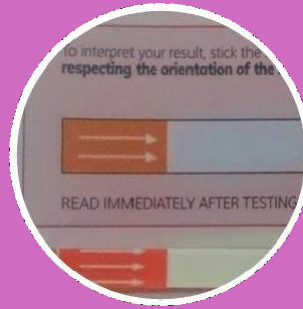


Jaroslav Doubek, Eva Matalová, Pavla Hamouzová,
Šárka Stehlíková, Ivana Veselá, Kristína Řeháková,
Ivana Váňová, Lucia Černá

Fyziologie I

Praktická cvičení
(2. rozšířené vydání)



Fyziologie I

Praktická cvičení

(druhé rozšířené vydání)

Jaroslav Doubek
Eva Matalová
Pavla Hamouzová
Šárka Stehlíková
Ivana Veselá
Kristína Řeháková
Ivana Váňová
Lucia Černá

Ústav fyziologie VFU Brno
Klinická laboratoř pro malá zvířata VFU Brno
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

Tento učební materiál je určen pro studenty Fakulty veterinárního lékařství a Fakulty veterinární hygieny a ekologie VFU Brno.

Tematicky vychází ze sylabů předmětu Fyziologie I zajišťovaného Ústavem fyziologie Fakulty veterinárního lékařství.

Výběr úkolů je dán současnými možnostmi Ústavu fyziologie a respektuje náplň praktické výuky v navazujících předmětech (patologická fyziologie, předměty laboratorní medicíny a klinické medicíny).

Učební materiál představuje otevřenou tematickou soustavu. Osnova jednotlivých úkolů vychází z minulého vydání. Témata jsou rozšířena, upraveno je jejich uspořádání, v šedých rámečcích jsou k tématu doplňující informace. Na závěr učebního je zařazena kapitola

Eponyma v učebních textech Fyziologie I pro VFU Brno,

jejíž obsah přispěje k osvojení a upevnění některých pojmů z fyziologie.

Věříme, že připravené návody zefektivní praktickou výuku a hands-on experience nabízené studentům a budou podkladem také pro samostudium a další vzdělávání.

Související materiály jsou k dispozici na stránkách <http://kreativnifyziologie.upol.cz>

Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.

Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.

MVDr. Pavla Hamouzová, Ph.D.

MVDr. Šárka Stehlíková, Ph.D.

MVDr. Ivana Veselá, Ph.D.

MVDr. Kristína Řeháková, Ph.D.

MVDr. Ivana Váňová, Ph.D.

MVDr. Lucia Černá

Ústav fyziologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

Klinická laboratoř pro malá zvířata Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.

© Jaroslav Doubek et al. 2020

Obsah

EXPERIMENTÁLNÍ FYZIOLOGIE	6
Laboratorní zvířata ve výuce fyziologie	6
BUNĚČNÁ FYZIOLOGIE	10
Buněčný cyklus, proliferace	10
Homeostaze na úrovni buněk	14
Alternativní metody, orgánové explantátové kultury	17
KREV	20
Krevní plazma	20
Suspenzní stabilita krve	20
Funkce a separace plazmatických proteinů	24
Erytrocytární komplex	28
Funkce erytrocytů, jejich podíl v celkovém objemu krve	28
Funkce erytrocytů, jejich počet v objemu krve	33
Osmotická rezistence erytrocytů	37
Počet retikulocytů	41
Indexy červeného krevního obrazu	45
Krevní skupiny	49
Hemostaze	55
Funkce trombocytů, jejich počet v objemu krve	55
Funkce koagulačních faktorů, protrombinový čas a aktivovaný parciální tromboplastinový čas	61
Leukocytární komplex	70
Funkce leukocytů, jejich počet v objemu krve	70
Funkce a zastoupení jednotlivých populací leukocytů	75
IMUNITNÍ SYSTÉM	88
Nespecifická imunita	88
Fagocytóza	88
C-reaktivní protein	95
Specifická imunita	97
Protilátková imunita	97
Autoprotilátky	101
VNITŘNÍ PROSTŘEDÍ	105
Elektrolyty: Na⁺, K⁺, Cl⁻	105
Acidobazický status	110
FYZICKÁ ZÁTĚŽ	116

Fyziologické kompenzace	116
METABOLISMUS	123
Bazální metabolismus	123
TERMOREGULACE	126
Fyziologická produkce tepla	126
Fyziologické ztráty tepla a jejich metabolická kompenzace	130
Homoiotermní a poikilothermní živočichové	134
Tuková tkáň	136
EPONYMA	143
REFERENCE	151

EXPERIMENTÁLNÍ FYZIOLOGIE

Laboratorní zvířata ve výuce fyziologie



Experimenty na zvířatech jsou stále důležité pro rychlý vývoj biomedicíny. Je však nezbytné dodržovat etické aspekty a tomu odpovídající legislativní rámec. Zákony podporující **3R zásady** – Replacement, Reduction, Refinement – zavedli Russell a Burch (1959) a postupně byly přijaty ve Velké Británii, Německu, Nizozemsku, USA a dalších zemích EU. Základy těchto zásad vytvořil již roku 1945 Hume.

Replacement zahrnuje metody, které umožňují dosažení daného záměru bez nutnosti využití laboratorních zvířat. Používají se alternativní metody, z nich jsou nejrozšířenější *in vitro/ex vivo* kultivace buněk, tkání nebo orgánů, ale také techniky *in silico*. Řada těchto metod zahrnuje také vylepšené ukládání, výměnu a použití informací o předchozím experimentování se zvířaty, aby se předešlo zbytečnému opakování pokusů. Používají se také matematické a počítačové modely.



Reduction zahrnuje postupy pro získání srovnatelných úrovní informací při použití minimálního počtu zvířat nebo pro získání validních informací z daného počtu zvířat. Je třeba vycházet ze statistických požadavků na průkaznost výsledků. Podhodnocení počtu zvířat může paradoxně vést k neprůkaznosti výsledků a nutnosti opakování celého pokusu, tedy vyšší potřebě zvířat.

Refinement zahrnuje metody, které snižují nebo minimalizují bolest a úzkost a zvyšují u zvířat pocit zdraví a celkové pohody (welfare). Bolest vyvolaná experimentálním zásahem je komplexním faktorem vyvolávajícím stres (stresorem). Lze ji do jisté míry eliminovat použitím anestetik a analgetik. Úzkost je stav, ve kterém zvíře není schopno kompenzovat zátěžové faktory (stresory). Refinement zahrnuje také kroky vedoucí k zajištění komfortu v daných podmínkách. V praxi se jedná zejména o obohacení stimulů (environmental enrichment).

Práce s laboratorními zvířaty podléhá **platné legislativě**. Přímá ochrana zvířat je zajištěna zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. Aktuální znění je dáno zákonem č. 359/2012 Sb. ze dne 19. září 2012, kterým se mění zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, zákon č. 634/2004 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů, a zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů. Na základě zákona č. 246/1992 Sb. je zřizována Odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat.

Účelem zákona je chránit zvířata, jež jsou živými tvory schopnými pociťovat bolest a utrpení, před týráním, poškozováním jejich zdraví a jejich usmrcením bez důvodu, pokud byly způsobeny, byť i z nedbalosti, člověkem.

Pokusným zvířetem se rozumí živý obratlovec, s výjimkou člověka, včetně samostatně se živících larválních forem a plodů savců od poslední třetiny jejich běžného vývoje, který je nebo má být použit k pokusům; za pokusné zvíře se považuje také zvíře, které je v ranějším stadiu vývoje, než je stadium samostatně se živících larválních forem a plodů savců od poslední třetiny jejich běžného vývoje, pokud má být zvířeti umožněno žít nad rámec tohoto stadia vývoje a v důsledku prováděných pokusů je pravděpodobné, že po dosažení tohoto stadia vývoje je postihne bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození. Za pokusné zvíře se považují také živí hlavonožci (§ 3 písm. j).

Pokusem se rozumí jakékoliv invazivní či neinvazivní použití zvířete pro pokusné nebo jiné vědecké účely se známým nebo neznámým výsledkem nebo pro vzdělávací účely, které může zvířeti způsobit bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození nejméně o intenzitě odpovídající vpichu jehly podle běžné veterinární praxe. Pokusem se rozumí rovněž jakýkoliv způsob jednání, který má nebo může vést k tomu, že se zvíře narodí nebo vylíhne nebo že vznikne a je zachována geneticky modifikovaná linie zvířete v takovém stavu; usmrcení zvířete pouze pro využití jeho orgánů nebo tkání se za pokus nepovažuje (§ 3 písm. t).

Pokusy lze provádět výhradně pro tyto účely:

- a) základní výzkum,
- b) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem (1) zabránit a předejít onemocnění, špatnému zdravotnímu stavu nebo jiným anomáliím nebo jejich následkům u lidí, zvířat nebo rostlin a diagnostikovat je nebo léčit, (2) posoudit, zjistit, regulovat nebo upravit fyziologické předpoklady lidí, zvířat nebo rostlin, nebo (3) zlepšit životní podmínky a podmínky produkce zvířat chovaných k zemědělským účelům,
- c) pro jakýkoliv z cílů uvedených v písmeni b) při vývoji, výrobě nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků, d) ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat,
- e) výzkum zaměřený na zachování druhů,
- f) vyšší vzdělávání nebo odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí,
- g) trestní řízení a jiné soudní řízení (§ 18).

Projektem pokusů se rozumí pracovní program s definovaným vědeckým cílem, jehož součástí je jeden nebo více pokusů (§ 3 písmene u).

Nikdo nesmí provést nebo nařídit provedení projektu pokusů nebo pokusu bez jeho předchozího schválení státním orgánem příslušným ke schvalování projektů pokusů. Pokusy smí uživatel pokusných zvířat provádět výhradně v rámci určitého schváleného projektu pokusů. Projekt pokusu musí být prováděn v souladu s rozhodnutím o schválení projektu pokusů (§ 16). Projekt pokusu je předkládán v každém případě, kdy se pro vědecké, vzdělávací nebo jiné účely plánuje využití laboratorních zvířat. Projekty pokusů schvaluje Odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat a předává je k vyjádření nadřízené odborné komisi.

Na úrovni plánování, vedení a provádění pokusů v ČR je nezbytné Osvědčení pro práci s laboratorními zvířaty, které vydává Ústřední komise na ochranu zvířat. Evropské osvědčení pro práci s laboratorními zvířaty vydává FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, <http://www.felasa.eu/>).

ČESKÁ REPUBLIKA
Ministerstvo zemědělství
vydává

Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektu pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů

Evidenční číslo osvědčení: **CZ 03436**

Titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení: _____

Datum a místo narození: _____

Název a adresa školicího pracoviště: **Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,**

Instituce celoživotního vzdělávání, Palackého tř. 1946/1, 602 00 Brno

Datum úspěšného složení zkoušky: **20.10.2017**

Toto osvědčení je platné do: **20.10.2024**

Podpis oprávněné úřední osoby Ministerstva zemědělství
a otisk úředního razítka Ministerstva zemědělství

ICLAS felasa
CERTIFICATE

has participated successfully in the intensive course on
RESEARCH, ANIMALS & WELFARE
held in Järnala, Latvia from 9-19 October 1999

This course followed the FELASA curriculum (Category C) for the training of scientific personnel, as acknowledged by the European Union and the Council of Europe, and aims at providing competence as "a person planning or performing animal experiments".

The Course included 80 hours of lectures, demonstrations, hands-on work and group work, on basic and applied laboratory animal science and a written examination.

Järnala, 19 October, 1999


 Professor Jean Marie
 Université Catholique de Louvain
 Brussels, Belgium
 Chairman Course Organisation Group


 Professor Vibe Rude
 University of Latvia
 Riga, Latvia
 President of FELASA
 Local organizer

Osvědčení umožňující práci s laboratorními zvířaty a jejich využití pro vědecké, vzdělávací a jiné účely

ŽÁDOST O SCHVÁLENÍ PROJEKTU POKUSŮ podle § 16a zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů		
IDENTIFIKAČNÍ ÚDAJE		
1. Název (případně evidenční číslo) projektu pokusů, studie, případně označení grantu		
2. Identifikační údaje uživatele pokusných zvířat		
Zadatel - název právnické osoby nebo jméno, popřípadě jména, a příjmení fyzické osoby, která provozuje zařízení		
IC, bylo-li přiděleno	Registrační číslo hospodářství ¹⁾	
Adresa sídla nebo místa podnikání žadatele (včetně PSČ)		
Adresa místa, kde hodlá vykonávat uživatel pokusných zvířat svoji činnost, včetně přesného umístění, názvu, případně jiného označení jednotlivých prostor, kde má být činnost prováděna; pokud má být na základě žádosti v rozhodnutí stanoveno, že je možno používat pokusná zvířata i mimo zařízení, uvede žadatel specifikaci místa, kde bude činnost prováděna, zejména zda bude činnost prováděna ve volné přírodě a na jakém území		
Statutární orgán žadatele - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení		
Osoba zmocněná k zastupování žadatele ve správním řízení ²⁾ - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení		
Adresa pro doručování		
Telefon	E-mail	Datová schránka
Číslo jednací a spisová značka rozhodnutí o udělení oprávnění k používání pokusných zvířat a doba jeho platnosti		
3. Seznam osob, které se na projektu pokusů podílejí		
Vedoucí projektu pokusů - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
Zástupce vedoucího projektu pokusů, je-li ustanoven - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
Osoba odpovědná za péči o pokusná zvířata - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
Určený veterinární lékař, příp. kvalifikovaný odborník - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení, u kvalifikovaného odborníka uveďte rovněž číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
Osoba, která řídí činnost odborné komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
Ostatní osoby - držitelé osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 nebo § 15d odst. 4 nebo § 15e odst. 2 zákona č. 246/1992 Sb.		
Zadatel prohlašuje, že všechny osoby podílející se na tomto projektu pokusů jsou odborně způsobilé podle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, k příslušné činnosti s pokusnými zvířaty - správnou variantu zaškrtněte (x) do prádního políčka		
☐ Ano ☐ Ne		

NAVRH PROJEKTU POKUSŮ	
4.	Účel plánovaných pokusů podle § 18 zákona č. 246/1992 Sb. - odpovídající zařazení zaškrtněte (x) do příslušného políčka a) základní výzkum b1) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem zabránit a předejít onemocnění, zlepšit zdravotní stavu nebo jiným anomáliím nebo jejich následkům u lidí, zvířat nebo rostlin a diagnostikovat je nebo léčit b2) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem posoudit, zjistit, regulovat nebo upravit fyziologické předpoklady lidí, zvířat nebo rostlin b3) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem zlepšit životní podmínky a podmínky produkce zvířat chovaných k zemědělským účelům c) jakýkoli z cílů uvedených v písmenu b) při vývoji, výrobě nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků d) ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat e) výzkum zaměřený na zachování druhů f) vyšší vzdělávání nebo odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí g) testování řízení a jiné soudní řízení
5.	Význam a zdůvodnění pokusů - podrobná charakteristika cílů studie s uvedením konkrétního očekávaného přínosu, včetně charakteristik aplikovaných látek, nebo zařazení látek do indikačních skupin
6.	Zdůvodnění výběru a používání pokusných zvířat, včetně jejich odhadovaného počtu, druhů a stadií vývoje
7.	Prohlášení žadatele o průkaz nezbytnosti pokusů nebo uvedení právního předpisu, který provedení pokusů ukládá, včetně zdůvodnění, proč nelze pokus na pokusném zvířeti nahradit alternativními metodami
8.	Zabránění případnému neodůvodněnému opakování pokusů - byl tento pokus na zvířatech již někdy v minulosti proveden? Pokud ano, odůvodněte, proč je nutné opakování; pokud ne, uveďte způsob, který jste použili pro ověření, že tento pokus nebyl dosud proveden
9.	Cinnost s pokusnými zvířaty Podrobný popis pokusů a činnosti s pokusnými zvířaty Časový plán jednotlivých fází pokusů na pokusných zvířatech včetně předpokládaného data jeho ukončení Pokusné nebo pozorovací strategie a statistický plán pro minimalizaci počtu pokusných zvířat, jejich bolesti, utrpení a strachu a případného dopadu na životní prostředí
10.	Navrhovaná klasifikace závažnosti pokusů - odpovídající zařazení zaškrtněte (x) do příslušného políčka; v pravé části řádek zdůvodněte Zvíře nenabude vědomí Mírné Střední Závažné
11.	Uplatnění metod v zájmu nahrazení a omezení používání pokusných zvířat a šetrného zacházení s nimi (3R) Nahrazení zvířat (Replacement) Omezení počtu zvířat (Reduction) Šetrné zacházení se zvířaty (Refinement)
12.	Plánované použití znečistivění, prostředků snižujících bolest nebo jiných metod tlumících bolest; zdůvodnění jejich případného nepoužití
13.	Hlavní operační vybavení, operační postupy a způsoby pooperační péče minimalizující bolest a stres zvířete
14.	Způsob naložení s pokusnými zvířaty po ukončení pokusu - usmrcení, převezení do chovu (jakého?), opětovné použití, při opětovném použití jeho kumulativní dopad na daná pokusná zvířata
15.	Metody usmrcování pokusných zvířat - odpovídající metody zaškrtněte (x) do příslušného políčka Předávkování anestetikem Upoutaný projekt Oxid uhličitý Zlomení vazů Tupý úder do hlavy

	Oddělení hlavy od trupu
	Osmkání elektrickým proudem
	Interní plyn (Ar, N ₂)
	Zastavení volným projektilem odpovídající střednou zbraní a střelivem
	Jiná metoda - žádost o udělení výjimky - níže zdůvodněte
16.	Původ pokusných zvířat - uveďte všechny předpokládání zdroje: u pokusných zvířat z volné přírody udičte co nej přesnější lokalitu (lokalitu) jejich odchytu
17.	Podmínky umístění a chovu pokusných zvířat a péče o ně včetně obohacení prostředí
18.	Způsob značení pokusných zvířat v pokusu
19.	Uvedení zdravotního rizika pro daňi pokusná zvířata a pro zaměstnance
20.	Pokus bude proveden za podmínek správné laboratorní praxe (je-li to požadováno jinými právními předpisy - např. zákon o léčivech, zákon o chemických látkách a chemických přípravcích) - správnou variantu zaškrtněte (x) do příslušného políčka Ano
21.	Datum Razítko a podpis žadatele Podpis vedoucího projektu pokusů

Poznámky:

- 1) § 2 písm. c) vyhlášky č. 136/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenníským zákonem, ve znění pozdějších předpisů.
- 2) Vyplní se jen v případě, je-li odlišná od statutárního orgánu.

Základní formulář projektu pokusů pro využití laboratorních zvířat pro vědecké, vzdělávací a jiné účely

Závěr, poznámky & komentáře

BUNĚČNÁ FYZIOLOGIE

Buněčný cyklus, proliferace

Úvod

Buňky jako základní funkční jednotky organismu procházejí mnohonásobným dělením (proliferují). Časování a řízení proliferace je založeno na specifických mechanismech buněčného cyklu (Nobelova cena za fyziologii/medicínu 2001), které zajišťují souslednost jednotlivých fází cyklu. V první fázi (G1) buněčného cyklu buňka zvětšuje svůj objem, dále dochází k syntéze (replikaci) DNA (S fáze), následuje přípravná fáze na dělení (G2) a nakonec buňka podstupuje mitózu (M fáze). Kontrolní body jsou umístěny v G1/S (G1 kontrolní bod), G2/M (G2 kontrolní bod) a v metafázi (M kontrolní bod). Každý krok buněčného cyklu zahrnuje aktivaci řady molekul. Jako markery se označují molekuly typické pro danou fázi.

Nejběžnějším **markerem proliferace** je PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), který se uplatňuje při replikaci DNA. Dalším používaným markerem je Ki67 (product of the MK167 gene), který má proti PCNA kratší poločas rozpadu. Oba markery jsou vhodné pro výzkumné i diagnostické účely. Jedna z běžně používaných detekčních metod je imunohistochemie umožňující průkaz těchto markerů *in situ* (tj. v místě jejich působení).

Cíle

- Zhodnocení životního cyklu buněk tkání s rychlou obnovou (například tenké střevo)
- Identifikace jednotlivých buněčných typů
- Lokalizace zóny proliferace, diferenciací a apoptózy
- Imunohistochemická detekce markerů proliferace
- Vyhodnocení výsledků a zhodnocení buněčného cyklu v tenkém střevě

Metody

Příprava vzorků

- ✓ Odběr tkáně, fixace, dehydratace, zalití do bločku (návaznost na cvičení z histologie)

Imunohistochemie

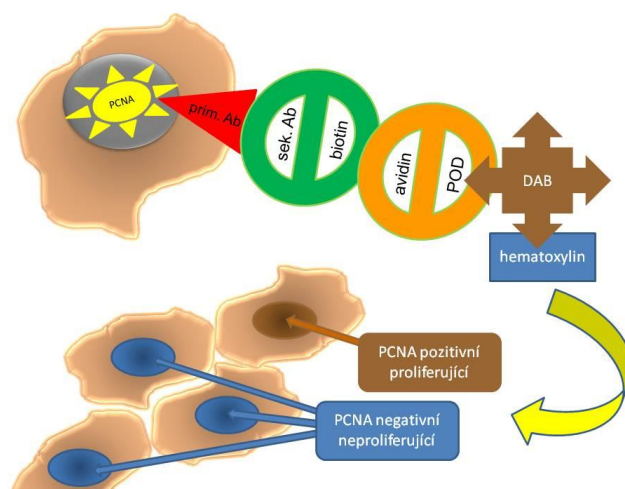
➤ 1. část: reakce antigen-protilátka

- ✓ Histologické řezy odparafinovat v xylenu a zavodnit sestupnou etanolovou řadou
- ✓ Aplikovat předpůsobení (revitalizace antigenů), je-li nutné
- ✓ Promýt 3×PBS (Phosphate Buffered Saline)
- ✓ Inhibovat endogenní peroxidázu peroxidem vodíku v PBS
- ✓ Promýt 3×PBS
- ✓ Aplikovat primární protilátku ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě, 30–60 min
- ✓ Promýt 3×PBS

➤ 2. část: vizualizace

- ✓ Aplikovat sekundární protilátku ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě, 30 min
- ✓ Promýt 3×PBS
- ✓ Aplikovat komplex streptavidin/avidin-POD (peroxidáza) ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě, 30 min
- ✓ Promýt 3×PBS
- ✓ Aplikovat chromogenní substrát (sledovat intenzitu hnědého zbarvení pozitivních jader pod mikroskopem!)
- ✓ Promýt destilovanou vodou
- ✓ Provést protibarvení hematoxylinem (5 min hematoxylin, 10 min tekoucí voda)
- ✓ Odvodnit, zamontovat, vyhodnotit

Při použití biotinylované primární protilátky se vynechává krok aplikace sekundární protilátky.

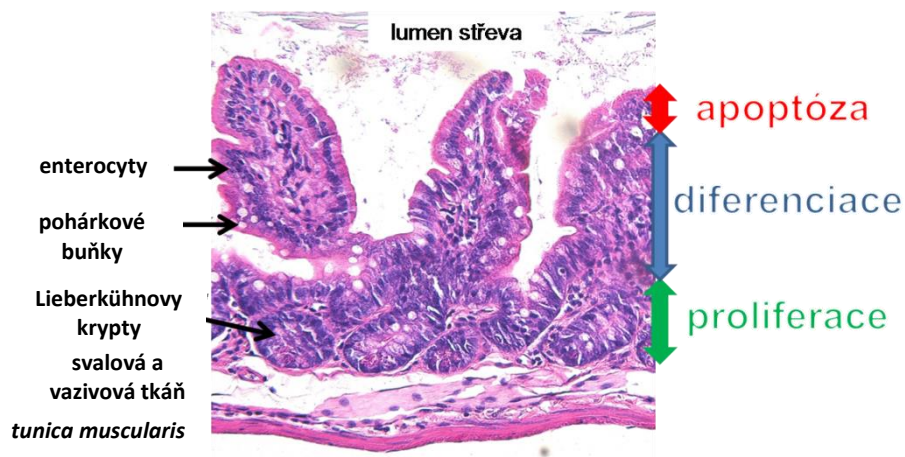


Přehled kroků víceetapové imunohistochemické metody

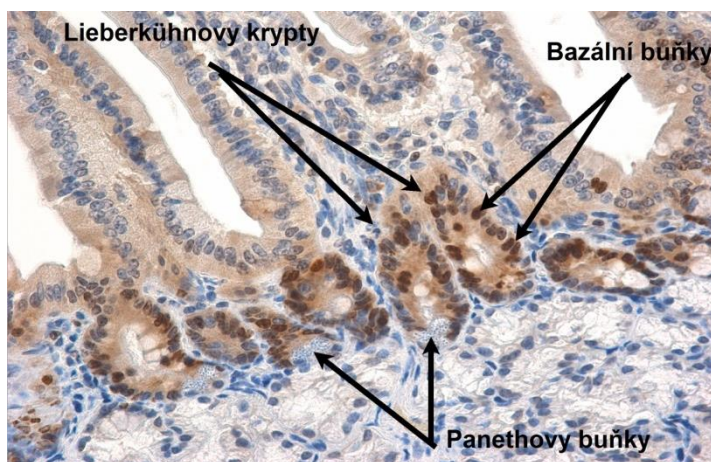
Vysvětlivky: Ab = protilátka, POD = peroxidáza, DAB = diaminobenzidin, PCNA = proliferating cell nuclear antigen.

Výsledky

- Identifikace buněk tenkého střeva a jejich funkce, zhodnocení životního cyklu



- Vyhodnocení proliferace jednotlivých typů buněk tenkého střeva na základě imunohistochemického značení (PCNA pozitivní buňky mají hnědá jádra, negativní modrá)



Výsledek imunohistochemické detekce proliferace

- Vyjádření proliferační aktivity v %

	Celkový počet hodnocených buněk	Počet PCNA pozitivních buněk	% PCNA pozitivních buněk
Enterocyty			
Panethovy buňky			
Buňky v jedné kryptě			
Bazální buňky			

Diskuse

Imunohistochemická reakce je založena na kompatibilitě antigenu a protilátky. Antigen (**antibody generating**) je každá cizorodá látka, která dokáže vyvolat specifickou imunitní odpověď, na jejímž konci je tvorba protilátek. Této skutečnosti, že proti každému tkáňovému antigenu lze vyrobit protilátku, se využívá ve výzkumu i diagnostice. Možných způsobů je několik – od injekce antigenu do těla králíka, myši, kozy nebo dalšího živočišného druhu a odběru protilátek z krevního séra, až po přípravu protilátek v kulturách hybridomů a jejich odběr z kultivačního média.

PCNA se účastní topologického propojení mezi DNA a DNA polymerázou při replikaci (DNA clump). Z toho je zřejmé, že tento protein je lokalizován v jádře (nuclear), kde dochází k replikaci a dosahuje nejvyšší hladiny během S fáze buněčného cyklu. Kromě syntézy DNA je PCNA protein důležitý i při opravách DNA (DNA repair).

Procento proliferujících buněk v dané tkáni charakterizuje její proliferační aktivitu. Hodnocení je také důležitou součástí analýzy tkání z hlediska obnovy a je součástí vyšetření některých zhoubných nádorů (karcinomů). Vysoká buněčnost (celularita), vysoký proliferační index, infiltrativní růst (prostoupení tkáně nádorovými buňkami bez jejího ničení) a nekrózy jsou obecně považovány za markery agresivního chování nádorů. Tuto metodu lze využít také pro hodnocení růstu explantátů v orgánových kulturách.

Při použití popsaného systému jsou jádra PCNA pozitivních buněk hnědá (reakce POD a DAB), negativních buněk modrá (dobarvení hematoxylinem). PBS používaný k promývání vzorků je izotonickým roztokem pro živočišné buňky s vybalancovaným zastoupením sodných a draselných kationtů, které odpovídají situaci *in vivo*. Tento roztok je proto vhodný pro práci s buňkami, tkáněmi i orgány mimo organismus.

Hybridom je buněčná linie odvozená z buněčného hybridu vzniklého fúzí buněk, z nichž jedna je nádorová.

Závěr, poznámky & komentáře

Homeostaze na úrovni buněk

Úvod

Homeostaze živých organismů představuje dynamicky stabilní vnitřní prostředí, které je nezbytnou podmínkou pro jejich fyziologické funkce, i když se vnější podmínky mění. Vhodné simulace různých prostředí pro volné buňky umožňuje přímé hodnocení následků změny vnějšího prostředí na interiér buněk, jeho účinky na buněčné membrány a další funkční aspekty. Pro demonstraci byl vybrán detergent (například Septonex), alkohol (například etanol) a dále hypotonické a hypertonické prostředí. Jako kontrolní prostředí lze využít izotonický fyziologický roztok. Morfologicky nejlépe patrný je účinek změny vnějšího prostředí u bezjaderných buněk, například savčích erytrocytů.

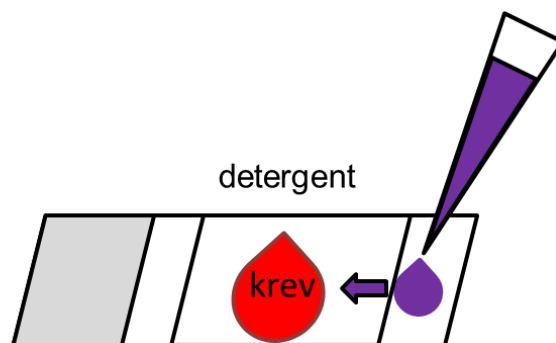
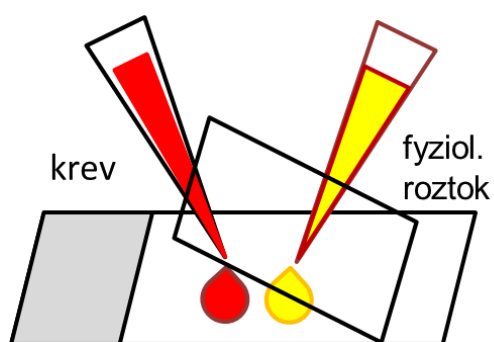
Cíle

- Sledování účinku různých prostředí na živočišné buňky (savčí erytrocyty), dynamické pozorování změn pod mikroskopem
- Sledování účinku Septonexu
- Sledování účinku etanolu
- Sledování účinku různě osmoticky aktivních prostředí

Metody

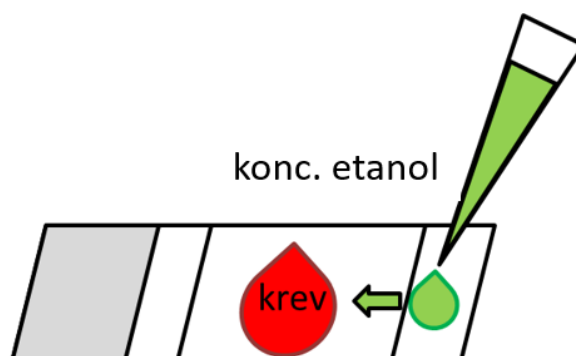
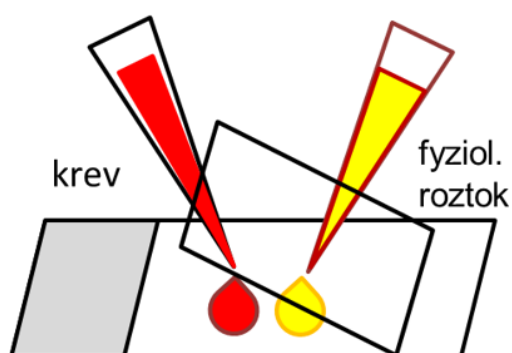
Účinek detergentu na živočišné buňky

- ✓ Kontrolní vzorek: na podložní sklo kápnout kapku čerstvé krve stabilizované heparinem a stejný objem PBS, překrýt krycím sklem, pozorovat pod mikroskopem
- ✓ Experimentální vzorek: kapku krve překrýt krycím sklem, umístit do mikroskopu, k hraně krycího skla kápnout Septonex, pozorovat účinek na buňky při pronikání Septonexu pod krycí sklo



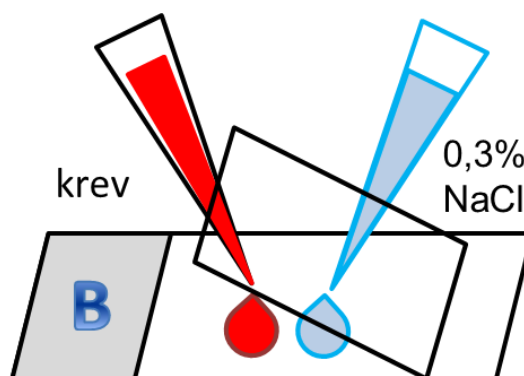
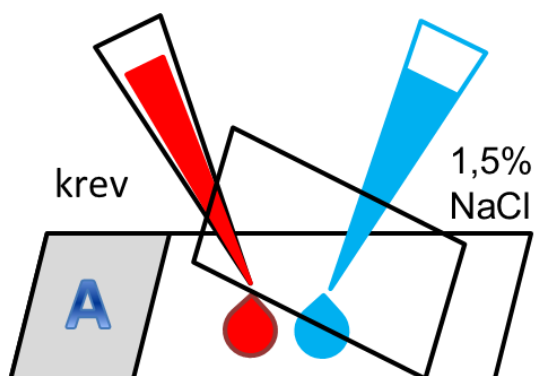
Účinek etanolu na živočišné buňky

- ✓ Kontrolní vzorek: na podložní sklo kápnout kapku čerstvé krve stabilizované heparinem a stejný objem PBS, přikrýt krycím sklem, pozorovat pod mikroskopem
- ✓ Experimentální vzorek: kapku krve přikrýt krycím sklem, umístit do mikroskopu, k hraně krycího skla kápnout koncentrovaný etanol, pozorovat účinek etanolu na buňky při pronikání etanolu pod krycí sklo



Osmotická aktivita prostředí buněk

- ✓ Kontrolní vzorek: na podložní sklo kápnout krev a stejný objem PBS, přikrýt krycím sklem, pozorovat pod mikroskopem
- ✓ Experimentální vzorek A: na podložní sklo kápnout krev a stejný objem 1,5% NaCl, přikrýt krycím sklem, pozorovat pod mikroskopem
- ✓ Experimentální vzorek B: na podložní sklo kápnout krev a stejný objem 0,3% NaCl, přikrýt krycím sklem, pozorovat pod mikroskopem



Výsledky

- Popis pozorovaných jevů
 - Účinek detergentu:
 - Účinek etanolu:
 - Účinek osmotické aktivity prostředí:

Diskuse

Detergent je schopen snižovat povrchové napětí molekul tekutin, interfáze dvou tekutin nebo rozhraní tekutiny a pevné látky. Účinek na buňky představuje destabilizaci cytoplazmatických membrán. Následkem je uvolnění intracelulárních složek do prostředí a tím snížení objemu (velikosti) buňky. **Etanol** váže vodu, čímž dochází ke snížení objemu buněk. Následek je tedy obdobný účinku detergentu, ale mechanismus působení je odlišný. Ke snížení objemu buněk dochází také v **hypertonickém prostředí**, kdy vlivem osmotického tlaku na polopropustnou cytoplazmatickou membránu přecházejí molekuly rozpouštědla (vody) do extracelulárního prostředí. Opačný účinek je zřetelný v **hypotonickém prostředí**, kdy se voda vlivem osmotického tlaku dostává do intracelulárního prostoru a dochází ke zvětšení objemu buňky. Tlak na cytoplazmatickou membránu je do určité míry kompenzován, pak dojde k její destrukci a uvolnění intracelulárního obsahu do okolí (lýza buněk, v případě erytrocytů erytrolýza nebo hemolýza) – viz také téma Osmotická rezistence erytrocytů. Fyziologický roztok NaCl používaný u kontrolních vzorků představuje **izotonické prostředí**.

