

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Genetické a negenetické příčiny poruchy krvetvorby u psů**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Eva Káňová**

**Obor studia: ABPC**

**Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Genetické a negenetické příčiny poruchy krvetvorby u psa" 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 \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost při tvorbě této bakalářské práce. Poděkování patří i mé rodině za podporu nejen při tvorbě této práce, ale i v průběhu celého studia.

# Genetické a negenetické příčiny poruchy krvetvorby u psů

## Souhrn

V bakalářské práci jsem se zaměřila na aktuální problematiku onemocnění způsobující poruchy krvetvorby u psa. U jednotlivých nemocí se zaměřuji na klinické příznaky, dědičnost a na případnou terapii. U genetických také na mutace genů, které jsou jejich příčinou. Z genetických onemocnění jsem se zaměřila na cyklickou neutropenii šedých kolí, deficit pyruvát kinázy, hemofilii A a B a von Willebrandovu chorobu. Z negenetických onemocnění na akutní myeloidní leukémii, chronickou lymfatickou leukémii, akutní lymfatickou leukémii, anémii, trombocytopenii a na otravy s vlivem na krvetvorbu. S poruchami krvetvorby postihující psy se můžeme setkat v běžném životě u čistokrevných psů i kříženců. Zvolila jsem proto jak nemoci běžně se vyskytující v chovech, tak i vzácně se vyskytující, jelikož ve většině případů končí smrtí psa.

Objevením konkrétních mutací genů odpovědných za dědičné poruchy krvetvorby jsme schopni pomocí genetických testů odhalit přenašeče daného onemocnění. Jako příklad můžeme uvést test pro rhodéského ridgebacka trpícího hemofilií B, umožňující detekci mutace genu CFXI nebo test pro šedě zbarvené kolie, trpící cyklickou neutropenií, schopný detekovat mutaci genu AP3B1. Zodpovědní chovatelé by proto měli využít této možnosti testování, zjištěné přenašeče vyřadit z chovu a zamezit tak dalšímu šíření dědičných nemocí.

U poruch krvetvorby bez genetického vlivu bychom se měli snažit těmito stavům předcházet. Především správnou výživou pokrývající nutriční požadavky psů, zejména na železo a měď. Dále nevystavovat psy působení toxinů a ionizujícího záření, které mohou být odpovědné za vznik leukémií. Zamezit psům přístup k jedům, těžkým kovům a jedovatým rostlinám. Nejčastěji dochází k otravám kumarinovými rodenticidy, které narušují hemokoagulaci. Dalším možným zdrojem otrav mohou být rostliny rodu *Allium*, konkrétně česnek a cibule, které jsou pro psy i v poměrně malém množství toxické. Dochází k oxidační hemolýze a vzniku hemolytické anémie. Chovatelé i veřejnost by proto měli dbát na zamezení přístupu zvířat k těmto nebezpečným látkám.

**Klíčová slova:** deficit pyruvát kinázy, hemofilie, hemokoagulace, krvetvorba, leukémie, neutropenie, pes, trombocytopenie, von Willebrandova choroba

# Genetic and non-genetic causes hematopoiesis disorders in dogs

## Summary

This thesis investigates and describes actual issue of diseases causing disorders of hematopoiesis affecting the dog. As regards to the individual diseases, the study focuses on clinical symptoms, inheritance and eventual therapy. As far as genetic diseases are involved, the study turns its intention to mutation of genes, which are the cause of their occurrence. Main focus in the field of genetic diseases is located in cyclic neutropenia, pyruvate kinase deficiency, hemophilia A and B and von Willebrand's disease. Concerning non-genetic diseases, the thesis aims at acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, acute lymphocytic leukemia, anemia, thrombocytopenia, and poisoning with impact on hematopoiesis. The haematopoietic affecting the dog is both being diagnosed - in individuals with pedigree and in mutts. I have chosen this topic because the mentioned diseases are being commonly found in all breeds, they are rare and in most cases results in death of the stricken dogs.

Thanks to the discovery of specific mutations in the genes causing hereditary disorders of hematopoiesis, we are able to use genetic tests to detect carriers of the disease. We can use as an example a DNA test for the Rhodesian Ridgeback afflicted with hemophilia B. This test provides a detection of mutations in the CFXI gene or a test for grey coloured Collie affected with cyclic neutropenia, and it is able to detect mutation in AP3B1 gene. Responsible breeders should take advantage of this testing and remove the carriers from breeding and thus, prevent further spread of the hereditary diseases.

For hematopoiesis disorder without genetic influence, we should try to prevent these conditions. Particularly, by good nutrition covering the nutritional requirements of dogs, especially iron and copper. Further, dogs should not be exposed to toxins and ionizing radiation, which can be cause leukaemia. Prevent dogs from getting access to poisons, heavy metals or poisonous plants. The most frequent poisoning is caused by coumarin rodenticides which damage hemocoagulation. Another possible source of poisoning of dogs can be a plant of the genus *Allium*, specifically garlic and onion which are toxic to dogs even in relatively small amounts. The oxidative hemolysis and hemolytic anemia occur. Therefore, breeders and the public should prevent their animals from getting access to these dangerous substances.

**Keywords:** pyruvate kinase deficiency, hemophilia, hemocoagulation, hematopoiesis, leukemia, neutropenia, dog, thrombocytopenia, von Willebrand's disease

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>2</b>
<b>3 Přehled literatury.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Anatomie a fyziologie krve a krvetvorných orgánů.....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Krev .....	3
3.1.1.1 Červené krvinky.....	3
3.1.1.2 Bílé krvinky.....	5
3.1.1.3 Krevní destičky .....	9
3.1.2 Krvetvorné orgány .....	9
3.1.2.1 Brzlík.....	9
3.1.2.2 Slezina.....	10
3.1.2.3 Kostní dřeň.....	10
<b>3.2 Genetické (dědičné) poruchy krvetvorby u psa.....</b>	<b>12</b>
3.2.1 Cyklická neutropenie šedých kolí (GCS) .....	12
3.2.1.1 Etiologie .....	12
3.2.1.2 Dědičnost.....	12
3.2.1.3 Klinická diagnostika.....	13
3.2.1.4 Laboratorní a molekulární diagnostika .....	13
3.2.1.5 Léčba.....	13
3.2.2 Deficience pyruvát kinázy .....	14
3.2.2.1 Etiologie .....	14
3.2.2.2 Dědičnost.....	15
3.2.2.3 Klinická diagnostika.....	15
3.2.2.4 Laboratorní a molekulární diagnostika .....	16
3.2.2.5 Léčba.....	16
3.2.3 Hemofilie A, B.....	16
3.2.3.1 Etiologie .....	16
3.2.3.2 Dědičnost.....	17
3.2.3.3 Klinická diagnostika.....	17
3.2.3.4 Laboratorní a molekulární diagnostika .....	17
3.2.3.5 Léčba.....	18
3.2.4 von Willebrandova choroba.....	18
3.2.4.1 Etiologie .....	18
3.2.4.2 Dědičnost.....	19

3.2.4.3	Klinická diagnostika.....	20
3.2.4.4	Laboratorní a molekulární diagnostika .....	20
3.2.4.5	Léčba.....	20
<b>3.3</b>	<b>Negenetické poruchy krvetvorby u psa.....</b>	<b>21</b>
3.3.1	Akutní myeloidní leukémie .....	21
3.3.1.1	Etiologie .....	21
3.3.1.2	Klinická diagnostika.....	21
3.3.1.3	Laboratorní diagnostika.....	22
3.3.1.4	Léčba.....	22
3.3.2	Chronická lymfatická leukémie .....	22
3.3.2.1	Etiologie .....	22
3.3.2.2	Klinická diagnostika.....	23
3.3.2.3	Laboratorní diagnostika.....	23
3.3.2.4	Léčba.....	24
3.3.3	Akutní lymfatická leukémie.....	24
3.3.3.1	Etiologie .....	24
3.3.3.2	Klinická diagnostika.....	24
3.3.3.3	Laboratorní diagnostika.....	25
3.3.3.4	Léčba.....	25
3.3.4	Anémie.....	25
3.3.4.1	Etiologie .....	25
3.3.4.2	Sideropenická anémie.....	26
3.3.4.2.1	Klinická diagnostika.....	26
3.3.4.2.2	Laboratorní diagnostika.....	27
3.3.4.2.3	Léčba.....	27
3.3.4.3	Hemolytická anémie.....	27
3.3.4.3.1	Imunitně zprostředkovaná hemolytická anémie (IMHA) .....	28
3.3.4.3.1.1	Klinická diagnostika.....	28
3.3.4.3.1.2	Laboratorní diagnostika.....	28
3.3.4.3.1.3	Léčba.....	29
3.3.4.3.2	Autoimunitně zprostředkovaná hemolytická anémie (AIHA) .....	29
3.3.4.3.2.1	Klinická diagnostika.....	29
3.3.4.3.2.2	Laboratorní diagnostika.....	30
3.3.4.3.2.3	Léčba.....	30
3.3.5	Trombocytopenie .....	30
3.3.5.1	Etiologie .....	30

3.3.5.1.1	Imunitně zprostředkovaná trombocytopenie .....	30
3.3.5.1.1.1	Klinická diagnostika.....	31
3.3.5.1.1.2	Laboratorní diagnostika.....	31
3.3.5.1.1.3	Léčba.....	31
3.3.6	Otrava olovem.....	32
3.3.6.1	Etiologie .....	32
3.3.6.2	Intoxikace.....	32
3.3.6.3	Mechanismus účinku.....	32
3.3.6.4	Klinická diagnostika.....	33
3.3.6.5	Laboratorní diagnostika.....	33
3.3.6.6	Léčba.....	33
3.3.7	Otrava rostlinami rodu <i>Allium</i> spp. ....	33
3.3.7.1	Toxicita .....	33
3.3.7.2	Intoxikace.....	34
3.3.7.3	Mechanismus účinku.....	34
3.3.7.4	Klinická diagnostika.....	35
3.3.7.5	Laboratorní diagnostika.....	35
3.3.7.6	Léčba.....	35
3.3.8	Otrava kumarinovými rodenticidy (warfarin).....	35
3.3.8.1	Etiologie .....	35
3.3.8.2	Intoxikace.....	36
3.3.8.3	Mechanismus účinku.....	36
3.3.8.4	Klinická diagnostika.....	36
3.3.8.5	Laboratorní diagnostika.....	36
3.3.8.6	Léčba.....	37
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>39</b>



# 1 Úvod

Krev je pro tělo naprosto nepostradatelná, protože zajišťuje mnoho nezbytných funkcí v organismu, bez kterých nelze existovat. Její hlavní úlohou je roznášení kyslíku, živin, hormonů a vitamínů do tkání a následný transport oxidu uhličitého, metabolitů a dalších cizorodých látek z těla. Proto je nezbytně nutné věnovat onemocněním s vlivem na krvetvorbu dostatečnou pozornost, jelikož většina těchto onemocnění je neslučitelná se životem.

V roce 1869 se podařilo švýcarskému lékaři F. Mischerimu objevit molekulu DNA. Avšak nebylo možné tuto molekulu dále studovat. Až roku 1953 se dvěma vědcům z Cambridge J. Watsonovi a F. Crikovi podařilo objevit charakteristickou strukturu DNA, což znamenalo neuvěřitelný vývoj genetiky. Byly objeveny první dědičné nemoci zvířat i lidí, s lokalizací genů odpovědných za danou poruchu. Jako důkaz pokroku v léčbě lze uvést možnost použití genové terapie pro léčbu hemofilie A i B u psů, při které je vnesen funkční gen na místo genu poškozeného. Vnesení funkčního genu vede k obnovení tvorby srážecích faktorů, které u tohoto onemocnění v krvi chybí. Vývoj molekulární diagnostiky vedl k vyloučení původní mutace odpovědné za neutropenii u šedých kolíí v genu ELA2 a identifikaci nové mutace označené AP3B1, která je za toto onemocnění u psů odpovědná. V dnešní době jsou již k dispozici genetické testy umožňující rozlišení postižených jedinců i přenašečů. Proto by měli zodpovědní chovatelé testovat svá zvířata a nemocné jedince vyřadit z chovu.

Neméně důležitou skupinou onemocnění s vlivem na krvetvorbu jsou onemocnění, která nejsou geneticky ovlivněná. Mezi tato onemocnění můžeme zařadit například leukémii, anémii, trombocytopenii, ale také otravy narušující krvetvorbu a hemokoagulaci. Příčiny těchto onemocnění jsou různé nejčastěji však spojené se špatnou výživou nepokrývající výživové požadavky psů jako například nedostatek železa či vitamínu B12 nebo nádorová onemocnění krve či krvetvorných orgánů, nejčastěji kostní dřeně. Další příčinou mohou být toxiny, které se do organismu dostanou pozřením jedů. Nejčastěji se jedná o otravy kumarinovými rodenticidy, používanými k hubení hlodavců. Tyto látky narušují syntézu vitamínu K a s ním spojenou hemokoagulaci. K častým otravám psů dále dochází rostlinami rodu *Allium*, nejčastěji česnekem a cibulí, které se běžně nacházejí v domácnostech. Tyto rostliny obsahují látky, způsobující oxidační hemolýzu a methemoglobinemii.

## **2 Cíl práce**

Cílem práce je sestavit komplexní přehled genetických a negenetických příčin vedoucích k poruchám krvetvorby a hemokoagulace u psů s akcentem na genetické a biochemické pozadí a aktuální možnosti genetické diagnostiky.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Anatomie a fyziologie krve a krvetvorných orgánů

#### 3.1.1 Krev

Krev tělem cirkuluje přes srdce do uzavřeného systému tepen, žil a vlásečnic. V těle zajišťuje zejména transport kyslíku a živin do tkání, dále odvádí odpadní látky do plic, jater a ledvin odkud jsou vyloučeny z těla ven (Bain, 2007). Barva krve je od jasně červené až po modrofialovou v závislosti na nasycení krve kyslíkem. Dále pak zabezpečuje udržování rovnováhy tělních tekutin.

Objem krve je závislý na hmotnosti zvířete. U psa představuje přibližně 8 – 9 % tělesné hmotnosti (Harvey, 2012). Objem červených krvinek z celkového objemu krve označujeme jako hematokrit (Reece, 2011). Zjišťuje se pomocí odstředění nesrážlivé krve, při kterém dojde vlivem působení gravitace k rozdělení na jednotlivé složky. Nejnižší vrstva má tmavě červenou barvu a je tvořena erytrocyty nad nimi se tvoří vrstva trombocytů a leukocytů, která je tvořena hlavně buňkami bílých krvinek a horní vrstva hematokritu je čirá případně světle žlutá, složená ze solí a bílkovin rozpustných ve vodě (Bain, 2007).

pH krve u psa se pohybuje okolo 7,4. Žilní krev bývá kyselější a její pH je u psa přibližně 7,36. Kyselost žilní krve je způsobena obsahem oxidu uhličitého. Při reakci oxidu uhličitého a vody se uvolňují vodíkové ionty a dochází k okyselení žilní krve (Reece, 2011).

##### 3.1.1.1 Červené krvinky

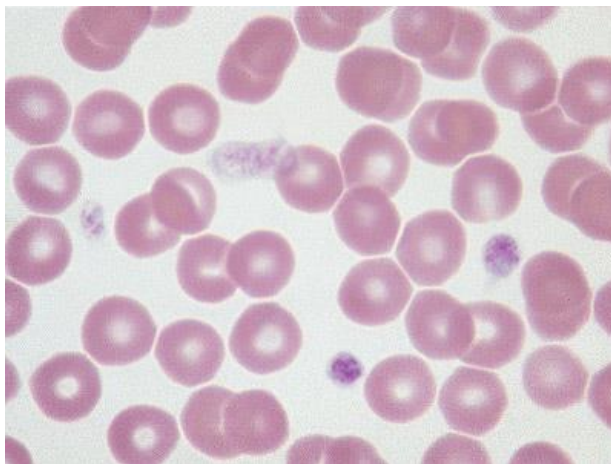
Červené krvinky (erytrocyty) (Obr. 1) jsou nejpočetnějšími buňkami v krvi (Lang et Fäller, 2012). Počet erytrocytů se pohybuje v závislosti na velikosti psa v rozmezí  $5,5 - 8,5 \cdot 10^{12}/l$  (Svoboda, 2008). Mají dorzoventrálně zploštělý tvar a jsou bezjaderné. Ve srovnání s jinými domácími zvířaty je u psů tento tvar daleko zřetelnější. Velikost erytrocytů se pohybuje v průměru přibližně kolem  $7 \mu m$  (Doubek, 2003).

Erytrocyty mají schopnost měnit svůj tvar, což jim umožňuje pronikat do krve. Zralé krevní buňky mají lepší schopnost měnit tvar, což brání vyplavování nezralých buněk do krevního oběhu (Doubek, 2003). Erytrocyty mají tři základní funkce – transportovat kyslík ( $O_2$ ) do tkání, odvádět oxid uhličitý ( $CO_2$ ) do plic a pufrovat vodíkové ionty ( $H^+$ ), aby bylo udrženo stálé pH v organismu (Harvey, 2012). Jejich tvar je udržován díky uspořádání molekuly hemoglobinu a kontraktilních bílkovin (Reece, 2011).

