publishing, a.s. Praha. 240 s. ISBN: 8024745343.
- Schrey, CH. F. 2006. Terapie urgentních stavů u psa a kočky. Grada Publishing, a.s. Praha. 247 s. ISBN: 8024713934.
- Sirois, M. 2015. Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. 6th Edition. Elsevier. Missouri. p. 440. ISBN: 9780323169301.
- Svoboda, M., Senior, D., F., Doubek, J., Klimeš, J. 2001. Nemoci psa a kočky. Noviko, a.s. Brno. 2038 s. ISBN: 8090259537.
- Toman, M. (ed.). 2009. Veterinární imunologie. Grada publishing, a.s. 392 s. ISBN: 9788024724645.
- Trojan, S., Langmeier, M. (eds.). 2003. Lékařská fyziologie. Grada Publishing, a.s. 772 s. ISBN: 8024705125.
- Weiss, J. D., Wardrop, J. K. (eds.). 2010. Schalm's veterinary hematology, 6th edition. Wiley-Blackwell. p. 1232. ISBN: 9780813817989.

6. Seznam příloh

Obr. 1	<i>Vývoj krevních elementů (Svoboda a kol., 2001)</i>	9
Obr. 2	<i>Morfologické znaky dozrávání krevních elementů (Svoboda a kol., 2001)</i>	10
Obr. 3	<i>Tvar a rozměry erytrocytu (Trojan a kol., 2003)</i>	12
Obr. 4	<i>Erytrocyt (Kuehnel, 2003)</i>	12
Obr. 5	<i>Nátěr se sférickými erytrocyty (Weiss and Wardrop, 2010)</i>	12
Obr. 6	<i>Schéma struktury hemoglobinu (Kittnar a kol., 2011)</i>	13
Obr. 7	<i>Schéma dělení a zrání buněk červené řady (Trojan a kol., 2003)</i>	14
Obr. 8	<i>Schéma struktury trombocytu (Reece, 2011)</i>	15
Obr. 9	<i>Struktury granulocytů (Toman a kol., 2009)</i>	16
Obr.10	<i>Neutrofilní granulocyt (Weiss and Wardrop, 2010)</i>	17
Obr. 11	<i>Eozinofilní granulocyt psa (Svoboda a kol., 2001)</i>	18
Obr. 12	<i>Bazofilní granulocyt psa (Doubek a kol., 2003)</i>	18
Obr. 13	<i>Struktura NK-buňky(Toman a kol., 2009)</i>	20
Obr. 14	<i>Plaménková buňka (Doubek a kol., 2003)</i>	20
Obr. 15	<i>Monocyt psa (Svoboda a kol., 2001)</i>	20
Obr. 16	<i>Struktura molekuly protilátky(Trojan a kol., 2003)</i>	23
Obr. 17	<i>Coombsův test – (A) přímý; (B) nepřímý test (Sirois, 2015)</i>	23
Obr. 18	<i>RapidVet H testovací křížová sada kompatibility pro zjišťování krevních skupin (Sirois, 2015)</i>	26
Obr. 19	<i>RapidVet-H aglutinační testovací karta psích krevních skupin (Sirois, 2015)</i>	27
Obr. 20	<i>Imunochromatografický test pro kočky RapidVet H (Sirois, 2015)</i>	28
Obr. 21	<i>Portrét Richarda Lowera (Fastag et al., 2013)</i>	30
Obr. 22	<i>První transfuze mezi psy (Cruse and Lewis, 2010)</i>	30
Obr. 23	<i>Článek R. Boyla z roku 1666 (Fastag et. al., 2013)</i>	30
Obr. 24	<i>Transfuze ze zvířete na člověka (Cruse and Lewis, 2010)</i>	30
Obr. 25	<i>Autotransfuzní set (Drobatz et al., 2011)</i>	36
Obr. 26	<i>Postup při autotransfuzi (Schrey, 2006)</i>	36
Tab. 5	<i>Metodický postup křížového testu (Lanevski and Wardrop, 2001)</i>	28
Tab. 2	<i>Dávkování a indikace některých transfuzních přípravků (Doubek a kol., 2009)</i>	32
Tab. 3	<i>Příklady imunologicky zprostředkovaných reakcí (Doubek a kol., 2003)</i>	34
Tab. 4	<i>Příklady neimunologicky zprostředkovaných reakcí (Doubek a kol., 2003)</i>	34