Tonicita krve je osmotický tlak roztoku proti krevní plazmě,
izotonicita = 1 (tzn. osmotický tlak roztoku = osmotickému tlaku krevní plazmy),
hypertonicita >1 (tzn. osmotický tlak roztoku je vyšší než osmotický tlak krevní plazmy),
hypotonicita <1 (tzn. osmotický tlak roztoku je nižší než osmotický tlak krevní plazmy).

Závěr, poznámky & komentáře

Alternativní metody, orgánové explantátové kultury

Úvod

Jednou z alternativních metod používaných nejenom v experimentální fyziologii jsou **orgánové explantátové kultury**. Umožňují zachování buněčných interakcí, sledování buněčných komunikací a signálů na autokrinní (látka/signál produkováný buňkou ovlivňuje buňku samotnou) a parakrinní (látka/signál produkováný buňkou ovlivňuje buňky v bezprostředním okolí) úrovni a také cílené modulace mimo vlastní organismus.

Propojení buněčné a molekulární fyziologie s biomedicínskými aplikacemi je založeno na funkčních experimentech, které vycházejí ze zvířecích, především myších modelů. Myší explantátové kultury jsou často používaným systémem **respektujícím principy 3R**, a to zejména díky své velikosti umožňující snadnou difuzi živného média. Na druhou stranu je nezbytné zvládnutí technik mikromanipulace pro přípravu takových kultur a jejich další modifikace. Explantátové kultury jsou proto připravovány s využitím stereoskopického mikroskopu za dodržení podmínek maximální sterility z důvodu eliminace rizika kontaminace.

Explantáty jsou kultivovány na plastových miskách, které obsahují nosnou mřížku a kultivační terčíky zajišťující optimální rozhraní mezi živným médiem a CO₂ atmosférou, což simuluje fyziologickou situaci v organismu.

Cíle

- **Příprava explantátových kultur**
 - ✓ Odběr orgánu (tkáně) pro kultivaci na příkladu myších orgánových kultur
 - ✓ Příprava kultivačního média a kultivační misky
- **Kultivace explantátů**
 - Umístění explantátů a jejich kultivace

Metody

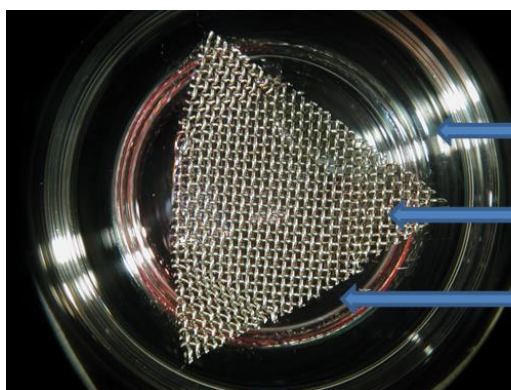
Disekce orgánu pro založení explantátové kultury

- ✓ Práce v co nejsterilnějších podmínkách (ošetření pracovní plochy 70% etanolem, sterilní nástroje, rukavice, případně rouška, ideálně práce v laminárním boxu)
- ✓ Veškerá manipulace probíhá v kultivačním médiu (prevence vysychání tkání a oxidačního stresu buněk)
- ✓ Na manipulaci s myšími orgány se vzhledem k jejich velikosti využívají mikrochirurgické nástroje (návlek mikrochirurgických technik a manipulace pod stereoskopem)



Příprava kultivační misky

- ✓ Kultivace myších explantátů probíhá ve Falcon miskách se střední jamkou.
 - Vnější obvod je vyplněn navlhčeným filtračním papírem (nejlépe pufr + antibiotika)
 - Vnitřní jamka je překryta podpůrnou mřížkou, na kterou se umísťuje kultivační terčík s explantátem a která je poté převrstvena médiem



Prostor pro zvlhčený filtrační papír

Podpůrná mřížka

Prostor pro kultivační médium

Kultivační miska pro myší explantátové kultury

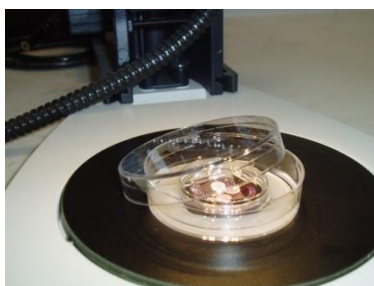
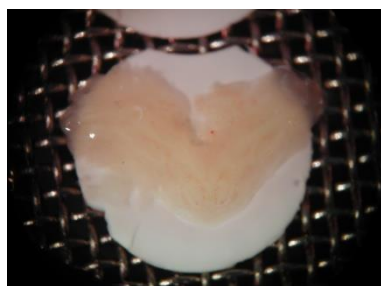
Příprava kultivačního média

- ✓ Nejběžnějším kultivačním médiem je DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ošetřené antibiotiky (penicilin/streptomycin), obohacené L-Glu a 10% FBS (fetálním bovinním sérem). Červenou barvu média způsobuje přidaná fenolová červeň, která slouží jako indikátor změn pH.



Umístění a kultivace explantátů

- ✓ Explantáty jsou v uzavřených miskách kultivovány v CO₂ inkubátoru
- ✓ Základní kultivační podmínky zahrnují atmosféru 5% CO₂ a teplotu 37°C



Umístění explantátu na kultivační terčík, do kultivační misky a do CO₂ inkubátoru

Výsledky

- Disekovaný orgán umístěný na kultivační terčík v požadované orientaci
- Odpovídající převrstvení médiem (rozhraní živin a CO₂ atmosféry)
- Fotodokumentace explantátu
- Umístění misky s explantáty do CO₂ termostatu

Diskuse

Explantáty mohou být také cíleně manipulovány, a to řadou způsobů na úrovni genomu, transkriptomu i proteomu. Používanými technikami jsou zejména elektroporace (působení elektrického pole umožní vstup DNA do cílové buňky) DNA konstruktů, RNA interference (Nobelova cena za fyziologii/medicínu 2006), implantace proteinových nosičů, ale také různé (například heterotypické, heterochronické) rekombinace epiteliálních a mezenchymálních částí zubních základů. Explantáty lze kultivovat ve standardní CO₂ atmosféře po dobu několika dnů, případně dále například v ledvinné kapsle (hostitelské dospělé myši).

Genom je soubor všech molekul DNA nebo RNA (jen u RNA-virů) organismu, které se vyznačují replikací a dědí se na potomstvo.

Replikace je tvorba replik (kopií) molekul nukleových kyselin zajišťující přenos genetické informace z DNA do DNA nebo z RNA do RNA.

Transkriptom je soubor všech molekul RNA vznikajících transkripcí (přepisem DNA do RNA) genomu a jejich posttranskripčními úpravami.

Proteom je soubor všech proteinů, jejich interakcí a funkčních vztahů kódovaných genomem buněk a virů.

Závěr, poznámky & komentáře

KREV

Krevní plazma

Suspenzní stabilita krve

Úvod

Krev představuje suspenzi krevních elementů v krevní plazmě. Krevní plazma je tekutina zbavená buněčných krevních elementů při zachovalé koncentraci v ní obsažených proteinů a dalších látek. Stabilita, tedy rovnoměrnost rozložení elementů, této suspenze je klíčová pro funkce krve. Suspenzní stabilita krve je zajištěna negativními náboji na erytrocytech (membránové sialoproteiny), což zamezuje přilnutí (adhezi) erytrocytů k sobě navzájem, a dále negativním nábojem membrány endotelových buněk, což zabraňuje adhezi erytrocytů na stěny krevních cév. Negativní náboje jsou kompenzovány plazmatickými proteiny. Dynamika počtu erytrocytů a koncentrace proteinů je tedy pro suspenzní stabilitu zásadní.

Sedimentace erytrocytů (ESR – Erythrocyte Sedimentation Rate) představuje metodu, s jejíž pomocí lze kvantifikovat a hodnotit suspenzní stabilitu krve. Jedná se o metodu založenou na měření rychlosti (v mm/h), kterou sedimentují buněčné krevní elementy ke dnu sedimentační kolony. Odečítá se horní hranice sedimentovaných erytrocytů za určitý čas.

Cíle

- Stanovení sedimentace u vybraných zvířecích druhů
- Srovnání výsledků s referenčními hodnotami
- Diskuse

Metody

Příprava vzorků

- ✓ Odběr krve a její stabilizace (1 díl 3,8% citrátu sodného ku 4 dílům plné krve)

Naplnění sedimentační kolony

- ✓ Klasická Fåhræus-Westergrenova kolona:
 - Naplnění rezervoáru po rysku

- Fixace kapiláry a rezervoáru (závitem)
- Vytlačení krve po nulovou hodnotu
- Umístění kolony kolmo na vodorovnou pracovní desku laboratorního stolu



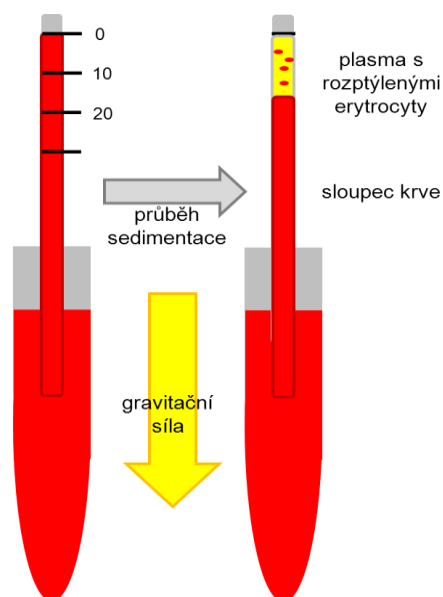
✓ Jednorázové kolony:

- Odběr krve přímo do zkumavky s citrátem sodným nebo umístění vzorku mezi rysky
- Vytlačení krve po nulovou hodnotu
- Umístění kolony do držáku v kolmé poloze



Výsledky

Sledování průběhu sedimentace, odečítání míry poklesu sloupce erytrocytů v intervalech 15, 30 a 60 min.



Záznam sedimentační rychlosti

Vzorek krve (druh zvířete)	15 min [mm]	30 min [mm]	60 min [mm]
Kůň			
Skot			

Srovnání výsledku s referenčními hodnotami

Druh	Čas [h]			
	0,5 [mm]	1 [mm]	2 [mm]	24 [mm]
Kočka	1,5	3	6	25
Skot	0,5	1	2	12
Pes	1	2	4	15
Kůň	63	69	71	74
Prase	2	5	10	45
Ovce	0,25	0,5	1	8

Podle Jelínka a Koudely et al. (2003)

Diskuse

Sedimentace je založena na principu gravitační síly, která způsobuje klesání erytrocytů, majících vyšší hustotu, krevní plazmou, která má nižší hustotu. Je závislá na počtu krevních buněk a vlastnostech jejich povrchu (velikosti jejich elektrického náboje). Sedimentaci usnadňuje penízkovatění erytrocytů (rouleaux efekt), ke kterému v koloně dochází.

Sedimentační rychlost je nepřímo úměrná suspenzní stabilitě krve. Zvýšená sedimentace indikuje nerovnováhu mezi krevními buněčnými elementy a krevní plazmou. Nejčastějšími příčinami zvýšené sedimentace krevních buněčných elementů je nárůst frakce proteinů krevní plazmy v souvislosti se zánětovou a obecně imunitní reakcí (například imunoglobulinů, tj. protilátek, proteinů akutní fáze zánětu atd.) a zvýšená degradace proteinů v organismu. Zvýšená hladina uvedených plazmatických proteinů kompenzuje negativní náboje erytrocytů, které pak více k sobě adherují a rychleji sedimentují. Sedimentační rychlost je rozdílná u jednotlivých zvířecích druhů a je také závislá na pohlaví.

Termínem plná krev se označuje odebraná krev, ale nezpracovaná na jednotlivé složky.

Krevní plazma je tekutá složka krve bez buněčných elementů, která se pro laboratorní analýzy získává šetrnou centrifugací plné krve s antikoagulačním prostředkem co nejdříve po odběru krve.

Krevní sérum je rovněž tekutá složka krve bez buněčných elementů, vzniká ale po vysrážení plné krve a následným odstraněním krevní sraženiny (koagula) centrifugací. Na rozdíl od krevní plazmy neobsahuje fibrinogen a další proteinové koagulační faktory krve.

Rouleaux (ruló) efekt se fyziologicky vyskytuje u koní, mají proto vysokou sedimentaci erytrocytů.

Z hlediska laboratorní diagnostiky je sedimentace erytrocytů nespecifická metoda (test) která je vhodná pro orientační skríníng zejména zánětových onemocnění.

Závěr, poznámky & komentáře

Funkce a separace plazmatických proteinů

Úvod

Plazmatické proteiny jsou součástí organického profilu krevní plazmy. Patří mezi ně zejména albuminy (prealbumin, albumin), globuliny (α -, β -, γ -) a fibrinogen. Funkce plazmatických proteinů jsou mj. transportní, zásobní, dále se uplatňují jako koagulační faktory a protilátky, podílejí se na onkotickém tlaku, udržování suspenzní stability krve, některé jsou antioxidanty atd.

Jednou z metod pro detekci a separaci plazmatických proteinů je **elektroforéza** krevní plazmy, případně krevního séra. Jedná se o semikvantitativní metodu založenou na oddělení proteinů v gelu působením elektrického pole na základě jejich velikosti a náboje.

Zastoupení jednotlivých typů proteinů závisí na živočišném druhu a jeho zdravotním stavu.

Cíle

- Separace krevní plazmy/séra ze vzorku krve vybraných živočišných druhů
- Separace proteinů gelovou elektroforézou
- Identifikace proteinových frakcí a jejich funkce
- Mezidruhové srovnání
- Diskuse

Metody

Příprava vzorků

- ✓ Odběr séra po koagulaci krevního vzorku
- ✓ Odběr plazmy z krve odebrané na antikoagulans

Nanesení vzorků na gel

- ✓ Na nosič aplikovat 120 μ l destilované vody
- ✓ Vyjmout elektroforetický gel z ochranného obalu, osušit jej filtračním papírem
- ✓ Fixace pozice gelu
- ✓ Do jamek aplikátoru napipetovat vzorky o objemu 10 μ l
- ✓ Odlomit ochranný rámeček zoubků aplikátoru

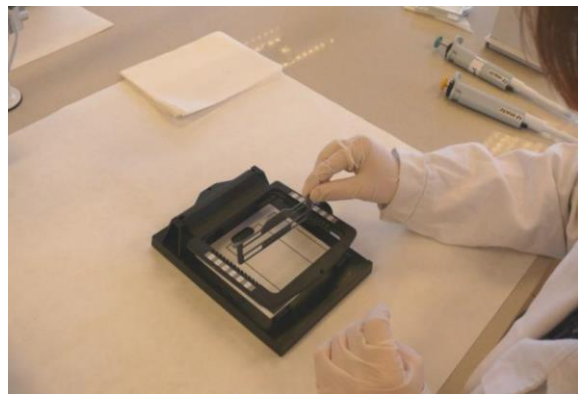
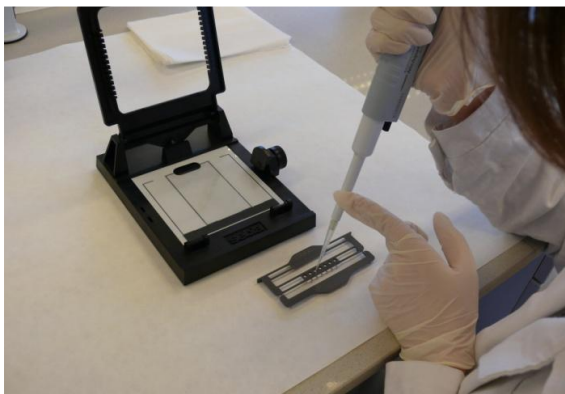
- ✓ Umístit aplikátor na nosič do pozice 5
- ✓ Odaretováním nosiče otisknout vzorky z aplikátoru na povrch gelu v nosiči, nechat je difundovat 40 s
- ✓ Vyjmout aplikátor z nosiče
- ✓ Gel obsahující vzorky vyjmout z nosiče

Elektroforéza

- ✓ Umístit gel do elektroforetické vany s tris-barbitalovým pufrem (orientace podle směru elektrického proudu)
- ✓ Uzavřít vanu a nastavit napětí 90 V na 22 min

Fixace a barvení gelu (proteinů)

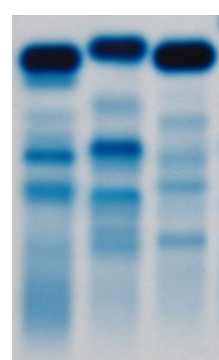
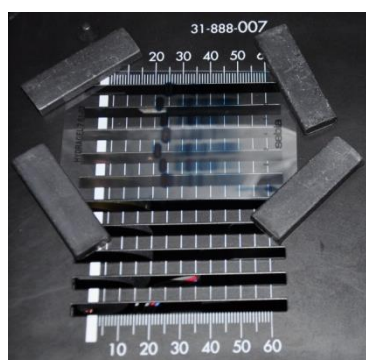
- ✓ Vysušit v desikátoru (10 min/80 °C)
- ✓ Obarvit amidočerní (4 min)
- ✓ Promýt ve 3 nádobách s odbarvovacím roztokem kyseliny citronové
- ✓ Vysušení gelu v desikátoru (1 min)



Pipetování vzorků do jamek aplikátoru a umístění aplikátoru do nosiče

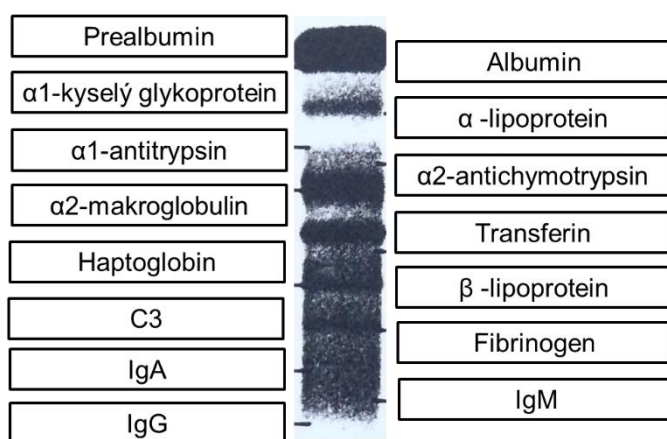
Výsledky

Nabarvený elektroforetický gel se separovanými proteiny



Elektroforetické zařízení pro separaci proteinů, upevnění gelu, výsledek

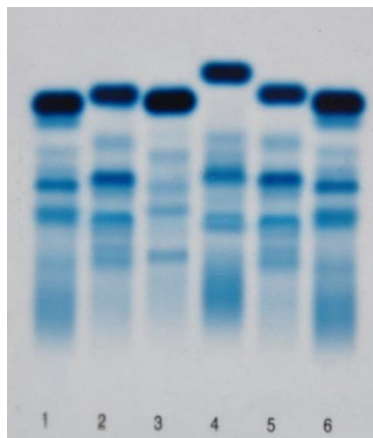
Identifikace proteinových frakcí



15 základních proteinových frakcí krevní plazmy

Vysvětlivky: C3 = frakce 3 komplementu, Ig = imunoglobuliny

Mezidruhové srovnání výsledků



*Separované proteinové frakce u vybraných živočišných druhů
(vzorek 1, 6 – kůň, 2, 5 – pes, 3 – králík, 4 – kočka)*

Diskuse

Elektroforéza je separační metoda využívající schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic závisí na jejich velikosti, povrchovém elektrickém náboji, tvaru molekuly a také koncentraci v roztoku. Elektroforetický gel je trojrozměrná síť, kterou putují proteiny k elektrodě s opačnou polaritou. Malé molekuly putují rychleji než velké, jsou tedy identifikovatelné blíže elektrody s opačnou polaritou. Při použití markerů (proteinů o známé velikosti) lze identifikaci jednotlivých frakcí ještě zpřesnit.

Pro další specifikace se využívá 2D elektroforéza, kapilární elektroforéza a další modifikace. Jednoduchá separace proteinů je orientační metodou.

V krevní plazmě je obsaženo několik stovek plazmatických proteinů. Syntetizovány jsou hlavně hepatocyty a potom plazmatickými buňkami (protilátky) aj. Degradovány jsou v játrech a mononukleárním fagocytárním systému. Zajišťují řadu **funkcí**:

- albuminy: transport látek (některých hormonů, vápníku, mastných kyselin, bilirubinu, antibiotik aj.), udržování onkotického tlaku, mají funkci nutriční a některé z nich funkci zásobní atd.,
- globuliny: součást imunitního systému (imunoglobuliny), transport mikroprvků, některých hormonů, některé jsou proteiny (reaktanty) akutní fáze zánětu (snižují poškození vyvolané zánětem, podílejí se na regeneraci poškozené tkáně atd.),
- fibrinogen: patří mezi srážecí faktory krve (faktor I, FI), je i proteinem akutní fáze zánětu.

Onkotický tlak krve je vytvářen plazmatickými proteiny a vyjadřuje vztah krevní plazmy k intersticiální tekutině.

Komplement je soubor několika desítek glykoproteinů, většinou se nacházejících v krvi, kde jsou v neaktivním stavu. Aby se uplatnily, musí být aktivovány (například protilátkami).

Závěr, poznámky & komentáře

Erytrocytární komplex

Funkce erytrocytů, jejich podíl v celkovém objemu krve

Úvod

Krev je suspenze plazmy a krevních elementů, z nichž největší početní i objemový podíl zaujímají erytrocyty (RBC, Red Blood Cell). Podíl erytrocytů v určitém objemu krve (v 1 l) se označuje poněkud nepřesně jako hematokrit (Ht, HCT) nebo také PCV (Packed Cell Volume). Jednotkou je tedy l/l, ale v klinické praxi se jednotka neuvádí nebo se používá %. Hematokrit patří mezi důležité parametry vyšetření krve, protože na výši jeho hodnoty přímo závisí funkce krve. Hematokrit lze stanovit přímým měřením nebo výpočtem. Pro přímé stanovení se využívá klasický (Wintrobův) hematokrit nebo mikrohematokrit. Mikrohematokritová metoda umožňuje stanovení hematokritu i z velmi malého objemu krve, lze ji tedy snadno aplikovat i u (pokusných) drobných savců.

Cíle

- Určení hematokritové hodnoty u vybraných živočišných druhů
- Mezidruhové srovnání výsledků
- Diskuse

Metody

Mikrohematokrit

- ✓ Naplnění hematokritové kapiláry krví ošetřenou antikoagulačním činidlem (EDTA, případně heparin) nebo při přímém odběru použít heparinizovanou kapiláru
- ✓ Na jednom konci zaslepit kapiláru
- ✓ Vložit kapiláru (zaslepeným koncem vně) do hematokritové centrifugy, uzavřít víko
- ✓ Provést centrifugaci 3-5 min při 10 000-15 000 g

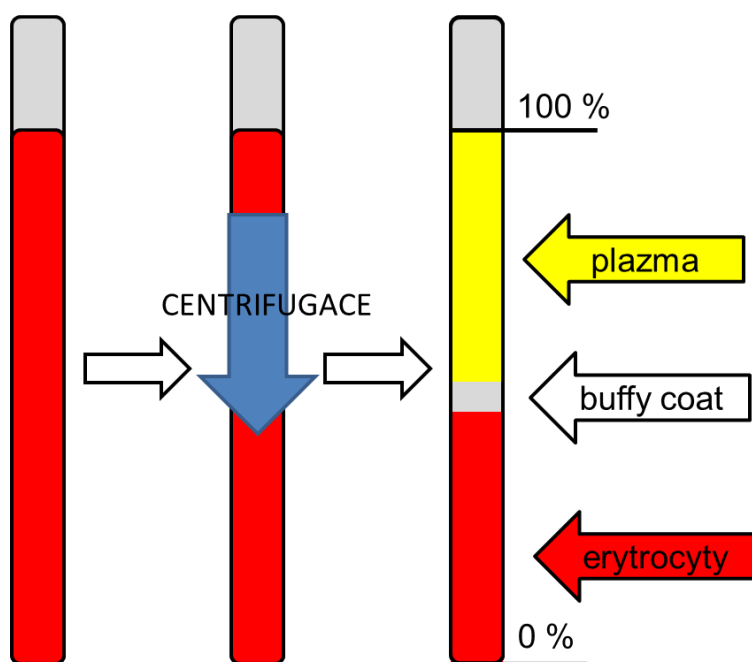


Hematokritová centrifuga

Výsledky

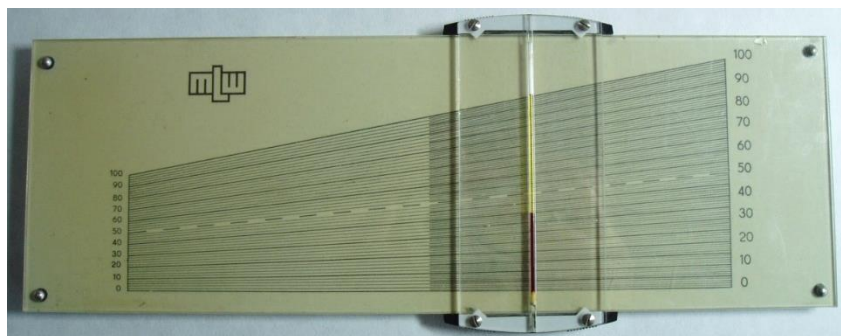
Hodnocení hematokritu

Po ukončení centrifugace jsou u zdravého zvířete v mikrohematokritové kapiláře okem patrné dvě frakce, erytrocyty a krevní plazma, které jsou odděleny tenkou vrstvou leukocytů a trombocytů označovanou jako buffy coat (tato frakce ale není ve vzorku krve ze zdravého zvířete prostým okem vidět).



Odečtení hematokritové hodnoty

Mikrohematokritové kapiláry nemají vyznačenou číselnou stupnici, proto se používají posuvná čtecí měřítka, která navíc umožňují uzpůsobení odečítání výchozímu objemu krve (sloupec vzorku se umísťuje mezi čísla 0 a 100).



Posuvné čtecí měřítko s mikrohematokritovou kapilárou po centrifugaci

Pro přesný výsledek bychom měli odečtenou hodnotu hematokritu násobit koeficientem 0,98, neboť ve sloupci erytrocytů zůstává i po uvedené centrifugaci malé množství plazmy (asi 2 %).

Živočišný druh	Mikrohematokritová hodnota

Mezidruhové srovnání hematokritu [l/l] s referenčními hodnotami

Pes	Kočka	Kůň	Skot	Ovce	Koza	Prase	Králík*
0,35- 0,52	0,22- 0,38	0,32- 0,52	0,30- 0,38	0,27- 0,45	0,22- 0,38	0,32- 0,50	0,33- 0,48

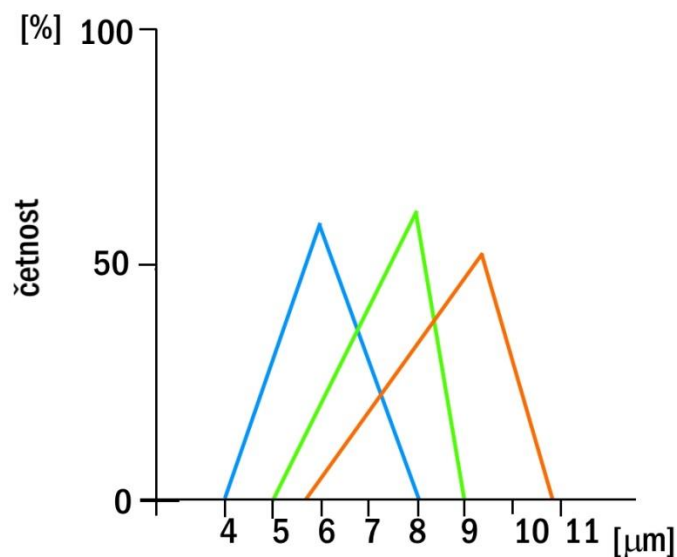
*Podle Doubka et al. (2014), * podle Knotka et. al. (2017)*

Diskuse

V mikrohematokritové kapiláře jsou po centrifugaci vrstvy: dole **erytrocyty**, nad nimi tenká vrstva leukocytů a trombocytů, označovaná **buffy coat**, a nahoře **krevní plazma**. Mikrohematokritové kapiláry nemají vyznačenou číselnou stupnici, proto se používají posuvná čtecí měřítka.

Hodnota hematokritu závisí na počtu erytrocytů a jejich velikosti (ta je vyjádřena středním objemem erytrocytu (MCV, Mean Cell Volume). Násobkem těchto dvou hodnot lze stanovit tzv. kalkulovaný hematokrit, používaný v automatizované hematologii.

Velikost erytrocytů je rozdílná nejen mezidruhově, ale i interindividuálně. Tento jev se označuje anizocytóza erytrocytů a je vyjádřen Priceovou-Jonesovou křivkou.



Priceova-Jonesova křivka
(při mikrocytóze, při normocytóze, při makrocytóze)

Ta zobrazuje pík v oblasti normocytů a pokles počtu směrem k mikrocytům (nižší MCV) a makrocytům (vyšší MCV). Podle velikosti erytrocytů se klasifikují anémie na mikrocytární, normocytární a makrocytární.

Hematokritová hodnota vyjadřuje podíl erytrocytů v 1 l plné krve. Na její výši závisí především transportní funkce krve (transport O_2 a CO_2). Hodnota Ht závisí na živočišném druhu, respektive plemeni (vyšší hodnoty u některých plemen psů a koní). Vyšší hodnoty jsou také u samců – samčí pohlavní hormon testosteron stimuluje tvorbu erytropoetinu (je uvolňován hlavně z ledvin a méně pak také z jater) a tím zvyšuje počet erytrocytů a tedy i hodnotu hematokritu. Samičí pohlavní hormony – estrogeny působí naopak inhibičně. Hematokrit je ovlivněn také parciálním tlakem kyslíku (pO_2) ve vdechovaném vzduchu (klesá se stoupající nadmořskou výškou) nebo v organismu. Pokles pO_2 syntézu erytropoetinu stimuluje. V organismu vyvolávají pokles pO_2 také hormony stimulující metabolismus, vedle androgenů (testosteronu) to jsou hormony štítné žlázy (trijodtyronin a tyroxin), růstový hormon (somatotropin) z adenohypofýzy, kortizol z kůry nadledvin aj.