Zásobníkem železa pro hemoglobin jsou makrofágy v ostrůvcích červené kostní dřeně (Doubek, 2003). Hemoglobin se skládá ze dvou polypeptidových řetězců a každý řetězec obsahuje dvě molekuly hemu spojených pomocí jedné molekuly globinu a zaujímá asi 96 % v molekule hemoglobinu. Syntéza hemoglobinu vyžaduje mitochondriální ( $\delta$ -ALA-syntáza) a cytosolické ( $\delta$ -ALA-dehydrogenáza) enzymy (Weiss et Wardrop, 2011; Doubek, 2003). Každá molekula hemu obsahuje atom železa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), který je dodáván z feritinu (Weiss et Wardrop, 2011), což je málo rozpustná forma bílkovin, které vznikají v případě, nezabudování železa do molekuly hemoglobinu (Doubek, 2003). Na tento atom železa se poté může volně vázat molekula kyslíku. Jako přenašeč slouží plazmatický transferrin, obsahující trojmocné železo ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

Většina železa v organismu se vstřebává pomocí enterocytů v proximální části tenkého střeva. Pomocí transferrinu je železo transportováno membránou pomocí invaginace. Vytváří se vakuola, která splývá s lysozomy a dochází k uvolnění železa do cytoplazmy. V cytoplazmě se redukuje na dvojmocné železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a je začleněno do vznikajícího hemu (Knovich et al., 2009; Doubek, 2003). Každá molekula hemoglobinu je schopná přenést až čtyři molekuly kyslíku (Harvey, 2012).

Díky hemoglobinu jsou erythrocyty schopné přenést až 60krát více kyslíku, než kdyby byl kyslík pouze rozpuštěn v krvi (Reece, 2011). Hemoglobin se nepodílí pouze na transportu kyslíku, ale i na transportu oxidu uhličitého. Podle plynu, který je na hemoglobinu navázán se označuje jako oxyhemoglobin při přenosu  $\text{O}_2$  nebo karbaminohemoglobin při přenosu  $\text{CO}_2$ . Bylo zjištěno, že afinita hemoglobinu k  $\text{O}_2$  se snižuje v případě rostoucí koncentrace  $\text{H}^+$ ,  $\text{CO}_2$ , teploty a dále souvisí i s tělesnou hmotností zvířete (nižší tělesná hmotnost, nižší afinita  $\text{O}_2$ ) (Harvey, 2012). Podíl hemoglobinu z celkové hmotnosti erythrocytu je přibližně 34 % (Doubek, 2003).



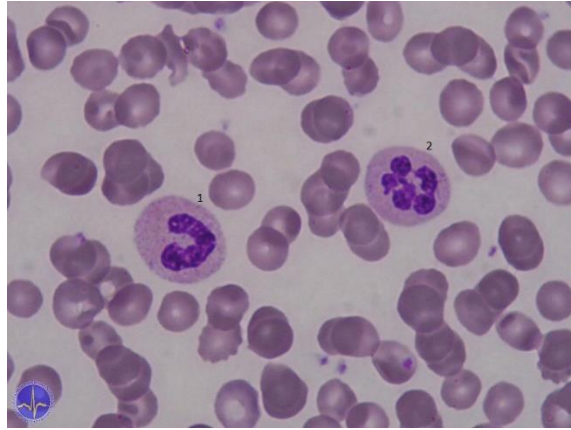
Obr. 1 – Erythrocyty psa <http://www.eclinpath.com>

### 3.1.1.2 Bílé krvinky

Bílé krvinky (leukocyty) jsou jaderné buňky, zabezpečující v organismu ochranou funkci proti bakteriálním, virovým, parazitárním infekcím a cizorodým bílkovinám. V krvi psů jsou zastoupeny v množství  $6,0 - 17,0 \cdot 10^9/l$  (Svoboda, 2008).

Dělí se granulocyty a agranulocyty (Reece, 2011). Granulocyty se vyvíjí z pluri/totipotentní kmenové buňky. Ta se poté vyvíjí a diferencuje do granulocytové, erytrocytové, monocytové a megakaryocytové řady. Výchozí buňkou pro granulocyty je myeloblast. Myeloblast se vyvíjí ve větší promyelocyt, ve kterém se intenzivně tvoří azurofilní granula a dochází k vývoji v myelocyt. V této fázi se tvoří specifické neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granula. Funkce granulocytů určuje místo jejich zániku, kterým je zejména slezina, játra, plíce a sliznice (respirační, gastrointestinální a další) (Doubek, 2003). Hlavním morfologickým znakem granulocytů je různě tvarované jádro a přítomnost granul nacházejících se v cytoplasmě. Podle afinity k barvivům můžeme granulocyty rozdělit na neutrofilní, bazofilní a eozinofilní granulocyty (Toman, 2009; Doubek, 2003).

Neutrofilní granulocyty mají okrouhlý tvar a velikost  $8 - 15 \mu m$ . Uplatňují se při nespecifické imunitě (Doubek, 2003). Jádro je u nevyzrálých neutrofilů nesegmentované a proto jsou tyto neutrofilny protáhlé a označují se jako tyčky (Obr. 2). Ve fázi promyelocytu se u neutrofilů vyvíjejí velká primární azurofilní granula, obsahující myeloperoxidázu, defenziny, což jsou látky narušující permeabilitu buněčných membrán a dále lysozym, proteázy a hydrolázy. V další fázi vývoje myelocytu a metamyelocytu se vyvíjejí sekundární specifická granula obsahující kolagenázu, lysozym a laktoferin, který zabraňuje pohlceným buňkám vázat železo, nezbytné pro jejich růst. Diferenciace končí po objevení terciálních granul, obsahujících gelatinázu a aktivátor plazminogenu (Toman, 2009). S postupným zráním se jádro dělí, získává laločnatý tvar. Tyto buňky se označují jako segmenty (Obr. 2) (Doubek, 2003). Neutrofilny mají velkou schopnost fagocytózy zejména bakterií, hub, mykoplazmat a komplexů vzniklých imunitní reakcí. V krvi přežívají několik hodin. Na základě signálů mohou z krve přestupovat do tkání, kde plní svou funkci (Doubek, 2003; Toman, 2009).



Obr. 2 - (1) Neutrofil s nesegmentovaným jádrem (tyčka), (2) neutrofil se segmentovaným jádrem (segment), <http://cuni.cz/>

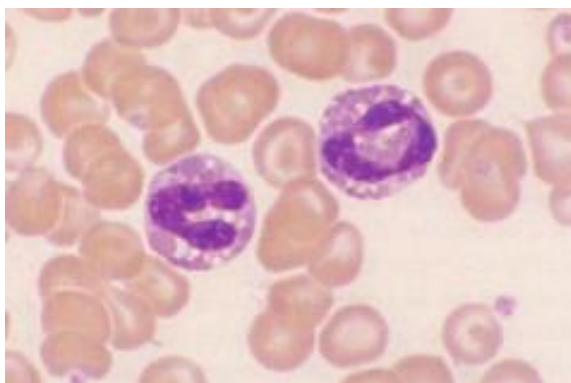
Bazofilní granulocyty (Obr. 3) mají většinou okrouhlý tvar a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 8 – 18  $\mu\text{m}$ . Uplatňují se při zánětu a přecitlivělosti organismu (Doubek, 2003). Jejich výskyt v periferní krvi psů je vzácností. Vyskytují se v rozmezí  $0,0 - 0,1 \cdot 10^9/l$  (Svoboda, 2008). Granula bazofilů obsahují histamin, bradykinin, serotonin a lysozomální enzymy a v organismu zahajují zánětlivou reakci. Na své membráně mají receptory pro IgE protilátky, které souvisí s alergickými reakcemi. Pokud dojde ke kontaktu protilátky na buněčné membráně s antigenem, dochází k prasknutí bazofilu a uvolnění obsahu jeho granul, což vede k alergické reakci. Počet bazofilů v krvi je však velmi malý (Toman, 2009; Reece, 2011). Bazofilní granulocyty přežívají v krvi maximálně týden (Doubek, 2003).



Obr. 3 - Bazofilní granulocyt psa <http://www.eclinpath.com>

Eozinofilní granulocyty (Obr. 4) jsou okrouhlé, ale mohou mít i jiný tvar. Účastní se zánětlivých reakcí. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 10 – 16  $\mu\text{m}$  (Doubek, 2003). U zdravého psa je v krvi nacházíme pouze v malých počtech v rozmezí  $0,0 - 0,6 \cdot 10^9/l$  (Svoboda, 2008). V krvi jsou přítomny po dobu 6 – 12 hodin, ve tkáních jsou schopny vydržet 4 – 10 dní (Toman, 2009).

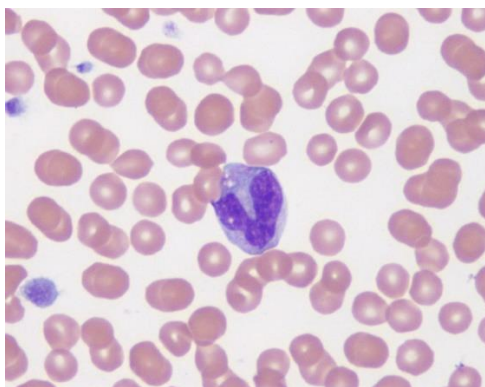
Cytoplazma obsahuje granula, která jsou po obarvení jasně červená či oranžovočervená (Reece, 2011). Jsou schopna odrážet světlo, proto se jeví jako by svítla (Doubek, 2003). Granula eozinofilů obsahují enzymy (histaminázu, myeloperoxidázu, histamin, plazminogen), lipidy a další láky (Doubek, 2003; Reece, 2011). Tyto enzymy tlumí a ukončují zánětlivé reakce způsobené alergickou reakcí. Počty eozinofilů se zvyšují při napadení organismu endoparazity, při chronických zánětech a alergických reakcích. Aktivované eozinofily uvolňují leukotrieny a faktor aktivující destičky, který vyvolává kontrakce hladké svaloviny a zvýšení produkce hlemu (Toman, 2009). Při kontaktu s parazitem se povrch parazita obalí protilátkami a dochází k uvolnění obsahu granul, které způsobí rozpad buněk a následně smrt parazita (Reece, 2011). Délka života eozinofilních granulocytů v krvi je maximálně týden (Doubek, 2003).



Obr. 4 - Eozinofilní granulocyt psa <http://www.eclinpath.com>

Agranulocyty můžeme rozdělit na monocyty a lymfocyty. Monocyty (Obr. 5) patří mezi největší leukocyty a patří mezi buňky mononukleárního fagocytárního systému (MPS). Často mají nepravidelný tvar a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 15 – 22  $\mu\text{m}$  (Doubek, 2003). V krvi psů jsou zastoupeny v rozmezí 0,0 – 0,5.10<sup>9</sup>/l (Svoboda, 2008). Mají schopnost fagocytózy, při které pohlcují bakterie, viry a komplexy antigen-protilátka (Reece, 2011). Monocyty v krvi jsou nevyzrálé buňky, které se po vstupu do tkání transformují ve tkáňové makrofágy a pohlcují bakteriální buňky (Doubek, 2003; Reece, 2011). Pohlcené buňky poté zabíjejí pomocí nízkého pH, bakteriostatických bílkovin a degenerativních enzymů.

Jejich počty rostou při chronických infekcích a v místech zánětů převažují nad neutrofilů díky delší životnosti. Jejich význam roste také při obraně organismu proti dlouhotrvajícím zánětům (Reece, 2011). V krvi se vyskytují pouze několik dnů, poté vstupují do tkání (Doubek, 2003).



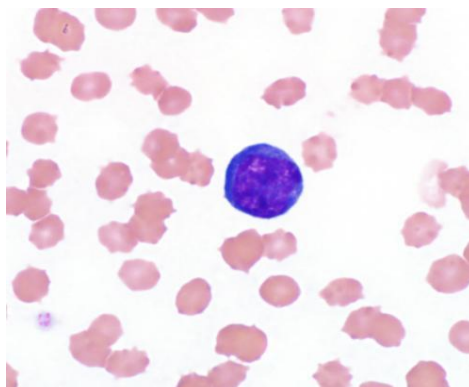
Obr. 5 - Monocyt psa <http://www.eclinpath.com>

Lymfocyty (Obr. 6) vznikají jako všechny krevní buňky z pluri/totipotentní kmenové buňky. Jsou druhými nejpočetnějšími buňkami v periferní krvi (Reagan et al., 2008). Jejich počty se pohybují v rozmezí  $1,0 - 3,6 \cdot 10^9/l$  (Svoboda, 2008). Účastní se specifické i nespecifické imunity. Zralý lymfocyt je okrouhlý a jeho velikost se pohybuje u malého lymfocytu kolem  $10 \mu m$  a u velkého lymfocytu v rozmezí  $14 - 20 \mu m$  (Doubek, 2003).

V imunitním systému jsou lymfocyty převládajícími buňkami, které se účastní mnoha imunitních reakcí a lze je rozdělit na T-lymfocyty a B-lymfocyty (König et al., 2007). Místem vývoje T-lymfocytů je brzlík, zatímco B-lymfocyty se vyvíjejí v játrech, slezině a kostní dřeni, kde se buňky formují před nebo po narození (Toman, 2009). T-lymfocyty se dělí na cytotoxické T buňky, které mají antineoplastické a antivirové vlastnosti. Vážou se na antigeny, uvolňují cytotoxiny a další sekrety jako například cytokiny. Tyto látky pronikají do bakterií či virů, tkáňových buněk nebo do buněk transplantovaných orgánů a vyvolávají buněčnou smrt. T-lymfocyty dělíme na pomocné T-lymfocyty (Th), které jsou nejpočetnější a jejich přítomnost napomáhá aktivovat cytotoxické T buňky (Tc), supresorové T-lymfocyty a B-lymfocyty. Th-lymfocyty se diferencují do dvou podtříd Th1 a Th2. Th1 jsou součástí buněčně zprostředkované imunity a Th2 podporují humorální imunitu (Slauson et Cooper., 2002). Poslední součástí T-lymfocytárních buněk jsou supresorové (tlumivé) T buňky, které snižují aktivitu Tc-lymfocytů a Th-lymfocytů, čímž chrání organismus před neúměrnou imunitní reakcí a zároveň před napadením vlastních tkání imunitním systémem (Reece, 2011; Doubek, 2003).

Aktivované B buňky se při působení antigenu namnoží a dojde k přeměně na plazmatické a supresorové buňky (Slauson et Cooper., 2002). B-lymfocyty nenapadají cizorodé buňky přímo, ale pomocí plazmatických buněk produkujících gamaglobuliny (Reece, 2011). Pro B-lymfocyty je typická přítomnost imunoglobulinu na povrchu buňky (Doubek, 2011). Gamaglobuliny způsobují inaktivaci antigenů nebo rozpad buňky (Reece, 2011).





Obr. 6 - Lymfocyt psa, <http://www.merckvetmanual.com>

### 3.1.1.3 Krevní destičky

Krevní destičky (trombocyty) se vyvíjejí z monopotentní progenitorové buňky. Tato buňka se dále diferencuje na megakaryoblast, ze kterého se endomitózou vyvíjí megakaryocyt. Megakaryocyt obsahuje velké polyploidní jádro, velké množství neaktivních jadérek a cytoplazmu, ve které se nachází azurofilní granula. Cytoplazmatická granula se shlukují a invaginací buněčné membrány se tvoří síť tubulů. Poté vznikají štěrbiný a dochází k vytvoření destiček, které jsou strhávány do krve.

Hlavní úlohou trombocytů je zástava krvácení. V místě poranění dochází k adhezi (přilnutí destiček k povrchu), agregaci (shlukování destiček a vytvoření zátky) (Doubek, 2003) a aktivaci, kdy dojde ke smrštění vnitřního svazku mikrotubulů, ke změně tvaru a vypuzení obsahu granul do kanálků ústících na povrch trombocytu (Reece, 2011). Aktivované destičky mají také četná cytoplazmatická pseudopodia (Doubek, 2003). V granulech je obsažena řada srážecích faktorů, bílkovin, vápníku, serotoninu, ATP a ADP. Všechny tyto látky napomáhají při procesu srážení krve a vytváří povrch pro tvorbu trombinu a fibrinu. Trombin je důležitý pro vytvoření nerozpustného fibrinu, který stabilizuje zátku z trombocytů. Po vytvoření zátky dochází k zástavě krvácení z vlásečnice nebo žíly. Při krvácení z tepny k zástavě krvácení nedojde, jelikož je krev pod větším tlakem. Proto záleží na místě a rozsahu poranění (Reece, 2011). Množství trombocytů se u psů pohybuje v rozmezí  $200 - 500 \cdot 10^9/l$  (Svoboda, 2008).

## 3.1.2 Krvetvorné orgány

### 3.1.2.1 Brzlík

Brzlík psa je laločnatý orgán uložený podél průdušnice (Červený, 2011). Plně vyvinutý je v prenatální fázi vývoje. Poté od 4 – 6 měsíce věku postupně zaniká a jeho parenchym je nahrazován tukovou tkání. Nedojde však k úplnému zániku, zůstávají zde malé ostrůvky, které

jsou aktivní i ve stáří zvířete (Budras et al., 2007). Řadí se mezi mízní orgány a je tvořen kůrou a dřevím. Neúčastní se přímo imunitních reakcí, ale slouží jako místo zrání T-lymfocytů (Budras et al., 2007; Toman, 2009), které v průběhu vývoje pronikají mezi epitelové buňky. Epitelové buňky tvoří hormony tymozin a tymopoetin, které zajišťují proliferaci, diferenciaci a zrání T-lymfocytů (Červený, 2011).

### 3.1.2.2 Slezina

Slezina je největším sekundárním lymfatickým orgánem v těle a zároveň jediným orgánem specializovaným na filtraci krve (König et al., 2007). Dochází zde k tvorbě krve před narozením do doby, než se vytvoří funkční kostní dřev, poté tato funkce zaniká (Reece, 2011). Slezinu obklopuje vazivové pouzdro, které obsahuje velké množství buněk hladké svaloviny (König et Liebich, 2002). Množství hladké svaloviny je pozorováno hlavně u masožravců. Z vazivového pouzdra pronikají do sleziny vazivové trávce, ve kterých jsou obsaženy tepny, žíly, mízní cévy a nervy.

Slezina je složená z červené dřevě, která zadržuje krev pomocí retikulárních vláken a z bílé dřevě, která je ve slezině rozmístěná ve formě lymfatických uzlíků kolem tepen. Bílá a červená dřev jsou od sebe odděleny hraniční oblastí, nazývanou marginální zóna. Červená dřev slouží k filtraci krve a obsahuje i řadu makrofágů. Dochází zde i k lymfopoéze, nově vytvořené lymfocyty poté migrují do lymfatických orgánů. Bílá dřev je místem průběhu specifické imunitní reakce. Po stimulaci antigeny zde vznikají germinální centra, což jsou místa, ve kterých se tvoří paměťové B – lymfocyty a plazmatické buňky (Toman, 2009).

Z krve vstupující do sleziny jsou odfiltrovány staré a porušené erytrocyty za pomoci buněk MPS. Slezina dále slouží jako místo pro skladování železa z rozpadlých erytrocytů a je významnou zásobárnou krve, zejména červených krvinek. V případě potřeby červených krvinek dochází ke stahům sleziny díky hladké svalovině, zejména při zvýšené aktivitě psa (Reece, 2011). Ve slezině je uložena přibližně jedna třetina krevních destiček, které jsou při krvácení uvolněny do krve (Doubek, 2003).

### 3.1.2.3 Kostní dřev

Kostní dřev patří k významným orgánům v těle. Je nezbytná při procesu krvetvorby (erytropoézy) a neustálého doplňování buněk nezbytných pro transport kyslíku, živin, odpadních látek, dále pro udržování obranných mechanismů a rovnováhy mezi krvácením a srážením krve (Sapo et al., 2016). Před narozením dochází k erytropoéze především v játrech a slezině, posléze se tvorba soustřeďuje do kostní dřev trupu a končetin (Reece, 2003).

Červená (aktivní) kostní dřeň je složena z retikulárního vaziva s krvetvornými ostrůvky a sinusoidních kapilár. Postupně je nahrazována tukem a vzniká takzvaná tuková (neaktivní) kostní dřeň. Během prvního týdnu života je až polovina ze všech buněk v kostní dřeni tvořena lymfocyty (Doubek, 2003).

#### Krvetvorba (erytropoéza)

K tvorbě erytrocytů dochází z nediferencované pluri/totipotentní kmenové buňky. Po porodu jsou první buňky označovány jako proerytoblasty, ty se dále dělí a vznikají další vývojová stádia označována jako erytoblasty. Erytoblasty vznikají v ostrůvcích červené kostní dřene. Tyto ostrůvky tvoří makrofág s prstencem erytoblastů (Doubek, 2003). Před tím, než erytrocyty vstoupí do krevního oběhu, dochází k vypuzení jejich jádra. Za vypuzení jádra je zodpovědná změna metabolismu. Vypuzené jádro poté fagocytují ostrůvkové makrofágy (Doubek, 2003). Polyribozomy a ribozomy v krevní buňce zůstávají a díky jejich síťovanému vzhledu je označujeme jako retikulocyty (Reece, 2011). Ty zůstávají v kostní dřeni a dozrávají za 2 – 3 dny v erytrocyty (Doubek, 2003).

Intenzita erytropoézy závisí na množství kyslíku potřebného pro tkáň. Při potřebě většího množství kyslíku ve tkáních dochází k sekreci hormonu erythropoetinu v ledvinách a játrech. Erythropoetin stimuluje činnost kostní dřene k tvorbě nových erytrocytů. Erythropoetin z krve mizí přibližně po 1 dnu, zatímco nově vzniklé erytrocyty se v krvi neobjeví dříve než za 4 – 5 dnů od jejich vytvoření. Po vytvoření a následném vypuzení nových erytrocytů do krve a nasycení tkání kyslíkem se další erythropoetin již netvoří (Reece, 2011).

## 3.2 Genetické (dědičné) poruchy krvetvorby u psa

### 3.2.1 Cyklická neutropenie šedých kolíí (GCS)

Toto onemocnění je autozomálně recesivní porucha (Weiden et al., 1974). Patří mezi vzácné chronické hematologické onemocnění (Lund et al., 1967), u kterého dochází ke dramatickému snížení počtu neutrofilů a poté opětovnému navrácení na normální hladinu (Pacheco et al., 2008). K opakování neutropenií dochází nejčastěji každých 21 dnů a trvají 3 až 10 dní (Lund et al., 1967).

#### 3.2.1.1 Etiologie

Jeden z možných vysvětlujících mechanismů vzniku neutropenie nabízí již výše zmíněné kolísání počtu neutrofilů v krvi. Počty cirkulujících neutrofilů jsou stabilizovány dvěma zpětnými regulačními smyčkami, kdy jedna reguluje produkci neutrofilů a druhá uvolňování zralých neutrofilů ze zásob kostní dřeně. Zpětná vazba regulující produkci má dobu odezvy 7-12 dní, proto pokud by byla produkce neutrofilů regulována pouze touto smyčkou, docházelo by k velkým výkyvům jejich počtu v krvi. Cyklická neutropenie (CN) vzniká v případě, že dojde k selhání tlumícího mechanismu nebo v případě, kdy se sníží zásoba neutrofilů v kostní dřeni selháním jejich produkce (Dale et al., 1972; Weiden et al., 1974). Bylo zjištěno, že nedochází pouze ke kolísání počtů neutrofilů v krvi, ale kolísají i počty monocytů, lymfocytů, eozinofilů, retikulocytů a krevních destiček (Dale et al., 1972).

U mnoha zvířat s neutropenií se vyskytuje mutace v genu neutrofilů označovaném ELA2. U psů byla jako příčina GCS vyloučena. Mutace ELA2 může být příčinou snížené citlivosti na faktor stimulující granulocytární kolonie (G – CSF) a dále může způsobovat rozkladné reakce proteinu vedoucí k předčasné smrti buněk (Pacheco et al., 2008). GCS u psů způsobuje mutace genu AP3B1, který kóduje  $\beta$  podjednotku proteinového komplexu 3, odpovědnou za transport proteinů z Golgiho aparátu. (Horwitz et al., 2004).

#### 3.2.1.2 Dědičnost

GCS patří mezi autozomálně recesivní onemocnění. Může postihnout všechna plemena kolíí, u kterých se vyskytuje šedé zbarvení srsti s výjimkou blue-merle. Aby vznikl nemocný potomek (recesivní homozygot), musí být oba rodiče přenašeči (musí mít jednu mutovanou alelu). Genotypově rozlišujeme tři možnosti. Zdravé jedince s genotypem N/N. Nemají mutovanou alelu a onemocnění se u nich nerozvine. Dále zdravé přenašeče s genotypem N/GCS, kteří mají jednu alelu normální a jednu mutovanou. Přenašeče můžeme odlišit od

zdravého jedince pomocí testu DNA a měli by se připouštět pouze se zdravými jedinci. Třetí možností jsou jedinci nemocní s genotypem GCS/GCS. U těchto zvířat dochází k projevu neutropenie a v případě připouštění budou vždy přenášet mutovanou alelu na své potomky (Laboklin, 2004).

K mutaci dochází v exonu 20 vložení adeninového zbytku do řady 9 adeninů. To má za následek posunutí čtecího rámce, předčasný vznik terminačního kodonu a tvorbu zkráceného nefunkčního proteinu. Stejná mutace je u lidí odpovědná za vzácné onemocnění označované jako Heřmanského – Pudlakův syndrom (HPS) (Horwitz et al., 2004).

### 3.2.1.3 Klinická diagnostika

Kolie s šedou barvou srsti se dožívají 1 až 3 let. Štěňata jsou po narození slabá a nejčastěji hynou do 1 týdne. U těchto psů byly pozorovány časté horečky a kožní infekce (Lund et al., 1967; Laboklin, 2004). U mladších psů byly prokázány akutní infekce zejména v plicích, trávicím traktu a ledvinách, zatímco u dospělých psů se objevovaly chronické záněty těchto orgánů (Hammond et al., 1983). Klinické projevy jsou pozorovány v průběhu neutropenické fáze cyklu, která trvá 3 – 4 dny a opakuje se jednou za 2 týdny (Horwitz et al., 2004).

První příznaky můžeme pozorovat už u narozených štěňat, která jsou v porovnání se svými sourozenci daleko menší, s výrazně světlou barvou srsti a nosní houby viz Obr. 7 (Bielikova, 2016). Mezi další klinické projevy můžeme zařadit horečku, malátnost, ústní vředy, furunkulózu (vředovitost), lymfadenitidu (zánět mízních uzlin) a vážné často smrtelné infekce, které vyžadují léčbu antibiotiky (Lund et al. 1967; Dale et al., 1972). Pokud není infekce vyléčena před neutropenickou fází, hrozí velké riziko úmrtí (Gershwin et Merchant, 2013).

### 3.2.1.4 Laboratorní a molekulární diagnostika

Kolie postižené CN vykazují snížené počty T a B – lymfocytů ve srovnání se zdravými jedinci (Wayand et Yang, 1981). K vyšetření se používá přímé sekvencování DNA, sloužící pro potvrzení nebo vyvrácení přítomnosti mutace v genu AP3B1. Vzorky krve od postižených psů jsou odebrány na FTA karty (filtrační papír sloužící k odběru a uchování vzorku krve), které jsou poté použity jako templát pro PCR. Pomocí přímého sekvencování DNA je u psů trpících GCS odhalena mutace v genu AP3B1 (Mizukami et al., 2012).

### 3.2.1.5 Léčba

CN se léčí pomocí opakovaného injekčního podávání rekombinantního granulocytárního faktoru stimulujícího kolonie (RG-CSF), který je základem pro granulopoezu.

U šedých kolií bylo pozorováno trvalé zvýšení počtu neutrofilů po dobu delší než 5 měsíců. V průběhu tří let od zahájení léčby pomocí RG-CSF došlo u těchto psů ke zvýšení hmotnosti, lepší imunitě a ke zvýšení počtu neutrofilů v krvi, ve srovnání se stavem před léčbou (Yanay et al., 2012).

Další možností léčby je podávání tablet uhličitanu lithného. Mechanismus účinku lithia na podporu produkce neutrofilů není znám, avšak po jeho podání došlo u kolií ke zvýšení počtu leukocytů, neutrofilů, a také byl pozorován stimulační účinek G-SCF. Po dobu podávání uhličitanu lithného došlo k eliminaci neutropenických cyklů a normalizaci počtu krevních buněk (Hammon et Dale, 1980).



Obr. 7 - Vlevo štěně postižené syndromem šedých kolií, vpravo srovnání se sourozenci

### 3.2.2 Deficience pyruvát kinázy

#### 3.2.2.1 Etiologie

Deficience pyruvát kinázy je autozomálně recesivně dědičné onemocnění. U psů do 4 měsíců věku je onemocnění obtížně diagnostikovatelné. Poprvé může být zjištěno zcela náhodně při preventivním vyšetření, u kterého jsou zjištěny velmi bledé sliznice (Hlavac et al., 2012).

Pyruvát kináza (PK) je jedním ze dvou regulačních enzymů anaerobní glykolýzy, která katalyzuje přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát, což je poslední krok zajišťující energii (Kohn et Fumi, 2008). Nedostatek PK způsobuje předčasnou destrukci erytrocytů, ochuzených o ATP. U psů způsobuje těžkou, chronickou a vysoce regenerační hemolytickou anémii s progresivní osteosklerózou (Hlavac et al., 2012). PK má čtyři izoenzymy, které jsou kódovány dvěma různými geny (PKLR a PKM). Isoenzymy PK jsou přítomny v játrech (L), svalcích a mozku ( $M_1$ ), slezině, leukocytech a trofocytech ( $M_2$ ), nebo erytrocytech (R). Nedostatek

izoenzymu v erytrocytech má za následek energetickou deprivaci červených krvinek, což zkracuje dobu jejich přežívání (Kohn et Fumi, 2008). L a R izoenzymy jsou kódovány stejným genem (Gultekin et al., 2012).

#### 3.2.2.2 Dědičnost

Deficit pyruvát kinázi může postihnout plemena basenji, bígl, cairn teriér, labrador, mops a west highland white teriér. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění proto, aby vznikl nemocný potomek (recesivní homozygot) musí být oba rodiče přenašeči (heterozygoti) s jednou mutovanou alelou (Genomia, 2016). Za onemocnění je zodpovědná mutace genu PK-LR nacházející se na chromozomu 7.

Sekvencování DNA labradorského retrívra odhalilo substituci báze exonu 7 (c.799C>T) v PK-LR genu, což vede ke vzniku terminačního kodonu. Výsledkem je závažné zkrácení R-PK proteinu (267 aminokyselin) ve srovnání s normální délkou R-PK proteinu (574 aminokyselin).

Sekvencování DNA mopse odhalilo substituci báze exonu 7 (c.848T>C) v PK-LR genu. Dochází k záměně valinu za alanin. Valin není v této poloze tolerován což může být důvodem nefunkčního R-PK proteinu.

U bíglů byla odhalena mutace v exonu 8 (994G>A) v PK-LR genu, vedoucí k záměně glycinu za serin. Jelikož je v této poloze tolerován pouze glycin, může mít tato mutace za následek nefunkční R-PK protein.

U Cairn teriéra byla odhalena stejná mutace jako u WHWT. Vložení 6 párů bází v exonu 10. Dojde k prodloužení R-PK proteinu na 123 aminokyselin oproti 117 aminokyselinám u zdravých psů (Gultekin et al. 2012).

#### 3.2.2.3 Klinická diagnostika

Mezi klinické příznaky patří snížená tolerance zátěže, poruchy růstu, bledé sliznice, tachykardie, zvětšení sleziny a selhání jater, což je nejčastější příčina úhynu takto nemocných psů (Laboklin, 2004). Deficit PK byl diagnostikován u mnoha plemen psů. Pro baseji, bígla, labradorského retrívra, mopse a west highland white teriéra je k dispozici genetický test, umožňující identifikaci homozygotů a heterozygotů. Pro další plemena jako je malý pudl, čivava, labradorský retrívr, německý ovčák a jezevčík se provádí vyšetření pomocí enzymatické aktivity v erytrocytech (Hlavac et al., 2012; Gultekin et al., 2012).

#### 3.2.2.4 Laboratorní a molekulární diagnostika

Pro plemena basenji a west highland white teriéra (WHWT) je k dispozici PCR test genu pro PK, který je schopen odhalit i přenašeče. Test je založen na specifické mutaci, proto ho nelze použít u ostatních plemen trpících tímto onemocněním. Přesto, že měření aktivity enzymu v erythrocytech není vhodné, používá se u plemen psů, u kterých není známá mutace způsobující deficit pyruvát kinázy (Schaer, 2010; Kohn et Fumi, 2008).

K vyšetření se používá krev odebraná do zkumavky s EDTA (zabraňuje srážení krve). Z krve se extrahují bílé krvinky. Pomocí PCR a specifických primerů se provede amplifikace oblasti, která obklopuje známou mutaci (Hlavac et al., 2012). Amplifikované oblasti jsou poté analyzovány pomocí 6% polyakrylamidového gelu a elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu (Gultekin et al., 2012).

#### 3.2.2.5 Léčba

Léčba deficitu pyruvát kinázy zatím není dostupná. Uplatňuje se pouze podpůrná léčba zahrnující transfuzi krve, která je vyžadována ve zvláště závažných případech (Zanella et al., 2007). Jelikož je slezina místem destrukce erytrocytů, může jejím odstraněním (splenektomie) zpomalit předčasný zánik PK – deficitních erytrocytů. Používá se v krajním případě u psů, kteří trpí těžkými anemiemi a jsou závislí na transfuzích (Hlavac et al., 2012).

### 3.2.3 Hemofilie A, B

#### 3.2.3.1 Etiologie

Hemofilie patří k nejčastější krvácivé poruše u psů a byla popsána u mnoha plemen. Jedná se o dědičně přenosné onemocnění recesivně vázané na pohlavní chromozom X (Aroch et al., 2015). Proto se projevuje zejména u psů, feny bývají přenašečkami (Doubek, 2003).

Hemofilie A je způsobena vrozeným deficitem faktoru VIII, označovaného také jako antihemofilický faktor A (Nichols et al., 2010). Faktor VIII napomáhá aktivaci faktoru X faktorem XIa (Hultin et Nemerason, 1978). Hemofilie B je dědičně přirozeně se vyskytující onemocnění u mnoha plemen psů (Mischke et al., 2011). Psi s hemofilií B trpí poruchou srážení krve kvůli nedostatečné aktivitě srážecího faktoru IX (Nichols et al., 2010), důležitého pro aktivaci faktoru X. U rhodeských ridgebacků s těžkou hemofilií B se onemocnění projevuje vážnějšími příznaky než u ostatních plemen (Mischke et al., 2011).



### 3.2.3.2 Dědičnost

Hemofilie je autozomálně recesivní onemocnění. Vzhledem ke způsobu dědičnosti můžeme říci, že při křížení nemocného psa ( $X^hY$ ) se zdravou fenou ( $XX$ ) budou všichni psi zdraví a všechny feny přenašečky. Pokud budeme křížit fenu přenašečku ( $X^HX^h$ ) a zdravého psa ( $XY$ ), budou psi z tohoto spojení z 50 % zdraví a z 50 % nemocní a narozené feny z 50 % zdravé a z 50 % přenašečky (Smejkal et al., 2013; Laboklin, 2004).

Pomocí PCR bylo zjištěno, že těžkou hemofilií B u rhodéského ridgebacka způsobuje mutace genu CFIX. V nukleotidu 752 v exonu 7 je výsledkem této mutace záměna glycinu (GGA) za kyselinu glutamovou (GAA), způsobená substitucí guaninu adeninem. Pomocí TaqMan testu lze rozlišit přenašeče onemocnění a omezit tak jejich použití v chovu. U labradorského retrievera postiženého hemofilií B je příčinou zcela chybějící gen CFIX (Mischke et al., 2011).

U plemene Lhaso Apso byla již dříve zjištěna delece 5 bází v nukleotidech 772 – 776 a dále záměna cytosinu za thymin v nukleotidu 777. Tato změna vede k posunutí čtecího rámce a vzniku terminačního kodonu v poloze 146. aminokyseliny. Výsledný protein je poté výrazně kratší ve srovnání s řetězcem 414 aminokyselin divokého typu. Důsledkem mutace je úplná absence funkčního faktoru IX (Mischke et al., 2011).