Na proporci mezi krevní plazmou a buněčnými krevními elementy má také vliv stupeň hydratace organismu – při dehydrataci je hematokrit relativně zvýšen a kromě toho se uplatňuje i deficit kyslíku v důsledku zhoršeného prokrvení tkání a orgánů (kvůli zvýšené viskozitě krve). K deficitu kyslíku v organismu dochází také například při nahromadění tekutiny (propotku – transudátu při poruchách cirkulace nebo výpotku – exsudátu při zánětech) v dutině břišní nebo hrudní, což vede ke stlačování plic a tím ke ztíženému dýchání. Na hodnotu hematokritu má vliv i metabolismus železa. Při jeho nedostatku se nacházejí v krevním oběhu mikrocyty.

Zvýšení hematokritu (hemokoncentrace) může mít následky v nedostatečné funkci orgánů – zejména srdce, ledvin a plic. Extrémní zvýšení hematokritu (například při krevním doping) může být fatální.

Anémie je onemocnění červené krevní řady, při němž je rozhodující snížená hladina hemoglobinu v periferní krvi pod dolní hranici referenčního rozmezí daného druhu zvířete.

Anémie bývá doprovázena i snížením absolutního počtu erytrocytů a/nebo hodnoty hematokritu.

V klinických projevech dominuje anemický syndrom (bledost nepigmentované kůže a sliznic, slabost, únava, zrychlená činnost srdeční, dušnost aj.). U hemolytických anémií bývá ikterus (žloutenka) nepigmentované kůže a sliznic v důsledku imbibice tkání bilirubinem, vznikajícím při destrukci erytrocytů.

Anémie vznikají při snížené krvetvorbě (erytropoéze), při zvýšených ztrátách krve včetně zvýšené destrukce erytrocytů.

Závěr, poznámky & komentáře

Funkce erytrocytů, jejich počet v objemu krve

Úvod

Počet erytrocytů v objemu krve je základním fyziologickým parametrem. Na počtu erytrocytů v objemu krve závisí hematokritová hodnota (viz výše).

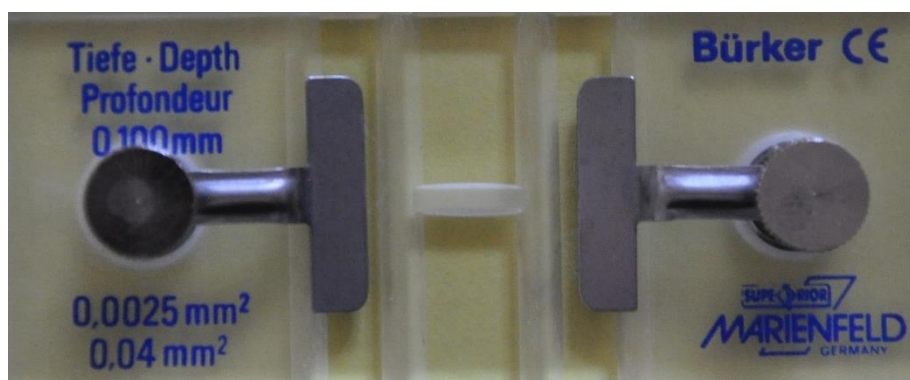
Stanovení počtu erytrocytů lze provádět automaticky s využitím hematologických analyzátorů, ale i manuálně. K manuálnímu stanovení se používá Bürkerova komůrka. Tato komůrka má přesně dané rozměry, které jsou na ní uvedeny a vymezují plochy/objemy na počítání jakýchkoliv buněk. Erytrocyty se vzhledem k vysokému počtu v objemu krve počítají v malých čtvercích nebo obdélnících komůrky a normativně se používá 200× ředěná krev. K ředění slouží Hayemův roztok. Tento roztok je mírně hypertonický a v něm obsažený sublimát (HgCl_2) fixuje erytrocyty a eliminuje leukocyty.

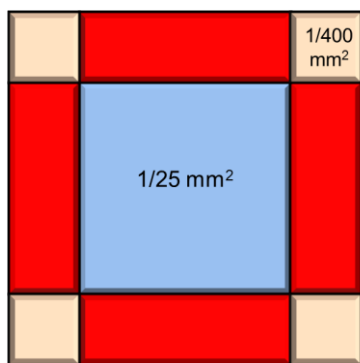
Cíle

- Seznámení s Bürkerovou komůrkou
- Určení počtu erytrocytů v objemu krve vybraných živočišných druhů
- Mezidruhové zhodnocení a srovnání s referenčními hodnotami
- Diskuse

Metody

Využití Bürkerovy komůrky





Bürkerova komůrka je tvořena opakujícími se obrazci, základní obrazec sestává z geometrických útvarů: centrálního čtverce, přilehlých obdélníků a rohových malých čtverců.

Na podložním skle Bürkerovy komůrky jsou udány hodnoty 0,04 mm² (tj. 1/25 mm²), 0,0025 mm² (tj. 1/400 mm²) a 1/10 mm. Tato čísla vyjadřují v mm² plochu centrálního a malého čtverce a hloubku komůrky v mm. Na základě uvedených čísel lze snadno dopočítat objemy jednotlivých geometrických útvarů, se kterými se pracuje při vlastním výpočtu.

Příprava vzorku

- ✓ Naředit 25 µl stabilizované krve Hayemovým roztokem do celkového objemu 5 000 µl
- ✓ Promíchat a nechat 2 min stát

Plnění Bürkerovy komůrky

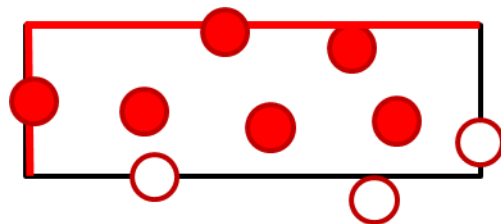
- ✓ Na komůrku umístit krycí sklo, jemně zafixovat
- ✓ Jemně promíchat vzorek, kapku umístit k hraně krycího skla – kapilárními silami dojde k přesunu tekutiny pod sklo
- ✓ Pevně zafixovat držák krycího skla
- ✓ Kontrola pod mikroskopem – vzorek musí být rovnoměrně rozptýlen a nesmějí být přítomny vzduchové bubliny

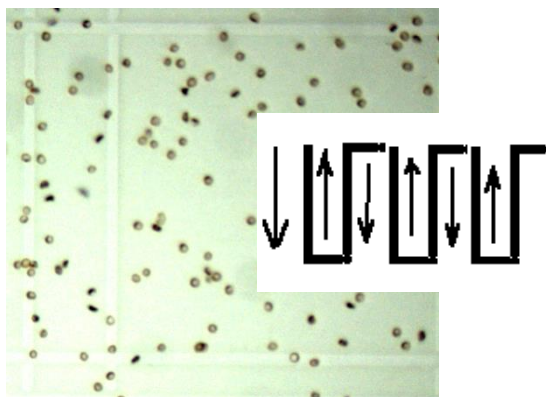
Počítání erytrocytů

- ✓ Počítat při zvětšení minimálně 200×, nejlépe 400× (tzn. objektiv 40)
- ✓ Prohlížet vzorek meandrovitým způsobem (žádný objekt se nesmí počítat vícekrát)

Dodržovat **Bürkerovo pravidlo** o hraničních čarách:

- Vybrat dvě na sebe kolmé strany útvaru, ve kterém jsou buňky počítány
 - Do celkového počtu buněk uvnitř útvaru započítat ty, co leží na nebo se dotýkají těchto dvou stran
 - Nezapočítat buňky, které leží na, nebo se dotýkají zbývajících dvou stran
- ✓ Spočítat buňky v 80 malých čtvercích nebo ve 20 obdélnících (obdélníky mají 4× větší obsah než malé čtverce, proto ve 20)





Erythrocyty v Bürkerově komůrce, postup prohlížení

Výsledky

Stanovení počtu erytrocytů v objemu krve

- ✓ Kalkulace počtu erytrocytů v objemu původního (neředěného) vzorku krve

Příklad:

- V 80 malých čtvercích bylo nalezeno 800 erytrocytů
- Objem jednoho čtverce vyplývá z údajů na Bürkerově komůrce: obsah $1/400 \text{ mm}^2$, hloubka $1/10 \text{ mm}$, tzn. objem $1/4000 \text{ mm}^3$
- Celkový objem geometrických útvarů, ve kterých byly erytrocyty počítány: $80 \times 1/4000 \text{ mm}^3 = 1/50 \text{ mm}^3$
- V 1 mm^3 je tedy $50 \times$ více erytrocytů, tzn. 800×50
- Vzorek byl ředěn $200 \times$, v neředěném původním vzorku je tedy $200 \times$ více erytrocytů, tzn. $800 \times 50 \times 200$
- Vyjádření v objemu 1 litr ($1 \text{ l} = 10^6 \text{ mm}^3$): $800 \times 50 \times 200 \times 10^6$
- V 1 l vyšetřovaného vzorku krve je 8×10^{12} erytrocytů

- ✓ Kalkulace a vyjádření počtu erytrocytů v 1 l původního (neředěného) vzorku krve:

Živočišný druh	Počet erytrocytů/l krve

Mezidruhové srovnání počtu erytrocytů [$\times 10^{12}/\text{l}$] s referenčními hodnotami

Pes	Kočka	Kůň	Skot	Ovce	Koza	Prase	Králík*
5,2-7,9	4,9-9,8	6,9-13,1	5,0-7,0	9,0-15,0	8,0-18,0	5,0-8,0	4,2-7,0

*Podle Doubka et al. (2014), * podle Knotka et. al. (2017)*

Diskuse

Počet erytrocytů v objemu krve zdravého zvířete závisí na jeho druhu, pohlaví a věku (mláďata vs. dospělá). Pohlavní rozdíly jsou dány účinkem pohlavních hormonů na syntézu erytropoetinu, testosteron má účinek stimulační, estrogeny inhibiční. Evolučně je tento rozdíl dán zřejmě obecně vyšší svalovou hmotou a nároky na kyslík u samců. Relativně snížený počet erytrocytů mají mláďata (štěňata nebo koťata do 3 měsíců věku), dále se vyskytuje v poslední třetině gravidity a u dojnic s vysokou laktací, kdy se zvyšuje podíl krevní plazmy (krev se zředí – hemodiluce), aby byl zajištěn dostatečný průtok krve tkáněmi. Počet erytrocytů ovlivňuje parciální tlak kyslíku (pO_2), ať již v prostředí nebo v organismu. Při jeho poklesu dochází ke stimulaci erytropoézy v kostní dřeni.

Nárůst počtu erytrocytů nad fyziologickou hranici (referenční rozmezí) se označuje erythrocytemie/erythrocytóza (což jsou zřídka užívané termíny, v klinické hematologii se užívá termín polycytemie), pokles erythrocytopenie (zase méně často používaný termín, v klinické hematologii oligocytemie). Onemocnění, jehož jedním ze základních znaků může být snížený počet erytrocytů spojený s nízkou koncentrací hemoglobinu, se nazývá **anémie**. Anémie vznikají při poruchách erytropoézy, dále ze zvýšených ztrát krve včetně zvýšené destrukce erythrocytů (viz výše). Je třeba si uvědomit, že bezprostředně po ztrátě krve (například při úrazu) je počet erythrocytů nezměněný, neboť erythrocyty a krevní plazma se ztrácejí ve stejném poměru a obnova krve ještě nenastala. Při mírné anémii nebývá snížený pO_2 obvykle stimulem pro zvýšenou syntézu erythropoetinu.

Referenční hodnoty jsou hodnoty laboratorního vyšetření získané za uplatnění standardních metod, mezi nimiž leží většina naměřených hodnot (95 % výsledků) souboru jedinců s definovaným zdravím. Pojem referenční hodnota jednoznačně nahradil pojem normální hodnota, neboť nelze přesně vymezit hranici mezi zdravým a nemocným jedincem a výsledky laboratorního vyšetření jsou ovlivňovány fyziologickými odchylkami, rozdílnými podmínkami a postupy uplatněnými při vyšetření.

Závěr, poznámky & komentáře

Osmotická rezistence erytrocytů

Úvod

K hodnocení osmotické rezistence buněk lze využít **test osmotické rezistence (fragility) erytrocytů**. Cytoplazmatická membrána erytrocytů je velmi flexibilní, protože erytrocyty musejí procházet i tenkými kapilárami. Této funkci napomáhá i bezjadernost savčích erytrocytů, která kromě zvýšení povrchu pro vazbu kyslíku a snížení oxidativního metabolismu umožňuje zvýšenou reverzibilní **deformabilitu** erytrocytů. Flexibilita membrány erytrocytů závisí na její struktuře. Testuje se rezistence membrány erytrocytů proti změněnému osmotickému tlaku okolního prostředí. Využívá se hypotonického prostředí, tzn. jeho osmotický tlak je nižší než osmotický tlak krevní plazmy. V hypotonickém prostředí vstupuje rozpouštědlo (voda) do buněk a jejich rostoucí objem zvyšuje tlak na cytoplazmatickou membránu. Po dosažení tlaku, který vyvolá destrukci membrány, dochází k uvolnění intracelulárního obsahu erytrocytů do okolního prostředí, což se označuje **erytrolýza**, respektive **hemolýza**.

Cíle

- Určení koncentrace NaCl, která způsobuje lýzu erytrocytů vlivem změny osmotického tlaku
- Určení minimální a maximální osmotické rezistence erytrocytů
- Porovnání výsledků s referenčními hodnotami, mezidruhové srovnání
- Diskuse

Metody

Příprava gradientu hypotonického prostředí

- ✓ Připravit sérii roztoků NaCl s klesající koncentrací smícháním zásobního roztoku (1% NaCl a destilované vody, dH₂O)

Číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6
1% NaCl [ml]	8	7	6	5	4	3
dH ₂ O [ml]	2	3	4	5	6	7
NaCl [%]	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3

- ✓ Do každé zkumavky přidat dvě kapky krve a jemně promíchat
- ✓ Nechat stát 30 min
- ✓ Provést čtecí zkoušku
 - Je-li přes zkumavku jasně čitelný text, došlo k úplné hemolýze, je-li text hůře čitelný, hemolýza je částečná, je-li nečitelný, k hemolýze nedošlo.

Hodnocení osmotické rezistence

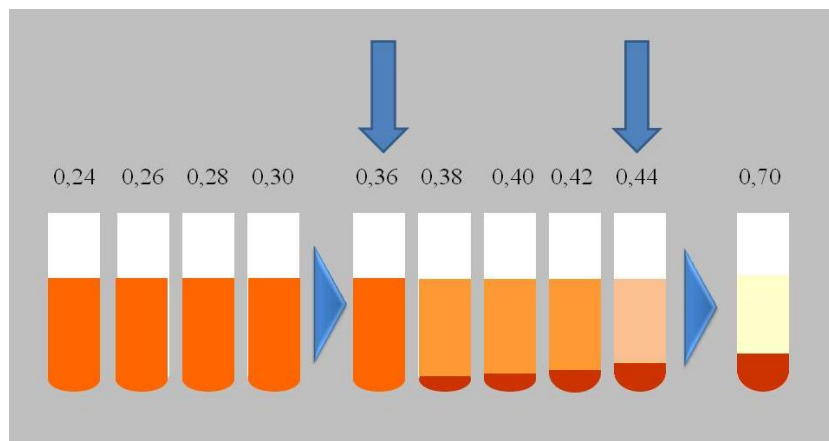
A. Praktické cvičení



B. V klinicko-laboratorní praxi se používají normativní testy osmotické rezistence, například:

- (1) do aglutinačních zkumavek se pipetuje hypotonický roztok s koncentrací 0,24 až 0,70% NaCl (2,4 g/l až 7,0 g/l),
- (2) do každé zkumavky se přidá 25 μ l venózní krve odebrané na antikoagulační prostředek (K₃EDTA aj.) a stojan se zkumavkami se šetrně protřepe,
- (3) hodnocení: při počáteční hemolýze má hypotonický roztok nad sedimentovanými erytrocyty načervenalou barvu = **minimální osmotická rezistence**, při úplné hemolýze je ve zkumavce sloupec hypotonického roztoku souvisle zbarven červeně (hodnotí se

srovnáním s kontrolou), chybí sediment erytrocytů (na dně zkumavky jsou pouze jejich stromata) = **maximální osmotická rezistence**



Zkumavka s koncentrací NaCl 0,44 % = minimální osmotická rezistence, zkumavka s koncentrací NaCl 0,36 % = maximální osmotická rezistence, 0,44 až 0,36 = rezistenční šíře (rezistenční interval).

Výsledky

Testovaný krevní vzorek (živočišný druh):

(1) Koncentrace NaCl způsobující částečnou hemolýzu:

Koncentrace NaCl způsobující úplnou hemolýzu:

(2) Minimální osmotická rezistence erytrocytů:

Maximální osmotická rezistence erytrocytů:

Porovnání výsledků s referenčními hodnotami, mezidruhové srovnání

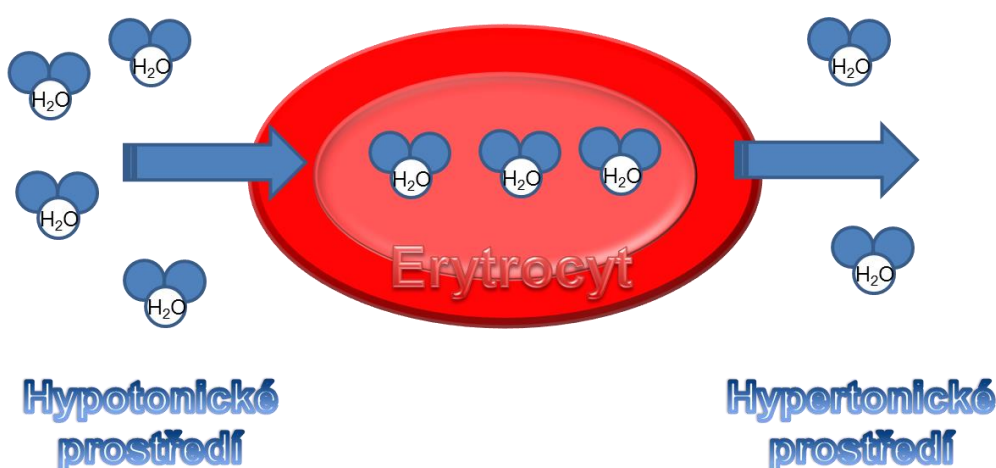
Druh	Osmotická rezistence	
	minimální [% NaCl]	maximální [% NaCl]
Pes	0,40-0,50	0,32-0,42
Kočka	0,66-0,72	0,46-0,54
Skot	0,52-0,66	0,44-0,52
Ovce	0,58-0,76	0,40-0,55
Koza	0,74	0,44
Prase	0,70	0,45

Podle Jainové, cit. Doubek et al. (2003)

Diskuse

Minimální osmotická rezistence odpovídá počátku hemolýzy (slabá hemolýza). Je to koncentrace NaCl, při které je nad sedimentem erytrocytů světle červená tekutina. **Maximální osmotická rezistence** odpovídá úplné hemolýze. Je to koncentrace NaCl, při které je nad vrstvičkou erytrocytárního stromatu červená tekutina. Rozdíl mezi maximální a minimální osmotickou rezistencí se označuje **rezistenční šíře (rezistenční interval)**.

Roztok NaCl o koncentraci 0,85-0,90 %, neboli fyziologický roztok NaCl, je pro savčí buňky izotonickým prostředím, stejně jako krevní plazma. Nižší koncentrace představují prostředí hypotonické. V tomto prostředí se molekuly rozpouštědla (vody) pohybují směrem do buňky, tj. do kompartmentu s vyšším osmotickým tlakem (transport na základě koncentračního gradientu) a objem buňky se zvětšuje. Při dosažení hranice rezistence buňka praská a její obsah se vlévá do okolního prostředí. Dochází k cytolýze. Je-li buňkou erytrocyt, označuje se tento děj **hemolýza** (erytolyza). Dochází přitom k uvolnění hemoglobinu, fragmenty buněk klesají ke dnu testovací zkumavky a obsah zkumavky se stává průhledným. Pokud k hemolýze nedojde, erytrocyty zůstávají rozptýlené a znemožňují čtení textu. Vyšší koncentrace představují prostředí hypertonické, molekuly rozpouštědla (vody) se tedy pohybují směrem ven z buňky a objem buňky se zmenšuje.



Snížená osmotická rezistence je spojena s defekty erytrocytů (zejména membrány), ke kterým dochází při anémiích, které se označují hemolytické.

Osmotický tlak roztoku proti krevní plazmě je vyjádřen termínem tonicita (viz výše).

Závěr, poznámky & komentář

Počet retikulocytů

Úvod

Retikulocyt je klinicko-hematologické označení pro vývojový stupeň erytrocytu, označovaný proerytrocyt. Je to bezjaderné stadium erytrocytu, mající malý (reziduální) obsah RNA (ribozomy) a zbytky dalších organel. Ribozomální RNA je uspořádána do zrněk a vláken, tvořících síťovinu, retikulum – odtud také označení retikulocyt. Tato struktura se označuje *substantia granulofilamentosa*. Je viditelná supravitálním barvením, například brilantkrezylovou modří nebo novou metylenovou modří. Vyšetření retikulocytů slouží k posouzení stupně erytropoézy.

Supravitální barvení znamená, že se barvivo smíchá s krví ještě před zhotovením krevního nátěru.

Cíle

- Příprava směsi vzorku krve vybraných druhů zvířat a barviva
- Supravitální barvení krevního preparátu
- Identifikace retikulocytů mikroskopicky u vybraných druhů zvířat
- Vyhodnotit retikulocyty z 1000 erytrocytů
- Mezidruhové srovnání
- Diskuse

Metody

Připravit trvalý krevní preparát s brilantkrezylovou modří

- Smíchat EDTA krev s 0,1% roztokem brilantkrezylové modří (1 díl krve + 1 díl barviva)
- Nechat 20 min inkubovat při laboratorní teplotě
- Zhotovit nátěr

Mikroskopie

- ✓ Umístit preparát do mikroskopu, objektiv 100× (celkové zvětšení 1000×) s využitím imerzního oleje

- ✓ Vyhodnotit 1000 erytrocytů v 5 náhodně vybraných zorných polích s hustotou 200 erytrocytů/zorné pole (zv. 1000×) do 1 h. Získané výsledky slouží k výpočtu následujících parametrů:

Počet retikulocytů v 1 l krve =

$$\frac{\text{retikulocyty (v \%)} \times \text{počet erytrocytů/l krve}}{100}$$

Retikulocytární index (RI) =

$$\frac{\text{retikulocyty (v \%)} \times \text{Ht}_{\text{zjištěný}} \text{ (v \%)}}{\text{Ht}_{\text{referenční}} \text{ (v \%)}}$$

nebo

$$\frac{\text{retikulocyty (v \%)} \times \text{Hb}_{\text{zjištěný}}}{\text{Hb}_{\text{referenční}}}$$

Retikulocytární produkční index (RPI) =

$$\frac{\text{retikulocyty (v \%)} \times \text{Ht}_{\text{zjištěný}} \text{ (v \%)}}{\text{doba zrání v perif. krvi (dny)} \times \text{Ht}_{\text{referenční}} \text{ (v \%)}}$$

Vysvětlivky: Ht = hematokrit, Hb = hemoglobin

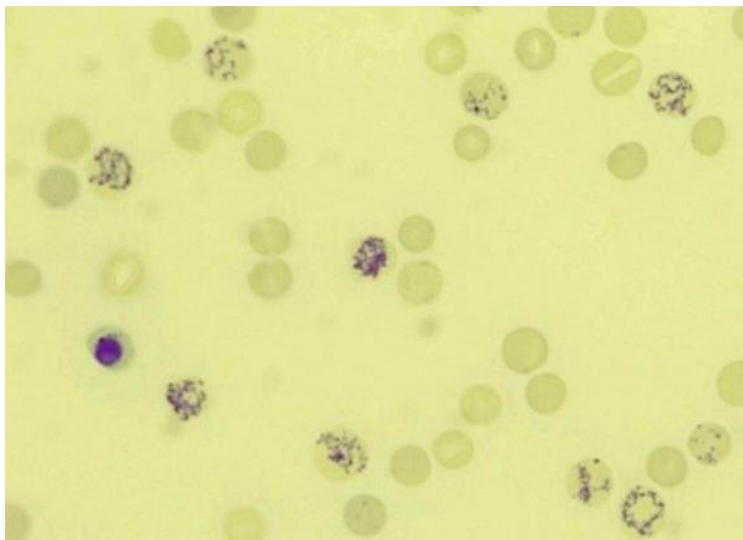
Doba zrání retikulocytů v periferní krvi psa nebo kočky při hodnotě Ht 45 % = 1 den, při Ht 35 % = 1,5 dne, při Ht 25 % = 2 dny, při hodnotách Ht mezi uvedenými body je doba určena trojčlenkou.

Výsledky

Trvalý krevní preparát (použita brilantkryzolová modř)



Identifikace buněk: mikroskopické určení retikulocytů, zhodnocení jejich morfologie (použita brilantkrezyllová modř)



Na obrázku 10 retikulocytů, 1 erytroblast (vlevo)

Výpočty

Druh zvířete	Počet retikulocytů/ 1 l krve	RI	RPI

Mezidruhové srovnání počtu retikulocytů [$\times 10^9/l$] s referenčními hodnotami

Pes	Kočka
do 90	do 60

Podle Klinické laboratoře pro malá zvířata FVL VFU Brno (2018)

Diskuse

Retikulocyty jsou vývojový stupeň erytrocytů těsně po vypuzení (enukleari) jádra. Signálem pro vypuzení jádra je změna metabolické aktivity buňky. Vývoj retikulocytu trvá za fyziologických podmínek asi 4-5 dní. Dalším, konečným vývojovým stupněm, je erytrocyt (denně je produkováno u zdravého jedince 2×10^{11} erytrocytů). Fyziologicky zvýšený počet retikulocytů mají novorozená mláďata. Retikulocyty mají proteosyntetickou aktivitu – ještě v nich probíhá syntéza hemoglobinu.

V ribozomech retikulocytů přetrvává obsah RNA. RNA se prokazuje barvením brilantkrezyllovou modří nebo novou metylenovou modří: barvivo pronikne do buňky a RNA je potom viditelná jako síťovitá nebo tečkovitá tmavě modře zbarvená struktura, označovaná *substantia granulofilamentosa*. U zralejších retikulocytů je tato substance řidší. Retikulocyty se identifikují mikroskopicky za použití imerze. Stanovuje se jejich podíl v 1000 erytrocytech,

ten pak slouží ke stanovení jejich počtu v 1 litru krve. Výpovědní hodnotu tohoto ukazatele lze zpřesnit výpočtem retikulocytárního indexu (s kalkulací hematokritu nebo hemoglobinu) či retikulocytárního produkčního indexu, který kalkuluje s dobou zrání retikulocytů.

Vyšetření periferní krve na retikulocyty je cenným diagnostickým testem pro hodnocení anémií u psů a koček. Při regenerativní anémii, na rozdíl od neregenerativní, je průkaz vyššího počtu retikulocytů – je vyšší regenerační odezva kostní dřeně. Mezi regenerativní anémie patří například anémie z rozpadu erytrocytů (hemolytické) nebo anémie ze ztrát krve (posthemoragické).

Závěr, poznámky & komentáře

Indexy červeného krevního obrazu

Úvod

Krevní obraz představuje běžné skrínigové vyšetření. Jeho základními součástmi týkajícími se červené krevní řady jsou počet erytrocytů v objemu krve, hematokrit, koncentrace hemoglobinu v objemu krve. Z těchto hodnot lze vypočítat **indexy červeného krevního obrazu**.

Tyto parametry zahrnují střední objem erytrocytu (MCV, Mean Corpuscular/Cell Volume), střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH, Mean Corpuscular/Cell Hemoglobin), střední koncentraci hemoglobinu v erytrocytech/erytrocytární mase (MCHC, Mean Corpuscular/Cell Hemoglobin Concentration), případně distribuční šíři erytrocytů podle MCV (RDW, Red Corpuscular/Cell Distribution Width) nebo střední průměr erytrocytu (MCD, Mean Corpuscular/Cell Diameter).

Cíle

- Výpočet indexů krevního obrazu u vybraných živočišných druhů
- Mezidruhové srovnání a porovnání s referenčními hodnotami
- Vztah indexů krevního obrazu k fyziologickým funkcím krve
- Diskuse

Metody

Výpočtové vztahy

- ✓ **Střední objem erytrocytu (MCV)** se udává ve femtolitrech [fl, femto = 10^{-15}] a vypočítá se z hematokritu a počtu erytrocytů v 1 litru krve:

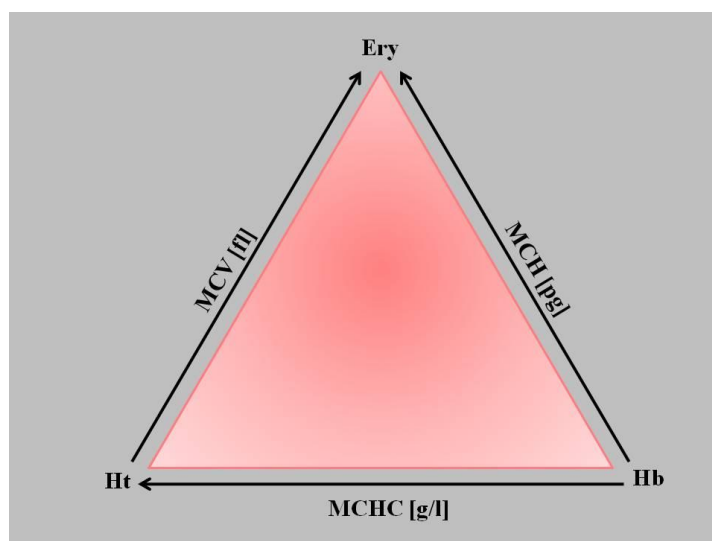
$$\frac{\text{hematokrit [l/l]} \times 1000}{\text{počet erytrocytů [10}^{12}\text{/l]}}$$

- ✓ **Střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH)** se udává v pikogramech [pg, piko = 10^{-12}] a vypočítá se z obsahu hemoglobinu v objemu krve a počtu erytrocytů v 1 litru krve:

$$\frac{\text{hemoglobin [g/l]}}{\text{počet erytrocytů [10}^{12}\text{/l]}}$$

- ✓ **Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC)** se udává v gramech na 1 litr [g/l] a vypočítá se z obsahu hemoglobinu v objemu krve a hematokritu.

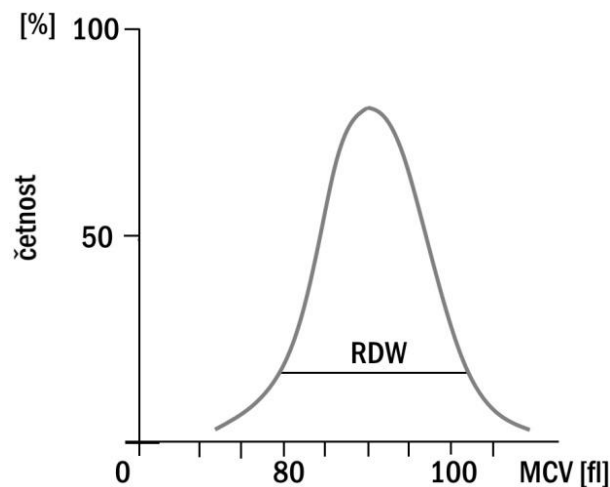
$$\frac{\text{hemoglobin [g/l]}}{\text{hematokrit [l/l]}}$$



Vysvětlivky: Ery = erytrocyty, Ht = hematokrit, Hb = hemoglobin, ostatní viz text

- ✓ **Šíře distribuce erytrocytů** vyjadřuje šíři hlavní populace erytrocytů v jejich histogramu podle MCV.

- ✓ **Histogram erytrocytů podle MCV** vyjadřuje závislost středního objemu erytrocytů (MCV) na jejich četnosti.



Histogram erytrocytů

Vysvětlivky: RDW = šíře distribuce erytrocytů (Red Cell Distribution Width)

Výsledky

Výpočet indexů červeného krevního obrazu u sledovaného vzorku

Příklad:

Hematokrit = 0,32 l/l

Hemoglobin = 111 g/l

Počet erytrocytů = $3,49 \times 10^{12}/l$

- ✓ MCV:
- ✓ MCH:
- ✓ MCHC:

Mezidruhové rozdíly indexů krevního obrazu

	MCV [fl]	MCH [pg]	MCHC [g/l]
Pes	605-71	22-26	344-381
Kočka	30-435	12-17	332-390
Kůň	36-57	12-20	319-392
Skot	40-60	11-17	300-360
Ovce	28-40	8-12	310-340
Koza	16-25	5-8	300-360
Prase	50-68	12-30	300-340
Králík	50-75	17-23	270-340

Podle Doubka et al. (2003, 2010, 2014)

Diskuse

V klinické praxi se vyskytují nejčastěji z indexů červeného krevního obrazu odchylky MCV a MCHC.