### 3.2.3.3 Klinická diagnostika

Hemofilie A i B byla diagnostikována napříč všemi plemeny psů. Jako příklad můžeme uvést nejběžnější plemena – labradorského retrievera, zlatého retrievera, německého ovčáka, rhodéského ridgebacka, west highland white teriéra či parson russell teriéra (Aroch et al., 2015).

Mezi klinické příznaky řadíme spontánní krvácení, ke kterému dochází v kloubech nebo v měkkých tkáních (Nichols et al., 2010), rozsáhlé hematomy, krvácení z nosu a kůže (Laboklin, 2004). Opakované krvácení do kloubů u těžké hemofilie vedou k destrukci kloubní chrupavky a kulhání (Smejkal et al., 2013). U psů s hemofilií B se vyskytuje spontánní krvácení 4 – 6krát ročně (Nichols et al., 2010).

První příznaky hemofilie můžeme pozorovat už u novorozených štěňat, u kterých dochází k nadměrnému krvácení z pupečního pahýlu a v pozdějším věku při přezubování dochází k velkým ztrátám krve (Píšlová, 2009).

### 3.2.3.4 Laboratorní a molekulární diagnostika

K nejdůležitějším testům patří aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTČ), který je používán jako vstupní vyšetření pro zhodnocení hemostázy. Pomocí tohoto testu můžeme zhodnotit funkci srážecích faktorů XII, XI, IX VIII, X, V, II (Lab Test, 2009). U psů

postižených hemofilii dochází k prodloužení v případě, že hladiny faktoru VIII a IX klesnou pod 25 %. Pro hemofilii je typické prodloužení APTČ na 50 – 80 sekund (Doubek, 2003). U zdravých psů je APTČ v rozmezí 12 – 15 sekund (Svoboda, 2008). Parciální tromboplastinový čas slouží k vyšetření vrozených a získaných defektů faktorů XII, XI, IX, VIII (Malý et al., 2007). Hemofilii A a B můžeme dále diagnostikovat pomocí vyšetření jednotlivých srážecích faktorů. Hemofilii A i B lze detekovat DNA testem, schopným rozeznat zdravé, nemocné i zdravé přenašeče (Laboklin, 2004).

#### 3.2.3.5 Léčba

Hemofilii A lze léčit pomocí kryoprecipitátu, který obsahuje faktor VIII, fibrinogen a Willebrandův faktor, dále pomocí antifibrinolytik a případně podáním desmopresinu. Hemofilie B se léčí pomocí transfuzí krve nebo plazmy od zdravých jedinců (Doubek, 2003). Nadějí pro léčbu hemofilie A i B je genová terapie. Jejím principem je vnesení funkčního genu, který zajistí tvorbu koagulačního faktoru FVIII resp. FIX, na místo genu poškozeného. Genová terapie byla použita u novorozených štěňat, jejichž imunitní systém není tak aktivní jako u dospělých zvířat, u kterých docházelo k tvorbě protilátek proti vytvořenému koagulačnímu faktoru. Po roce od léčby byly provedeny testy, které prokázaly normální hladinu koagulačního faktoru. U takto léčených zvířat došlo k vymizení krvácivých stavů (Xu et al., 2005).

### 3.2.4 von Willebrandova choroba

#### 3.2.4.1 Etiologie

Von Willebrandova choroba je autozomálně recesivní onemocnění, postihující jedince nezávisle na pohlaví, způsobená kvalitativní nebo kvantitativní porucou von Willebrandova faktoru (vWF) (Venta et al., 2000). U psů se projevuje prodlouženou dobou krvácení, nízkou hladinou faktoru VIII, sníženou přilnavostí krevních destiček a nadměrnou spotřebou protrombinu (Dodds, 1970).

VWF je vysokomolekulární glykoprotein, syntetizovaný endotelovými buňkami výstelky cévních stěn, megakaryocyty kostí dřeně a prekurzorovými buňkami cirkulujících trombocytů. Podporuje adhezi a agregaci destiček v místě poranění. VWF zprostředkovává vazbu mezi kolagenem a destičkovým glykoproteinem Ib (GB Ib) a dále slouží i jako nosný protein pro faktor VIII, který chrání před rychlou proteolytickou degradací a clearenc (ostranění z krevního řečiště) (Lawrie et al., 2013; Oost et al., 2004).

Jsou známy tři typy von Willebrandovy choroby.

Typ I se vyznačuje krvácením způsobeným sníženou koncentrací vWF, krvácení je méně vážné než u zbylých dvou typů (Venta et al., 2000). Tento typ se vyskytuje u plemen bernský salašnický pes, dobrman, kerry blue teriér, welsh corgi pembroke, zlatý retrívr, německý ovčák, malý knírač, coton de tular, jezevčík a další (Genomia, 2016).

Typ II je u psů děděn recesivně (Venta et al., 2000) a je způsoben kvalitativní poruchou vazebného místa vWF (neschopnost vázat GB Ib a faktor VIII) a psi trpí těžkým krvácením (Venta et al., 2000). V krvi chybí vysokomolekulární multimery vWF. Von Willebrandova choroba typu II byla popsána u německého krátkosrstého ohaře a německého drsnosrstého ohaře, u kterých je větší riziko poranění divokým zvířetem při lovecké práci a následné ošetření komplikuje těžké krvácení (Gavazza et al., 2012). Tento typ byl dále popsán u německého ovčáka, šeltie, welsh corgiho pembrok, trpasličího pinče a rotvajlera (Lawrie et al., 2013).

U plemen skotský teriér a kookirhondaje byl popsán typ III, který je způsoben nepřítomností vWF v krevní plazmě a trombocytech. Jedinci trpí vážným krvácením, které vyžaduje transfuze krve nebo kryoprecipitátu pro dodání chybějícího vWF do krve (Venta et al., 2000; Oost et al., 2004).

#### 3.2.4.2 Dědičnost

U recesivních homozygotů s typem II se v krvi nachází vWF neschopný vázat GB Ib a faktor VIII a tito jedinci trpí krvácivostí, zatímco recesivní homozygoti s typem III nemají v krvi přítomný žádný vWF. Heterozygoti mají pouze snížené množství vWF a onemocnění u nich nevyvolává žádné příznaky (Oost et al., 2004; Venta et al., 2000).

##### von Willebrandova choroba typu I

K mutaci dochází záměnou guaninu za adenin (G/A) v exonu 43 von Willebrandova genu. Mutace je přítomná v sestřihovém místě, ve kterém normálně dochází k sestřihu genu v 90 % transkriptů, což vede k tvorbě funkčního vWF faktoru. Pokud se však v tomto místě mutace objeví tvoří se nefunkční vWF. Existuje i alternativní místo sestřihu, které je využíváno z 10 %, což je patně důvod menší závažnosti příznaků. V tomto místě nedochází k mutaci a funkce vWF není omezena (Genomia, 2016).

##### Von Willwbrandova choroba typu II

Von Willebrandova choroba typu II je způsobena mutací v exonu 28 von Willebrandova genu, ve kterém dochází k záměně adeninu za guanin (A/G) (Kramer et al., 2004).

##### von Willebrandova choroba typu III

U skotského teriéra byla zjištěna delece cytosinu v exonu 4, která vede k posunutí čtecího rámce v kodonu 88 k novému terminačnímu kodonu o 103 bází dále. Výsledkem

mutace je silně zkrácený protein složený ze 119 aminokyselin, který neobsahuje žádné oblasti von Willebrandova faktoru (Venta et al., 2000).

U kookirhondaje byla pomocí PCR odhalena mutace exonu 16, při které dochází k záměně guaninu (TGG) za adenin (TGA). Tato mutace vede ke změně kodonu na stop kodon a translace je poté ukončena v pozici aminokyseliny 729. Stejně jako u skotského teriéra dochází k úplné absenci von Willebrandova faktoru (Oost et al., 2004).

#### 3.2.4.3 Klinická diagnostika

Toto onemocnění se nejčastěji projeví při prořezávání zubů, ale také může zůstat skryté po několik let. Mezi klinické příznaky patří krvácení po úrazech, krvácení z nosu, gastrointestinální krvácení, které může být doprovázeno průjmem. Dále dochází ke krvácení dásní, prodloužení doby krvácení u hárajících fen, kulhání v důsledku krvácení do kloubů nebo krvácení po zastřížení drápů (Oost et al., 2004; Laboklin, 2004). Klinická i laboratorní diagnostika může být ovlivněna fyzikálním nebo emočním stresem zvířat či hormonální nerovnováhou, nejčastěji hypertyreózou. Pro vyšetření jsou nezbytné speciální testy pro vWF (Szponder, 1999).

#### 3.2.4.4 Laboratorní a molekulární diagnostika

Diagnostika zahrnuje měření koagulační aktivity faktoru VIII v plazmě, vWF antigenu a vazebnou aktivitu mezi kolagenem a destičkovým glykoproteinem (GB Ib), závislost adheze a agregace trombocytů na vWF, koncentraci vWF, distribuci a velikost multimerů vWF (Ettinger et Feldman, 2009).

#### 3.2.4.5 Léčba

Léčba zahrnuje intravenózní podání čerstvé plné krve, krevní plazmy nebo kryoprecipitátu pro doplnění chybějícího von Willebrandova faktoru. Dále je doporučeno vyhýbat se léčivům s vlivem na homeostázu (Dodds, 1984). Jedinou prevencí tohoto onemocnění je selekce postižených zvířat s využitím genetických testů, které jsou schopny odhalit i přenašeče.

### 3.3 Negenetické poruchy krvetvorby u psa

#### 3.3.1 Akutní myeloidní leukémie

##### 3.3.1.1 Etiologie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je vzácné onemocnění krvetvorných buněk vyskytující se častěji než akutní lymfatická leukémie (ALL). AML je maligní nádorové onemocnění krvetvorných buněk kostní dřeně (Nelson et al., 2014; Hisasue et al., 2008). V periferní krvi jsou přítomny abnormální buňky nebo v krvi tyto buňky zcela chybí (Nelson et al., 2014). U psů dochází k leukoerytroblastické reakci, při které jsou v krvi přítomny nezralé formy bílých krvinek a erytroblastů v důsledku nadměrného vyplavování z kostní dřeně (Vokurka et Hugo, 2015).

AML se podle FAB (Francouzsko-Ameicko-Britská) klasifikace dělí na 6 podtypů M1, M2, M3, M4, M5a, M5b a M6. Nejčastějšími typy leukémií u psa jsou myeloidní leukémie typu M1, M2 a myelomonocytická leukémie M4 (Fiala et al., 2008). Počty megakaryocytů u typu M1 a M6 jsou sníženy nebo zcela chybí a u M2 jsou nepřítomny nebo mírně zvýšené a zvýšení eozinofilů se projevuje u typů M2 a M4 (Jain et al., 1991).

U myeloidní leukémie typu M1 převládají v kostní dřeni myeloblasty I, vzácně se vyskytují i myeloblasty II, které společně zahrnují více než 90 % všech jaderných buněk. Diferencované granulocyty zahrnují méně než 10 % z nonerytroidních buněk a často jsou přítomny promyelocyty, segmentované neutrofilů a eozinofilů. Myeloidní leukémie typu M2 zahrnuje myeloblasty v monožství 30 až 90 % ze všech jaderných buněk, avšak podíl myeloblastů je variabilní. Diferencované granulocyty zahrnují více než 10 % a monocytární buňky méně než 20 % nonerytroidních buněk s převahou promyelocytů. Myelomonocytická leukémie M4 je charakterizována pronikáním nádorových buněk do granulocytární a monocytární řady buněk. Je potvrzena v případě přítomnosti prominentní granulocytární a monocytární buněčné linie. Monoblasty a myeloblasty zaujímají více než 30 % všech jaderných buněk, diferencované granulocyty více než 20 % a monocyty více než 20 % nonerytroidních buněk (Jain et al., 1991).

##### 3.3.1.2 Klinická diagnostika

Podezření na AML vzniká v případě, že je v kostní dřeni přítomno více než 30 % blastů a erytroidní složka krve zaujímá méně než polovinu všech jaderných buněk (Hisasue et al., 2008). Mezi klinické příznaky patří teplota (40 °C), bledé sliznice, zvětšená slezina, kulhání a oční léze. Psi s AML – M5 trpí méně závažnou formou anemie a trombocytopenie, než psi

s jiným podtypem (Hiraoka et al., 2007; Nelson et al., 2014). Ultrazvukové vyšetření odhalí zvětšení jater a sleziny (Hisasue et al., 2008).

### 3.3.1.3 Laboratorní diagnostika

Základem diagnostiky je cytomorfologická analýza kostní dřeně, protože vyšetření krve je často k diagnóze AML nedostačující. V roztěru periferní krve je pozorováno velké množství zralých neutrofilů, monocytů a jejich nezralých prekurzorů. Při roztěru kostní dřeně se buňky barví dle Wright-Giemse a počítají. Ve srovnání s počty mononukleárních buněk je erytroidní buněčná linie téměř nepřítomná. Rozlišení myeloidních a monocytárních buněk se provádí pomocí peroxidázy, alfa-naftolmásečné esterázy, dinaftol-AS-D chloroctové esterázy a alfa-naftolbutyrát esterázy. Pro diagnózu AML je nezbytné, aby největší množství buněk mělo pozitivní reakci na myeloperoxidázové barvení, přibližně čtvrtina buněk pozitivní reakci na alfa-naftolmásečnou esterázu a velmi malé množství buněk může být současně pozitivní na dinaftol-AS-D chloroctovou esterázu a alfa-naftolmásečnou esterázu.

Z výsledku je zřejmé, že největší množství buněk kostní dřeně je myeloidních, což podporuje diagnózu AML (Hisasue et al., 2008). Vyšetření průtokovou cytometrií slouží k fenotypizaci buněk pomocí monoklonálních protilátek označovaných jako CD antigeny. U AML jsou buňky pozitivní na přítomnost myeloperoxidázy (MPO) a/nebo CD11b, CD4, CD14 antigenů a negativní pro všechny lymfoidní markery (Novacco et al., 2016).

### 3.3.1.4 Léčba

Cílem léčby je odstranit leukemické buňky z postižených tkání a obnovit normální krvetvorbu. V současnosti se AML léčí cytoredukční chemoterapií. Nejčastěji používané kombinace činidel jsou Ara – C (cytosinarabinosid), antracyklin (doxorubicin a cyklofosfamid), vinkristin a prednison. Ara – C se psům podává v dávkách 100 – 200 mg/m<sup>2</sup> pomalou infuzí, trvající 12 až 24 hodin. Tyto infuze se podávají denně po dobu 3 dnů a dále se opakují každý týden. Lze použít i střídavé podávání Ara – C a doxorubicinu v dávce 30 mg/m<sup>2</sup> intravenózně každé 2 až 3 týdny (Withrow et al., 2013).

## 3.3.2 Chronická lymfatická leukémie

### 3.3.2.1 Etiologie

Chronická lymfatická leukémie (CLL) psů je podobná leukémii postihující člověka. Příčina tohoto onemocnění není u zvířat známá (Workman et Vernau, 2003). CLL je méně častá a obtížně diagnostikovatelná. Napodobuje běžné nemoci, jako je lymfom nebo ehrlichioza

(Presley et al., 2006). U nemocných psů je v krvi pozorováno abnormální šíření zralých, malých lymfocytů. Onemocnění může být doprovázeno zvětšením uzlin a sleziny (Leifer et Matus, 1985). Normální počty lymfocytů v krvi psů se pohybují v hodnotách 80 % T-lymfocytů, 45 % pomocných T-lymfocytů, 28,8 % cytotoxických T-lymfocytů a 12,9 % B-lymfocytů (Byrne et al., 2000).

### 3.3.2.2 Klinická diagnostika

Diagnóza CLL je u zvířat založena na morfologických, cytochemických, imunofenotypických, cytogenetických a molekulárně genetických informacích o krvi a kostní dřeni. CLL u psů probíhá často bez příznaků a její diagnóza je většinou náhodná při preventivním vyšetření krve. Mezi nečastější klinické příznaky patří letargie, nechutenství, těžká anémie, trombocytopenie, úbytek hmotnosti a bledé sliznice. Další vyšetření často odhalí splenomegalii, s plástvovým vzhledem, případně hepatomegalii (Jung et Jung, 2014).

### 3.3.2.3 Laboratorní diagnostika

Při diagnostice se provádí kompletní vyšetření krve a kostní dřene. Pro CLL jsou typické malé lymfocyty vyskytující se v periferní krvi. Při biopsii kostní dřene je pozorováno nadměrné zmnožení buněk a velké množství mononukleárních buněk (Jung et Jung, 2014).

Doplňkovým vyšetřením je imunofenotypizace sloužící k určení správné diagnózy a terapie. Provádí se průtokovou cytometrií, imunochemií nebo imunohistochemií zmrazených, parafinovaných řezů tkání fixovaných formalínem nebo na neupravených krevních nátěrech, tekutinách (krev, kostní dřeň) a cytologických stěrech. Imunofenotypizací lze identifikovat různé linie maligních klonů lymfocytů, ale nevyužívá se pro rozlišení neoplastických a maligních buněk od buněk benigních (Workman et Vernau, 2003). Používá se specifická monoklonální protilátka (CD antigen), pro diferenciační antigeny lymfocytů a příslušných buněk imunitního systému. U přímé imunofluorescence je protilátka značená fluorescenčním činidlem. Pokud značená není, je potřeba reakce se sekundární, značenou protilátkou (Toman, 2009; Anonym1, 2007).

K rozpoznání antigenu T-buněk slouží vytvoření komplexu s receptorem na povrchu buňky. T-buněčný antigenní receptor (TCR) a CD3 komplex je exprimován pouze na povrchu zralých lymfocytů. Existují dva typy TCR (TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ ), které jsou heterodimerní a odpovídají za vazbu s antigenem (Workman et Vernau, 2003). Po vytvoření komplexu se vzorek vyhodnotí průtokovou cytometrií, umožňující fenotypizaci buněk nejčastěji na základě povrchových znaků. Principem je ozáření krevních buněk laserovým paprskem a následná fluorescence (Toman, 2009).