Snížený MCV vyjadřuje **mikrocytózu**. Ta je charakteristická pro mikrocytární anémie, například z nedostatku železa (označované také sideropenické), může se také vyskytovat při sférocytózách (výskyt malých kulovitých erytrocytů, tj. bez centrálního projasnění), talasemii (vyznačuje se poruchou syntézy globinových řetězců hemoglobinu) aj.

Zvýšený MCV vyjadřuje **makrocytózu**. Ta je fyziologická u novorozenců, patologicky je přítomná u makrocytárních anémií, například megaloblastové (způsobené nedostatkem vitamínu B₁₂ nebo folátu) a dále u hematologických onemocnění spojených s vyšším výskytem prekurzorů erytrocytární řady (proerytroblastů a erytroblastů) v periferní krvi.

Snížené hodnoty MCH značí **hypochromii**. Ta je charakteristická pro hypochromní anémie, kam lze zařadit anémie hemolytické, sideropenické, při chronických onemocněních aj.

Zvýšené hodnoty MCH značí **hyperchromii**. Ta se fyziologicky vyskytuje u novorozenců.

Anémie se klasifikují podle různých hledisek. Častým hlediskem je morfologická charakteristika: anémie mikrocytární, a. normocytní, a. makrocytní; nebo a. hypochromní, a. normochromní, případně a. s/nebo bez anizocytózy apod.

Podle průběhu: a. akutní nebo a. chronické. Z hlediska prognózy: a. regenerační (nepoškozená krvetvorba v kostní dřeni) a a. neregenerační (poškozená krvetvorba).

Členění podle příčin vzniku a mechanismů rozvoje (etiopatogenetické hledisko):

a. z nedostatečné krvetvorby, a. z nadměrného zániku nebo ztrát červených krvinek.

Obě tyto skupiny se bohatě člení, například a. hemolytické, a. z poruch hemoglobinu, a. nutričně podmíněné, a. posttraumatické atd.

Závěr, poznámky & komentáře

Krevní skupiny

Úvod

Savčí erytrocyty jsou bezjaderné buňky, na svém povrchu nemají MHC antigeny. Jejich membrána však obsahuje antigeny jiného typu, jejichž znalost je důležitá pro prevenci aglutinace krve například při transfuzi.

Aglutinogeny jsou povrchové receptory erytrocytů, které se na jejich povrchu exprimují (vyjadřují) během maturace před ztrátou jádra.

Aglutiny jsou protilátky proti těmto aglutinogenům, které se vyskytují v krevní plazmě.

Aglutinace je reakce aglutinogenu s odpovídajícím aglutininem, výsledkem je shlukování erytrocytů. Na aglutinační reakci je také založen princip **určování krevních skupin**.

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC, major histocompatibility complex) zahrnuje několik typů komplexů, glykoproteinové povahy, lokalizovaných na vnější straně cytoplazmatické membrány buněk obratlovců. Má význam v imunitních reakcích.

U psa se označuje DLA, kočky FLA, koně ELA, skotu BoLA, ovce OVA, kozy CLA, prasete SLA. MHC geny kódují MHC antigeny.

Cíle

- Pochopení principu aglutinace a krevních skupin
- Určení krevní skupiny u vybraných živočišných druhů
- Diskuse

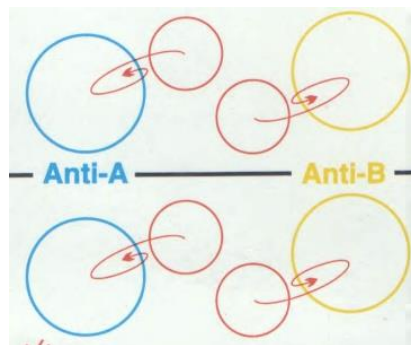
Metody

Aglutinační reakce v kapce s využitím komerčně dostupných protilátek

- ✓ Použít komerčně dostupnou sadu protilátek (ABC set)
- ✓ Použít vzorky lidské krve z transfuzní stanice



- ✓ Smíchat kapku krve s protilátkou anti-A a kapku krve s protilátkou anti-B
- ✓ Promíchat a pozorovat reakci

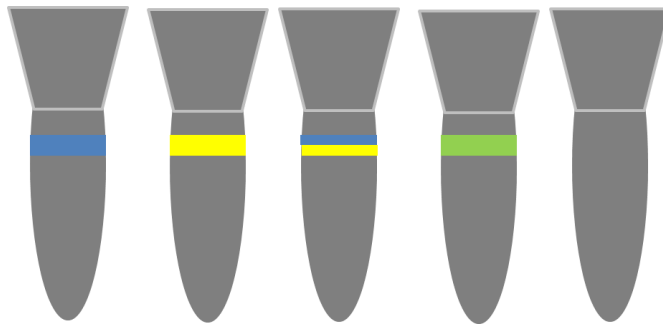


Aglutinační reakce s využitím imobilizovaných protilátek

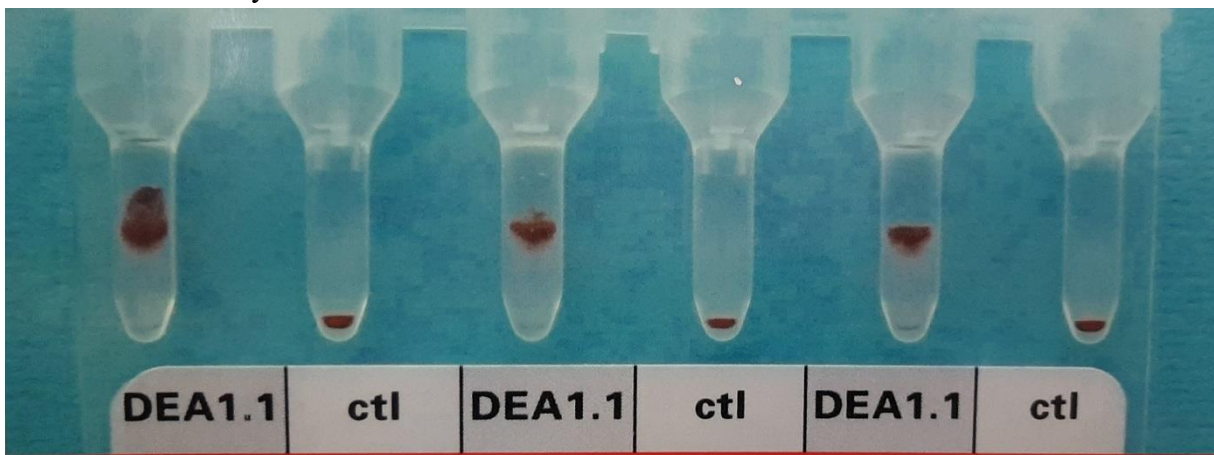
- ✓ Použít komerčně dostupné karty s imobilizovanými protilátkami



- ✓ Použít vzorky lidské krve z transfuzní stanice
- ✓ Použít vzorky zvířecí krve (kočka)
- ✓ Nanést kapku vyšetřované krve do každé kolonky
 - V kolonce jsou v prouzcích gelu imobilizovány protilátky, pro AB0 skupinu například modře anti-A, žlutě anti-B, zeleně anti-D, poslední kolonka je kontrola centrifugace (bez protilátek)



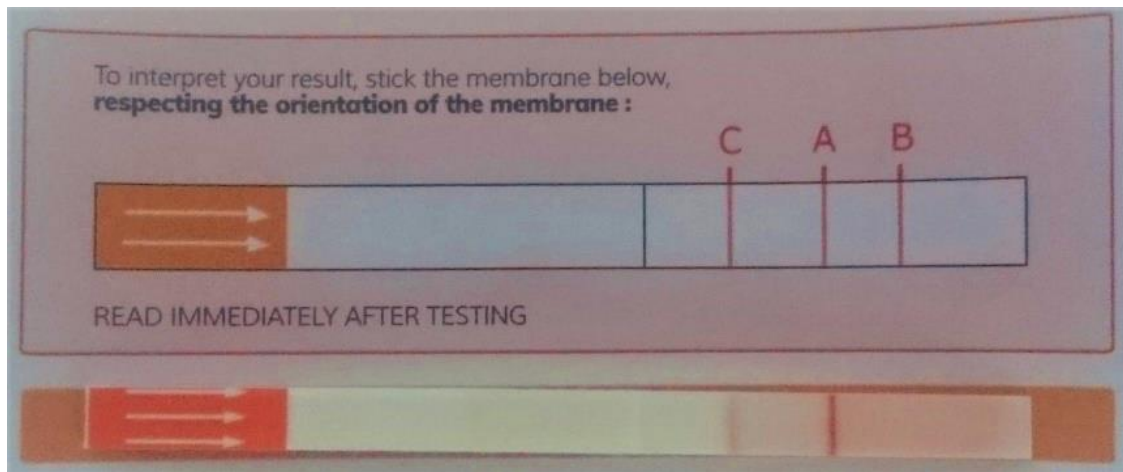
- ✓ Provést centrifugaci
- ✓ Zhodnotit výsledek



Pes, antigen DEA 1.1 (3 pozitivní jedinci)
 Vysvětlivky: ctl = kontrola

Aglutinační reakce s využitím monoklonálních protilátek

- ✓ Přenést 3 kapky pufrovacího roztoku do eppendorf zkumavky
- ✓ Přidat 10 µl EDTA krve
- ✓ Jemně promíchat
- ✓ Vložit testovací proužek do eppendorf zkumavky
- ✓ Za 2-4 min odečíst výsledek testu

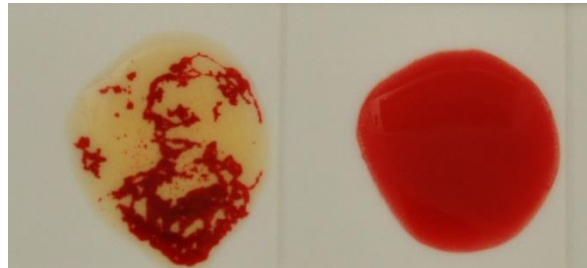


Kočka, krevní skupina A (C = kontrola)

Výsledky

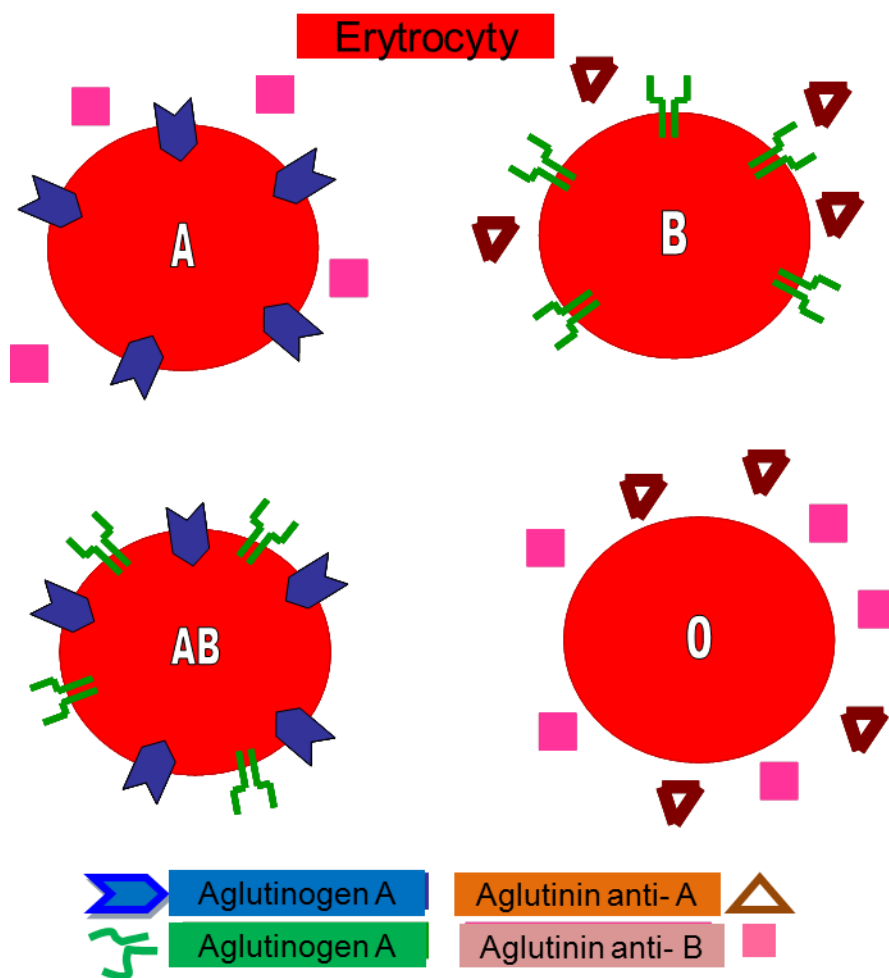
Aglutinační reakce

- ✓ Pozitivní reakce (vlevo), shlukování erytrocytů
- ✓ Negativní reakce (vpravo), ke shlukování nedochází



Princip určování krevních skupin aglutinační reakcí

Za fyziologických podmínek *in vivo* není nikdy přítomen antigen a jeho protilátka (například antigen A a anti-A) u téhož jedince. Demonstrace principu na příkladu AB0 skupiny u člověka.



Určení krevní skupiny aglutinační reakcí v kapce

Vzorek krve: člověk

Reakce s anti-A: negativní/aglutinace

Reakce s anti-B: negativní/aglutinace

Krevní skupina:

Určení krevní skupiny aglutinační reakcí s využitím imobilizovaných protilátek

Vzorek krve: člověk

Reakce v kolonce s anti-A: negativní/aglutinace

Reakce v kolonce s anti-B: negativní/aglutinace

Reakce v kolonce s anti-A/anti-B: negativní/aglutinace

Reakce v kolonce s anti-D: negativní/aglutinace

Kontrolní kolonka:

Krevní skupina:

Vzorek krve: kočka

Reakce v kolonce s anti-A: negativní/aglutinace

Reakce v kolonce s anti-B: negativní/aglutinace

Kontrolní kolonka:

Krevní skupina:

Diskuse

Objev principu krevních skupin je spjat se jménem rakouského biologa a lékaře Karla Landsteinerera (Nobelova cena 1930), ale také českého lékaře Jana Janského, který nezávisle o něco později došel ke stejným výsledkům.

Krevní skupiny u zvířat

- Antigeny u různých druhů bývají označovány stejnými písmeny, nejedná se však o tytéž antigeny (například A u kočky není shodné s A u koně nebo člověka)
- Většina krevních skupin u zvířat se dědí mendelovsky s úplnou dominancí
- Mnoho krevních systémů u zvířat je polyalelických, sestávají tedy z desítek až stovek faktorů (například 300 alel u skotu)

Krevní transfuze u zvířat

- Krevní transfuze představuje přístup náhrady krve nebo jejích komponent pro záchranu života nebo zlepšení zdravotního stavu
- Zatímco u člověka je nezbytné určení krevní skupiny, ve veterinární medicíně je často využívána **křížová zkouška** (cross-matching). Ta je založena na smíchání krve dárce a příjemce a hodnocení aglutinace. Křížová zkouška informuje o kompatibilitě krve, nikoliv o krevní skupině
- Antigeny krevních skupin se stejně jako u člověka liší svojí antigenicitou (mírou imunitní reakce, kterou vyvolávají). Také aglutininy se v krevní plazmě buď objevují společně s antigeny na membránách erytrocytů, pak se označují jako **přírozené protilátky** nebo se vyskytují až po imunizaci, pak se jedná o **protilátky imunitní**. Přírozené protilátky jsou typické pro lidský systém AB0 a kočičí systém AB, imunitní pro lidský Rh systém a většinu psích DEA (Dog Erythrocyte Antigen). U zvířat s imunitními protilátkami je proto obecně přijímáno, že první transfuze je bez rizika. K imunizaci dochází při transfuzi, ale také transplacentárním přenosem

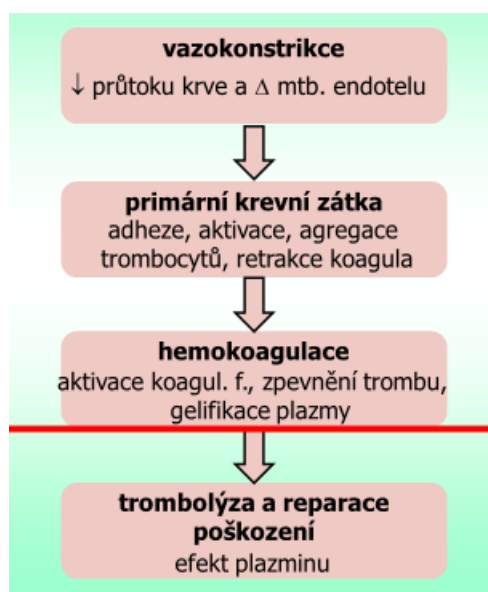
Závěr, poznámky & komentáře

Hemostaze

Funkce trombocytů, jejich počet v objemu krve

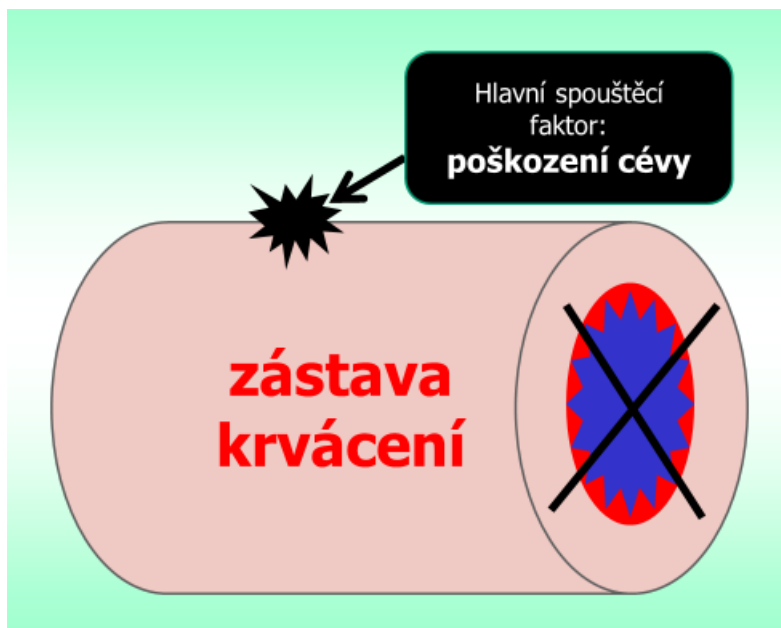
Úvod

Hemostaze (hemostáza, zástava krvácení) představuje fyziologický mechanismus obrany organismu před nežádoucím krvácením. Důležitou součástí je proces hemokoagulace (srážení krve). Zahrnuje několik fází, při kterých se uplatňují především **cévní stěna, krevní destičky** a **plazmatické koagulační faktory** spolu s **inhibitory koagulace**. Spasmus cévy v místě poranění eliminuje případné krevní ztráty, agregace destiček přispívá k tvorbě primární krevní zátky a hojení poškozené cévy a kaskáda aktivací koagulačních faktorů s uplatněním inhibitorů koagulace zajišťuje vytvoření adekvátní fibrinové sítě (tvorba sekundární zátky). Fáze (zjednodušeně):



Vysvětlivky: Δ = změna, mtb. = metabolismus, f. = faktor

Hlavním spouštěcím faktorem pro zástavu krvácení je poranění stěny cévní. Po splnění své úlohy musí být koagulum odstraněno – trombolýzou a potom nastává reparace poškozené cévy. Stěžejním faktorem trombolýzy je plazmin, který rozpouští fibrin na rozpustné degradační produkty fibrinu a D-dimery.



Trombocyty vznikají postnatálně v kostní dřeni procesem, který se označuje megakaryopoéza (podle konečného vývojového stadia, v němž jsou již přítomné zralé trombocyty).

Hemostazeologické vyšetření (vyšetření hemostaze) je důležité pro hodnocení krevního statusu organismu a má význam pro diagnostiku poruch srážení krve. Nedílnou součástí tohoto vyšetření je vyšetření trombocytů. Pro práci s krevními vzorky jsou klíčová antikoagulační činidla.

Cíle

- Fyziologické aspekty hemostaze se zaměřením na trombocyty
- Stanovení počtu trombocytů v objemu krve u vybraných živočišných druhů
- Mezidruhové zhodnocení a srovnání s referenčními hodnotami
- Diskuse

Metody

Stanovení počtu trombocytů (metoda podle Brechera-Cronkita)

Využití Bürkerovy komůrky (viz stanovení počtu erytrocytů v objemu krve)

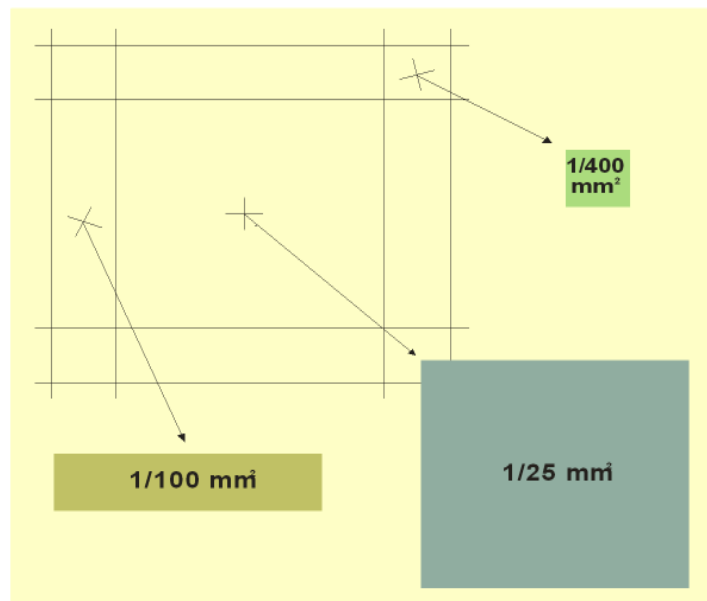
Příprava vzorku

- ✓ Naředit 25 μ l EDTA krve 1% šřavelanem amonným do celkového objemu 500 μ l (pipetu několikrát propláchnout ředícím roztokem z baničky)
- ✓ Míchat 1-2 min (manuálně nebo v laboratorní míchačce)

- ✓ Přenést Pasteurovou pipetou kapku suspenze do počítacího prostoru připravené Bürkerovy komůrky (dobře upevněné krycí sklo), aby došlo k zaplavení celého prostoru
- ✓ Počkat 10 min, aby se náplav trombocytů ustálil v jedné horizontální rovině

Počítání trombocytů

- ✓ Spočítat trombocyty pod mikroskopem při zvětšení $400\times$ ve 20 obdélnících (obsah jednoho obdélníku je $1/100\text{ mm}^2$)



- ✓ Prohlížet vzorek meandrovitým způsobem (žádný objekt se nesmí počítat vícekrát)
- ✓ Dodržovat **Bürkerovo pravidlo** o hraničních čarách (viz stanovení počtu erytrocytů v objemu krve)

Při počítání trombocytů je třeba položit důraz na čistotu pomůcek, neboť trombocyty se jeví jako drobné světlolomné elementy, které lze snadno zaměnit s nečistotou. Taktéž svůj význam má 10minutová doba vyčkání, než se začnou počítat – po této době se ustálí v jedné horizontální rovině a nemusí se tedy používat mikrozaostřování.

Krevní destičky se velmi dobře počítají při použití fázového kontrastu.

Samozřejmě dnes se ke stanovení počtu trombocytů používají hematologické automaty.

Výsledky

Manuální stanovení počtu trombocytů v objemu krve

- ✓ Kalkulace počtu trombocytů v objemu původního (neředěného) vzorku krve

Příklad:

- Ve 20 obdélnících bylo nalezeno n trombocytů

- Objem jednoho počítaného geometrického útvaru: $1/100 \text{ mm}^2$, hloubka $1/10 \text{ mm}$, tzn. objem $1/1000 \text{ mm}^3$
- Celkový objem geometrických útvarů, ve kterých byly trombocyty počítány: $20 \times 1/1000 \text{ mm}^3 = 1/50 \text{ mm}^3$
- V 1 mm^3 je tedy $50 \times$ více trombocytů, tzn. $n \times 50$
- Vzorek byl ředěn $20 \times$, v neředěném původním vzorku je tedy $20 \times$ více trombocytů, tzn. $n \times 50 \times 20$
- Vyjádření v objemu 1 litr, tj. v jednotkách SI ($1 \text{ l} = 10^6 \text{ mm}^3$): $n \times 50 \times 20 \times 10^6$

Počet trombocytů lze kvalifikovaně odhadnout mikroskopií z panopticky (přehledně) obarveného krevního nátěru při zvětšení $1000 \times$, pak platí:
 počet trombocytů ($\times 10^9/\text{l}$) = průměrný počet trombocytů v 10 zorných polích $\times 20$.

Živočišný druh	Počet trombocytů/l krve

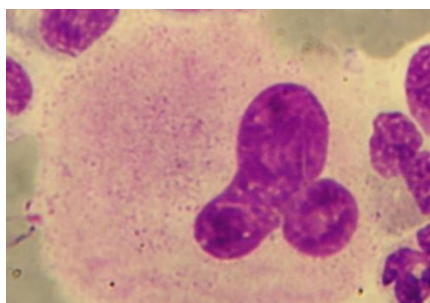
Mezidruhové srovnání počtu trombocytů [$\times 10^9/\text{l}$] s referenčními hodnotami

Pes	Kočka	Kůň	Skot	Ovce	Koza	Prase	Králík*
180-500	175-360	130-470	800-1100	800-1100	300-600	520	250-600

*Podle Doubka et. al. (2014), * podle Knotka et. al. (2017)*

Diskuse

Trombocyty savců jsou buněčné bezjaderné fragmenty oddělené z megakaryocytů (z 1 megakaryocytu až 1-3 tis. trombocytů).



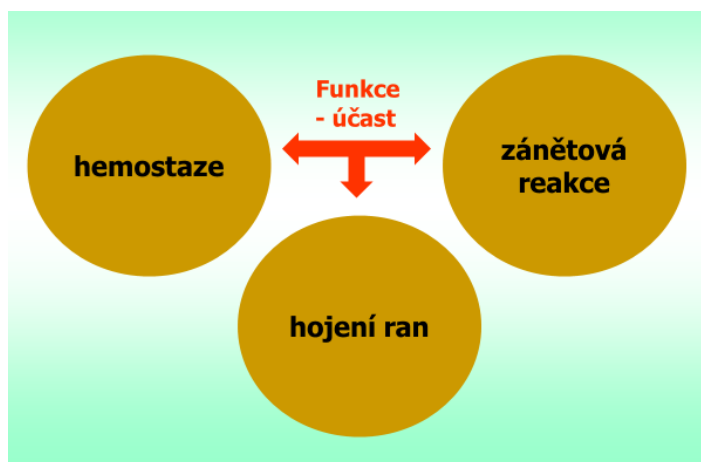
Megakaryocyt

Jejich tvorba probíhá postnatálně v kostní dřeni. Megakaryopoéza je pod vlivem růstových faktorů: trombopoetinu (produkovan v játrech) a erythropoetinu (produkovan zejména

v ledvinách a pak v játrech). Nefunkční trombocyty jsou odstraňovány makrofágy jater a sleziny.

Z hlediska funkce se v trombocytu rozlišují 4 zóny: (1) v **periferní zóně** jsou mj. receptory zprostředkující aktivaci koagulačních procesů (například pro kolagen, faktor aktivující destičky aj.), dále membránové fosfolipidy, které se uplatňují v koagulaci jako destičkový faktor 3, kontraktilní vlákna obsahující aktin přispívají k retrakci výběžků (pseudopodií) trombocytů v průběhu koagulace; (2) **zóna rozpustného (solubilního) gelu** (zóna sol-gel) obsahuje systém vláken (mikrofilament) a kanálků (mikrotubulů), tvořených kontraktilními proteiny (myozinem a aktinem) a majícími význam pro zajištění tvaru destičky a sekreci granulí (viz dále); (3) v **zóně organel** se nacházejí mj. mitochondrie a granule (alfa, delta, lambda) – α -granule obsahují destičkové faktory 2 a 4, von Willebrandův faktor, imunoglobuliny, destičkový růstový faktor pro fibroblasty nebo pro hladkosvalové buňky cévní stěny aj., v δ -granulích se skladují serotonin, Ca^{2+} , ADP, ATP aj., lyzozomální λ -granule obsahují kyselé hydrolázy (například katepsiny), v zóně organel jsou také přítomné peroxisomy, v nichž jsou obsaženy antioxidantní enzymy (například glutathionperoxidáza); (4) **zóna membránových systémů** obsahuje dva vzájemně propojené systémy: otevřený kanalikulární systém – má význam pro transport granulí na povrch destičky, a hutný (denzní) tubulární systém – obsahuje Ca^{2+} a enzymy, zapojené do tvorby derivátů kyseliny arachidonové (prostaglandinů, prostacyklinu a tromboxanu A_2) které rovněž ovlivňují hemostazi. Na povrchu destičky jsou také různé antigeny.

Trombocyty jsou jednou z hlavních komponent, uplatňujících se v procesu hemokoagulace. Jejich účast v ní probíhá v součinnosti s dalšími faktory – cévní stěnou a plazmatickými faktory (koagulačními faktory a jejich inhibitory). Významná je jejich účast i v dalších procesech:



Předpokladem zapojení trombocytů v hemostazi je jejich aktivace (tzn. zvýšení obsahu a aktivity enzymů, změna tvaru, tvorba pseudopodií, zvýšená exprese povrchových receptorů, zvýšené uvolňování mediátorů aj.). Proces aktivace destiček je důsledkem jejich interakcí s porušeným cévním endotelem a plazmatickými faktory. Účast destiček v hemostazi spočívá zjednodušeně vyjádřeno v tvorbě primární krevní zátky a v usnadnění (facilitaci) koagulace, tzn. v prokoagulačním působení.

Primární zvýšení počtu trombocytů se označuje **trombocytemie**, příčina je v kostní dřeni (většinou esenciální trombocytemie, tj. neznámého původu, například při nádorových onemocněních). Sekundární (reaktivní) zvýšení počtu trombocytů se označuje **trombocytóza**, příčina je mimo kostní dřeň a je reakcí na různé patologické procesy (například na záněty, akutní stres doprovázený zvýšenou kontrakcí sleziny u některých zvířat – psa, koně aj.).

Snížení počtu trombocytů se označuje **trombocytopenie**, příčinami je snížená tvorba (při aplikaci kortikoidů, estrogenů, parvovirovém onemocnění psů, autoimunitních procesech aj.), zvýšená destrukce (imunitně zprostředkovaná onemocnění), zvýšená sekvestrace, tj. oddělení části krve od krevního oběhu (například ve slezině při její torzi).

Pro poruchu funkce se používá označení **trombocytopatie**, zvýšená funkce bývá při *diabetes mellitus*, infekčním zánětu peritonea u koček aj., snížená funkce při těžkých onemocněních ledvin, nádorech aj.

Tvorba trombocytů se označuje **megakaryopoéza** – vývoj prekursorů totiž probíhá do stadia megakaryocyty a v něm jsou již zralé trombocyty, které se uvolňují do krevního řečiště.

Trombocyty lze blíže charakterizovat pomocí **trombocytárních indexů**. Ty poskytují údaje zejména o tvorbě trombocytů a jejich uplatnění v hemostazi. Mezi hlavní indexy (hodnoty destičky) patří: střední objem destičky (MPV, Mean Platelet Volume), což je průměrná hodnota průměrů destičky získaná přímo v automatických analyzátoch, vyjadřuje se ve fl, destičkový hematokrit (Pt, Plateletcrit), který vyjadřuje podíl objemu krevních destiček na celkovém objemu krve, je vypočítán z hodnoty MPV a počtu trombocytů, vyjadřuje se v l/l; histogram podle MPV, který vyjadřuje křivku závislosti MPV na četnosti krevních destiček, se zjišťuje na automatických analyzátoch; distribuční šířka destiček (PDW, Platelet Distribution Width) udává šíři hlavní populace destiček v jejich histogramu podle MPV.

Závěr, poznámky & komentáře

Funkce koagulačních faktorů, protrombinový čas a aktivovaný parciální tromboplastinový čas

Úvod

V procesu hemostaze hrají podstatnou roli mechanismy hemokoagulace. Tyto jsou výsledkem interakcí mezi strukturami cévní stěny, trombocyty a faktory přítomnými v krevní plazmě. Plazmatické faktory lze rozdělit na faktory srážecí (koagulační), faktory rozpouštějící krevní sraženinu (fibrinolytické) a inhibitory koagulace. Aktivace plazmatických faktorů vede v konečném efektu k přeměně fibrinogenu na fibrin, zpevnění trombu a přeměně tekuté plazmy na gel.