#### 3.3.2.4 Léčba

Psům s CLL se podává chlorambucil a prednison (Jung et Jung, 2014). Chlorambucil se podává perorálně v dávkách 0,2 mg/kg jedenkrát denně po dobu 7 až 14 dnů. Poté lze dávku snížit na 0,1 mg/kg denně. Při dlouhodobém užívání se používá dávka 0,06 mg/kg každý druhý den. Prednison se podává souběžně s chlorambucilem v dávkách 1 mg/kg jedenkrát denně po dobu 7 až 14 dnů (Withrow et al., 2013). Psi s CLL slouží jako model pro výzkum léčby tohoto onemocnění u lidí (Jung et Jung, 2014).

### 3.3.3 Akutní lymfatická leukémie

#### 3.3.3.1 Etiologie

Příčina akutní lymfatické leukémie (ALL) není zatím známá. U zvířat může být vyvolaná ionizujícím zářením, onkogenními viry a celou řadou chemických činidel. ALL je rychlé progresivní onemocnění, charakteristické šířením zhoubných, morfologicky nezralých lymfoblastů v periferní krvi a kostní dřeni (Leifer et Matus, 1985; Jung et Jung, 2014). Jedná se o vážné onemocnění s rychlým průběhem, končící ve většině případů smrtí pacienta (Tomaz et al., 2013). ALL může vzniknout z jakékoliv lymfatické buňky v určitém stádiu vývoje. Ve srovnání s buňkami způsobujícími AML, rozpoznatelných přítomností Aevových tyčí a myeloperoxidázy, u leukemických lymfoblastů chybí určité morfologické znaky nebo cytochemické funkce. Proto je diagnostika závislá na imunofenotypizaci (Wood et al., 1998).

Průtokovou cytometrií lze ALL rozdělit na dva typy. Akutní B – lymfoidní leukémii, s buňkami pozitivními na CD21 a/nebo CD79a antigeny, negativní pro všechny antigeny T – lymfocytů a myeloidní markery. Zatímco akutní T – lymfoidní leukémie jsou buňky pozitivní na CD3 a/nebo CD4, CD5, CD8 antigeny, negativní pro všechny antigeny B – lymfocytů a myeloidní markery (Novacco et al., 2016). Onemocnění postihuje nejčastěji psy ve věku 6 let, není však vyloučen výskyt v nižším věku. ALL postihuje častěji psy než feny, což vyplývá i ze studie, porovnávající 30 případů psů trpících tímto onemocněním. Poměr mezi nemocnými psy a fenami byl 3:2 (Leifer et Matus, 1985).

#### 3.3.3.2 Klinická diagnostika

Nejčastějšími klinickými příznaky jsou anorexie, letargie, zvracení, splenomegalie a bledé sliznice, závažná anémie a trombocytopenie (Leifer et Matus, 1985; Jung et Jung, 2014). Psi mají snížené počty krevních destiček v periferní krvi infiltrací kostní dřene leukemickými buňkami, u většiny se projevuje i snížení jednoho či více srážecích faktorů (II, X, XI) a prodloužuje se APTT i PT (protrombinový čas) (Mischke et al., 1998).



### 3.3.3.3 Laboratorní diagnostika

Diagnostika zahrnuje kompletní krevní obraz a vyšetření kostní dřeně. V krevním nátěru periferní krve jsou přítomny nezralé lymfoidní buňky a počty bílých krvinek jsou vyšší než 100 000/μl (Nelson et al., 2014; Jung et Jung, 2014). U zdravých psů se jejich počty pohybují od 5 000 do 12 000 buněk/mm<sup>3</sup>. Dochází k metabolickým poruchám, zahrnující zvýšenou hladinu laktátdehydrogenázy, kyseliny močové, močoviny a zvýšenou aktivitu jaterních enzymů v krvi (Leifer et Matus, 1985). Biopsie kostní dřeně odhalí nadměrné zmnožení buněk a velké množství nezralých lymfoblastů (Jung et Jung, 2014). K diagnostice lze využít průtokovou cytometrii, jelikož se v krvi psů s ALL vyskytuje zřetelná populace buněk, kterou u zdravých psů nenajdeme (Weiss, 2001).

### 3.3.3.4 Léčba

Základní léčba akutní leukémie je pomocí chemoterapeutického protokolu označovaného jako COP (cyklofosamid, vinkristin, prednison). Podává se cyklofosamid v dávce 50 mg/m<sup>2</sup> perorálně jedenkrát za 2 dny, vinkristin v dávce 0,5 – 0,7 mg/m<sup>2</sup> intravenózně jedenkrát týdně a prednison 40 – 60 mg/m<sup>2</sup> perorálně jedenkrát denně po dobu 1 týdne, poté se dávka snižuje na 20 mg/m<sup>2</sup> perorálně, jedenkrát za 2 dny po dobu 7 týdnů a dále na 10 mg/m<sup>2</sup> perorálně, jedenkrát za 2 dny po dobu 4 týdnů. Léčebně nejúspěšnějším je chemoterapeutický protokol označovaný COPL (cyklofosamid, vinkristin, prednison, L-asparagináza). K výše uvedeným cytostatikům je zde přidána L-asparagináza v dávce 10 000 IU/m<sup>2</sup> intramuskulárně nebo subkutánně, jedenkrát za 2 – 3 týdny (Makaloušová et Kučera, 2003; Nelson et al., 2014).

## 3.3.4 Anémie

### 3.3.4.1 Etiologie

Anémie je patologický stav způsobený sníženým množstvím erytrocytů a hemoglobinu v krvi (Laboklin, 2004; Paltrinieri, 2014). Ke snížení počtů erytrocytů dochází vlivem toxických, infekčních nebo idiopatických onemocnění kostní dřeně a metabolických či nádorových onemocnění, se sekundárním vlivem na erythropoézu. Tyto vlivy jsou odpovědné za „non regenerativní anémii“, u které nedochází k uvolňování retikulocytů z kostní dřeně do krevního oběhu a zahrnuje několik typů.

Anémie způsobená výživovými nedostatky zejména proteinů a aminokyselin pro syntézu hemoglobinu a buněčných membrán. Vzniká hladověním nebo onemocněním vyvolávajícím malabsorpční nebo proteinové ztráty (Paltrinieri, 2014). Anémie z nedostatku vitamínu B<sub>12</sub>, se vyskytuje u velkých kníračů, kteří mají vrozený deficit vnitřního faktoru pro

jeho vstřebávání (Fyfe et al., 1991). Anémie z nedostatku mědi je vzácná, podobná anémii z nedostatku železa. Aplastická anémie je vzácné onemocnění, při kterém je kostní dřeň nahrazována tukovou tkání a dochází k porušení tvorby leukocytů a trombocytů. Poslední anémie v této skupině je způsobená myelosupresivními léky.

Dalším vlivem odpovědným za vznik anémie je snížená životnost erytrocytů nebo hemolýza. Těmito vlivy vzniká „regenerativní anémie“, při které se do krve uvolňují nezralé retikulocyty s cílem obnovit počty erytrocytů. Řadíme zde anémii vzniklou akutním krvácením a hemolytickou anémii (Paltrinieri, 2014).

#### 3.3.4.2 Sideropenická anémie

Sideropenická anémie vzniká nedostatkem železa v organismu nezbytným pro fungování mnoha metabolických dějů. Jako součást hemoglobinu zajišťuje transport kyslíku. U psů je tento typ anémie vzácný a vzniká při chronické ztrátě krve důsledkem krvácení v gastrointestinálním traktu. Krvácení je způsobeno žaludečními vředy (podáváním ulcerogenních léků, kortikoidů a nesteroidních protizánětlivých léků), nádory (leiomyom, leiomyosarkom, karcinom) nebo zánětlivým onemocněním střev (Paltrinieri, 2014; Bohn, 2013). Štěňata trpí chronickou ztrátou krve při napadení ektoparazity (blechy) nebo endoparazity (měchovci, tenkohlavci) (Bohn, 2013). Další příčinou je nedostatečný přísun železa v potravě. Výživový požadavek dospělých psů na jeho obsah v krmivu je odhadován na 80 mg/kg sušiny. Psi krmení komerčními krmivy nedostatkem netrpí, ten se projevuje u psů krmených doma připravovanou stravou bez vhodných doplňků (Michel, 2006).

##### 3.3.4.2.1 Klinická diagnostika

Diagnóza sideropenické anémie zahrnuje hodnocení minulosti zvířete (užívané léky, podávaná potrava), zdravotního stavu, možnosti napadení parazity nebo možnosti ztráty krve vlivem vnitřního či vnějšího zranění (Naigamwalla et al., 2012). Klinické příznaky bývají velmi variabilní a projeví se až při těžkých stavech. Zahrnují letargii, intoleranci zátěže, slabost, úbytek hmotnosti, nevolnost a u štěňat a mladých psů opoždění růstu (Harvey et al., 2008). Sideropenická anémie se vyvíjí pozvolna a mnoho psů je schopno se tomuto stavu přizpůsobit a kompenzovat i těžké anémie. Při těžkých stavech se může projevovat arytmie a systolický srdeční šelest. Zvířata bývají normovolemická až mírně hypervolemická a mohou trpět i trombocytopenií. Ultrazvukové vyšetření slouží k vizualizaci vnitřních orgánů a posouzení trávicího traktu (vředy, ztlustění stěn) (Naigamwalla et al., 2012).

#### 3.3.4.2.2 Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika sideropenické anémie zahrnuje mikroskopické vyhodnocení krevního nátěru a hodnocení objemu červených krvinek, bílkovin, celkový krevní obraz zahrnující počty retikulocytů, parametry koagulace, vyšetření moči a množství železa v séru, jehož koncentrace je velmi nízká. Fekálními testy na okultní krvácení lze odhalit krvácení, nezřetelné při vizuální kontrole (Naigamwalla et al., 2012; Harvey et al., 2008). Zásoba železa v organismu může být kvalitativně posouzena barvením stěrů berlínskou modří nebo biopsií jater, sleziny a kostní dřeně (Schultheiss et al., 2002). Vylučujícím faktorem sideropenické anémie je přítomnost železa ve vzorcích (Naigamwalla et al., 2012).

#### 3.3.4.2.3 Léčba

Obecné zásady pro léčbu zvířat se sideropenickou anémií je předcházení ztrátám krve, doplnění železa a léčba onemocnění odpovědných za tento stav. U těžce anemických zvířat vykazujících známky hypoxie je nezbytné podat krevní transfuzi, ideálně erytrocytů. Transfuze řeší anémii a poskytuje ideální zdroj biologicky dostupného železa. K obnovení homeostázy lze podat železo i ve formě doplňků síranu železnatého, perorálně v dávce 15 mg/ kg každých 8 – 12 hodin, parenterálně lze podat železo-dextran v dávce 10 mg/kg jedenkrát týdně. S terapií je třeba pokračovat i po návratu počtu erytrocytů do normálu. Podání železa není vhodné pro léčbu jiných typů anémie (Naigamwalla et al., 2012).

#### 3.3.4.3 Hemolytická anémie

K hemolýze erytrocytů dochází poškozením toxiny, oxidací nebo narušením vnitřních či vnějších faktorů ovlivňujících jejich stárnutí. Nejčastější příčiny hemolýzy u psů jsou nedostatek antioxidantních enzymů, zneumožňující výrobu energie erytrocytům a ty pak nejsou chráněny před oxidací. Vrozený nedostatek pyruvát kinázy u basenji, biglů a teriérů, který postupně vyvolává myelofibrózu. Nedostatek fosfofruktokinázy u kokršpanělů, způsobující hemolýzu po zátěži, destrukcí erytrocytů, vlivem respirační alkalózy vyvolané hyperventilací (Harvey, 2006). Působení chemických látek, například toxinů v jedech hadů či hmyzu zapříčínující rozpad membrán erytrocytů nebo anémie spojená s infekčním onemocněním, způsobeného bakteriemi, viry a parazity (*Babesia canis*), nejčastěji prostřednictvím imunitně zprostředkovaných mechanismů, uvolněním toxinů nebo mechanickým poškozením erytrocytů v průběhu jejich vzniku (Riegel et Stockham, 2010).

#### 3.3.4.3.1 Imunitně zprostředkovaná hemolytická anémie (IMHA)

IMHA je jedním z nejčastějších imunitních onemocnění psů, vzniklá destrukcí erytrocytů vlivem přítomnosti protilátek. Plemenná predispozice je prokázána u pudlů, bobtailů, irských setrů a kokršpanělů (Sosnar et Růžička, 2002). Charakteristické pro IMHA je hyperaktivace imunitního systému, která vzniká při selhání endogenních glukokortikoidů, potlačujících imunitní reakce v organismu (Skelly et Swann, 2016). IgG nebo IgM protilátky se vážou na membránu erytrocytů a aktivuje se komplement vedoucí k jejich rozpadu (Piek, 2011). IgG protilátky jsou považovány za patogenní a jejich přítomnost může vést k rychlému odstranění erytrocytů ze sleziny a jater (Morley et al., 2008). Při IMHA dochází k imunitní reakci na antigeny, přirozeně se nevyskytující na povrchu erytrocytů. Jejich přítomnost může nastat vlivem léků (penicilin, levamizol, trimetoprim) nebo infekčních agens (víry, antigeny parazitů, bakterií). Erytrocyty jsou poté napadeny imunitním systémem a dochází k jejich odbourání ve slezině či játrech nebo jejich rozpadu přímo v krevním řečišti vlivem hypersenzitivní (cytotoxické) reakce. U psů s IMHA často dochází k dramatickému a rychlému odbourávání erytrocytů vedoucího ke smrti pacienta. Smrt nastává do dvou týdnů od diagnózy. IMHA se může projevit v jakémkoliv věku nejčastěji však v 6. roce života psa (Piek, 2011).

##### 3.3.4.3.1.1 Klinická diagnostika

Mezi klinické příznaky patří letargie, ztráta chuti k jídlu, slabost, horečka, hemoglobinurie, anémie a ve většině případů i zvracení a průjem (Sosnar et Růžička, 2002; Piek, 2011). S ohledem na hemolýzu erytrocytů se objevují i žlutě až oranžově zbarvené výkaly a moč. Fyzické vyšetření odhalí příznaky způsobené anémií, jako jsou bledé sliznice, systolický šelest, tachykardie a tachypnoe, zvětšení jater a sleziny (Burgess et al., 2000).

##### 3.3.4.3.1.2 Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika se opírá o prokázání imunitně zprostředkovaného mechanismu hemolýzy (Piek, 2011). Hlavní metodou k prokázání antierytrocytárních protilátek je přímý antiglobulinový Coombsův test. Alternativní metodu diagnózy je průtoková cytometrie, která je považována za citlivější a kvantitativnější test pro detekci antierytrocytárních protilátek (Morley et al., 2008). U psů s IMHA se projevuje snížení hematokritu pod 25 % (Burgess et al., 2000).

#### 3.3.4.3.1.3 Léčba

Základem léčby IMHA je imunomodulace s cílem snížit erytrofagocytózu a potlačit tvorbu imunoglobulínů. Může být kombinována s krevní transfuzí plné krve nebo erytrocytů (Balch et Mackin, 2007). Snížení imunity je udržováno po dobu 3 měsíců (Piek, 2011). Během léčby se podává prednison v dávkách 2,2 – 4,4 mg/kg perorálně v jedné dávce nebo jej lze rozdělit do dávek menších, každých 24 hodin. Cyklofosamid lze použít jako doplňkovou léčbu v dávce 50 mg/m<sup>2</sup> perorálně po dobu 4 dnů nebo 200 mg/m<sup>2</sup> intravenózně a následně 50 mg/m<sup>2</sup> perorálně po dobu 3 dnů.

Podávání různých dávek cyklofosfamidu nemá vliv na dobu přežití psů, ale lze jej použít u psů, kteří nereagují na samostatně podávaný prednison (Burgess et al., 2000). Léčba steroidními léčivy má mnoho vedlejších účinků zahrnujících polydypsii, polyúrii, polyfágií, dušnost, neklid, svalovou slabost a atrofii což často odradí majitele od další léčby (Skelly et Swann, 2016).

#### 3.3.4.3.2 Autoimunitně zprostředkovaná hemolytická anémie (AIHA)

AIHA je jedním z nejčastějších projevů autoimunitního onemocnění u psů, způsobena rozpadem červených krvinek. AIHA vzniká ve většině případů jako samostatné onemocnění, ale může se rozvinout i spolu s autoimunitní trombocytopenií, nebo jako součást multisystémového onemocnění jako je systémový *Lupus erythematoses*. AIHA je popsána u kokršpaněla, bobtaila a pudla (Day, 1999). AIHA má podobný mechanismus účinku jako IMHA, působí proti endogenním antigenům. Vyskytuje se především u fen velkých plemen (Piek, 2011). Dochází k tvorbě specifických protilátek IgG a IgM proti vlastním erytrocytům. Následkem je jejich rozpad přímo v krevním řečišti nebo jejich nadměrné odbourávání ve slezině či játrech (Piek, 2011; Day, 1999). Protilátky mohou napadat také prekuzory erytrocytů v kostní dřeni a dochází k čisté aplazii červené krevní řady. AIHA mohou vyvolat stresové faktory nebo vakcinace (Day, 1999).

##### 3.3.4.3.2.1 Klinická diagnostika

U většiny psů je nástup nemoci pozvolný (dny až týdny), projevující se anémií způsobenou ztrátou erytrocytů vlivem extravaskulární hemolýzy. U malého počtu psů je nástup nemoci rychlý (jeden až dva dny). Dochází k hemolytické anémii způsobené intravaskulárním rozpadem erytrocytů, autoaglutinaci, kolapsu, žloutence, hemoglobinémií a hemoglobinurií (Day, 1999).