K hodnocení hemostaze se používá, jak bylo uvedeno výše, hemostazeologické vyšetření. Patří mezi ně stanovení protrombinového času (test se také označuje Quickův), pomocí něhož se vyhodnocuje zejména vnější cesta koagulace, dále stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového času, kterým lze vyhodnotit především vnitřní cestu koagulace krve.

Cíle

- Fyziologické aspekty hemostaze se zaměřením na koagulaci
- Protrombinový čas a jeho stanovení
- Aktivovaný parciální tromboplastinový čas a jeho stanovení
- Antikoagulační činidla
- Hemostazeologické testy
- Diskuse

Metody

Protrombinový čas

Příprava vzorku

- ✓ Čerstvý vzorek krve stabilizovat citrátem sodným
- ✓ Centrifugací získat citrátovou plazmu
- ✓ Použít reagentie Tromboplastin-S

Vyšetření vzorku

- ✓ Využít koagulometr



Přístroj pro měření hemostazeologických parametrů

- ✓ Stanovit protrombinový čas
 - Pracovní postup – viz laboratoř
- ✓ Využít kapesní systém CoaguChek s testovacími proužky (orientační stanovení)
 - Odběr kapky krve například z ušní žíly
 - Pracovní postup – viz obrázek



Tester CoaguChek

Protrombinový čas a aktivovaný parciální protrombinový čas

✓ Automatizovaná hematologie

- Pracovní postup – viz laboratoř



Hematologický automatický analyzátor

Sysmex CA-1500					
ID	11111	PT	27.4 sec		
Final		APTT	30.7 sec		
10/10	07:42	000008-01	Fbg	5.6 sec	3.58 g/L
Valid		TT	26.5 sec		
		AT3	0.141 dOD	118.0 %	

Příklad výsledku hemostazeologického vyšetření

Vysvětlivky: PT = protrombinový čas, APTT = aktivovaný parciální tromboplastinový čas, Fbg = fibrinogen, TT = trombinový čas, AT3 = antitrombin 3

Výsledky

Protrombinový čas (Quickův test)

- ✓ Vyšetřovaná krev (živočišný druh):
- ✓ Stanovená hodnota:
- ✓ Srovnání s referenčními hodnotami:

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas

- ✓ Vyšetřovaná krev (živočišný druh):
- ✓ Stanovená hodnota:
- ✓ Srovnání s referenčními hodnotami:

Mezidruhové srovnání PT [s] a APTT [s] s referenčními hodnotami

	Pes	Kočka	Kůň
PT	7-10	9-13	21-57
APTT	12-17	14-20	64-110

Podle Doubka et. al. (2014)

Diskuse

Klasický výklad charakterizuje hemokoagulaci jako sled aktivací koagulačních faktorů (většinou serinových proteináz), uspořádaných stupňovitě (kaskádovitě). V zásadě podle tohoto modelu probíhá aktivace koagulace vnější cestou (má význam pro spuštění koagulace) a vnitřní cestou (má význam pro zesílení koagulace). V zájmu zachování tekutosti krve a průchodnosti cév jsou v plazmě přítomné inhibitory koagulace, například antitrombin.

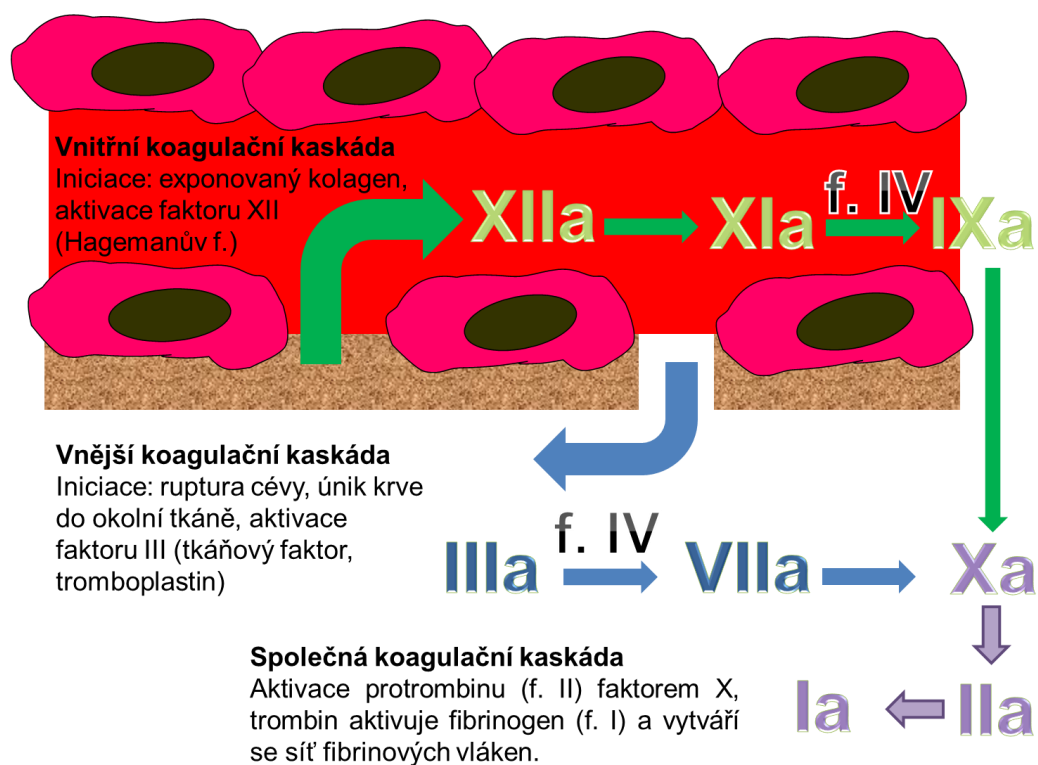
hemokoagulační faktory

Produkce: hepatocyty (většina), megakaryocyty (FV, von Willebrandův faktor), endotel (tkáňový faktor, von Willebrandův faktor), monocyty, mozek, plíce, placenta (tkáňový faktor)

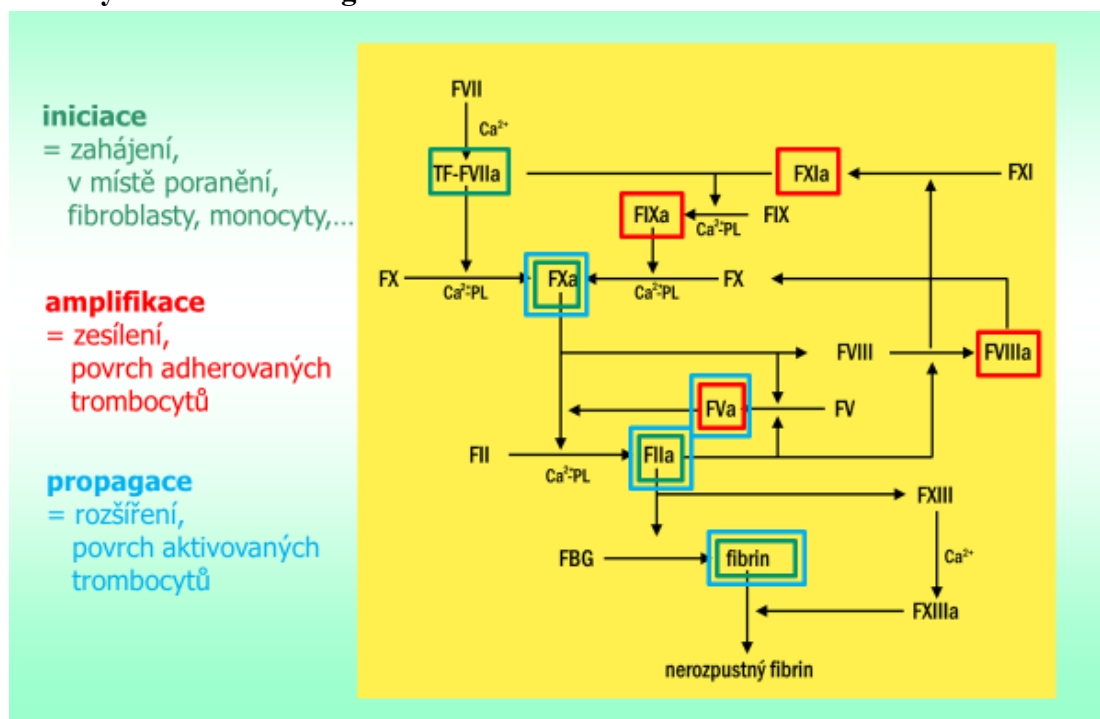
Faktor (pořadí podle okamžiku zapojení do koagulačních reakcí)	Funkce - specifikace
prekallikrein (Fletcherův faktor)	serinová proteináza
kallikrein	kofaktor
FXII (Hagemanův faktor)	serinová proteináza
Vysokomolekulární kininogen (HMWK, Fitzgeraldův faktor)	kofaktor
FXI (Rosenthalův faktor, antihemofilní faktor C)	serinová proteináza
FIX (Christmas faktor, antihemofilní faktor B)	serinová proteináza
FVIII (antihemofilní faktor A)	kofaktor
FVII (prokonvertin)	serinová proteináza
tkáňový faktor (FIII, tromboplastin)	kofaktor
FX (Stuartův-Prowerův faktor)	serinová proteináza
FV (proakcelerin)	kofaktor
FIV	Ca ²⁺
destičkové fosfolipidy (FL)	kofaktor
FII (protrombin)	serinová proteináza
fibrinogen (FI)	stavební (tvorba síťoviny)
FXIII (faktor stabilizující fibrin)	transamináza

Většina koagulačních faktorů je v krevní plazmě přítomna v neaktivní (prekurzorové) formě (mimo tkáňového faktoru a Ca²⁺) a v průběhu koagulace je aktivována.

Klasický model hemokoagulace



Revidovaný model hemokoagulace



Nový (revidovaný) model hemokoagulace vychází z klasického modelu, jeho předností je, že vysvětluje fyziologickou i patologickou hemokoagulaci probíhající *in vivo*. Je to třístupeňový model s fázemi: iniciace, amplifikace, propagace.

Antikoagulační činidla

Antikoagulační činidla jsou látky zabraňující koagulaci. Podle mechanismu účinku lze tato činidla rozdělit do několika skupin:

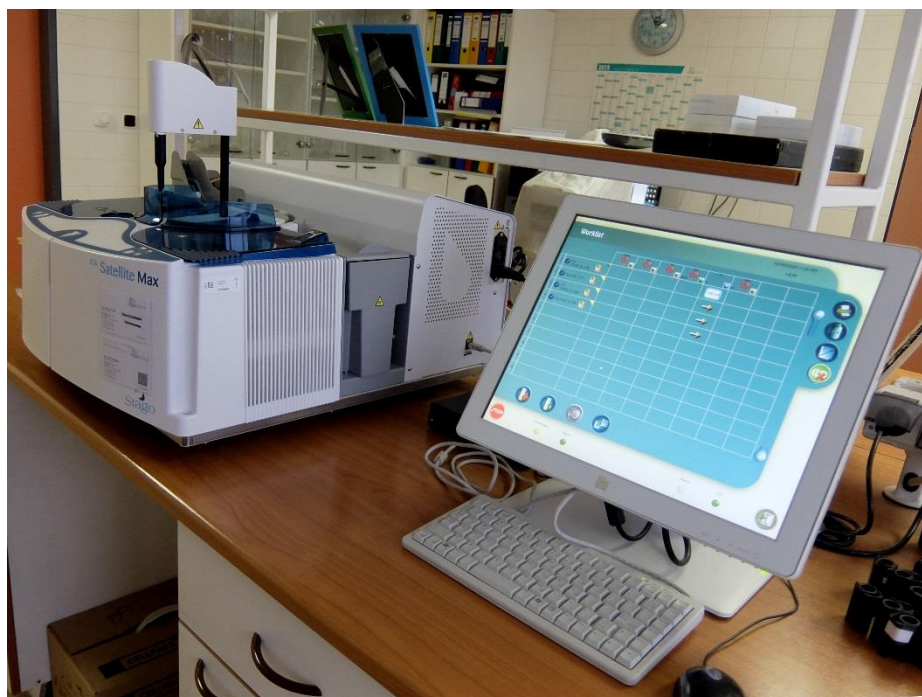
- Antagonisté vitaminu K: zasahují do metabolismu vitaminu K, který je nezbytný pro tvorbu řady koagulačních faktorů v játrech (zejména karboxylaci FFII, VII, X), působí tedy pouze *in vivo* a používají se i terapeuticky (například kumarinové preparáty, warfarin)
- Účinek na úrovni aktivace trombinu. Na bázi potenciace účinku antitrombinu a inhibice FXa (a dalších serinových proteináz) působí heparin (obsažen v granulích žírných buněk a bazofilů), který se používá při aplikacích *in vitro* i *in vivo*, kde se využívá i při terapiích (nízkomolekulové hepariny). Přímým inhibitorem trombinu je hirudin (secernován slinnými žlázami pijavice *Hirudo medicinalis*), který účinkuje jak *in vivo*, tak *in vitro*. Trombin a FXa jsou inhibovány i novějšími perorálními antikoagulanty (gastrany – trombin, xabany – FXa)
- Dekalcifikační činidla: reverzibilně lze koagulaci zabránit vazbou kalciových iontů (FIV). Takto působí citrát sodný, oxaláty či soli EDTA

Kumarin je obsažen v rostlinách – tomce vonné, semenech silivoně obecného, svízeli obecném aj. Od kumarinu jsou odvozené i některé rodenticidy (brodifakum), které jsou potencionálními příčinami otrav psů a dalších savců.

Hemostazeologické testy

Hemostazeologické testy lze členit na:

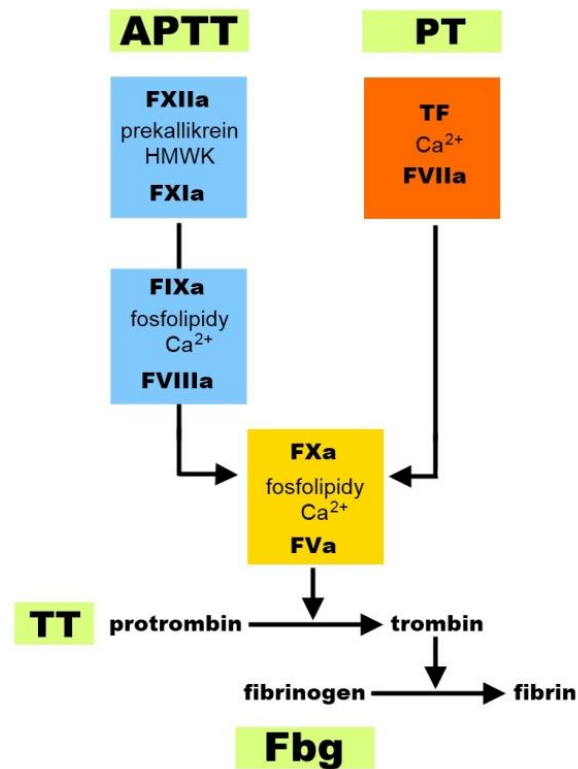
- nespecifické:
 - a) globální – hodnotí jeden systém srážení krve, například hemostatickou funkci trombocytů,
test: čas krvácení (sledování zástavy krvácení po vpichu, nejčastěji do bukalní sliznice);
 - b) vyhledávací (skupinové) – hodnotí vnější a vnitřní cestu koagulace a přeměnu fibrinogenu,
testy: protrombinový čas, PT, aktivovaný parciální tromboplastinový čas, APTT (viz dále);
- specifické – hodnotí plazmatické koagulační faktory, například koncentraci fibrinogenu, případně inhibitory koagulace, například aktivitu antitrombinu



Hemostazeologický analyzátor

Hlavními vyhledávacími hemostazeologickými testy užívanými ve veterinární medicíně jsou:

- **PT (protrombinový čas, Quickův test).** Test ověřuje funkčnost vnější cesty koagulační kaskády (FFVII, X, II a V) a fibrinogenu a také společné cesty. Určuje čas od aktivace FIII do vytvoření fibrinové sítě a vyjadřuje se buď v sekundách nebo jako INR (International Normalized Ratio). Využívá se při diagnostice například onemocnění jater, nedostatku vitamínu K, diseminované intravaskulární koagulace (DIC), dále před chirurgickými zákroky a pro monitoring léčby warfarinem nebo kumariny. Principem testu je přidání CaCl_2 a FIII (tkáňového faktoru neboli tromboplastinu) ke stabilizované (dekalcifikované) krvi. Hodnocení je založeno na optické a mechanické detekci fibrinové sítě
- **APTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas).** Test ověřuje funkčnost vnitřní cesty koagulační kaskády (FFXII, XI, IX, VIII) a společné cesty. Určuje čas od aktivace FXII po vytvoření fibrinové sítě. Pro aktivaci se využívají kontaktní povrchy (například kaolin a parciální tromboplastin, parciální se označuje proto, že se využívá jen jeho fosfolipidová složka, což je náhrada destičkového faktoru 3), které *in vivo* poskytují trombocyty. Nezbytné je (stejně jako u dalších testů) přidání vápenatých iontů. Využívá se zejména k diagnostice deficitů výše uvedených koagulačních faktorů. Hodnocení je založeno na optické a mechanické detekci fibrinové sítě
- Vyhledávacím testem je také stanovení **trombinového času (TT)**. Slouží k testování štěpení fibrinogenu trombinem (tzn. společné cesty) po přidání trombinu k plazmě. Užitečný je při diagnostice onemocnění jater, při nichž je narušena proteosyntéza (mj. snížená syntéza fibrinogenu, hypofibrinogenemie nebo albuminu, hypoalbuminemie)



Základní skupinové hemostazeologické testy

Vysvětlivky: APTT = aktivovaný parciální tromboplastinový čas, PT = protrombinový čas, TT = trombinový čas, Fbg = fibrinogen, Pre-K = prekallikrein, HMWK = vysokomolekulární kinogen (high molecular weight kininogen), PL = fosfolipidy

K posouzení fibrinolýzy slouží stanovení fibrin(ogen) degradačních produktů a D-dimerů, které jsou štěpnými produkty fibrinu.



Přístroj pro stanovení D-dimerů

Závěr, poznámky & komentáře

Leukocytární komplex

Funkce leukocytů, jejich počet v objemu krve

Úvod

Funkce leukocytů představují **komplex interakcí** s dalšími buněčnými systémy. Interakce se uskutečňují většinou prostřednictvím řady látek v leukocytech obsažených nebo jimi produkováných (protilátek, cytokinů a reaktivních forem kyslíku aj.) a které jsou podstatou jejich pestrých efektů. K hodnocení leukocytů se používají kvantitativní (numerické) testy, kvalitativní (morfologická) vyšetření a funkční vyšetření.

Leukocyty (bílé krvinky, WBC, White Blood Cell) jsou krevní buňky, které jsou důležitou součástí imunitního systému. Pro jeho správnou funkci je důležitý adekvátní počet leukocytů.

Počet leukocytů v objemu krve je tedy důležitým fyziologickým i diagnostickým parametrem. Počet leukocytů lze stanovit manuálně pomocí Bürkerovy komůrky (viz počet erytrocytů v objemu krve). Pro ředění krve se používá Türkův roztok, který lyzuje erytrocyty a trombocyty a barví jádra leukocytů metylenovou (genciánovou) violetí, která je v něm obsažena. V současné době se počet leukocytů stanovuje pomocí automatických hematologických analyzátorů.

Protilátky (Ab, Antibodies, Ig, imunoglobuliny) jsou chemicky γ -globuliny, které se syntetizují v plazmatických buňkách (vznikají z B-lymfocytů po jejich stimulaci antigenem). Skládají se ze 2 identických těžkých řetězců a 2 identických lehkých řetězců. Těžkým řetězcům odpovídají třídy Ig – A, D, E, G a M. Funkce Ig spočívají například ve zvýšení účinnosti fagocytózy, inaktivaci bakteriálních toxinů, neutralizaci virových částic aj.

Antigen (Ag) je zjednodušeně cizí protein nebo polysacharid (tedy substance s velkou molekulovou hmotností), rozpoznatelný imunitním systémem a schopný vyvolat imunitní odpověď (například tvorbu protilátek).

Cytokiny jsou různorodá skupina látek, nejednotné klasifikace, s poměrně velkou molekulovou hmotností (chemicky peptidy). Jsou produkovány monocyty, neutrofile a dalšími buňkami po jejich stimulaci (například při zánětu, nádorovém onemocnění aj.). Působí v bezprostředním okolí svých producentů nebo přímo na ně, přičemž účinky jsou mnohostranné: některé ovlivňují zánětovou reakci (interleukiny), jiné působí virocidně (interferony), další jsou mediátory horečky (některé interleukiny, faktory nekrotizující tumory aj.) atd. Účinné jsou již ve velmi malých koncentracích (nmol až pmol). Působí receptorovým mechanismem, jsou známy i inhibitory jejich účinku.

Reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) mají vysokou chemickou reaktivitu. Obvykle se člení (1) na volné kyslíkové radikály, které mají ve vnější sféře svého elektronového obalu volný (nespárovaný) elektron – patří sem například superoxidový anion, hydroxylový radikál aj., a (2) formy bez nespárovaného elektronu – například singletový kyslík, peroxid vodíku. Mezi ROS se řadí i reaktivní formy dusíku (jeho sloučeniny s kyslíkem), například radikálová forma oxidu dusnatého.

Zdroje vzniku ROS lze rozdělit na (1) endogenní, například ox.-red. reakce dýchacího

řetězce, reperfuze (obnova prokrvení tkáně po předchozí nedokrevnosti, což nastává například po operacích apod.) aj., (2) exogenní, například UV záření, znečištěné ovzduší průmyslem, dopravou, v potravě obsažené těžké kovy (Fe, Cu, Cd), některé léky.

Obrana proti účinkům ROS může být zajišťována antioxidačními enzymy (například superoxiddismutázou, glutathionperoxidázou, cytochromoxidázami dýchacího řetězce aj.) a také neenzymově (například vitaminy E, C, dále β -karotenem, albuminem, ceruloplazminem, bilirubinem, selenem aj.).

Hlavním efektem ROS je peroxidace fosfolipidů buněčných membrán s následným poškozením dalších součástí buňky. Z tkání je k jejich účinku nejcitlivější cévní endotel. Působení ROS je i prospěšné, například při smrcení živého objektu během fagocytózy, na jejich uvolňování je založen také efekt některých léků (chemoterapeutik) aj.

Cíle

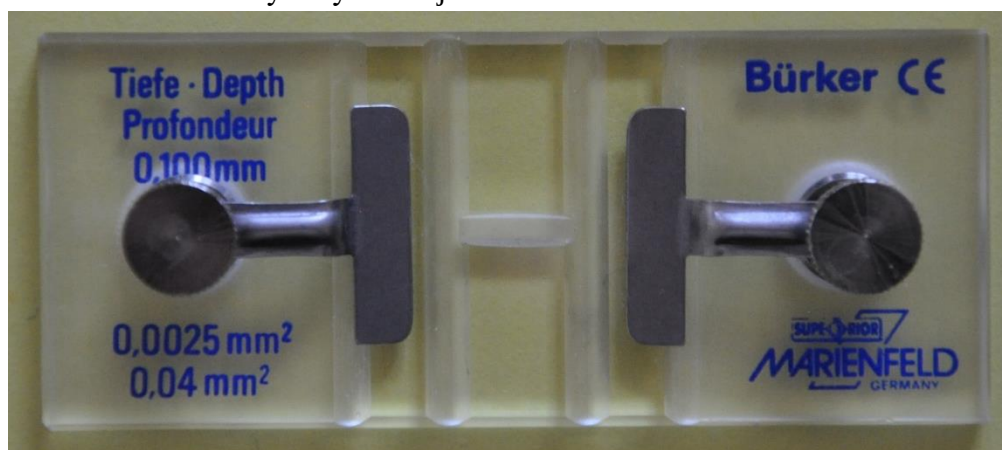
- Stanovení počtu leukocytů v objemu krve vybraných druhů zvířat
- Mezidruhové zhodnocení a srovnání s referenčními hodnotami
- Diskuse

Metody

Manuální stanovení počtu leukocytů

Využití Bürkerovy komůrky

- ✓ Viz cvičení Počet erytrocytů v objemu krve



Bürkerova komůrka

Příprava vzorku krve

- ✓ Naředit 25 μ l krve stabilizované krve do 475 μ l Türkova roztoku
- ✓ Ve skleněné baničce jemně promíchat, nechat 2 min stát

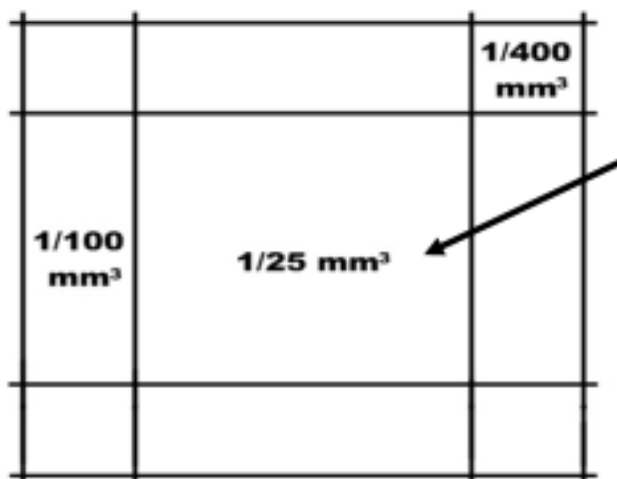


Automatické pipety

Vysvětlivky: 1 – pro Hayemův roztok (počítání erytrocytů – 4975 μl), 2 – pro Türkův roztok (počítání leukocytů – 475 μl), 3 – pro krev (počítání erytrocytů, leukocytů, trombocytů – 25 μl)

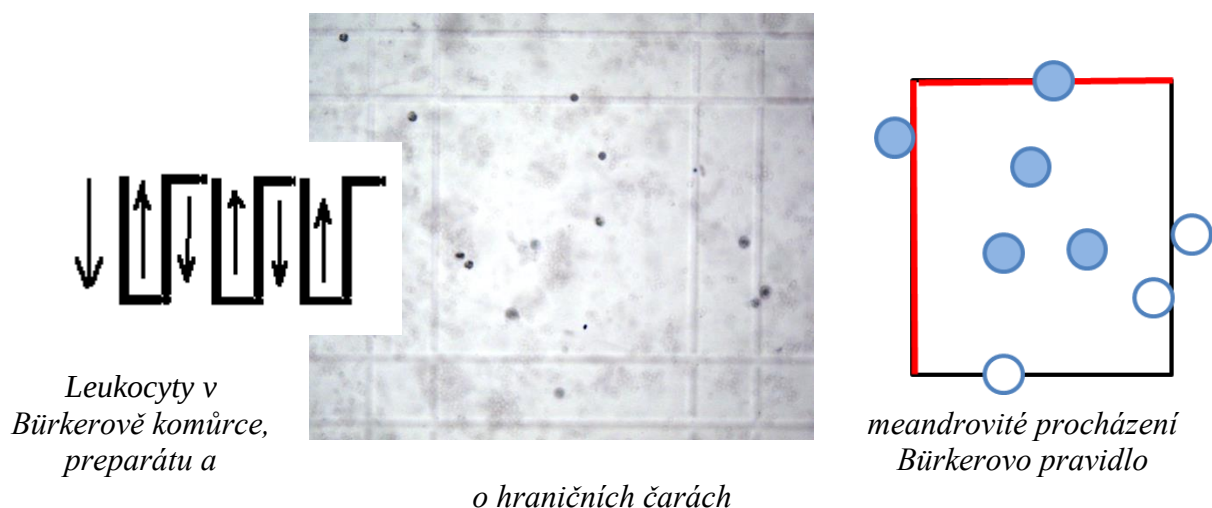
Plnění Bürkerovy komůrky

- ✓ Viz cvičení Počet erytrocytů v objemu krve



Počítání leukocytů

- ✓ Umístění Bürkerovy komůrky na stolek mikroskopu
- ✓ Nastavení finálního zvětšení 400 $\times$ (objektiv 40)
- ✓ Prohlížení preparátu meandrovitým způsobem
- ✓ Počítání buněk v 50 velkých čtvercích (obsah jednoho čtverce je 1/25 mm^2 – viz údaj na komůrce) s dodržáním Bürkerova pravidla (viz Počet erytrocytů v objemu krve)



Výsledky

Stanovení počtu leukocytů v objemu krve

- ✓ Kalkulace počtu leukocytů v objemu původního (neředěného) vzorku krve.

Příklad:

- V 50 velkých čtvercích bylo nalezeno 80 leukocytů
- Objem jednoho geometrického útvaru vyplývá z údajů na Bürkerově komůrce (obsah $1/25 \text{ mm}^2$, hloubka $1/10 \text{ mm}$), tedy $1/250 \text{ mm}^3$
- Celkový objem geometrických útvarů, ve kterých byly leukocyty spočítány: $50 \times 1/250 \text{ mm}^3 = 1/5 \text{ mm}^3$
- V 1 mm^3 je $5 \times$ více leukocytů, což činí 80×5
- Vzorek byl ředěn $20 \times$, v neředěném původním vzorku je tedy $20 \times$ více leukocytů, tedy $80 \times 5 \times 20$
- Vyjádření v objemu 1 l ($1 \text{ l} = 10^6 \text{ mm}^3$): $80 \times 5 \times 20 \times 10^6$
- V 1 l vyšetřovaného vzorku krve je 8×10^9 leukocytů

- ✓ Kalkulace a vyjádření počtu leukocytů v 1 l původního (neředěného) vzorku krve:

Živočišný druh	Počet leukocytů/l krve

Mezidruhové srovnání počtu leukocytů [$\times 10^9/\text{l}$] s referenčními hodnotami

Pes	Kočka	Kůň	Skot	Ovce	Koza	Prase	Králík*
6,0-18,0	6,8-16,8	5,6-14,8	6,0-10,0	4,0-12,0	4,0-13,0	11,0-22,0	5,1-12,5

Podle Doubka et al. (2014), *podle Knotka et al. (2017)

Diskuse

Leukocyty jsou krevní buněčné jaderné elementy. Postnatálně za fyziologických podmínek se tvoří v primárních (centrálních) lymfatických orgánech (kostní dřeň a thymus). Mimo krevní řečiště se vyskytují ve slezině, ale také vystupují z krevního řečiště (diapedezí) a migrují do tkání, kde se některé můžou diferencovat v další buňky (například tkáňové makrofágy).

Počet leukocytů za fyziologických podmínek závisí na živočišném druhu (viz tabulka výše) a také aktuálním stavu organismu – věku (novorozenci mají často vyšší počet, především neutrofilů), počet leukocytů vykazuje také cirkadiánní kolísání (ráno nejméně, v průběhu dne narůstání počtu), pohlaví počet leukocytů příliš neovlivňuje. Příčinami patologických změn počtu leukocytů jsou například stres, infekce a záněty, hypoxické stavy (deficit kyslíku), nádorová onemocnění, hemolýzy, vrozené poruchy imunitního systému aj.

Funkce leukocytů koncentrovaně vyjádřeno spočívají v zajišťování **obranyschopnosti** (pomocí v nich obsažených enzymů, dále jimi uvolňovaných cytokinů a dalších látek). Granulocyty přitom zajišťují nespecifickou imunitu (neutrofily, eozinofily – fagocytózu), agranulocyty nespecifickou (monocyty, NK-buňky) a specifickou imunitu (B-lymfocyty – protilátkovou imunitu, T-lymfocyty – buněčnou imunitu). Podrobněji – viz dále.

Odchyly v počtu krevních leukocytů od referenční hodnoty mohou indikovat některé z těchto případů:

Leukocytóza – zvýšený počet leukocytů v obvodové (periferní) krvi nad referenční rozmezí daného zvířecího druhu. Nastává například při bakteriálních zánětech a hematologických malignitách (některých lymfomech, leukemiích).

Leukopenie – snížený počet leukocytů v obvodové krvi pod referenční rozmezí daného zvířecího druhu. Nastává například při virových infekcích, některých terapiích (aplikace imunosupresiv) aj. a vede ke zvýšené náchylnosti organismu k infekcím.

Tyto odchylky jsou dány hlavně změnami počtu neutrofilů a lymfocytů, tj. dvou nejpočetnějších populací leukocytů.

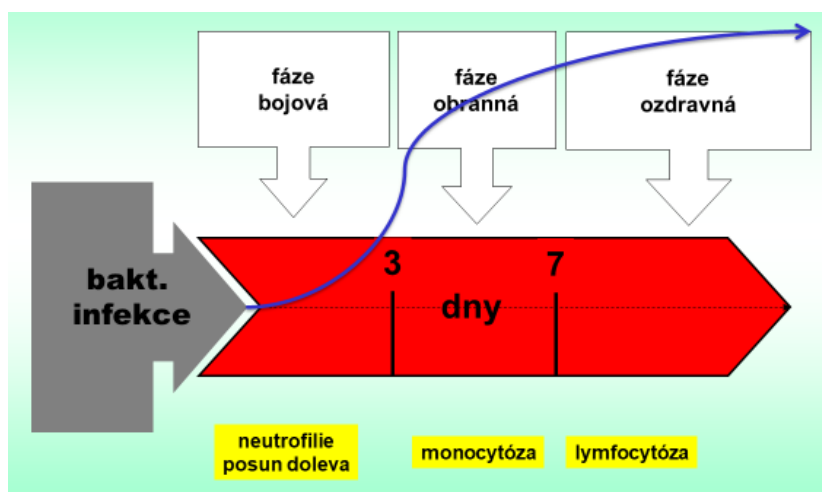
Závěr, poznámky & komentáře

Funkce a zastoupení jednotlivých populací leukocytů

Úvod

V periferní krvi lze na základě morfologických kritérií rozlišit pět základních populací leukocytů, které se řadí na základě tvaru jádra a přítomnosti či nepřítomnosti cytoplazmatických specifických granulí do dvou skupin: (1) leukocyty s více či méně členitým jádrem a přítomností specifických granulí se nazývají granulocyty, (2) leukocyty s kompaktním jádrem a bez specifických granulí se označují agranulocyty. Granule jsou vlastně lyzosomy. **Neutrofilní granulocyty** (dále rozlišovány na tyčky/tyče a segmenty), **eozinofilní granulocyty** a **bazofilní granulocyty** se řadí mezi polymorfonukleární leukocyty se specifickými granulemi. **Monocyty** a **lymfocyty** patří mezi monomorfonukleární leukocyty bez specifických granulí.

Uvedené populace leukocytů jsou vytvářeny v různém počtu vzhledem ke svým specifickým funkcím a aktuálním potřebám organismu. Podíl jednotlivých populací leukocytů na celkovém počtu leukocytů je důležitým fyziologickým parametrem a diagnostickým ukazatelem a označuje se **diferenciální rozpočet leukocytů**. Obecné příčiny patologických změn jednotlivých populací leukocytů mají původ v poruchách jejich tvorby a uvolňování do cirkulace, v jejich zkráceném přežívání, ve zvýšené konzumpci (spotřebování), redistribuci (neutrofilie marginující, tj. „nalepené“ na stěny cévy vs. axiální, tj. proudící podle osy cévy), náhradní krvetvorbě (při nádorových onemocněních kostní dřeně probíhá náhradní krvetvorba ve slezině, v játrech) a také fázi onemocnění. Fáze při bakteriálním zánětu vyjadřuje Schillingova křivka. Ta je tvořena postupně následujícími fázemi: (1) bojovou se zvýšeným počtem neutrofilů s posunem doleva, (2) obrannou se zvýšeným počtem monocytů a (3) ozdravnou se zvýšeným počtem lymfocytů.



Pro manuální hodnocení diferenciálního rozpočtu se využívá trvalý krevní preparát. Trvalý krevní preparát je mikroskopický film získaný šetrným rozetřením kapky krve na podložní sklo a jeho přehledným (panoptickým) obarvením. Používá se metoda podle Pappenheima (kombinace barviv podle Maye-Grünwalda a podle Giemsy-Romanowského). Panoptické barvení se využívá na vizualizaci a hodnocení jak leukocytů, tak erytrocytů i trombocytů. Barvivo podle Maye-Grünwalda barví cytoplazmu, barvivo podle Giemsy-Romanowského jádra bílých krvinek.

Označení bílé krvinky pochází z období, kdy se nepoužívalo barvení krevních nátěrů. Viktor Schilling (*1883-†1960) – německý hematolog, zavedl klasifikaci leukocytů a jejich diferenciální rozpočet.

Artur Pappenheim (*1870-†1916) – německý hematolog, který mj. vypracoval metodu panoptického barvení, například krevních nátěrů nebo aspirátů kostní dřeně.

Podstatou tohoto barvení je použití barviv podle Maye-Grünwalda a Giemsy-Romanowského.

(Richard May /*1863-†1937/ – německý patolog, Ludwig Grünwald /*1863-†1927/ – německý otorinolaryngolog, Gustav Giemsa /*1867-†1948/ – německý chemik, Dmitri L. Romanowsky /*1861-†1921/ – ruský parazitolog.)

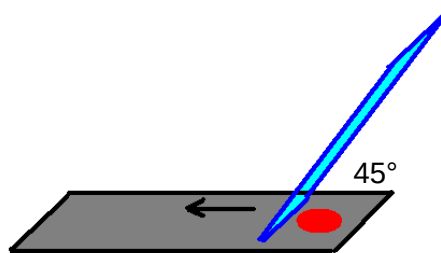
Cíle

- Příprava trvalého krevního preparátu vybraných druhů zvířat
- Panoptické barvení trvalého krevního preparátu s využitím protokolu podle Pappenheima
- Identifikace (morfologické hodnocení) leukocytů obvodové krve u vybraných druhů zvířat
- Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů
- Mezidruhové srovnání a hodnocení
- Diskuse

Metody

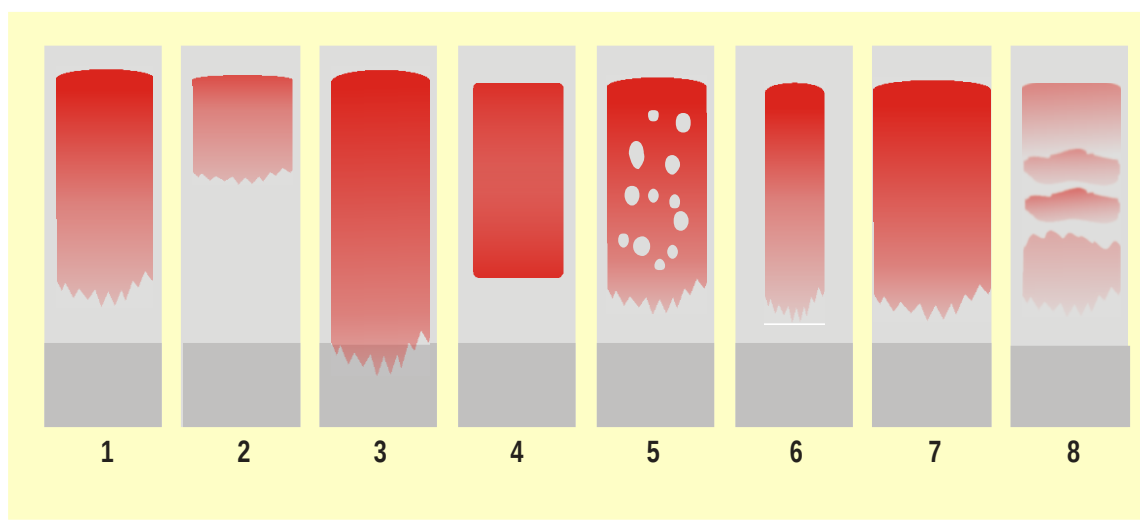
Připravit krevní nátěr

- ✓ Kápnout krev (kapka velikosti barevné špendlíkové hlavičky) na podložní sklo k matovému okraji
- ✓ Uchopit palcem a ukazovákem zabroušené roztěrové sklo, přiložit ho pod úhlem asi 45 ° až se kapka krve rozlije po celé hraně roztěrového skla a zhotovit nátěr lehkým pohybem směrem k opačnému konci podložního skla tak, aby nátěr byl rovnoměrný, tenký, s rovnými okraji a přecházel do ztracena
- ✓ Označit nátěr
- ✓ Sušit při laboratorní teplotě ve stojanu na nátěry nebo na pracovním stole (minimálně 10 min)



Postup zhotovení krevního nátěru

Kategorickým požadavkem je, aby krevní nátěry byly technicky dokonalé.

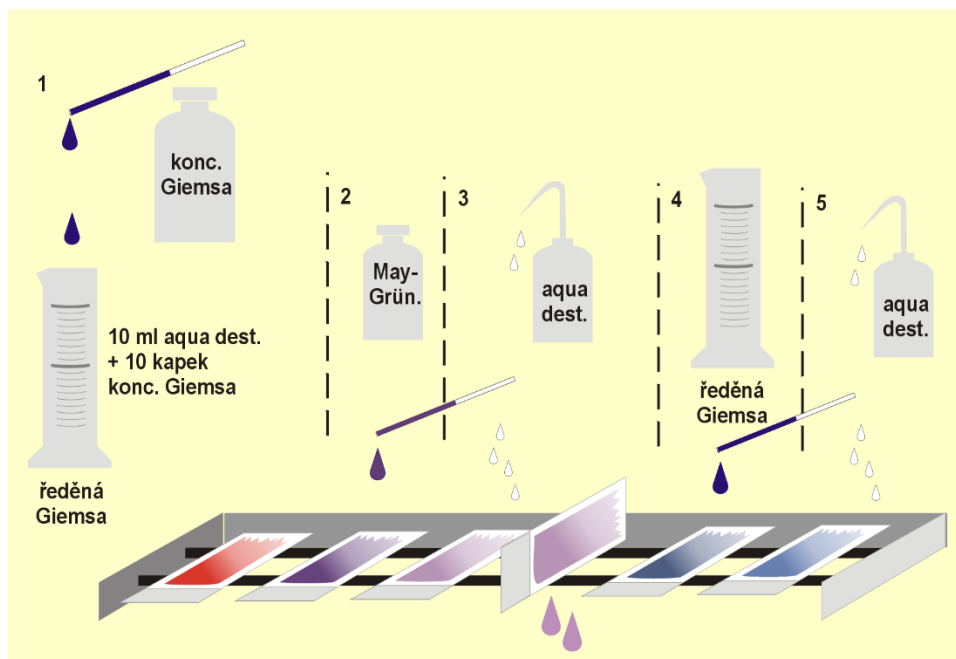


Nativní krevní nátěry

Vysvětlivky: 1 = správný nátěr, nesprávné nátěry: 2 = krátký, 3 = dlouhý, 4 = bez cípů,
5 = s mastnými oky, 6 = úzký, 7 = široký, 8 = nerovnoměrný

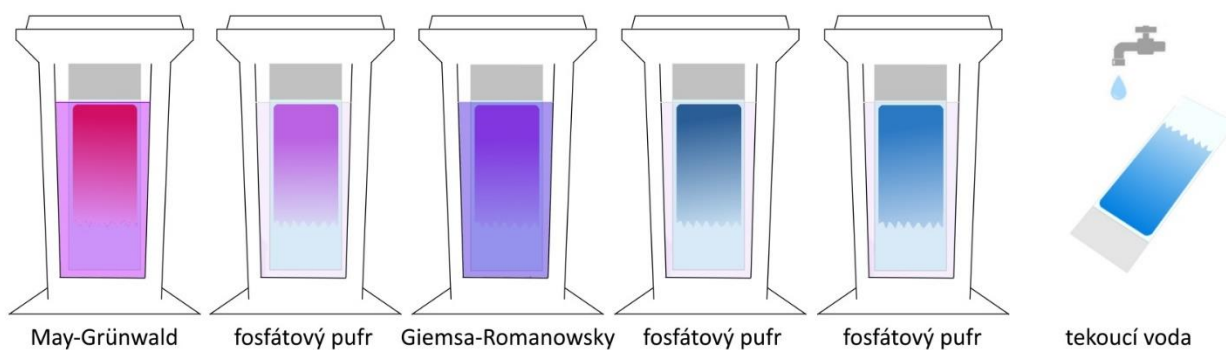
Barvení krevního nátěru

- ✓ Barvit podle Pappenheima (podložní skla v horizontální poloze):
 - Přidat asi 20 kapek roztoku podle Maye-Grünwalda, nechat působit 3 min
 - Opláchnout destilovanou vodou – 3 min
 - Přidat roztok podle Giemsy-Romanowského (ředění zásobního roztoku: 10 kapek do 10 ml vody) – 15 min
 - Opláchnout v destilované vodě, nechat oschnout při laboratorní teplotě



Postup barvení krevního nátěru podle Pappenheima (podložní skla v horizontální poloze)

✓ Barvit podle Pappenheima (v kyvetách):



- Uložit nátěr do 1. kyvety s Mayovým-Grünwaldovým roztokem – 10 min
- Oplachovat ve 2. kyvetě fosfátovým pufrém o pH 6,7-6,8 (podle potřeby vyměňovat)
- Uložit do 3. kyvety s Giemsovým-Romanowského roztokem – 10 min
- Opláchnout ve 4. kyvetě fosfátovým pufrém o pH 6,7-6,8
- Opláchnout v 5. kyvetě fosfátovým pufrém o pH 6,7-6,8
- Opláchnout pod tekoucí vodou a nechat oschnout při laboratorní teplotě
- Nátěry po nabarvení zkontrolovat mikroskopicky:
 - erytrocyty růžovošedé, leukocyty – jádra tmavě fialová, eozinofily – granule žlutohnědé až oranžové, neutrofilů – granule purpurové, bazofily – granule tmavě fialové, trombocyty tmavě růžové – viz dále

- ✓ Barvit metodou rychlého barvení – například Hemacolorem



Barvení nátěru – Hemacolor

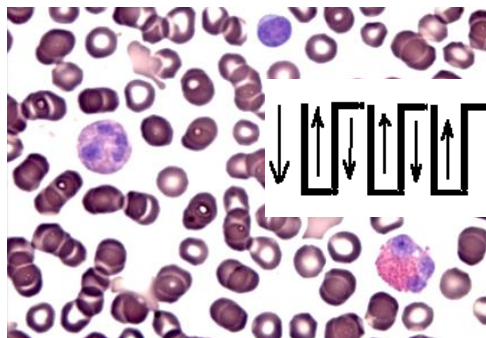
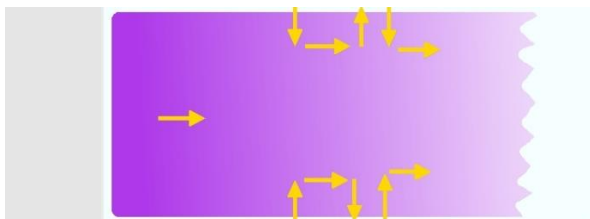
- Fixovat nátěr v alkoholové směsi po dobu 5–30 s
- Barvit v roztoku eozinu Y po dobu 3×1s až 2 min
- Barvit v roztoku azuru B po dobu 6×1s až 3 min
- Ponořit nátěr do roztoku s pufrům o pH 7,2 na 45 s, případně opláchnout pod tekoucí vodou
- Uložit nátěr do stojanu a nechat oschnout při laboratorní teplotě – 3 min
- Nátěry po nabarvení zkontrolovat mikroskopicky:
jádra všeobecně purpurová až fialová, lymfocyty – cytoplazma světle šedá až modrá, případné azurofilní granule purpurově červené, monocyty – cytoplazma šedavá, neutrofily – granule narůžovělé až světle fialové, eozinofily – granule oranžovorůžové až červenohnědé, bazofily – granule tmavě fialové až černé

Fixovaný nenabarvený nátěr lze uchovávat při laboratorní teplotě několik týdnů (do okamžiku barvení), fixovaný obarvený nátěr lze uchovávat při laboratorní teplotě několik roků. Zbarvení granulí určité populace granulocytů vykazuje rozdíly u jednotlivých druhů zvířat, případně plemen (u psů).

Rychlé testy (Hemacolor, Diff-Quik) barví intenzivněji erytrocyty – proto nemusí být odhaleny odchylky v barvě erytrocytů (polychromazie).

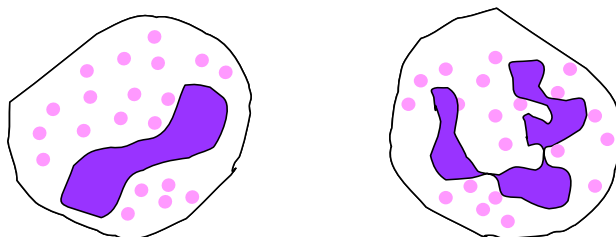
- ✓ Mikroskopie

- Umístit trvalý krevní preparát do mikroskopu, objektiv 100 (celkové zvětšení 1000×) s využitím imerzního oleje
- Meandrovité procházení preparátu v místech rovnoměrného rozprostření buněk (1–3 cm od konce nátěru), hodnocení 100 leukocytů, u patologických nálezů se doporučuje 200 buněk

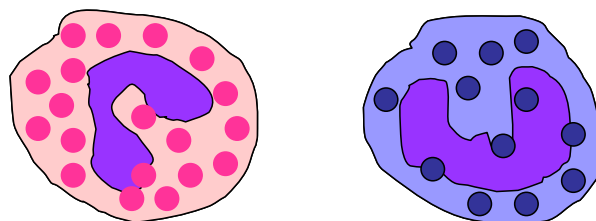


Meandrovité prohlížení trvalého krevního preparátu

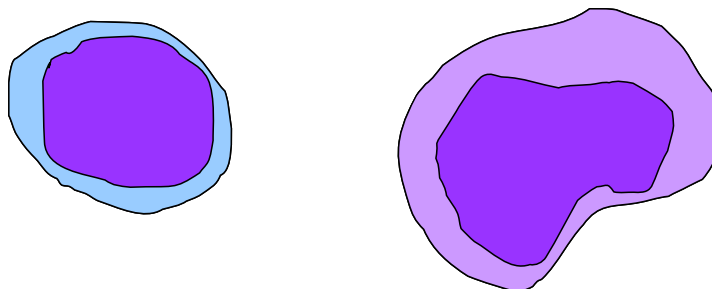
- Kategorizace hodnocených leukocytů (granulocyty neutrofilní – tyčky, segmenty, granulocyty eozinofilní, granulocyty bazofilní, lymfocyty, monocyty) na základě jejich morfologie (tvar buňky a jádra, tinkění vlastnosti cytoplazmy a jádra, přítomnost granulí, poměr jádra a cytoplazmy, velikost buňky aj.).



Schematické znázornění morfologie neutrofilních granulocytů (vlevo tyčka, vpravo segment)

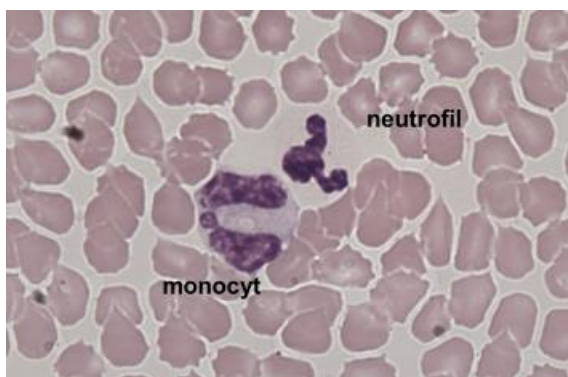


Schematické znázornění morfologie eozinofilních (vlevo) a bazofilních (vpravo) granulocytů



Schematické znázornění morfologie agranulocytů (vlevo lymfocyt, vpravo monocyt)

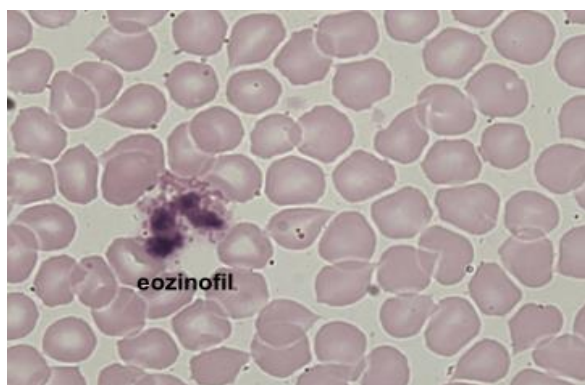
Leukocyty



Pes



Pes



Pes



Kočka

- Vyjádření diferenciálního rozpočtu leukocytů v % nebo v absolutních počtech ($n \times 10^9/l$),
pro vyjádření v absolutních počtech je nutné znát celkový počet leukocytů (viz předešlý úkol)

Výsledky

Identifikace (morfologické hodnocení) leukocytů obvodové krve a jejich popis u vybraných druhů zvířat

Druh zvířete	Neutrofil	Eozinofil	Bazofil	Lymfocyt	Monocyt

Diferenciální rozpočet leukocytů [%] u psa a kočky

Leukocyty	Pes	Kočka
Neutrofily – tyčky		
Neutrofily – segmenty		
Eozinofily		
Bazofily		
Lymfocyty		
Monocyty		

Mezidruhové srovnání diferenciálního rozpočtu leukocytů [$\times 10^9/l$] s referenčními hodnotami

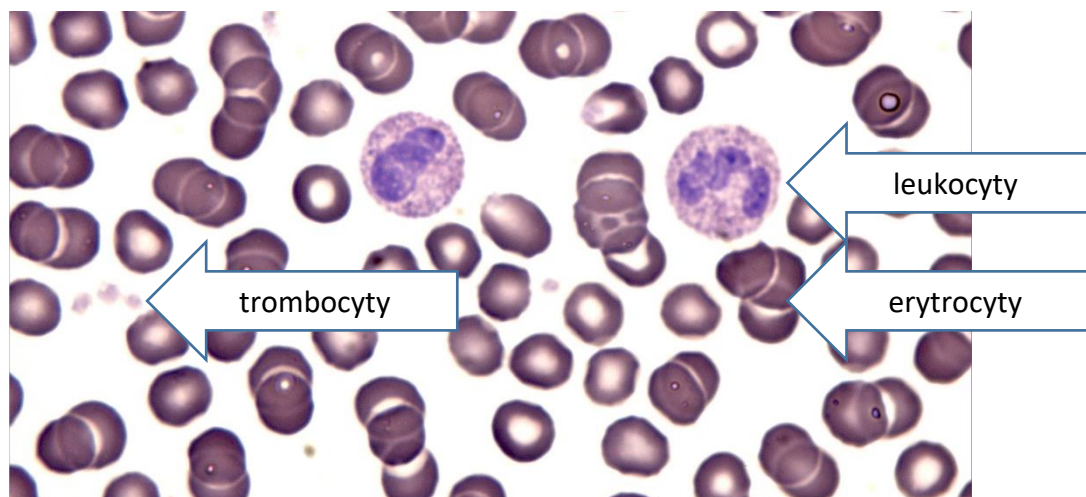
	Pes	Kočka	Kůň	Skot	Ovce	Koza	Prase	Králík*
Neutrofily - tyčky	0,0-0,45	0,0-0,3	0,0-0,1	0,0-0,12	0,0-0,12	0,0-0,12	0,0-0,9	
Neutrofily - segmenty	3,3-10,5	3,6-12,0	2,3-8,6	0,6-4,0	0,7-6,0	1,2-7,2	3,1-10,3	0,6-9,9 ⁺
Eozinofily	0,0-0,6	0,0-0,9	0,0-0,1	0,0-2,4	0,0-1,0	0,05-0,65	0,06-2,4	0,0-0,2
Bazofily	0,0-0,1	0,0-0,1	0,0-0,3	0,0-0,2	0,0-0,3	0,0-0,12	0,0-0,4	0,0-0,7
Lymfocyty	1,0-3,6	1,0-6,0	1,5-7,7	2,5-7,5	2,0-9,0	2,0-9,0	4,3-13,6	2,6-11,2
Monocyty	0,0-0,5	0,0-0,6	0,0-0,1	0,02-0,84	0,0-0,75	0,0-0,55	0,2-2,2	0,0-0,9

Vysvětlivky: ⁺ neutrofily celkem

Podle Doubka et al. (2014), * podle Knotka et al. (2017)

Diskuse

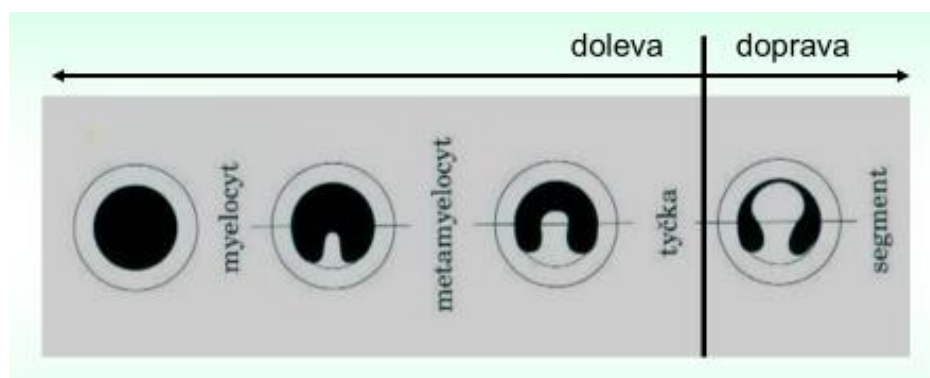
Panopticky obarvený krevní nátěr souží kromě diferenciálního rozpočtu bílých krvinek: (1) u leukocytů k hodnocení charakteru jejich jádra (chromatin, patologické segmentace), (2) u neutrofilů k průkazu inkluzí v jejich cytoplazmě (například Döhleho tělísek, což jsou modré/modrošedé útvary obsahující RNA, vyskytují se při těžkých infekcích), vakuol a toxických granulací (granule obsahují RNA a vyskytují se při těžkých infekcích), (3) u erytrocytů k posouzení jejich velikosti, tvaru, barvitelnosti, přítomnosti jader (erytroblasty) a inkluzí v cytoplazmě (například Howellových-Jollyho tělísek, což jsou zbytky jádra erytroblastu) a (4) u trombocytů k průkazu jejich velikosti, aktivace (pseudopodie) apod.



Nejvíce zastoupené buněčné krevní elementy jsou erytrocyty, což je dáno jejich celkovým počtem v objemu krve ($\times 10^{12}/l$), dále trombocyty (řádově stovky $\times 10^9/l$) a leukocyty ($\times 10^9/l$).

Funkce jednotlivých populací leukocytů

Neutrofilní granulocyty patří pro svou fagocytární schopnost a malou velikost mezi mikrofágy. Představují první buněčnou linii obrany při bakteriálních infekcích. Ve specifických granulích jsou obsaženy alkalická fosfatáza, lysozym, myeloperoxidáza, kolagenáza, elastáza, defenziny (peptidy s antimikrobiálním a cytotoxickým efektem). V mechanismech fagocytózy uplatňují svůj účinek ROS, které vznikají při respiračním (oxidačním) vzplanutí neutrofilů (respiratory burst). Do místa poškození (zánětu) pronikají z krevního řečiště diapedézou. Podle stupně vyžrávání (stupně segmentace jádra, tj. jeho rozčlenění na úseky/segmenty spojené tenkými můstky) se rozlišují neutrofilní tyče/tyčky (jádro nečleněné, nesegmentované) a neutrofilní segmenty (jádro členěné, segmentované). Průměrný počet segmentů se vyjadřuje Hynkovým číslem (Schillingovým indexem). Hynkovo číslo je počet jaderných segmentů na 100 neutrofilů. Jeho fyziologická hodnota se blíží 3. Je-li v obvodové krvi vyšší počet tyček, znamená to jejich předčasné vyplavování z kostní dřeně (z různých příčin), což se označuje posun doleva (podle toho, že při seřazení vývojových stadií neutrofilů zleva doprava, jsou mladé formy vlevo). Opačný stav se označuje posun doprava, je-li počet segmentů vyšší než 5 označuje se to hypersegmentace. V obvodové krvi přežívají neutrofily řádově jednotky hodin, můžou na základě různých signálů přestupovat do tkání, kde žijí 5-6 dní.



Eozinofilní granulocyty Mají schopnost fagocytózy, působí cytotoxicky proti parazitárním infekcím a inhibičně u hypersenzitivit. V jejich granulích jsou přítomné myeloperoxidáza, histamin, elastáza, defenziny.

Bazofilní granulocyty mají v granulích heparin, serotonin, histamin. Uplatňují se při hypersenzitivitách, zánětových reakcích, při inhibici parazitárních infekcí. Funkčně jsou to vlastně cirkulující žírné buňky, ale s odlišným – segmentovaným jádrem. U koček a psů jejich granule nejsou tmavé, ale spíše v odstínech růžové až purpurové.

Lymfocyty jsou zapojené do mechanismů specifické i nespecifické imunity. Recirkulují mezi krví a lymfou. Můžou se tak setkávat s antigeny v lymfatických tkáních a vykonávat tím imunitní dohled. Obsahují fosfatázy, lipidy aj.

B-lymfocyty (B-buňky) zajišťují humorální imunitu (produkci protilátek – imunoglobulinů), diferencují se v kostní dřeni. Délka života B-lymfocytů se uvádí přibližně 2 až 3 týdny.

T-lymfocyty (T-buňky) zprostředkovávají buněčnou (přímý cytotoxický účinek) imunitu. Rozlišují se subpopulace (1) pomocných T-lymfocytů (T_H), které stimulují B-lymfocyty

k produkci protilátek proti určitým antigenům (virům, bakteriím, alergenům), (2) cytotoxických T-lymfocytů (T_C), které vykazují toxický (lytický) efekt na cílové buňky a (3) regulačních T-lymfocytů (T_{reg}), které tlumí imunitní reakce. T-lymfocyty (T-buňky) se diferencují v thymu. Délka života T-lymfocytů může činit roky.

Subpopulací lymfocytů jsou také non B- a non T-lymfocyty (NK-buňky), které vykazují cytotoxicitu proti nádorovým buňkám, virem napadeným buňkám aj., uplatňují se tedy nespecificky.

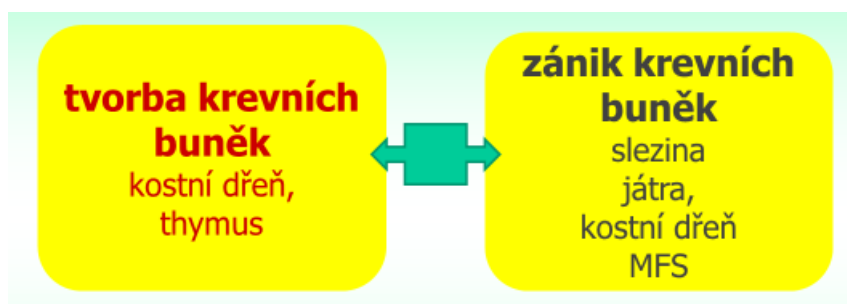
B- a T-lymfocyty a jejich subpopulace nelze rozlišit s využitím trvalého obarveného krevního nátěru, jejich diferenciaci je založena na detekci specifických povrchových markerů, nejčastěji metodou imunofenotypizace s využitím průtokové cytometrie.

Monocyty jsou největší buňkami obvodové krve. Patří mezi profesionální fagocyty – jsou součástí monokleárního (monocyto-makrofágového) fagocytárního systému (MPS/MFS) a zajišťují tedy nespecifickou imunitu. Ve tkáních se diferencují na tkáňové makrofágy. Fagocytují bakterie, mikroskopické houby, viry, zestárlé buňky (erytrocyty), cizorodé látky. Vykazují cytotoxický efekt proti nádorovým buňkám. Předkládají (prezentují) antigen T-lymfocytům. Obsahují esterázy, myeloperoxidázu (pouze mladé), lysozym aj. Tvoří se v kostní dřeni, po vyplavení z kostní dřene často marginují na endotel cév. Délka života je ve dnech, ale ve tkáních přežívají i několik let.

Kristián Hynek (*1879-†1960) – český internista.
Karl G. P. Döhle (*1855-†1928) – německý patolog.