#### 3.3.4.3.2.2 Laboratorní diagnostika

Pro laboratorní diagnostiku se používá přímý antiglobulinový test tzv. Coombsův test, jehož výsledek potvrdí navázání antiprotilátek (IgG nebo IgM) na membránu erytrocytů. Erytrocyty se promyjí pufovacím roztokem NaCl a inkubují se s Coombsovým antisérem proti imunoglobulinům. Při pozitivní reakci dojde k aglutinaci, která potvrdí přítomnost protilátek na povrchu erytrocytů (Faldyna et al., 2006). Citlivějším testem na navázané protilátky může být DELAT test, schopný detekovat méně než 250 molekul navázaných imunoglobulinů na povrchu erytrocytů (Day, 1999).

#### 3.3.4.3.2.3 Léčba

Léčba AIHA je obdobná léčbě IMHA. Zahrnuje podání imunomodulačních či imunosupresivních léků s cílem omezit imunitně zprostředkovanou hemolýzu. Primární léčba psů s AIHA zahrnuje podání imunosupresivní dávky glukokortikoidu prednisonu v množství 2 mg/kg perorálně dvakrát denně. V těžších klinických případech AIHA se podává cyklosporin, danzol, cyklofosfamid a azathioprin (Carr et Rubin, 2007).

### 3.3.5 Trombocytopenie

#### 3.3.5.1 Etiologie

Trombocytopenie může mít mnoho příčin, dochází při ní k abnormálnímu snížení počtu cirkulujících trombocytů v krvi pod 100 000 destiček/ $\mu$ l, vlivem jejich snížené produkce, ztrátou, nadměrným odbouráváním nebo odstraňováním imunitním systémem. Nejčastější příčinou snížené tvorby destiček je porucha kostní dřeně, podávání léků, styk s infekčními agens (*Ehrlichia canis*, virus psinky) nebo toxiny (chemoterapeutické léky, linezolid, sulfonamidy, estrogen) (Schaer et Gaschen, 2016).

##### 3.3.5.1.1 Imunitně zprostředkovaná trombocytopenie

Imunitně zprostředkovaná trombocytopenie (IMT) je u psů poměrně časté a závažné hematologické onemocnění (Bianco et al., 2007). IMT se klasifikuje jako primární nebo sekundární. Sekundární IMT (sIMT) je způsobena infekčním, zánětlivým, neoplastickým onemocněním nebo podáváním léků (Cummings et Rizzo, 2017). Léky vzniklá trombocytopenie byla spojena s podáváním antibiotik na bázi sulfonamidů (Trepanier et al., 2003). Trombocytopenie způsobené neoplastickým onemocněním lze pozorovat se zvýšeným rizikem u hemangiosarkomu, lymfomu a melanomu (Grindem et al., 1994). Primární IMT (pIMP) má idiopatický původ a je způsobena destrukcí trombocytů v periferní krvi nebo

snížením jejich tvorby imunitně zprostředkovanou destrukcí megakaryocytů kostní dřeně (Cooper et al., 2016). U pIMT se vážou IgG protilátky na povrch trombocytů, následkem čehož jsou odstraněny z krevního oběhu buňkami MPS a dochází k jejich snížení (Wilkerson et al., 2001). PIMT bývá diagnostikována po vyloučení ostatních příčin trombocytopenie (Cummings et Rizzo, 2017).

Úmrtnost je vyšší než 30 % v průběhu počátečních stádií nebo při návratu onemocnění, z důvodu nekontrolovatelného krvácení nebo závažných nežádoucích účinků během imunosupresivní léčby (Bianco et al., 2007). Příčina krvácení u psů trpících pIM je do značné míry neznámá a může být zapříčiněna zvýšenou hladinou protizánětlivého cytokinu a interleukinu-10 (LeVine et al., 2014).

#### 3.3.5.1.1.1 Klinická diagnostika

Konečná diagnóza pIMP se provádí detekcí protidestičkových protilátek na povrchu trombocytů. Tyto testy nejsou schopny rozeznat pIMP a sIMP jsou různě citlivé a v dnešní době nejsou snadno dostupné. Proto se diagnóza pIMT provádí vyloučením jiných příčin trombocytopenie a možných odpovědí na léčbu (Cummings et Rizzo, 2017; Bianco et al., 2007). Psi se středně těžkou až těžkou trombocytopenií mají počty trombocytů menší než 50 000 destiček/ $\mu$ l. Klinické příznaky těžké trombocytopenie zahrnují modřiny, krvácení z dásní, krev ve stolici (melena, hematochezie), zvracení krve (hemateméza), hematurie, krvácení z nosu, krvácení do přední oční komory (hyféma), do očního bělma a do kloubů (Lewis et Meyers, 1996).

#### 3.3.5.1.1.2 Laboratorní diagnostika

K laboratorní diagnostice se používají laserové hematologické analyzátoary, schopny určit počty trombocytů v krvi. Měří střední objem trombocytů, šíře distribuce trombocytů a platelekrit. U psů s IMT je nízký počet trombocytů spojen s vyšším rizikem krvácení (Schwartz et al., 2014).

#### 3.3.5.1.1.3 Léčba

Primární léčba IMT zahrnuje podávání imunosupresivních léčiv (glukokortikoidů). Jejich podáním dochází ke zvýšení počtu trombocytů (Bianco et al., 2007). Léčba steroidy může být neúčinná a způsobit závažné vedlejší účinky. Tito psi poté vyžadují individuální léčbu. Sekundární léčba není přesně definována a může zahrnovat transfuzi trombocytů, intravenózně podání imunoglobulinů ve vysokých dávkách, podání vinkristinu, cyklofosfamidu, azotropinu,

cyklosporinu, danazolu a leflunomidu (Kohn et al., 2016). Cílem léčby IMT je udržet normální počet trombocytů i po vysazení imunosupresiv a léčba sekundárních příčin trombocytopenie (Jans et al., 1990). Psům nereagujícím na léčbu hrozí vysoké riziko život ohrožujícího krvácení a ve většině případů končí smrtí. K dispozici není žádná jiná možnost terapie. Návratnost trombocytopenie a úmrtnost se pohybuje v rozmezí 9 – 43 % (Kohn et al., 2016).

### **3.3.6 Otrava olovem**

#### **3.3.6.1 Etiologie**

Chronická otrava olovem (Pb) může vyvolat zvláštní formu anémie důsledkem inhibice enzymů účastnících se syntézy hemu (Naigamwalla et al. 2012). Otravy Pb jsou patrné zejména u psů mladších jednoho roku. Zdrojem otrav jsou především barvy na bázi Pb, linoleum (Zook, 1972), příjem kontaminované vody či jiných předmětů obsahujících Pb. V dnešní době hrozí otrava Pb zejména u loveckých psů, kteří jsou odměňováni odřezky či vnitřnostmi z kořisti, nevyužívané pro lidskou spotřebu. Pochází z okolí rány, kde může dojít k uvíznutí olovené munice, která může být psem pozřena (Høgåsen et al., 2016).

#### **3.3.6.2 Intoxikace**

Pb patří mezi těžké kovy, které mají negativní dopad na gastrointestinální trakt, nervový, kardiovaskulární a krevní systém (Høgåsen et al., 2016). K otravě Pb dochází nejčastěji jeho pozřením a absorpce v organismu je závislá na mnoha faktorech (chemická forma, velikost částic, věk a výživa zvířete) (Barltrop et Meek, 1975; Hamir et al., 1982). Absorpce se snižuje s rostoucí velikostí částic. Vlivem nízkého pH žaludeční šťávy může docházet k vyšší absorpci pozřené Pb (Høgåsen et al., 2016). Nejnižší dávka octanu olovnatého způsobující akutní otravu a smrt psa je 300 mg/kg živé hmotnosti (Mouw et al., 1978).

#### **3.3.6.3 Mechanismus účinku**

Pb má afinitu k proteinům a je schopné nahradit vápník. Ovlivňuje homeostázu minerálních látek zejména zinku a hořčíku. V nervovém systému ovlivňuje neurální tkáň, ve které způsobuje buněčnou smrt nervových buněk a znemožňuje přenos nervových signálů (Høgåsen et al., 2016). Po absorpci je Pb snadno distribuováno v organismu pomocí transportu erytrocyty, navázané na hemoglobin nebo na další proteiny v krvi (albumin). Pb proniká hematoencefalickou a placentární bariérou, akumuluje se v kostech, játrech, ledvinách, slezině, slinivce a krvi. Vylučováno z organismu je převážně stolicí. Poločas rozpadu olova je přibližně 346 dní (Stowe et al., 1973).



#### 3.3.6.4 Klinická diagnostika

Pro otravu Pb jsou typické zažívací problémy (zvracení, průjem a koliky) a nervové poruchy (hysterie, nervozita, křeče, třes, epileptické záchvaty a letargie) (Zook, 1972). V ledvinách dochází k poškození epitelových buněk proximálních tubulů a nekrotám. Kardiovaskulární změny zahrnují hypertenzi, endoteliální degradaci a kapilární proliferaci v mozku (Høgåsen et al., 2016). V týlním a temenním laloku jsou často nalezeny léze (Mouw et al., 1978).

#### 3.3.6.5 Laboratorní diagnostika

Otravu Pb lze diagnostikovat krevním testem na koncentraci Pb, která je při otravách v rozmezí 250 – 400 µg/l (Mouw et al., 1978). Kompletní vyšetření krve, odhalí anémii, bazofilní tečkování, jaderné erythrocyty a zvýšený počet leukocytů (Høgåsen et al., 2016).

#### 3.3.6.6 Léčba

Základem léčby je zamezení přístupu psa ke zdroji otravy a chirurgické odstranění cizích těles ze zažívacího traktu. Je zahájena chelatační terapie pomocí vápenatého EDTA zředěného na koncentraci 10 mg/ml, za použití 5 % dextrózy v dávce 25 mg/kg subkutánně každých 6 hodin po dobu 5 dní (Schaer et Gaschen, 2016).

### 3.3.7 Otrava rostlinami rodu *Allium spp.*

Otravy rostlinami rodu *Allium spp.* nejsou u psů běžné, jelikož nepředstavují běžnou součást přijímané potravy. Nicméně při jejich pozření jsou odpovědné za život ohrožující stav a jsou bezprostřední příčinou úmrtí. Pro psy a kočky představují riziko zejména cibule (*Allium cepa*), česnek (*Allium sativum*), pór (*Allium porum*) a pažitka (*Allium schoenoprasum*). Cibule obsahuje toxické látky, způsobující u psů poškození erythrocytů a hemolytickou anémii doprovázenou tvorbou erythrocytů s Heinzovými tělísky (Salgado et al., 2011).

#### 3.3.7.1 Toxicita

Rostliny rodu *Allium* obsahují různé sloučeniny organických sulfidů. Nejčastěji se vyskytují alkenyl cystein sulfoxidy, které jsou zodpovědné za jejich charakteristický zápach (Lanzotti, 2006). Při řezání či žvýkání se přeměňují na směs obsahující síru a organické sloučeniny odpovědné za toxické účiny pro zvířata. Organické sloučeniny síry jsou snadno absorbovány v trávicím traktu (Amagase et al., 2001). Di-propylsulfid a allyl propylsulfid jsou látky, obsažené v cibuli odpovědné za hemolytickou anémii (Munday et al., 2003). Sodík-n-propylthiosulfát, přítomný ve vařené cibuli zvyšuje množství Heinzových tělísek

v erythrocytech a způsobuje hemolytickou anémii. Česnek je v přiměřené dávce považován za méně toxický než cibule (Kovalkovičová et al., 2009).

### 3.3.7.2 Intoxikace

Psi i kočky jsou velmi náchylní k otravě cibulí. Stačí velmi malé množství, 15 – 30 g/kg živé hmotnosti u psů a pouhých 5 g/kg živé hmotnosti u koček, vedoucí k závažným hematologickým změnám. Otrava cibulí hrozí buď po pozření množství většího než 0,5 % tělesné hmotnosti nebo po pozření relativně vysoké dávky (600 – 800 g) najednou či po menších dávkách několik dní po sobě. Nebezpečné je nejen pozření čerstvé rostliny, ale i džusů, potravinových doplňků, práškových přípravků na vaření a sušeného česneku či cibule (Kovalkovičová et al., 2009; Salgado et al., 2011). Predisponovaná jsou japonská plemena akita inu a shiba inu, která mají geneticky sníženou hladinu glutathionu a draslíku cirkulujícího v krvi (Salgado et al., 2011).

### 3.3.7.3 Mechanismus účinku

Za toxické účinky jsou odpovědné sloučeniny organické síry způsobující oxidační hemolýzu. Oxidační hemolýza nastává, pokud koncentrace oxidačních činidel v erythrocytech překročí kapacitu antioxidačních metabolických drah. Antioxidační aktivita katalázy v erythrocytech psů je asi 30x nižší než u člověka a hemoglobin je proto náchylný k oxidačnímu poškození (Nakamura et al., 1998).

V cibuli se nachází n-propylsulfid, způsobující vážný pokles aktivity glukózy-6-fosfát dehydrogenázy a sodík-n-propylthiosulfát zvyšující koncentraci methemoglobinu, počet Heintových tělísek a snižuje koncentraci glutathionu v erythrocytech (Tang et al., 2008; Yamato, 1999). Narušením aktivity glukóza-6-fosfát dehydrogenázy, klesá obsah glutathionu v erythrocytech a zvyšuje se koncentrace peroxidu vodíku v krvi. Dochází k peroxidaci lipidů vedoucí k tvorbě malondialdehydu, který spolu s peroxidem vodíku oxiduje sulfohydrylové skupiny hemoglobinu a ten poté denaturuje (Tang et al., 2008). Oxidaci podléhají i β-93 cysteinové zbytky v hemoglobinu a vytváří se sulfhemoglobin, který je spolu s denaturovaným hemoglobinem méně rozpustný, dochází ke srážení a navázání na buněčnou membránu erytrocytů a k tvorbě Heinz-Ehrlichových tělísek. Poškozené erythrocyty a erythrocyty s Heinz-Ehrlichovými tělísky jsou odstraněny z krevního oběhu a vzniká anémie, hemoglobinémie a hemoglobinurie. Oxidačním poškozením erythrocytů dochází i k poškození sodno – draselné pumpy, přispívající k buněčné lýze. Oxidací  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$  v molekule hemoglobinu vede k methemoglobinemii. Snižuje se schopnost transportovat kyslík a zhoršuje se jeho dodávka tkáním (Salgado et al., 2011).

V česneku jsou obsaženy látky allicin a ajoen patřící mezi farmakologicky aktivní látky používané jako silné relaxanty srdeční a hladké svaloviny, vasodilatancia a hypotensiva (Malik et Siddiqui, 1981). Ajoen a sloučeniny odvozené od organické síry v cibuli patří také mezi antitrombotika (Salgado et al., 2011).

#### 3.3.7.4 Klinická diagnostika

Klinické příznaky se mohou objevit během dne při pozření velkého množství cibule či česneku, avšak častější je projev až po několika dnech od pozření (Salgado et al., 2011).

Mezi první příznaky patří gastroenteritida (zvracení, průjem, bolesti břicha), ztráta chuti k jídlu, deprese a dehydratace. K anémii dochází po několika dnech, projevující se bledými sliznicemi, zrychleným a obtížným dýcháním, letargií, rudě až hnědě zbarvenou močí, žloutenkou, slabostí, intolerancí zátěže a rychlou tepovou frekvencí (Kovalkovičová et al., 2009).

#### 3.3.7.5 Laboratorní diagnostika

Hematologické vyšetření krve může odhalit neutrofilii, lymfopenii, anémii s přítomností Heinzových tělísek v erythrocytech a methemoglobinémii (Kovalkovičová et al., 2009). Další nálezy jsou intravaskulární a extravaskulární hemolýza, hemoglobinémie, hemoglobinurie a hyperbilirubinémie. Hlavním příznakem hemolýzy způsobené otravou česnekem je přítomnost eccentrocytů (erythrocyty s hemoglobinem koncentrovaným na jedné straně buňky) (Salgado et al., 2011).

#### 3.3.7.6 Léčba

Na otravu rostlinami rodu *Allium* dosud není žádný protijed. K dispozici je pouze podpůrná léčba zahrnující hospitalizaci pacienta, intravenózní podání tekutin a krevní transfuze (Kovalkovičová et al., 2009). Bylo navrženo několik terapeutických postupů pro otravy cibulí zahrnující gastrointestinální odstranění zbytků rostlin, podávání antioxidantních vitamínů (C a E). U psa v dávce 30 mg C/kg tělesné hmotnosti intravenózně, každých 6 – 8 hodin. Do dvou hodin od pozření lze vyvolat zvracení 3% peroxidem vodíku (2 ml/kg perorálně) (Salgado et al., 2011).

### **3.3.8 Otrava kumarinovými rodenticidy (warfarin)**

#### 3.3.8.1 Etiologie

Otrava kumariny je u psů velmi často způsobena warfarinem, používaným k hubení hlodavců (Lutze et al., 2003). Warfarin se řadí mezi 4 – hydroxykumarinové rodenticidy patřící mezi rodenticidy první generace. Deriváty 4 – hydroxykumarinu jsou známy pro své

antikoagulační, uklidňující a rodenticidní účinky a jsou antagonisty vitamínu K (Valchev et al., 2008).

#### 3.3.8.2 Intoxikace

K intoxikaci zvířat žijících v domácnostech dochází nejčastěji po pozření warfarinu pro jeho příjemnou chuť (přítomnost sacharózy) a absenci zápachu, pozřením živého či otráveného hlodavce nebo kontaminované vody (hydroxykumarinovými deriváty rozpustnými ve vodě). Toxický účinek jedné dávky warfarinu trvá přibližně 14 dní. Akutní toxická dávka LD<sub>50</sub> je u psů 58 mg/kg, u koček 20 – 50 mg/kg. Antikoagulační rodenticidy (AR) dosáhnou nejvyšší koncentrace v krevní plazmě po 12 hodinách od pozření. Hydroxykumariny podléhají metabolismu v játrech a jsou vylučovány močí a v malém množství i fekáliemi (Valchev et al., 2008).