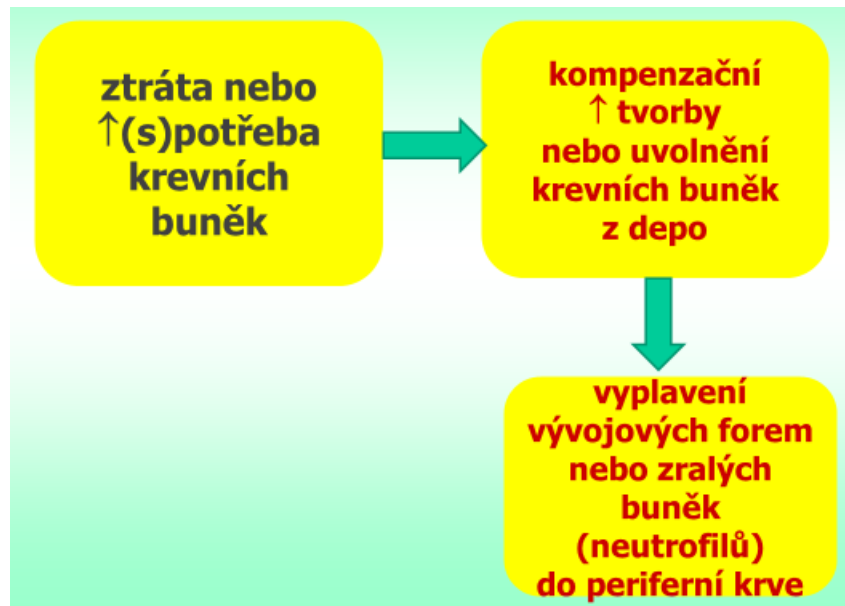
Regulace a dysregulace buněčných krevních řad (obecně)

Tvorba krevních buněk je v dynamické rovnováze s jejich zánikem

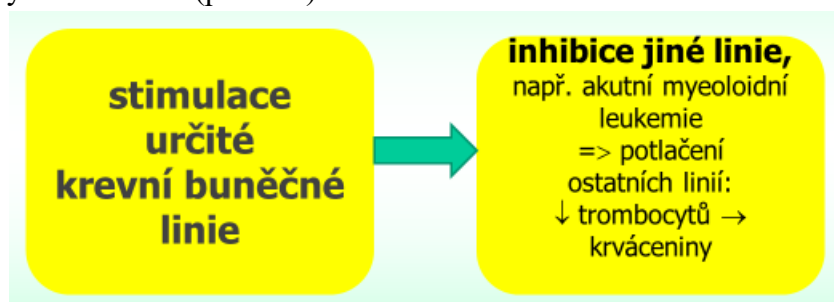


Vysvětlivky: MFS – mononukleární (monocyto-makrofágový) fagocytární systém

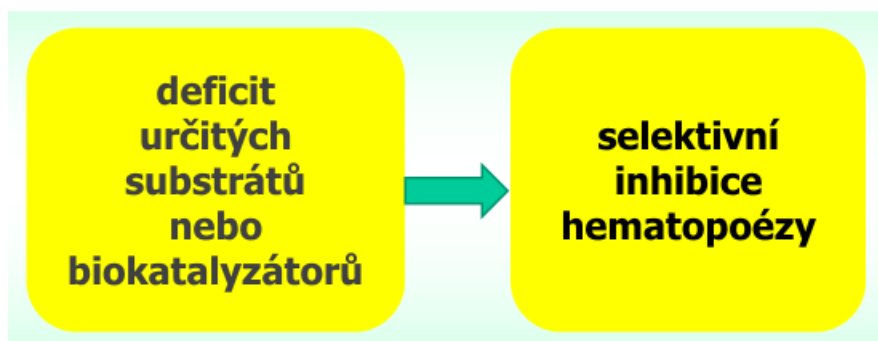
Ztráta krve nebo zvýšená potřeba či spotřeba krevních buněk indukuje jejich nahrazování zvýšenou proliferací. Při takové kompenzaci vznikají i kvalitativní změny buněčného složení obvodové krve. V rámci obranných pochodů se v obvodové krvi můžou objevit nezralé formy leukocytů (posun doleva).



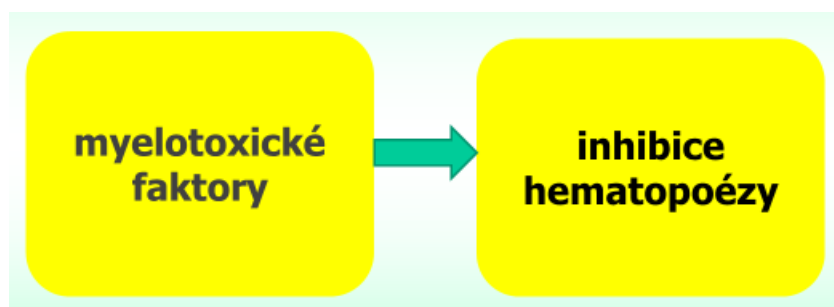
Stimulace určité buněčné linie může vyvolat potlačení jiné řady. Například zmnožení nezralých forem při akutní myeloidní leukemii (myeloblastů) potlačí ostatní krevní řady, což může mít za následek, je-li potlačena například megakaryopoéza, snížený počet trombocytů a vznik tečkovitých krvácenin (petechií) na kůži nebo sliznicích.



Pro hematopoézu jsou nezbytné substráty – například Fe, biokatalyzátory – například vit. B₁₂ a folát. Jejich nedostatek vyvolá poruchy krvetvorby. Pro krvetvorbu je důležité hematopoetické induktivní mikroprostředí zahrnující různé buněčné systémy (endotelie, makrofágy, fibroblasty, vývojová stadia krevních buněk aj.). Regulaci hematopoézy zajišťují humorální (látkové) faktory – klasické hormony (pohlavní hormony, hormony štítné žlázy aj.), růstové faktory (erythropoetin, trombopoetin aj.).



Mezi myelotoxické faktory (působící toxicky na kostní dřeň) patří například chemikálie, léky, záření, chronické infekce nebo nádory. Myelotoxickými faktory bývají nejméně zasaženy lymfocyty a trombocyty.



Abnormality počtu leukocytů v obvodové krvi zahrnují jak zvýšení počtu, tak jeho snížení. Zvýšený počet leukocytů nad horní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **leukocytóza**. Snížený počet leukocytů pod dolní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **leukopenie**. Jejich hlavní příčiny jsou uvedeny výše.

Zvýšený počet neutrofilů nad horní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **neutrofilie**. Jejimi příčinami bývají (akutní) bakteriální záněty (výrazná neutrofilie bakteriálního původu je zejména u psa, kočky a prasete, naopak u skotu nemusí být zjištěna), dále stres, nádory kostní dřeně aj. Snížený počet neutrofilů pod dolní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **neutropenie**. Vyskytuje se při virových onemocněních (parvoviróze), septických stavech aj. Zvýšený počet eozinofilů nad horní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **eozinofilie**. Bývá zjišťována při hypersenzitivitách, parazitárních infekcích aj. Snížený počet eozinofilů pod dolní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **eozinopenie**, bývá zjišťována například při zvýšené funkci kůry nadledvin nebo po aplikaci kortikoidů. Zvýšený počet bazofilů nad horní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **bazofilie**, doprovází parazitární infekce a hypersenzitivity. Snížený počet bazofilů vzhledem k jejich velice malému počtu v obvodové krvi je prakticky neprokazatelný.

Zvýšený počet lymfocytů nad horní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **lymfocytóza**. Bývá zjišťována při chronických infekcích, nádorových onemocněních krvetvorných orgánů aj. Snížený počet lymfocytů pod dolní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **lymfopenie**. Vyskytuje se při stresu, akutních virových infekcích aj. Zvýšený počet monocytů nad horní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **monocytóza**. Bývá při těžkých zánětech (spojených s destrukcí tkáně a uvolněním monocytů do krve). Snížený počet monocytů pod dolní hranici referenčního rozmezí daného zvířecího druhu se označuje **monocytopenie**, má však malý vypovídací význam.

Hodnocení funkcí leukocytů (fagocytární aktivita, aktivita lymfocytů, hladiny protilátek, případně další testy) je předmětem dalšího tématu.

Závěr, poznámky & komentáře

IMUNITNÍ SYSTÉM

Nespecifická imunita

Fagocytóza

Úvod

Leukocyty se uplatňují jak při nespecifické, tak specifické imunitní odpovědi organismu. Mezi důležité funkce neutrofilních granulocytů a makrofágů patří **fagocytóza**. Tento obranný proces probíhá v několika fázích, jejichž podstatou je rozpoznání cizorodé částice fagocytující buňkou, její navázání na částici, pohlcení částice a potom degradace pohlčeného materiálu (v případě živých objektů, například bakterií, jejich usmrcení). Podmínkou je, aby částice měly průměr alespoň 0,1 μm . Pohlcování částic nepocházejících z fagocytující buňky se označuje heterofagie, pohlcování částic původem z vlastní buňky (poškozené orgány) se označuje autofagie.

Hodnocení fagocytární schopnosti leukocytů slouží k posouzení připravenosti nespecifické složky imunitního systému. Testy fagocytózy jsou důležitým vyšetřením nespecifické buněčné imunity. K testování schopnosti fagocytů pohltnout cizorodý materiál se používají různé substráty. Principem jedné z metod je předložení arteficiálních částic (mikrosférických hydrofilních partikulí, MSHP) buňkám obvodové krve a po inkubaci hodnocení fagocytů na trvalém obarveném krevním preparátu. Analýza se provádí buď u všech potenciálních fagocytů, nebo separátně pro jednotlivé populace (neutrofilní granulocyty vs. monocyty). Výsledkem pro hodnocení nespecifické imunity je číslo udávající podíl skutečně fagocytujících buněk v populaci potenciálních fagocytů, tj. **fagocytární aktivita (FA)** a průměrný počet částic fagocytovaných jednou buňkou, tj. **fagocytární index (FI)**. Tato metoda se týká pouze vyšetření fagocytární fáze pohlcování.

Další metodou jsou například baktericidní testy. Je to skrínigové posouzení všech fází fagocytózy až do usmrcení pohlcené bakterie, tzn. živého mikroorganismu. Používá se například *Candida albicans* nebo *Staphylococcus aureus* aj. Principem metody v případě použití *C. albicans* je inkubace krve se suspenzí kandid, dále obarvení trypanovou modří a lýza fagocytů (například osmoticky). Hodnocení se provádí pod mikroskopem, přičemž usmrcené kandidy jsou zbarvené modře, neusmrcené mají barvu nezměněnou, tj. bílou. Metoda má význam ve výzkumu, v diagnostice se nevyužívá.

K vyhodnocení baktericidních testů lze dnes použít například průtokovou cytometrii. Respirační (oxidační) vzplanutí neutrofilů při fagocytóze lze hodnotit **cytochemickým NBT testem**. Principem metody je přeměna nitrotetrazoliové modři (NBT, nitro-blue tetrazolium) působením reaktivních forem kyslíku, přičemž vznikne tmavomodrá až černá sraženina

formazánu v neutrofilech. Hodnotí se podíl (%) pozitivních buněk ze 100. Oxidační vzplanutí neutrofilů lze kvantitativně stanovit chemiluminiscencí.

Cíle

- Určení fagocytární aktivity a fagocytárního indexu u dvou populací fagocytů – neutrofilních granulocytů a monocytů
- Výpočet % pozitivních buněk při použití NBT testu
- Diskuse

Metody

Určení fagocytární aktivity a fagocytárního indexu

(použití mikrosférických hydrofilních partikulí)

- ✓ Připravit soupravu mikrosférických hydrofilních partikulí na stanovení fagocytární schopnosti leukocytů
- ✓ Připravit čerstvě (do 30 min) odebraný vzorek heparinizované obvodové krve
- ✓ Smíchat vzorek krve s mikrosférickými hydrofilními partikulemi
- ✓ Inkubovat vzorek při teplotě 37 °C – 30 min, občas jemně promíchat
- ✓ Zhotovit trvalý krevní preparát

Mikrosférické hydrofilní partikule (MSHP) mají průměr 1 μm a jsou tvořené hydroxyetylmetakrylátem. Mají malý negativní náboj, který minimalizuje jejich schopnost přilnout k buněčným povrchům.

Hodnocení fagocytární schopnosti leukocytů

- ✓ Zhodnotit parametry fagocytózy (FA, FI) pod mikroskopem (zv. 1000 $\times$) u 100 buněk (prohlížet meandrovitým pohybem)

NBT test

- Smíchat ve zkumavce 0,4 ml čerstvé heparinizované krve + 0,2 ml filtrovaného 2% vodného roztoku NBT + 0,2 ml fosfátového pufru o pH 7,2
- Inkubovat v termostatu při 37 °C – 25 min, každých 10 min promíchávat jemným přeléváním
- Nechat stát při 18-25 °C – 10 min, promíchat
- Zhotovit tenké nátěry, nechat na vzduchu oschnout
- Fixovat metylalkoholem – 15 min
- Obarvit roztokem podle Giemsy-Romanowského (10 kapek do 10 ml vody) – 10-15 min, nechat na vzduchu oschnout
- Spočítat pod mikroskopem pozitivní neutrofile (mají uvnitř tmavomodrou až černou sraženinu)

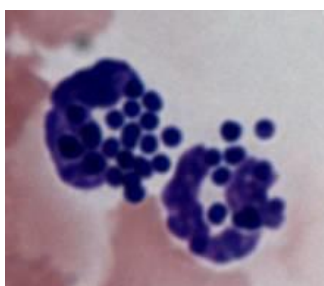
Hodnocení NBT testu

- ✓ Vypočítat % pozitivních buněk ze 100 neutrofilů

Výsledky

Vyhodnocení fagocytární schopnosti leukocytů

- Trvalý krevní preparát s fagocytujícími buňkami



Fagocytující neutrofilní granulocyty v trvalém krevním preparátu

- Vyhodnocení z trvalého krevního preparátu

Hodnocený živočišný druh:

Hodnocená populace buněk:

Fagocytární aktivita (% reálně fagocytujících buněk ze 100 potenciálních):

Fagocytární index (průměrný počet částic na jednu fagocytující buňku):

Jako fagocytující se hodnotí buňka, která pohltila minimálně 3 částice.

- Záznam hodnocení parametrů fagocytózy

Populace buněk	Potencionální fagocyty [n]	Fagocytující fagocyty [n]	Fagocytární aktivita [%]	Pohlčené částice [n]	Fagocytární index
Fagocyty celkem					
Neutrofily					
Monocyty					

- Srovnání s referenčními hodnotami

Na našem pracovišti jsme zjistili u zdravých prasat hodnoty: fagocytární aktivita – nad 25 % neutrofilů, fagocytární index – kolem 2,4.

Tyto hodnoty byly získány vyšetřením krve malého počtu zvířat a je třeba je chápat jako orientační!

Z hlediska diagnostiky je výpovědní hodnota FA a FI malá. Omezený význam mají pouze snížené hodnoty, a to při závažných onemocněních, jako jsou septické stavy nebo nádorová onemocnění v terminálním stadiu.

Vyhodnocení NBT testu

- Vyhodnocení z obarveného preparátu

Hodnocený živočišný druh:

% pozitivních neutrofilů (ze 100 buněk):

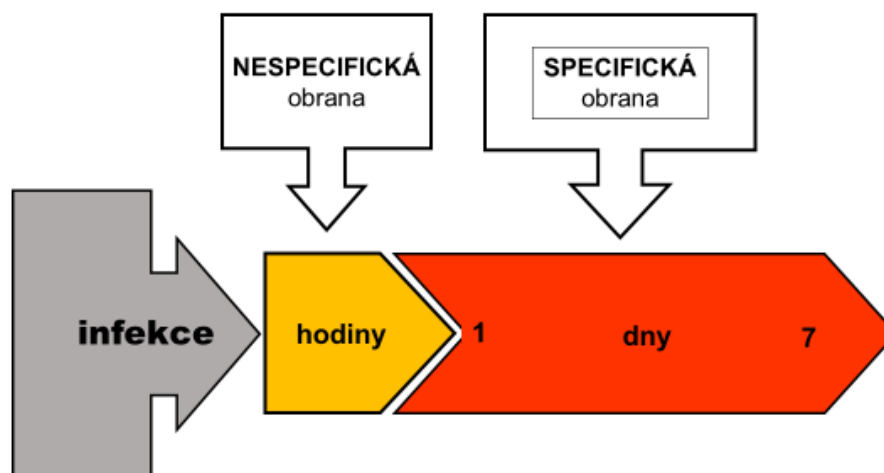
- Srovnání s referenčními hodnotami

Hodnoty získané na našem pracovišti byly u zdravých psů v rozmezí 5-15 %. Byly získány vyšetřením krve omezeného počtu zvířat, proto je také vnímáme jako orientační!

Zvýšené hodnoty lze očekávat při bakteriálních infekcích, snížené hodnoty při snížené aktivitě neutrofilních granulocytů, například při těžkých infekcích nebo při aplikaci léků tlumících krvetvorbu (kortikoidů).

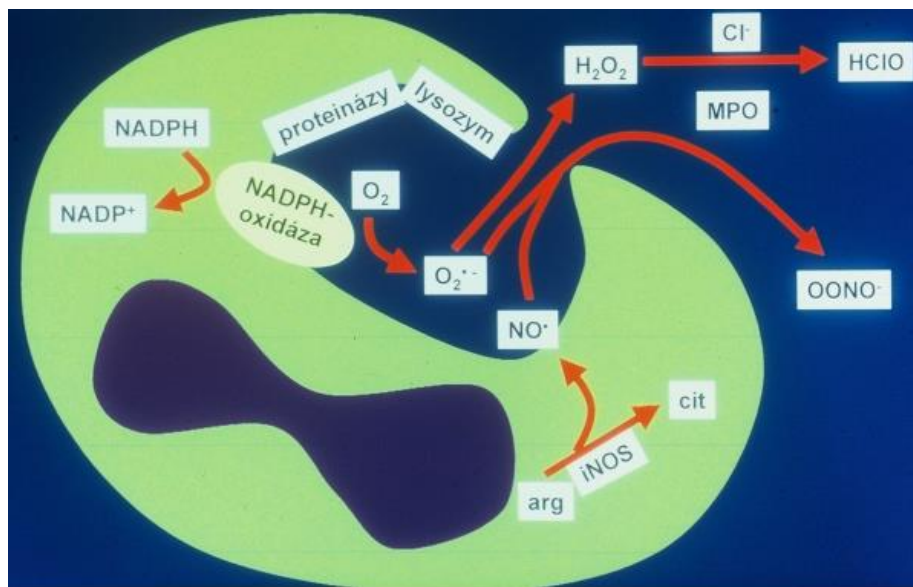
Diskuse

Fagocytóza je obranný proces uplatňující se při nespecifické (vrozené) imunitě. Představuje první linii obrany proti infekcím. Na časové ose je vymezena hodinami.



Buněčnými složkami fagocytárního systému jsou neutrofilní granulocyty, eozinofilní granulocyty a dále buňky mononukleárního (monocyto-makrofágového) fagocytárního systému (MFS) – monocyty, dendritické buňky (v lymfatické tkáni), Kupfferovy buňky (v játrech), alveolární makrofágy (v plicích), mikroglie (v mozku), osteoklasty (v kostech), Langerhansovy buňky (v kůži) aj. Fagocytóze předchází usměrněný pohyb fagocyta za škodlivinou. Vlastní fagocytóza probíhá v několika fázích:

- přilnutí (adheze) fagocyta k fagocytovanému objektu a jeho aktivace navozená adhezí, různými signály z poškozené tkáně (alarminy) aj.,
- pohlcení (ingescence) fagocytovaného objektu, vytvoření fagosomu a jeho splynutí s lyzosomy a vznik fagolyzosomu,
- usmrcení živého objektu buď mechanismy závislémi na kyslíku – při respiračním/oxidačním vzplanutí vzniklými reaktivními formami kyslíku přímo či v součinnosti s enzymem myeloperoxidázou a chloridy, nebo mechanismy na kyslíku nezávislémi – lysozymem, laktoferrinem, defenziny aj.,
- trávení/rozložení (digesce) objektu hydrolytickými enzymy na nízkomolekulové fragmenty (reziduální tělíska) a ty jsou z fagocyta vyvrženy.



Oxidační vzplanutí neutrofilů

Vysvětlivky: NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováný), NADP⁺ – nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný), O₂⁻ – superoxid, NO[•] – radikál oxidu dusnatého, arg – arginin, cit – citrulin, iNOS – inducibilní NO-syntáza, MPO – myeloperoxidáza, HClO – kyselina chlorná, OONO⁻ – peroxynitrit

Lyzozym – enzym štěpící β-1-4-glykosidové vazby v polysacharidech stěny bakterií, je produkován fagocyty, obsažen je i ve slinách, slzách a ve vaječném bílku.

Laktoferrin – protein nacházející se například v neutrofilech, váže železo, které je růstovým faktorem bakterií.

Defenziny – peptidy nacházející se v neutrofilech a makrofázích, jejich antimikrobiální efekt spočívá v perforaci buněčné stěny bakterie.

Fagocyty pohlcují cizorodé částice, ale nedestruují normální buňky a tkáně vlastního organismu savce. Tato důležitá selekce je založena na těchto předpokladech:



Drsné povrchy zvyšují pravděpodobnost fagocytózy. Protektivní (ochranný) povrch zdravých buněk je odvozen od složení cytoplazmatické membrány. Mezi mechanismy sloužící k rozpoznání cizorodého materiálu patří například systém komplementu.

Proces fagocytózy zahrnuje nejenom destrukci pohlcených částic, ale také indukci sekrece řady látek (mediátorů), které eliminují cílový materiál nefagocyticky a uplatňují se v zánětových a jiných imunitních procesech. Tyto mediátory mají mj. schopnost vyvolat:

- aktivaci kininového systému s účinky: chemotaxe (podpora migrace fagocytů), aktivace nociceptorů (receptorů bolesti), stimulace komplementového systému, zesílení cévní odpovědi při zánětu,
- aktivaci koagulace a inhibitorů koagulace,
- stimulaci uvolňování histaminu,
- stimulaci aktivity lyzozomálních enzymů, laktoferrinu aj.,
- stimulaci granulopoézy v kostní dřeni,
- stimulaci syntézy proteinů akutní fáze zánětu (podporují imunitní odpověď),
- stimulaci činnosti hypotalamu (rozvoj horečky),
- aktivaci T- a B-lymfocytů (propojení nespecifické a specifické složky imunity).

Kininy – peptidy, které vznikají působením enzymu kallikreinu na jejich prekurzory – kininogeny.

Systém komplementu – soubor několika desítek glykoproteinů, většinou se nacházejících v krevním séru v neaktivním stavu, aktivovány jsou například protilátkami, viry, parazity atd., stimulují chemotaxi, agregaci neutrofilů, opsonizaci („zchutnění“ bakterií pro fagocyty) aj.

Proteiny akutní fáze zánětu – jsou to většinou glykoproteiny, syntetizované v játrech, stimulují mj. chemotaxi a adhezi fagocytů, opsonizaci, stimulují tvorbu protilátek, aktivují komplement aj.

Závěr, poznámky & komentáře

C-reaktivní protein

Úvod

C-reaktivní protein (CRP) patří mezi tzv. proteiny akutní fáze, jejichž koncentrace výrazně stoupá během akutního zánětu. Detekuje se v nesrážlivé plné krvi, plazmě nebo séru.

Principem metody je navázání CRP v testovaném vzorku na protilátku anti-CRP obsaženou v testu. Tento komplex následně migruje do oblasti „T“, kde je fixována sekundární protilátka, na níž se vytvořený komplex CRP a anti-CRP naváže – vzniká barevný proužek. Protilátka je také v zóně „C“, která slouží jako kontrola – vzniká druhý barevný proužek.

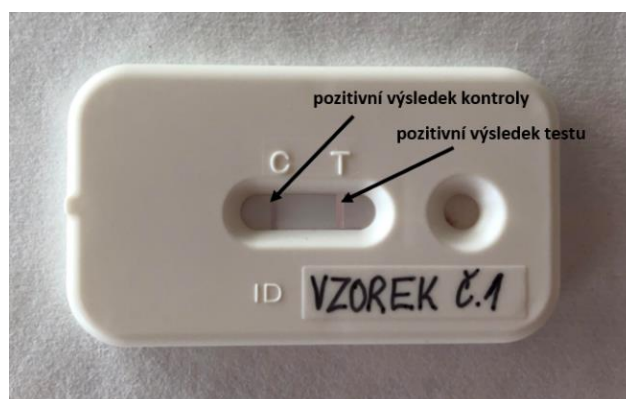
Cíle

- Stanovení CRP jako markeru akutního zánětu
- Diskuse

Metody

- ✓ Nanést 5 µl plazmy/séra nebo 10 µl nesrážlivé plné krve do kulatého konce testovací části proužku
- ✓ Přidat 2 kapky pufru
- ✓ Po 5 minutách odečíst výsledek

Výsledky



Diskuse

CRP je lektin, jehož syntéza v hepatocytech mnohonásobně stoupá během akutního zánětu, přičemž maxima dosahuje přibližně za 24 hodin. U zdravých zvířat je jeho tvorba velmi nízká. Výrazný vzestup koncentrace CRP v krvi je tak markerem akutního zánětu. Syntéza CRP je stimulována prozánětovými cytokiny (interleukinem-1, IL-1, interleukinem-6, IL-6, faktorem nekrotizujícím tumory α , TNF α). Z funkčního hlediska patří CRP do nespecifické imunity. Váže se na stěny bakterií a jaderné komponenty, jejichž přítomnost signalizuje poškození tkání. Účastní se také aktivace komplementu a opsonizace antigenu.

U některých druhů zvířat nemá jeho stanovení diagnostické využití, například u koní jej nahrazuje stanovení jiného proteinu akutní fáze, a sice sérového amyloidu A (SAA).

Specifická imunita

Protilátková imunita

Úvod

Specifická (získaná, adaptivní) imunita je založena na aktivaci lymfocytů. Jedním typem specifické imunity je **protilátková (humorální) imunita**, která se odvozuje od aktivace B-lymfocytů (B-buněk). B-lymfocyty mají schopnost rozpoznat specifické mikroby i nemikrobní proteinové antigeny pomocí receptorů, lokalizovaných na své membráně a označovaných BCR. Vyvolaná odpověď se na rozdíl od nespecifické imunity manifestuje s určitým zpožděním.

K vyšetření protilátkové imunity se používají **imunologické testy** zaměřené na stanovení koncentrace tříd imunoglobulinů (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM). Z hlediska klinické imunologie se jedná o metody první volby. V rámci imunologických metod druhé volby (specializovaných) se k vyšetření protilátkové imunity využívá například vyšetření autoprotilátek nebo podtříd některých imunoglobulinů.

Protilátky se nejčastěji stanovují v krevním séru, lze je ale stanovit v celé řadě dalších tělních tekutin, například v krevní plazmě, moči, mozkomíšním moku, výpotcích apod.

Druhým typem specifické imunity je buněčná (celulární) imunita, která se odvozuje od aktivace T-lymfocytů (T-buněk). Také T-lymfocyty mají schopnost pomocí receptorů rozpoznat specifické antigeny. Tyto receptory T-lymfocytů jsou označovány TCR, jsou rovněž lokalizované na membráně a reagují pouze s jedním typem agens. Vyvolaná odpověď se projeví později.

K vyšetření specifické buněčné imunity se používají imunologické testy zaměřené například na stanovení počtu T-lymfocytů. Z pohledu klinické imunologie se jedná o metody první volby. V rámci imunologických metod druhé volby (specializovaných) se k vyšetření specifické buněčné imunity využívají například imunofenotypizace (rozlišení subpopulací lymfocytů) nebo funkční vyšetření buněčné imunity (test blastické transformace T-lymfocytů).

Cíle

- Stanovit koncentraci imunoglobulinů srážecí Zn-sulfátovou metodou
- Provést separaci imunoglobulinů elektroforézou
- Diskuse

Metody

Srážecí metoda Zn-sulfátem

Příprava reagensů

- ✓ Připravit roztok síranu zinečnatého: 208 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ do 1000 ml destilované, 15 minut převařené vody, $\text{pH} = 5,8$
(pH roztoku je nutné před každým stanovením kontrolovat a upravovat)
- ✓ Připravit fyziologický roztok chloridu sodného
- ✓ Zajistit standardní sérum o známé koncentraci imunoglobulinů (například Exatest, Lyonorm, Precinorm apod.)

Postup stanovení

- ✓ Napipetovat 25 μl séra do 1,5 ml roztoku ZnSO_4 , dobře protřepat
- ✓ Pro slepou zkoušku napipetovat 25 μl séra do 1,5 ml fyziologického roztoku, dobře protřepat
- ✓ Slepou zkoušku je vhodné dělat pro každé vyšetřované sérum (nutné zejména u hemolytických nebo starších sér)
- ✓ Každou sérii vyšetření prováděnou za stejných podmínek je nutné doplnit vyšetřením standardního séra o známé koncentraci imunoglobulinů, včetně jeho slepé zkoušky
- ✓ Nechat stát při laboratorní teplotě – 120 min
- ✓ Bezprostředně před vlastním měřením důkladně protřepat
- ✓ Intenzitu vytvořeného zákalu stanovit spektrofotometricky v procházejícím světle o vlnové délce 590 nm na základě úbytku absorbance, koncentrace imunoglobulinů je přímo úměrná intenzitě vytvořeného zákalu

Výpočet koncentrace imunoglobulinů

- ✓ Od absorbancí vyšetřovaného vzorku a kontrolního séra se odečtou absorbance příslušných slepých zkoušek
- ✓ Koncentrace imunoglobulinů ve vyšetřovaném vzorku se vypočte úměrou na základě absorbance standardního séra o známé koncentraci imunoglobulinů nebo z kalibrační křivky sestavené z hodnot několika ředění standardního séra

Separace imunoglobulinů elektroforézou

Viz téma Funkce a separace plazmatických proteinů

Výsledky

Srážecí metoda Zn-sulfátem

Živočišný druh	Koncentrace imunoglobulinů (g/l)

Mezidruhové srovnání koncentrace imunoglobulinů (g/l) s literárními údaji

Třída Ig	Pes	Kočka	Kůň	Skot	Ovce	Prase
IgG	9,25-20,00	11,70-22,60	3,34-24,60	17,60-22,90	20,95-30,52	18,31-28,20
IgM	1,30-2,00	0,06-0,39	1,20-1,80	2,39-3,48	1,51-6,80	3,15-4,80
IgA	0,44-1,77	0,10-0,58	1,53-3,05	0,25-0,50	0,07-0,35	1,44-2,68

Podle Tomana et al. (2008)

Diskuse

Protilátková (humorální) imunita je zajišťována B-lymfocyty, respektive jejich aktivovanou formou – plasmocyty (ty jsou konečným stadiem B-lymfocytů). B-lymfocyty jsou stimulovány extracelulárními antigeny. Vznikají z nich plasmocyty (plazmatické buňky), které potom produkují specifické protilátky (chemicky to jsou gamaglobuliny, imunoglobuliny). Ty představují výkonné molekuly humorální imunity. Protilátky jsou složeny ze dvou totožných těžkých řetězců a dvou totožných lehkých řetězců. Těžkým řetězcům, označovaným písmeny řecké abecedy – alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gama (γ) a mí (μ), odpovídají třídy imunoglobulinů – IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Specifická odpověď nastupuje se zpožděním a odvíjí se od toho, zda se kontakt organismu s antigenem uskutečnil poprvé (tvorba IgM), nebo ke kontaktu organismu s antigenem došlo již někdy dříve (tvorba IgA, IgE, IgG). U skotu, ovce a prasete nebyly prokázány IgD. Protilátky se nacházejí v krevním séru, IgA jsou kromě toho secernovány na povrch epitelů.

Protilátky mají rozličné funkce, například zintenzivňují fagocytózu tím, že přilnou k povrchu mikroba (toto jakési „zchutňování“ fagocytovaného objektu se označuje opsonizace), inaktivují bakteriální toxiny, zamezují průniku viru do buňky tím, že se navážou na určitá místa virové partikule (virus je tak neutralizován), aktivují komplement. Při aktivaci komplementu vznikají různé faktory, které se podílejí na lýze antigenu, na jehož povrchu se vytváří struktura, označovaná komplex atakující membránu.

Základním vyšetřením humorální imunity je stanovení protilátek. Kvalitativním vyšetřením lze stanovit třídu protilátek. Elektroforéza (imuno elektroforéza) je metodou orientační. Kvantitativní analýzou se hodnotí celková koncentrace protilátek nebo koncentrace dané protilátky. K tomu se používají zákalové metody (nefelometrie nebo turbidimetrie), na vzniku

zákalu je založena i Zn-sulfátová metoda. Specifita protilátek se dnes obvykle stanovuje metodou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Stanovení koncentrace protilátek se využívá k diagnostice imunodeficiencí (nedostatečnosti funkcí imunitního systému), v tomto případě protilátkové imunodeficience, projevující se sníženou odolností proti infekcím v důsledku snížené tvorby protilátek.

K rychlé detekci protilátek, ale i dalších markerů (například biochemických) u různých nemocí, tzn. diagnosticky, se dnes používají v humánní medicíně také rychlotesty.

Závěr, poznámky & komentáře

Autoprotilátky

Úvod

Specifická neodpovídavost imunitního systému na určitý antigen, který by ale za jiných podmínek vyvolal u téhož individua imunitní odpověď, se nazývá **imunologická tolerance**. Mechanismy imunologické tolerance se obvykle člení na (1) centrální a (2) periferní. Centrální tolerance se ustanovuje pouze v primárních lymfatických orgánech – pro T-lymfocyty v thymu a pro B-lymfocyty v kostní dřeni, v primárních lymfatických orgánech se B- a T-lymfocyty tvoří, dozrávají a také eliminují. Periferní tolerance probíhá v sekundárních lymfatických orgánech – mizních uzlinách, slezině, tonzilách aj. V sekundárních lymfatických orgánech dochází k reakcím B- a T-lymfocytů s buňkami prezentujícími antigen (upravují antigen do podoby, kterou jsou schopné rozpoznat T-lymfocyty). Mezi buňky prezentující antigen patří B-lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky, epitelové buňky aj.

Pro život jedince je nutná tolerance ke strukturám vlastního těla, tj. **autotolerance**. Autotolerance se formuje již intrauterinně, tj. před narozením, kdy se plod ve sterilní děloze setkává pouze s vlastními antigeny.

Za určitých podmínek vznikají působením antigenů vlastního těla (autoantigenů) **autoprotilátky**. K průkazu autoprotilátek se používají mj. Coombsovy testy.

Robin R. C. Coombs (*1921-†2006) – britský veterinární patolog. Jím (společně s Mourantem a Raceem) vypracovaný test (viz dále) se používá i v humánní medicíně (dnes již řidčeji).