#### 3.3.8.3 Mechanismus účinku

AR se vážou na komplex enzymů K 2,3 – epoxid reduktázu v jaterních mikrosomech, odpovědnou za syntézu protrombinu a koagulačních faktorů (Berny, 2007). Nastává kompetitivní inhibice vitamínu K a neúplná syntéza koagulačních faktorů II, VII, IX, X způsobující závažné krvácení (Lutze et al., 2003).

#### 3.3.8.4 Klinická diagnostika

Při otravách AR dochází k masivnímu vnějšmu i vnitřnímu krvácení a narušení hemokoagulace. Místo krvácení závisí na aktivitě zvířete. Nastává v hrudníku, gastrointestinálním traktu, mozku, děloze, ledvinách a játrech, kde se mohou tvořit i hematomy (Valchev et al., 2008). Ztráta krve způsobuje bledé sliznice, anémii, slabost, hypotermii a tachykardii. Zvířata jsou slabá, letargická, náchylnější k nehodám, predaci a infekčním onemocněním. Testy na otravu kumariny jsou potvrzeny vyšetřením krve nebo jaterních vzorků (Berny, 2007).

#### 3.3.8.5 Laboratorní diagnostika

Hlavní způsobem stanovení AR je hmotnostní spektrometrie a kapalinová chromatografie, kombinovaná s ultrafialovými a fluorescenčními detektory. Tyto přístroje jsou schopny detekovat AR ze vzorků jaterní tkáně postižených zvířat (Jin et al., 2007). Laboratorní vyšetření odhalí hematologické abnormality, hypochromní anémii, sníženou hodnotu hematokrytu, leukocytózu s neutropenií, zvýšenou rychlost sedimentace erytrocytů, zvýšenou degradaci fibrinu, snížené množství faktorů II, VII, IX, X a zvýšenou hladinu fibrinogenu.

Dochází k proteinurii, hematurii a v sedimentu je přítomno velké množství erytrocytů (Valchev et al., 2008).

#### 3.3.8.6 Léčba

V prvních 4 hodinách se podává suspenze aktivního uhlí a emetika. Po projevu klinických příznaků je zahájena léčba podáním vysoké dávky vitamínu K1. U psů se podává perorálně v dávce 1,5 – 2,5 mg/kg živé hmotnosti dvakrát denně. U malých plemen lze dávku zvýšit na 4 – 5 mg/kg živé hmotnosti (Mount et al., 2003). Pro zvýšení absorpce při orálním podávání se podává spolu s potravou (Valchev et al., 2008). Obnovení aktivity koagulačních faktorů závislých na vitamínu K je po jeho podání velmi rychlé. Následně se podává pouze perorálně v dávce 2,5 – 5 mg/kg jedenkrát za 24 hodin po dobu 3 – 6 týdnů (Mount et al., 2003).

## 4 Závěr

Většina dosud známých dědičných onemocnění ovlivňujících krvetvorbu a hemokoagulaci jsou recesivně dědičné. Mezi tyto nemoci postihující psy patří cyklická neutropenie šedých kolií, deficiencie pyruvát kinázy a von Willebrandova choroba. Na rozdíl od výše uvedených onemocnění je hemofilie, stejně jako u lidí, gonozomálně recesivně dědičná vázaná na pohlavní chromozóm X. Díky molekulární genetice jsou dnes známy mutace způsobující dané poruchy umožňující testování zvířat a odhalení přenašečů. Proto by zodpovědní chovatelé měli využít této možnosti a testovat svá zvířata s cílem vyřadit z chovu postižené jedince a zamezit tak šíření těchto nemocí v budoucí populaci.

U nemocí a poruch spojených s krvetvorbou a hemokoagulací bez genetického založení bychom se měli snažit těmto stavům předcházet. Nevystavovat psy působení chemikálií, pesticidů, jedů, těžkých kovů a ionizujícímu záření. Otravy olovem sice nejsou v dnešní době časté z důvodu zamezení používání olova, ale stále se mohou nacházet v starých budovách přístupných psům. Nejčastější otravy v současné době způsobují jedy na hlodavce. Narušují hemokoagulaci a tím způsobují vážné krvácivé stavy, které při pozdní diagnóze mohou skončit smrtí psa. Proto by nejen chovatelé, ale i veřejnost měli dbát na bezpečné uložení a zabezpečení návnad na hlodavce, aby se zamezilo přístupu k těmto látkám psům, kočkám.

Téměř v každé domácnosti se nachází rostliny rodu *Allium* (česnek, cibule, pór a další), které jsou při pozření jakékoliv formy (čerstvé, sušené nebo kapalné) vážným rizikem pro psy i kočky. Proti těmto otravám není k dispozici žádný protijed, proto by měly být skladovány a uloženy mimo dosah psů a koček.

## 5 Seznam literatury

Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., Itakura, Y. 2001. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. The American Society for Nutritional Sciences. 131 (3). 955-962.

Anonym1, 2007. Imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie. Laboratoř experimentální medicíny: Dětská klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci [online]. Laboratoř experimentální medicíny. Olomouc. [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/imunofenotypizace-pomoci-prutokove-cytometrie>.

Aroch, I., Tamarin, I., Kuzi, S. 2015. Hemophilia A in a Male Parson Russell Terrier Puppy. Israel Journal of Veterinary Medicine. 70 (4). 57-62.

Bain, B. J. 2007. A Beginner's Guide to Blood Cells. 2. vyd. John Wiley. Oxford. ISBN: 978-140-5146-173.

Balch, A., Mackin, A. 2007. Canine Immune-Mediated Hemolytic Anemia: Pathophysiology, Clinical Signs, and Diagnosis. Compendium. 29 (4). 217-225.

Barltrop, D., Meek, F. 1975. Absorption of different lead compounds. Postgraduate Medical Journal. 51 (601). 805–809.

Berny, P. 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 30 (2). 93-100. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2007.00836.x. ISSN: 0140-7783.

Bianco, D., Armstrong, P. J., Washabau, R. J. 2007. Treatment of Severe Immune-Mediated Thrombocytopenia with Human IV Immunoglobulin in 5 Dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine. 21 (4). 694-699. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2007.tb03010.x. ISSN: 08916640.

Bielikova, M. 2016. CN - canine cyclic neutropenia (Grey Collie syndrome). In: <http://www.slovgen.sk/> [online]. Slovgen. Slovensko. [cit. 2016-11-10]. Dostupné z: <http://www.slovgen.sk/detekcia-ochoreni-diseases/dedicne-prenosne-genetic-diseases/cn-canine-cyclic-neutropenia-grey-collie-syndrome/>.

Bohn, A. A. 2013. Diagnosis of Disorders of Iron Metabolism in Dogs and Cats. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 43 (6). 1319-1330. DOI: 10.1016/j.cvsm.2013.07.002. ISSN: 01955616.

Budras, K. D., McCarthy, P. H., Fricke, W., Richter, R. 2007. Anatomy of the dog. 5th rev. ed. Schlütersche. Hannover. ISBN: 978-389-9930-184.

Burgess, K., Moore, A., Rand, W., Cotter, S. M. 2000. Treatment of Immune-Mediated Hemolytic Anemia in Dogs with Cyclophosphamide. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 14 (4). 456-462. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2000.tb02256.x. ISSN: 08916640.

Byrne, K. M., Kim, H. W., Chew, B. P., Reinhart, G. A., Hayek, M. G. 2000. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 73 (2). 167-182. DOI: 10.1016/S0165-2427(99)00163-4. ISSN: 01652427.

Carr, A. P., Rubin, S. I. 2007. *Canine internal medicine secrets*. 2. Mosby. St. Louis. ISBN: 978-143-7711-479.

Cooper, S. A., Huang, A. A., Raskin, R. E., Weng, H. Y., Moncrieff, S. J. C. 2016. Clinical data, clinicopathologic findings and outcome in dogs with a megakaryocytic thrombocytopenia and primary immune-mediated thrombocytopenia. *Journal of Small Animal Practice*. 57 (3). 142-147. DOI: 10.1111/jsap.12441. ISSN: 00224510.

Cummings, F. O., Rizzo, S. A. 2017. Treatment of presumptive primary immune-mediated thrombocytopenia with mycophenolate mofetil versus cyclosporine in dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 58 (2). 96-102. DOI: 10.1111/jsap.12621. ISSN: 00224510.

Červený, Č. 2011. *Vademecum anatomie domácích savců pro studium a veterinární praxi*. Vyd. 1. Brázda. Praha. ISBN: 978-80-209-0389-1.

Dale, D. C., Alling, D. W., Wolff, S. M. 1972. Cyclic hematopoiesis: the mechanism of cyclic neutropenia in grey collie dogs. *Journal of Clinical Investigation*. 51 (8). 2197-2204. DOI: 10.1172/JCI107027. ISSN: 0021-9738.

Day, M. J. 1999. Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 69 (2-4). 215-224. DOI: 10.1016/S0165-2427(99)00055-0. ISSN: 01652427.

Dodds, W. J. 1970. Canine von Willebrand's disease. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 5 (76). 713-721

Dodds, W. J. 1984. Von Willebrand's disease in dogs. *Modern veterinary practice*. 65 (9). 681-686.

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

Ettinger, J. S., Feldman, E. C. 2009. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7. Elsevier Health Sciences. USA. ISBN: 9781437702828.



Faldyna, M., Kudláčková, H., Knötigová, P., Toman, M. 2006. Hemolytické anémie a jejich průkaz Coombsovým testem. *Veterinářství*. (56). 533-536.

Fiala, T., Kvapil, P., Alexa, M. 2008. Akutní leukémie psů – popis čtyř případů. *Veterinářství*. (58). 3-9.

Fyfe, J. C., Giger, U., Hall, C. A., Jezyk, P. F., Klumpp, S. A., Levine, J. S., Patterson, D. F. 1991. Inherited Selective Intestinal Cobalamin Malabsorption and Cobalamin Deficiency in Dogs. *Pediatric Research*. 29 (1). 24-31. DOI: 10.1203/00006450-199101000-00006. ISSN: 0031-3998.

Gavazza, A., Presciuttini, S., Keuper, H., Lubas, G. 2012. Estimated prevalence of canine Type 2 Von Willebrand disease in the Deutsch-Drahthaar (German Wirehaired Pointer) in Europe. *Research in Veterinary Science*. 93 (3). 1462-1466. DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.06.010. ISSN: 00345288.

Genomia. 2016. PK deficit. Genetic laboratory [online]. Plzeň. [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: [http://www.genomia.cz/cz/test/pk\\_def\\_dog](http://www.genomia.cz/cz/test/pk_def_dog).

Genomia. 2016. Von Willebrandova choroba typ I. Genetic laboratory [online]. Plzeň. [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <http://www.genomia.cz/cz/test/vwd1>.

Gershwin, M. E., Merchant, B. 2013. *Immunologic Defects in Laboratory Animals 1*. Springer Verlag. New York. ISBN: 978-147-5703-276.

Grindem, C. B., Breitschwerdt, E. B., Corbett, W. T., Page, R. L., Jans, H. E. 1994. Thrombocytopenia Associated With Neoplasia in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 8 (6). 400-405. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1994.tb03258.x. ISSN: 08916640.

Gultekin, G. I., Raj, K., Foureman, P., Lehman, S., Manhart, K., Abdulmalik, O., Giger, U. 2012. Erythrocytic Pyruvate Kinase Mutations Causing Hemolytic Anemia, Osteosclerosis, and Secondary Hemochromatosis in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 26 (4). 935-944. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2012.00958.x. ISSN: 08916640.

Hamir, A. N., Sullivan, N. D., Handson, P. D. 1982. The effects of age and diet on the absorption of lead from the gastrointestinal tract of dogs. *Australian Veterinary Journal*. 58 (6). 266-268. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1982.tb00694.x. ISSN: 0005-0423.

Hammon, W. P., Dale, D. C. 1980. Lithium therapy of canine cyclic hematopoiesis. *The American Society of Hematology*. 55 (1). 26-28.

Hammond, W. P., Kunz, L. L., Cox, P. A. 1983. Clinical and Pathologic Features of Cyclic Hematopoiesis in Grey Collie Dogs. *The American Journal of Pathology*. 111 (2). 224 - 233.

Harvey, J. W. 2006. Pathogenesis, laboratory diagnosis, and clinical implications of erythrocyte enzyme deficiencies in dogs, cats, and horses. *Veterinary Clinical Pathology*. 35 (2). 144-156. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2006.tb00108.x. ISSN: 0275-6382.

Harvey, J. W. 2012. *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas*. Elsevier Saunders. St. Louis, Mo. ISBN: 978-143-7701-739.

Harvey, J. W., Bruss, M. L., Kaneko, J. J. (ed.). 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Elsevier. Burlington. ISBN: 978-008-0568-829.

Hiraoka, H., Hisasue, M., Nagashima, N., Miyama, T., Tanimoto, T., Watanabe, M., Itamoto, K., Mizuno, T., Inikuma, H., Okuda, M. 2007. A Dog with Myelodysplastic Syndrome: Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Journal of Veterinary Medical Science*. 69 (6). 665-668. DOI: 10.1292/jvms.69.665. ISSN: 0916-7250.

Hisasue, M., Nishimura, T., Neo, S., Nagashima, N., Ishikawa, T., Tsuchiya, R., Yamada, T. 2008. A Dog with Acute Myelomonocytic Leukemia. *Journal of Veterinary Medical Science*. 70 (6). 619-621. DOI: 10.1292/jvms.70.619. ISSN: 0916-7250.

Hlavac, N. R. C., Lacerda, L. A., Conrado, F. O., Hünning, P. S., Seibert, M., González, F. H. D., Giger, U. 2012. Hemolytic anemia caused by hereditary pyruvate kinase deficiency in a West Highland White Terrier dog. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 44 (2). 195-200.

Høgåsen, H. R., Ørnsrud, R., Knutsen, H. K., Bernhoft, A. 2016. Lead intoxication in dogs: risk assessment of feeding dogs trimmings of lead-shot game. *BMC Veterinary Research*. 12 (1). -. DOI: 10.1186/s12917-016-0771-z. ISSN: 1746-6148.

Horwitz, M., Benson, K. F., Duan, Z., Li, F. Q., Person, R. E. 2004. Hereditary neutropenia: dogs explain human neutrophil elastase mutations. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 10 (4). 163-170. [cit. 2016-11-10]. DOI: 10.1016/j.molmed.2004.02.002. ISSN: 14714914.

Hultin, M. B., Nemerason, Y. 1978. Activation of factor X by factors IXa and VIII; a specific assay for factor IXa in the presence of thrombin-activated factor VIII. *American Society of Hematology*. 5 (52). 920 - 940.

Jain, N. C., Blue, J. T., Grindem, C. B., Harvey, J. W., Kociba, G. J., Krehbiel, J. D., Latimer, K. S., Raskin, R. E., Thrall, M. A., Zinkl, J. G. 1991. Proposed Criteria for Classification of Acute Myeloid Leukemia in Dogs and Cats. *Veterinary Clinical Pathology*. 20 (3). 63-82. DOI: 10.1111/j.1939-165X.1991.tb00571.x. ISSN: 02756382.

Jans, H. E., Armstrong, P. J., Price, G. S. 1990. Therapy of Immune Mediated Thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 4 (1). 4-7. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1990.tb00867.x. ISSN: 08916640.

Jin, M. C., Chen, X. H., Zhu, Y. 2007. Determination of five 4-hydroxycoumarin rodenticides in animal liver tissues by ion chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 1155 (1). 57–61.

Jung, H. W., Jung, D. I. 2014. Acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia in dogs. *Journal of Biomedical Research*. 15 (1). 32-35. DOI: 10.12729/jbr.2014.15.1.032. ISSN: 19767447.

Knovich, M. A., Storey, J. A., Coffman, L. G., Torti, S. V., Torti, F. M. 2009. Ferritin for the clinician. *Blood Reviews*. 23 (3). 95-104. DOI: 10.1016/j.blre.2008.08.001. ISSN: 0268960x.

Kohn, B., Bal, G., Chirek, A., Rehbein, S., Salama, A. 2016. Treatment of 5 dogs with immune-mediated thrombocytopenia using Romiplostim. *BMC Veterinary Research*. 12 (1). 96-102. DOI: 10.1186/s12917-016-0718-4. ISSN: 1746-6148.

Kohn, B., Fumi, C. 2008. Clinical course of pyruvate kinase deficiency in Abyssinian and Somali cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 10 (2). 145-153. DOI: 10.1016/j.jfms.2007.09.006. ISSN: 1098-612x.

König, H. E., Bragulla, H., Weller, R. 2007. *Veterinary anatomy of domestic mammals textbook and colour atlas*. 3. ed. Schattauer. Stuttgart. ISBN: 978-379-4524-853.

König, H. E., Liebich, H. G. 2002. *Anatomie domácích savců*. H&H. Bratislava. ISBN: 80-887-0057-4.

Kovalkovičová, N., Šutiaková, I., Pistl, J., Šutiak, V. 2009. Some food toxic for pets. *Interdisciplinary Toxicology: The Journal of Institute of Experimental Pharmacology of Slovak Academy of Sciences*. 2 (3). 169–17. DOI: 10.2478/v10102-009-0012-4. ISBN: 10.2478/v10102-009-0012-4.

Kramer, J. W., Venta, P. J., Klein, S. R., Cao, Y., Schall, W. D., Gurkan, Y. V. 2004. A von Willebrand's Factor Genomic Nucleotide Variant and Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test Associated with Inheritable Type-2 von Willebrand's Disease in a Line of German Shorthaired Pointer Dogs. *Veterinary Pathology*. 41 (3). 221-228. DOI: 10.1354/vp.41-3-221. ISSN: 0300-9858.

Lab test. 2009. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas, aPTT, APTT. [online]. Lab Tests Online Editorial Review Board. Praha. [cit. 2016-11-08]. Dostupné z: <http://www.labtestsonline.cz/tests/aPTT.html?tab=3>.

Laboklin. 2004. Anémie u psů a koček: Manuál pro veterinární praxi. [online]. Laboklin. Německo. [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: [http://oldsite.laboklin.de/pages/html/cz/VetInfo/aktuell/lab\\_akt\\_1006\\_cz.html](http://oldsite.laboklin.de/pages/html/cz/VetInfo/aktuell/lab_akt_1006_cz.html).

Laboklin. 2004. Cyklická neutropenie šedých kolií (Grey Collie Syndrome, GCS). [online]. Německo. [cit. 2016-10-27]. Dostupné z: [http://www.laboklin.de/pages/html/cz/Genetic/canine\\_disease/dog\\_gray\\_collie\\_syndrome.htm](http://www.laboklin.de/pages/html/cz/Genetic/canine_disease/dog_gray_collie_syndrome.htm).

Laboklin. 2004. Deficit pyruvát kinázy (PK). [online]. Laboklin. Německo. [cit. 2016-11-26]. Dostupné z: [http://www.laboklin.de/pages/html/cz/Genetic/canine\\_disease/pes\\_deficit\\_PK.htm](http://www.laboklin.de/pages/html/cz/Genetic/canine_disease/pes_deficit_PK.htm).

Laboklin. 2004. Hemofilie A (deficience VIII koagulačního faktoru). [online]. Laboklin. Německo. [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: [http://oldsite.laboklin.de/pages/html/cz/Genetic/canine\\_disease/pes\\_hemofilie\\_a.htm](http://oldsite.laboklin.de/pages/html/cz/Genetic/canine_disease/pes_hemofilie_a.htm).

Laboklin. 2004. Hemofilie B (deficience IX koagulačního faktoru). [online]. Laboklin. Německo. [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: [http://oldsite.laboklin.de/pages/html/cz/Genetic/canine\\_disease/pes\\_hemofilie\\_b.htm](http://oldsite.laboklin.de/pages/html/cz/Genetic/canine_disease/pes_hemofilie_b.htm).

Laboklin. 2004. Von Willebrandova choroba (vWD). [online]. Laboklin. Německo. [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: [http://oldsite.laboklin.de/index.php?link=labogen/pages/html/sk/geneticdiseases/dog/pes\\_vwd.html](http://oldsite.laboklin.de/index.php?link=labogen/pages/html/sk/geneticdiseases/dog/pes_vwd.html).

Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*. 1112 (1-2). 3–22. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.12.016. ISSN: 00219673.

Lawrie, A. S., Stufano, F., Canciani, M. T., Mackie, I. J., Machin, S. J., Peyvandi, F. 2013. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia*. 19 (2). 338-342. DOI: 10.1111/hae.12064. ISSN: 13518216.

Leifer, C. E., Matus, R. E. 1985. Lymphoid Leukemia in the Dog: Acute Lymphoblastic Leukemia and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 15 (4). 723-739. DOI: 10.1016/S0195-5616(85)50032-7. ISSN: 01955616.

LeVine, D. N., Birkenheuer, A. J., Brooks, M. B., Nordone, S. K., Bellinger, D. A., Jones, S. L., Fischer, T. H., Oglesbee, S. E., Frey, K., Brinson, N. S., Peters, A. P., Marr, H. S., Motsinger-Reif, A., Gudbrandsdottir, S., Bussel, J. B., Key, N. S. 2014. A novel canine model of immune thrombocytopenia: has immune thrombocytopenia (ITP) gone to

the dogs? *British Journal of Haematology*. 167 (1). 110-120. DOI: 10.1111/bjh.13005. ISSN: 00071048.

Lewis, D. C., Meyers, K. M. 1996. Canine Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 10 (4). 207-218. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1996.tb02052.x. ISSN: 08916640.

Lund, E., Pedgett, J. A., Ott, G. L. R. 1967. Cyclic Neutropenia in Grey Collie Dogs. *American Society of Hematology*. 29 (4). 452-461. ISSN: 1528-0020.

Lutze, G., Römhild, W., Elwert, J., Leppelt, J., Kutschmann, K. 2003. Case report. Phenprocoumon (Marcumar, Falithrom) as an unusual reason for coumarin poisoning in a dog. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. 110 (1). 31 - 33.

Makaloušová, E., Kučera, J. 2003. Lymfom očima českého praktika. In: *Veterinářství* [online]. Praha. [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://vetweb.cz/lymfom-ocima-ceskeho-praktika/>.

Malik, Z. A., Siddiqu, S. 1981. Hypotensive effect of freeze-dried garlic (*Allium sativum*) sap in dog. *Journal Of Pakistan Medical Association*. 31 (1). 12-13.

Malý, J., Duříček, P., Blažek, M., Malý, R., Pecka, M., Šimkovič, M. 2007. Trombofilní stavy - Laboatorní a klinická diagnostika. *Intervenční a akutní kardiologie*. 6 (12). B11 - B16.

Michel, K. E. 2006. Unconventional Diets for Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 36 (6). 19104–6010.

Mischke, R., Freund, M., Leinemann-Fink, T., Eisenberger, B., Casper, J., Nolte, I. 1998. Changes in hemostasis of dogs with acute lymphoblastic leukemia. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift*. 111 (2). 53 - 59.

Mischke, R., Kühnlein, P., Kehl, A., Detsch, L. I., Steudle, F., Schmid, A., Dandekar, T., Czwalinna, A., Müller, E. 2011. G244E in the canine factor IX gene leads to severe haemophilia B in Rhodesian Ridgebacks. *The Veterinary Journal*. 187 (1). 113-118. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.01.017. ISSN: 10900233.

Mizukami, K., Shoubudani, T., Nishimoto, S., Kawamura, R., Yabuki, A., Yamato, O. 2012. Trapped Neutrophil Syndrome in a Border Collie Dog: Clinical, Clinico-Pathologic, and Molecular Findings. *Journal of Veterinary Medical Science*. 74 (6). 797 - 800.

Morley, P., Mathes, M., Guth, A., Dow, S. 2008. Anti-Erythrocyte Antibodies and Disease Associations in Anemic and Nonanemic Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22 (4). 886-892. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.0112.x. ISSN: 08916640.

Mount, M. E., Kim, B. U., Kass, P. H. 2003. Use of a test for proteins induced by vitamin K absence or antagonism in diagnosis of anticoagulant poisoning in dogs: 325 cases (1987-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 222 (2). 194-198. DOI: 10.2460/javma.2003.222.194. ISSN: 0003-1488.

Mouw, D. R., Vander, A. J., Cox, J., Fleischer, N. 1978. Acute effects of lead on renal electrolyte excretion and plasma renin activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 46 (2). 435-447. DOI: 10.1016/0041-008X(78)90089-3. ISSN: 0041008x.

Munday, R., Munday, J. S., Munday, C. M. 2003. Comparative effects of mono-, di-, tri-, and tetrasulfides derived from plants of the *Allium* family: redox cycling in vitro and hemolytic activity and Phase 2 enzyme induction in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 34 (9). 1200–1211. DOI: 10.1016/S0891-5849(03)00144-8. ISBN: 10.1016/S0891-5849(03)00144-8.

Naigamwalla, D. Z., Webb, J. A., Giger, U. 2012. Iron deficiency anemia. *Canadian Veterinary Journal*. 53 (3). 250–256.

Nakamura, K., Watanabe, M., Tanimoto, S. S., Ikeda, T. 1998. A low catalase activity in dog erythrocytes is due to a very low content of catalase protein despite having a normal specific activity. *The International Journal of Biochemistry*. 30 (7). 823-831. DOI: 10.1016/S1357-2725(98)00044-2. ISSN: 13572725.

Nelson, R. W., Couto, C. G. 2014. *Small animal internal medicine*. 5. vyd. Elsevier Health Sciences. USA. ISBN: 978-032-3243-001.

Nichols, T. C., Raymer, R. A., Franck, H. W. G., Merricks, E. P., Bellinger, D. A., Defriess, N., Margaritis, P., Arruda, V. R., Kay, M. A., High, K. A. 2010. Prevention of spontaneous bleeding in dogs with haemophilia A and haemophilia B. *Haemophilia*. 16 (3). 19-23. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2010.02255.x. ISSN: 13518216.

Novacco, M., Comazzi, S., Marconato, L., Cozzi, M., Stefanello, D., Aresu, L., Martini, V. 2016. Prognostic factors in canine acute leukaemias: a retrospective study. *Veterinary and Comparative Oncology*. 14 (4). 409-416. DOI: 10.1111/vco.12136. ISSN: 14765810.

Oost, B. A., Versteeg, S. A., Slappendel, R. J. 2004. DNA Testing for Type III von Willebrand Disease in Dutch Kooiker Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 18 (3). 282-288. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2004.tb02546.x. ISSN: 08916640.

Pacheco, J. M., Traulsen, A., Antal, T., Dingli, D. 2008. Cyclic neutropenia in mammals. *American Journal of Hematology* [online]. 83 (12). 920-921. [cit. 2016-06-17]. DOI: 10.1002/ajh.21295. ISSN: 03618609.

Paltrinieri, S. 2014. The diagnostic approach to anaemia in the dog and cat. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 65 (3). 149-164.

Piek, C. J. 2011. Canine idiopathic immune-mediated haemolytic anaemia: a review with recommendations for future research. *Veterinary Quarterly*. 31 (3). 129-141. DOI: 10.1080/01652176.2011.604979. ISSN: 0165-2176.

Pišlová, A. 2009. Hemofilie. In: Klub chovatelů Dandie Dinmont teriérů [online]. Praha. [cit. 2016-10-14]. Dostupné z: <http://www.dandies.eu/index.asp?menu=693&record=4329>.

Presley, R. H., Mackin, A., Vernau, W. 2006. Lymphoid leukemia in dogs. *Compendium on Continuing Education for The Practicing Veterinarian*. 28 (12). 831-849.

Reagan, W. J., Rovira, A. R. I., DeNicola, A. R. I. 2008. *Veterinary hematology: Atlas of common domestic and non-domestic species*. 2. vyd. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa. ISBN: 978-081-3828-091.

Reece, W. O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada. Praha. ISBN: 978-80-247-3282-4.

Riegel, C. M., Stockham, S. L. 2010. Anemia associated with bacteria and viral infections. *Schalm's Veterinary Hematology*. Iowa, USA. 213-214.

Salgado, B. S., Monteiro, L. N., Rocha, N. S. 2011. Allium species poisoning in dogs and cats. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 17 (1). 4-11. DOI: 10.1590/S1678-91992011000100002. ISSN: 1678-9199.

Sapo, L., Tao, O., Sangam, K. 2016. Imaging of bone marrow. *Hematology/Oncology Clinic of North America*. 30 (4). 945-971.

Schaer, M. 2010. *Clinical medicine of the dog and cat*. 2nd ed. Manson Publishing. London. ISBN: 978-184-0766-400.

Schaer, M., Gaschen, F. P. 2016. *Clinical Medicine of the Dog and Cat*. 3rd. CRC Press. USA. ISBN: 9781482226065.

Schultheiss, P. C., Bedwell, C. L., Hamar, D. W., Fettman, M. J. 2002. Canine Liver Iron, Copper, and Zinc Concentrations and Association with Histologic Lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 14 (5). 396-402. DOI: 10.1177/104063870201400506. ISSN: 1040-6387.

Schwartz, D., Sharkey, L., Armstrong, P. J., Knudson, C., Kelley, J. 2014. Platelet Volume and Plateletcrit in Dogs with Presumed Primary Immune-Mediated Thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 28 (5). 1575-1579. DOI: 10.1111/jvim.12405. ISSN: 08916640.

Skelly, B., Swann, J. 2016. Canine autoimmune hemolytic anemia: management challenges. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 7. 101-112. DOI: 10.2147/VMRR.S81869. ISSN: 2230-2034.

Slauson, D. O., Cooper., B. J. 2002. Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology. 3. ed. Mosby. St. Louis, Mo. [u.a.]. ISBN: 03-230-0228-5.

Smejkal, P., Blatný, J., Blažek, B., Černá, Z., Dulíček, P., Hrachovinová, I., Hluší, A., Hrdličková, R., Komrska, V., Pospíšilová, D., Procházková, D., Šlwchtová, J., Timir, P., Vonke, I., Walterová, L., Penka, M. 2013. Diagnostika a léčba hemofilie. *Transfuze a hematologie dnes*. Praha. 19 (2). 100-114. ISSN: 1213-5763.

Sosnar, M., Růžička, M. 2002. Autoimunitní hemolytická anémie u psa – popis případu. *Veterinářství*. (52). 274-275. Dostupné také z: <http://vetweb.cz/autoimunitni-hemolyticka-anemie-u-psa-popis-pripadu/>.

Stowe, H. D., Goyer, R. A., Krigman, M. M., Wilson, M., Cates,, M. 1973. Experimental oral lead toxicity in young dogs. *Journal Article*. United States. 95.

Svoboda, M. 2008. Nemoci psa a kočky. 2. vyd. Noviko. Brno. ISBN: 978-80-86542-18-8.

Szponder, J. W. 1999. Von Willebrand disease in dogs. *Medycyna weterynaryjna*. 55 (5). 288-291.

Tang, X., Xia, Z., Yu, J. 2008. An experimental study of hemolysis induced by onion (*Allium cepa*) poisoning in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 31 (2). 143-149. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2007.00930.x. ISSN: 0140-7783.

Toman, M. 2009. Veterinární imunologie. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Grada. Praha. ISBN: 978-802-4724-645.

Tomaz, K. L. R., Vale, A. M., Blanco, S. B. 2013. Acute lymphoblastic leukemia in a dog. *Acta Scientiae Veterinariae*. 14 (1). 19-20. ISSN: 1679-9216.

Trepanier, L. A., Danhof, R., Toll, J., Watrous, D. 2003. Clinical Findings in 40 Dogs with Hypersensitivity Associated with Administration of Potentiated Sulfonamides. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 17 (5). 647-652. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02495.x. ISSN: 08916640.

Valchev, I., Binev, R., Yordanova, V., Nikolov, Y. 2008. Anticoagulant Rodenticide Intoxication in Animals – A Review. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 32 (4). 237-243.



Venta, P. J., Li, J., Gurkan, Y. V., Brewer, G. J., Schall, W. D. 2000. Mutation Causing von Willebrand's Disease in Scottish Terriers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 14 (1). 10-19. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2000.tb01493.x. ISSN: 08916640.

Vokurka, M., Hugo, J. 2015. *Velký lékařský slovník*. 10. aktualizované vydání. Maxdorf. Praha. Jessenius. ISBN: 978-80-7345-456-2.

Wayand, R. C., Yang, T. J. 1981. T and B lymphocyte levels in the peripheral blood of dogs affected with cyclic neutropenia. *Experimental Hematology*. 1 (9). 52-62.

Weiden, P. L., Robinett, B., Graham, T. C., Adamson, J., Storb, R. 1974. Canine Cyclic Neutropenia. *Journal of Clinical Investigation*. 53 (3). 950-953. DOI: 10.1172/JCI107636. ISSN: 0021-9738.

Weiss, D. J. 2001. Flow Cytometric and Immunophenotypic Evaluation of Acute Lymphocytic Leukemia in Dog Bone Marrow. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 15 (6). 589-594. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2001.tb01596.x. ISSN: 08916640.

Weiss, D. J., Wardrop, K. J. 2011. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. vyd. John Wiley & Sons. USA. ISBN: 9780470961834.

Wilkerson, M. J., Shuman, W., Swist, S., Harkin, K., Meinkoth, J., Kocan, A. A. 2001. Platelet Size, Platelet Surface-Associated IgG, and Reticulated Platelets in Dogs with Immune-Mediated Thrombocytopenia. *Veterinary Clinical Pathology*. 30 (3). 141-149. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2001.tb00423.x. ISSN: 0275-6382.

Withrow, S. J., Page, R., Vail, D. M. 2013. *Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. Elsevier Health Sciences. London. ISBN: 978-032-3241-977.

Wood, A. J. J., Pui, C. -H., Evans, W. E. 1998. Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 339 (9). 605-615. DOI: 10.1056/NEJM199808273390907. ISSN: 0028-4793.

Workman, H. C., Vernau, W. 2003. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 33 (6). 1379-1399. DOI: 10.1016/S0195-5616(03)00120-7. ISSN: 01955616.

Xu, L., Nichols, T. C., Sarkar, R., McCorquodale, S., Bellinger, D. A., Ponder, K. P. 2005. Absence of a desmopressin response after therapeutic expression of factor VIII in hemophilia A dogs with liver-directed neonatal gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102 (17). 6080-6085. DOI: 10.1073/pnas.0409249102. ISSN: 0027-8424.

Yamato, O. 1999. Reduced glutathione accelerates the oxidative damage produced by sodium n-propylthiosulfate, one of the causative agents of onion-induced hemolytic anemia

in dogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1427 (2). 175-182. DOI: 10.1016/S0304-4165(99)00023-9. ISSN: 03044165.

Yanay, O., Dale, D. C., Osborne, W. R. A. 2012. Repeated Lentivirus-Mediated Granulocyte Colony-Stimulating Factor Administration to Treat Canine Cyclic Neutropenia. *Human Gene Therapy*. 23 (11). 1136-1143. DOI: 10.1089/hum.2012.045. ISSN: 1043-0342.

Zanella, A., Bianchi, P., Fermo, E. 2007. Pyruvate kinase deficiency. *Haematologica*. 92 (6). 721-723. DOI: 10.3324/haematol.11469. ISSN: 0390-6078.

Zook, B. C. 1972. The Pathologic Anatomy of Lead Poisoning in Dogs. *Veterinary Pathology*. 9 (5). 310-327. DOI: 10.1177/030098587200900503. ISSN: 0300-9858.