(Arthur Ernest Mourant /*1904-†1994/ – britský chemik, hematolog a genetik, Robert Russell Race /*1907-†1984/ – britský hematolog a genetik.)

Cíle

- Průkaz autoprotilátek přímým Coombsovým testem
- Diskuse

Metody

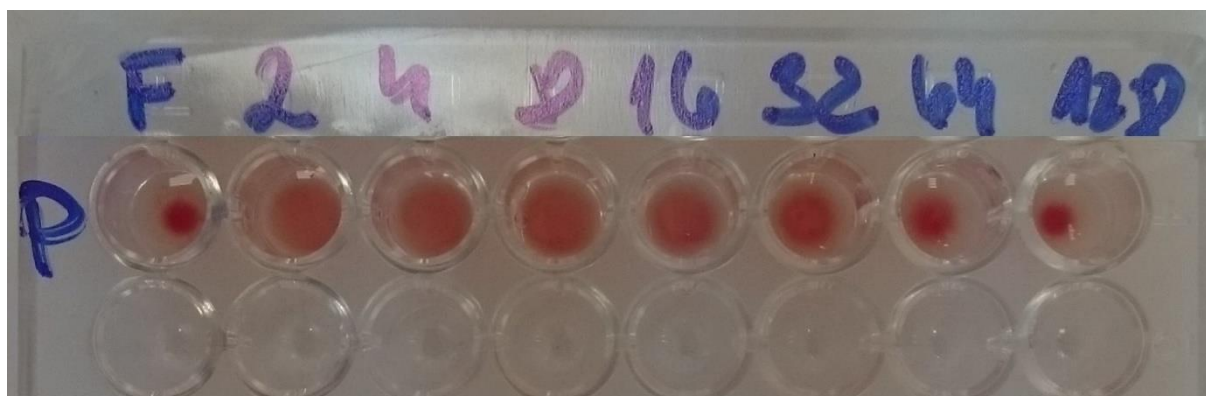
Přímý Coombsův test

Princip

- ✓ Aglutinace v mikrotitračních destičkách

Postup stanovení

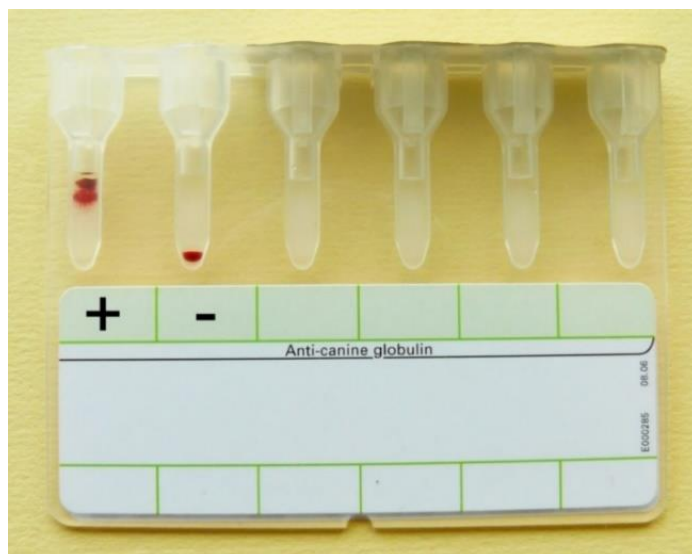
- ✓ 1) Centrifugovat při 1500 g 1 ml psí EDTA krve – 3 min
- ✓ 2) Odstranit supernatant
- ✓ 3) Přepipetovat 100 µl erytrocytární masy do 5mlilitrové zkumavky
- ✓ 4) Doplnit 4,9 ml fyziologického roztoku NaCl, jemně promíchat
- ✓ 5) Centrifugovat při 1500 g – 3 min
- ✓ 6) Odstranit supernatant
- ✓ 7) Doplnit 4,9 ml fyziologického roztoku NaCl, jemně resuspendovat
- ✓ 8) 2× zopakovat body 5-7
- ✓ 9) Připravit diluční řadu Coombsova reagens s fyziologickým roztokem NaCl (ředění 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128)
- ✓ 10) Do 8 jamek mikrotitrační destičky napipetovat po 25 µl erytrocytární suspenze
- ✓ 11) K jamkám č. 2-8 přidat po 25 µl ředěného Coombsova reagens
- ✓ 12) Do jamky č. 1 přidat 25 µl fyziologického roztoku NaCl (kontrolní vzorek pro vyloučení autoaglutinace)
- ✓ 13) Zakrýt destičku parafilmem
- ✓ 14) Nechat inkubovat při 37 °C – 30 min
- ✓ 15) Vyhodnocení:
 - Negativní reakce = sedimentace na dně jamky
 - Pozitivní reakce = aglutinace na povrchu jamky (signifikantní nález je aglutinace při ředění 1:4 a víc)



Pozitivní reakce 1:64

Aglutinace je shlukování buněk (zde erytrocytů).
--

- ✓ Přímý Coombsův test lze provádět také metodou sloupcové aglutinace v gelové matrix:



Výsledky

(metoda aglutinace v mikrotitračních destičkách)

Druh zvířete	Pozitivní reakce

Diskuse

Autoprotilátky vznikají působením antigenů vlastního těla (autoantigenů). Autoantigeny můžou vzniknout například při virových infekcích nebo nádorových onemocněních. Nadprodukce autoprotilátek může za určitých podmínek vyvolat poruchu funkce imunitního systému (autoimunitní reakci), mající za následek poškození tkání a orgánů vlastního těla. Vznikají tak autoimunitní nemoci. Vedle zvýšené tvorby autoprotilátek vznikají autoimunitní nemoci i při nadměrné tvorbě autoreaktivních T-lymfocytů.

Autoprotilátky lze prokázat Coombsovými testy. Přímým Coombsovým testem (přímým antiglobulinovým testem) se zjišťují antierytrocytární autoprotilátky navázané na erytrocyty, nepřímým Coombsovým testem (nepřímým antiglobulinovým testem) se zjišťují autoprotilátky v séru. Protilátky proti červeným krvinkám můžou být aloimunitní – aloprotilátky (například u hemolytické potransfuzní reakce) nebo autoimunitní – autoprotilátky (autoimunitní hemolytické anémie). Přímým Coombsovým testem se diagnostikují například autoimunitní hemolytické anémie. Nepřímý Coombsův test se provádí před transfuzí krve.

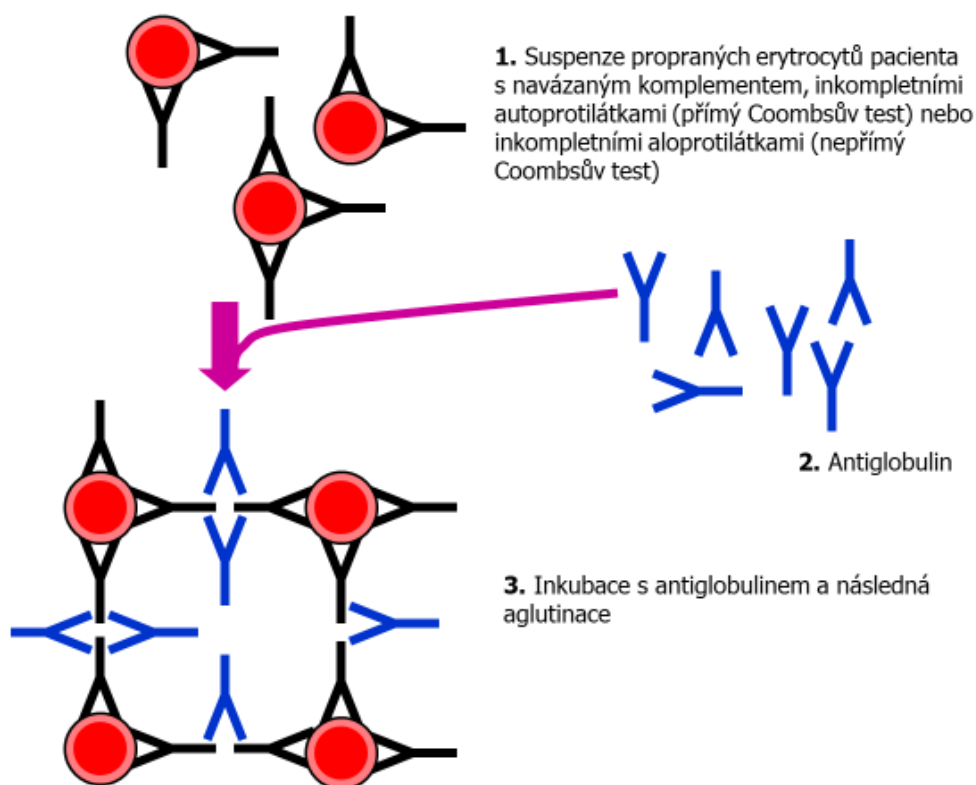


Schéma principu Coombsových testů

Transfuze krve (krevní převod) je podání krve od dárce příjemci. Podmínkou je kompatibilita (slučitelnost) v krevních skupinách. Kompatibilita se vyšetřuje křížovou zkouškou (viz téma Krevní skupiny) nebo nepřímým Coombsovým testem. Mimo plnou (kompletní) krev lze použít její části (masu erytrocytů). Transfuzí krve nevhodného dárce nebo transfuze příjemci s klinickým nálezem na srdci apod. mohou vzniknout akutní, mnohdy smrtelné posttransfuzní reakce.

Aloprotilátky (protilátky cizorodé, také označované izoprotilátky) jsou protilátky vznikající v těle příjemce po transfuzi krve, případně jsou přijaté při transfuzi, nebo jsou tvořené kojící matkou, přestupují z krevního oběhu matky do kolostra a způsobují destrukci erytrocytů u mláďat (onemocnění označované neonatální izoerytrolyzou).

Závěr, poznámky & komentáře

VNITŘNÍ PROSTŘEDÍ

Elektrolyty: Na⁺, K⁺, Cl⁻

Úvod

Elektrolyty patří mezi základní složky vnitřního prostředí organismu. Zjednodušeně – jsou to látky štěpící se, ionizující, disociující při rozpouštění nebo tavení na ionty, jejich roztoky vedou elektrický proud. Vnitřní prostředí z pohledu fyziologie je extracelulární prostor obsahující extracelulární tekutinu (například krev bez buněčných elementů, lymfu bez buněčných elementů, intersticiální tekutinu), která je součástí celkové tělesné tekutiny – ta obsahuje vedle extracelulární tekutiny i tekutinu intracelulární.

Analýza elektrolytů je jednou z metod pro hodnocení homeostaze a jejích regulací.

Cíle

- Určení hladiny elektrolytů (sodíku, draslíku a chloridů) v krevní plazmě/séru u vybraných druhů savců
- Porovnání výsledků s referenčními hodnotami, mezidruhové srovnání
- Diskuse

Metody

Odběr vzorků

- ✓ Odběr krve (například z ušní žíly králíka) na požadovaný antikoagulační prostředek (například heparin)

Poznámka: Na cvičení lze využít krev (od psa nebo kočky) zaslanou k analýze do Klinické laboratoře pro malá zvířata

Příprava vzorků

- ✓ Separace heparinizované plazmy centrifugací odebrané krve při 1500 ot./min – 10 min
Odběr plazmy (supernatantu) do čisté eppendorf zkumavky

Automatická analýza vzorků

- ✓ Provést identifikaci vzorku v analyzátoru

- ✓ Zadat požadované analýzy (Na^+ , K^+ , Cl^-)
- ✓ Odeslat požadavek na analýzu vzorku
- ✓ Umístit zkumavku do stojanu na pozici pro automatické podávání vzorků



Biochemický analyzátor

Výsledky

Vyhodnocení záznamu analyzátoru

Zpráva Laboratorní vzorek

Jméno:

ID vzorku: Ca 11/675/2p

N/P : U634 / 1

Prostor / část: 2 / 5

Pohlaví:

Datum/čas odběru:

ID pacienta:

Lékař:

Datum narození:

Umístění:

Metoda	Výsledek		Rozmezí	Příznaky	Kód
	V rozmezí	Mimo rozmezí			
Cl	117.2		mmol/L		
K	3.9		mmol/L		
Na	146.0		mmol/L		

Konec záznamu o vzorku

Vzorek	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	Cl ⁻ [mmol/l]

Porovnání výsledků s referenčními hodnotami, mezidruhové srovnání

Parametr	Pes	Kočka	Kůň	Skot	Ovce	Prase	Králík*
Na [mmol/l]	140–155	150–160	131–146	132–152	139–152	135–150	138–155
K [mmol/l]	4,0–5,5	3,5–5,0	3,5–5,3	3,9–5,8	3,9–5,4	4,4–6,7	3,7–3,9
Cl ⁻ [mmol/l]	96–115	110–128	95–109	97–111	95–103	94–106	92–112

Podle Doubka et al. (2014) a Klinické laboratoře pro malá zvířata FVL VFU Brno (2018),

**podle Knotka et al. (2017)*

Diskuse

Elektrolyty se podílejí zejména na **transdukci** (převodu) a **transmisí** (přenosu a šíření) signálů ve vzrušivých strukturách (srdci, svalech, nervovém systému), dále na **udržování objemu** a **osmolality** tělesných tekutin (Na⁺ na sebe váže nejvíce vody ze všech iontů), **acidobazické rovnováhy** aj. Důležité uplatnění v těchto funkcích mají především kationty sodíku (Na⁺) a draslíku (K⁺), které jsou doprovázeny anionty chloru (Cl⁻). Koncentrace těchto iontů v krevní plazmě je regulována především systémem vnitřní sekrece s hlavními regulátory aldosteronem, natriuretickými peptidy a nepřímo antidiuretickým hormonem. Cílové tkáně těchto regulátorů se nacházejí zejména v ledvinách, kůži (u některých zvířecích druhů) a gastrointestinálním traktu.

Osmolalita je dána počtem rozpuštěných částic v krevní plazmě, vedle elektrolytů závisí i na koncentraci glukózy, močoviny aj. Kvalifikovaně ji lze odhadnout právě z koncentrací sodíku, glukózy a močoviny podle jednoduchého vzorce: $2[\text{Na}] + [\text{glc}] + [\text{urea}]$. Proteiny ji příliš neovlivňují. Fyziologická hodnota je kolem 300 mmol/kg vody. Na osmolalitě závisí **osmotický tlak** (je funkcí osmolality), který je dán rozdílem v počtu osmoticky aktivních částic mezi krevní plazmou a vodou při ideálně permeabilní membráně. Je to tlak toku rozpouštědla pronikajícího přes semipermeabilní membránu do roztoku s vyšší koncentrací osmoticky aktivních látek. Tok ustává, vyrovnají-li se na obou stranách membrány koncentrace látek. Může být také ukončen, objeví-li se nějaká překážka nebo protisíla – například působení nějakého regulátoru, který ovlivní koncentraci látek na jedné straně membrány (takto působí hormon kůry nadledvin aldosteron v ledvinách). Fyziologická hodnota osmotického tlaku činí kolem 750 kPa.

Semipermeabilními membránami jsou biologické membrány
(propouští volně vodu a omezeně v ní rozpustěné látky).

Hladina/koncentrace iontů sodíku v krevní plazmě se označuje jako **natremie** (odchylky od referenčního rozmezí jsou označovány hypo- nebo hypernatremie). Její regulace zahrnuje zejména účinek aldosteronu (produkovaného kůrou nadledvin) na distální tubulus a sběrný kanálek ledvin, kde má stimulační efekt na resorpci Na^+ . Sekundárně ovlivňuje hladinu sodíku také antidiuretický hormon (produkovaný hypothalamem a uvolňovaný z neurohypofýzy), protože transport Na^+ je vázán na zvýšenou resorpci vody v distálním tubulu působením tohoto hormonu. Vylučování sodíku močí stimuluje například atriový natriuretický peptid (produkovaný myocyty srdečních síní). Tento působí proti systému renin-angiotenzin-aldosteron a má důležitou roli v homeostazi srdečního svalu při měnících se potřebách organismu (především s ohledem na systémový krevní tlak).

Kalemie označuje hladinu iontů draslíku v krevní plazmě (odchylky od referenčního rozmezí – hypo- nebo hyperkalemie). Také ta je regulována aldosteronem, ale zatímco aldosteron hladinu sodíku v krevní plazmě zvyšuje, hladinu draslíku snižuje. Aldosteron totiž stimuluje sekreci draslíku v distálním tubulu a sběrném kanálku ledvin do moči.

Chloridemie (odchylky od referenčního rozmezí – hypo- nebo hyperchloridemie) je hladina chloridových iontů v krevní plazmě, souvisí s regulacemi kationtů sodíku a draslíku.

Z rozdílu koncentrací sodíku a chloridů lze usuzovat na AB status:

$\uparrow[\text{Na}^+ - \text{Cl}^-]$ ukazuje na metabolickou alkalózu, neboť snížení $[\text{Cl}^-]$ je doprovázeno zvýšením $[\text{HCO}_3^-]$,

$\downarrow[\text{Na}^+ - \text{Cl}^-]$ ukazuje na metabolickou acidózu, neboť zvýšení $[\text{Cl}^-]$ je doprovázeno snížením $[\text{HCO}_3^-]$.

Stav	Příčiny	Obecné projevy
Hypernatremie $\uparrow[\text{Na}]$	zvýšená funkce kůry nadledvin, poruchy funkce ledvin, poruchy činnosti srdce, zvýšený příjem potravy aj.	svalový třes až křeče, otoky, zvýšený krevní tlak, snížená tvorba moči, žíznivost aj.
Hyponatremie $\downarrow[\text{Na}]$	průjmy, dlouhodobější zvracení, selhání ledvin, selhání srdce, popáleniny, silné pocení (u zvířecích druhů s celotělovou distribucí potních žláz), neprůchodnost střeva aj.	ospalost, únava, poruchy činnosti srdce, poruchy funkcí kůže aj.
Hyperkalemie $\uparrow[\text{K}]$	selhání ledvin, Addisonova nemoc, acidózy, horečnaté stavy, hemolýzy aj.	poruchy činnosti srdce, poruchy povrchové citlivosti, slabost svalů až obrny, ochabnutí hladké svaloviny (střeva) aj.

Hypokalemie ↓[K]	chronické průjmy, chronické zvracení, selhání ledvin, <i>diabetes mellitus</i> , záněty pobřišnice, alkalózy aj.	poruchy činnosti srdce, poruchy funkcí ledvin, poruchy hladké svaloviny GIT aj.
Hyperchloridemie ↑[Cl ⁻]	selhání ledvin, zvýšená funkce kůry nadledvin, srdeční nedostatečnost, zvýšený přísun potravou aj.	viz hypernatremie
Hypochloridemie ↓[Cl ⁻]	poruchy činnosti ledvin, snížená funkce kůry nadledvin, silné pocení (u zvířecích druhů s celotělovou distribucí potních žláz), neprůchodnost střeva aj.	viz hyponatremie

Je třeba zdůraznit, že specifické projevy změn koncentrací uvedených elektrolytů jsou vázány na základní onemocnění či příčinu.

Addisonova nemoc je onemocnění vyvolané sníženou sekrecí hormonů kůry nadledvin (včetně aldosteronu), například v důsledku její imunitní destrukce.

Závěr, poznámky & komentáře

Acidobazický status

Úvod

Pro normální (fyziologické) životní funkce a morfologickou stabilitu buněk, tkání a orgánů je nutné, aby byla udržována **rovnováha mezi kyselinami a zásadami** ve vnitřním prostředí organismu. Rovnováha je dosažena, jestliže produkce a příjem protonu (H^+) na jedné straně odpovídají jeho spotřebě a eliminaci na straně druhé.

Vyšetření acidobazického (AB) statusu je velice důležitým segmentem laboratorní diagnostiky poruch vnitřního prostředí a také celé řady orgánových či systémových onemocnění.

Cíle

- Určení hlavních AB parametrů: pH, výchylky bází (BE) koncentrace HCO_3^- a pCO_2 v krvi
- Porovnání výsledků s referenčními hodnotami, mezidruhové srovnání
- Diskuse

Metody

Odběr vzorků

- ✓ Odběr krve (například od králíka) při respektování pravidel preanalytické fáze AB vyšetření, tj. anaerobní odběr s minimální kompresí, uchovávání vzorku při 1-4 °C (na ledové tříšti), analýza do 2 h po odběru

Příprava vzorků

- ✓ Promíchat heparinizovanou krev, odstranit bubliny vzduchu

Analýza vzorků analyzátozem

- ✓ Provést identifikaci vzorku v analyzátoru
- ✓ Zadat tělesnou teplotu jedince v době odběru vzorku
- ✓ Vložit senzorové karty do analyzátoru
- ✓ Automatická kalibrace senzorové karty
- ✓ Umístit odběrovou zkumavku do místa pro aplikaci vzorku
- ✓ Aplikovat vzorek pod tlakem do zaznění zvukového signálu



Přenosný acidobazický analyzátor

Výsledky

Vyhodnocení záznamu analyzátoru – příklad

[GASTAT-navi RESULT]				
----- 092 -----				
2017/11/13 10:24				
SAMPLE No :00005				
PATIENT ID :00000000				
SAMPLE TYPE:Blood				
pH	7.373			L
PCO2	4.6	kPa		
PO2	12.9	kPa		
cNa	144.1	mmol/L		
cK	4.0	mmol/L		
Hct	31.5	%		L
Temp	37.0	°C		
FI02	21.0	%		
BP	101.3	kPa		
ctHb	107.2	g/L		L
chCO3	19.8	mmol/L		L
cBE	-4.8	mmol/L		L
sO2	97.3	%		
ctCO2	20.8	mmol/L		
ctO2	14.8	vol/L		L

Získané výsledky

Vzorek	pH	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	BE [mmol/l]	pCO ₂ [kPa]

Porovnání výsledků s referenčními hodnotami, mezidruhové srovnání (venózní krev)

Parametr	Pes	Kočka	Kůň	Skot	Prase
pH	7,35-7,43	7,28-7,40	7,38-7,42	7,38-7,43	7,33-7,41
HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	18,7-25,6	17,5-20,7	20,0-28,0	23,5-27,0	23,0-26,5
BE [mmol/l]	-4,5-+0,3	-0,5-+4,0	-2,0-+4,0	-0,5-+4,0	-0,5-+4,0
pCO ₂ [kPa]	4,0-6,1	4,8-6,4	5,0-6,4	5,3-6,4	5,3-6,4

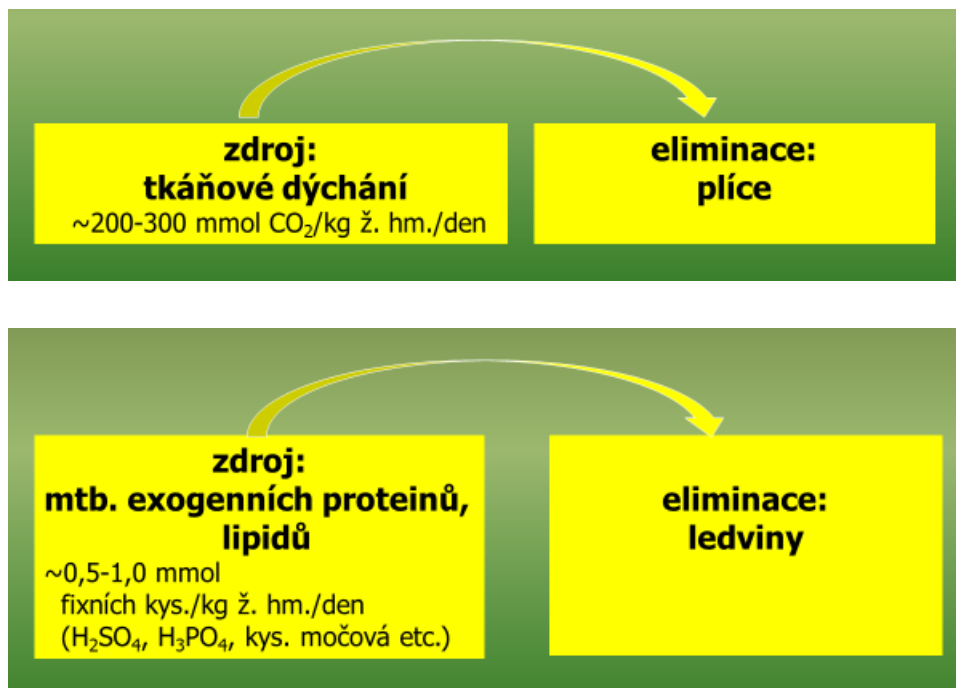
Podle Klinické laboratoře pro malá zvířata FVL VFU Brno (2018)

Parametr pH krve je ve skutečnosti pH krevní plazmy.

Diskuse

AB status závisí na produkci H⁺ a CO₂, jejich transportu a eliminaci plicemi a ledvinami. Na rozdíl od H⁺ příčinou sníženého pCO₂ není nikdy snížená produkce (ale zvýšená ventilace).

Produkce a spotřeba (konzumpce) protonu se realizuje v různých metabolických drahách: **protonprodukčními reakcemi** jsou například neoxidativní glykolýza, ketogeneze, ureosyntéza, lipolýza aj., **protonkonzumpčními reakcemi** například glukoneogeneze z laktátu, oxidace laktátu aj.

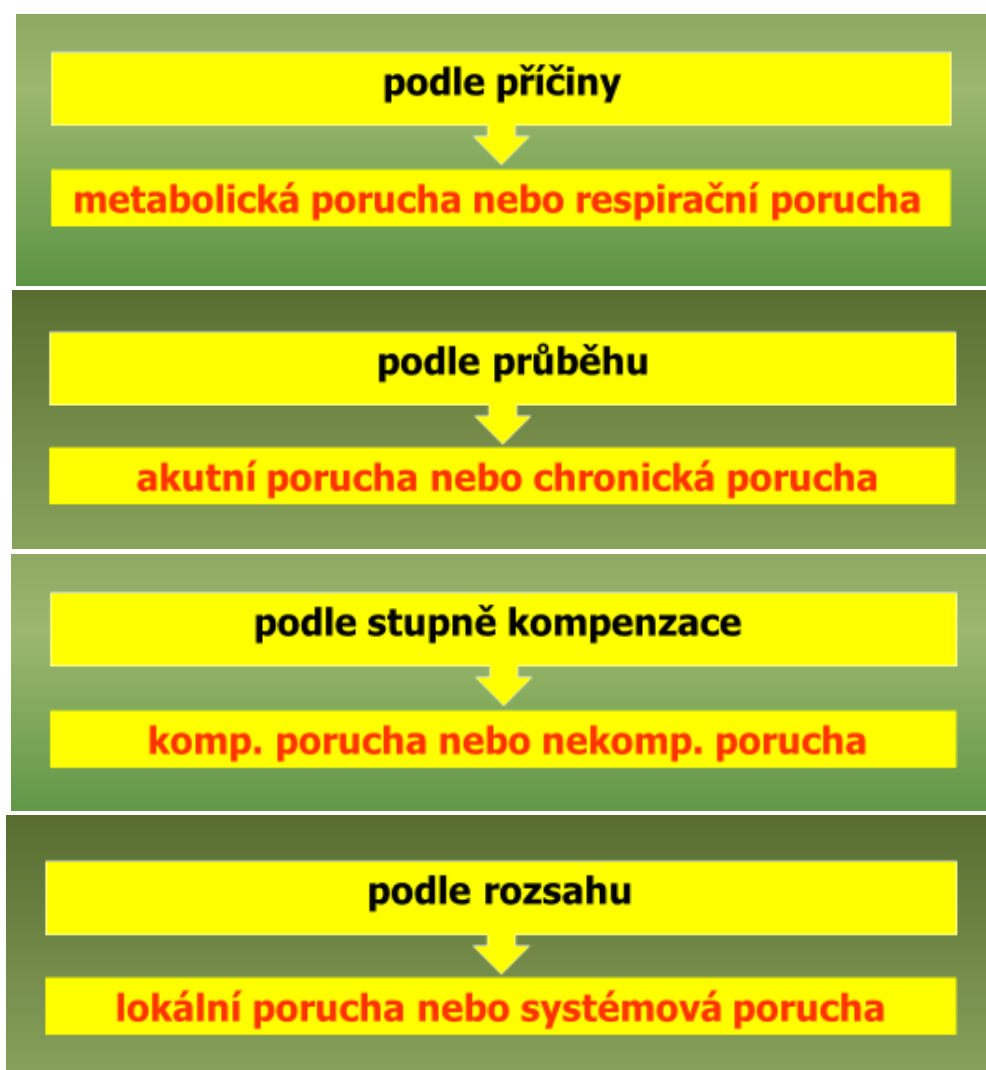


Udržování acidobazické rovnováhy vyžaduje účinnou regulaci, neboť H⁺, respektive oxoniový kation (H₃O⁺), je velmi reaktivní. **Homeostaze H⁺** je zajišťována reakcemi nárazníků v krvi (hydrogenkarbonátového, hemoglobinového, fosfátového, proteinátového aj.), především ale regulačními funkcemi orgánů (plícemi, ledvinami, kostmi, játry aj.). Koncentrace H⁺ v arteriální plazmě je 0,00004 mmol/l (40 nmol/l), záporný dekadický log této hodnoty, tzn. pH je 7,4, pokles pH o jednu jednotku (z 7,0 na 6,0 představuje 10násobný vzestup koncentrace H⁺! Krátkodobě slučitelné se životem jsou výchylky pH v rozmezí 6,8-7,7.

Vychýlení AB statusu vede obvykle k poruchám funkcí orgánů s doprovodnými projevy. Podstatu poruch funkcí lze shrnout: porucha permeability buněčných membrán, snížení aktivity enzymů a deficit energie. **Poruchy AB statusu** lze v zásadě rozdělit na acidózy a alkalózy, které mohou být podle příčin metabolické a respirační a podle průběhu akutní a chronické.

Klasifikace základních AB poruch:





AB poruchy můžou ještě být jednoduché a smíšené (současně acidóza a alkalóza). Často jsou asociovány s dalšími poruchami, například minerálního metabolismu.

Acidózy se při laboratorním vyšetření vyznačují poklesem pH krve a podle příčin eventuálním vychýlením dalších laboratorních parametrů. Alkalózy mají v laboratorním nálezu zvýšené pH krve a podle příčin eventuální vychýlení dalších laboratorních parametrů. V případě, že dojde k úpravě pH krve do referenčního rozmezí, ale hodnota některého z dalších laboratorních ukazatelů je mimo referenční rozmezí, jde o kompenzovanou AB poruchu.

Porucha	Příčiny	Projevy
Acidóza metabolická	hladovění, <i>diabetes mellitus</i> (neléčený), závažné anémie, onemocnění jater, některé otravy, průjmy, onemocnění ledvin	deprese CNS, poruchy plicní ventilace, poruchy činnosti srdce,

Acidóza respirační	onemocnění plic spojená se snížením ventilace, útlum respiračního „centra“ (léky, při otravách, traumatech), poruchy funkce hrudníku	poruchy funkce ledvin
Alkalóza metabolická	zvracení, obstrukce pyloru, torze žaludku, hyperaldosteronismus	zvýšená dráždivost CNS, poruchy činnosti srdce, poruchy trávení (zácpy)
Alkalóza respirační	stimulace respiračního „centra“ (léky, při otravách, traumatech, nádorech)	

Hyperaldosteronismus je nadbytek hormonu aldosteronu v důsledku jeho zvýšené sekrece kůrou nadledvin (při její hyperplazii nebo nádoru) nebo může být způsoben faktory mimo kůru nadledvin (zvýšená funkce adenohypofýzy spojená se zvýšenou sekrecí adrenokortikotropního hormonu).

Pro úpravu AB poruchy lze využít vzorec:

výpočet množství látky v mmol, kterou je třeba organismu dodat = výchylka bazí v mmol/l] × kg ž. hm. × 0,3. Podle směru výchylky (minus nebo plus) se aplikuje nitrožilně báze nebo kyselina ve vypočteném množství. Nejefektivnější uplatnění tohoto vzorce je při pCO₂ 5,3 kPa, není-li tomu tak, je nutné vzorec korigovat.

Závěr, poznámky & komentáře

FYZICKÁ ZÁTĚŽ

Fyziologické kompenzace

Úvod

Kompenzace je typem adaptace, která má obranný význam, například proti působení stresorů, tj. faktorů vyvolávající stres neboli zátěž. Patří do komplexu fyziologických regulací, jež slouží k **udržování homeostaze** na různých úrovních. Na úrovni celého organismu se na regulacích podílejí tři základní systémy: nervový, vnitřní sekrece a imunitní. Nejrychlejší regulační procesy probíhají prostřednictvím nervového systému. Účinek regulací lze demonstrovat při jednoduché simulaci **fyzické zátěže a její kompenzaci**. Sledovanými fyziologickými parametry mohou být tělesná teplota, krevní tlak, počet pulzů, dechová frekvence, dechový objem a saturace periferních tkání kyslíkem. Monitoring je založen na neinvazivních metodách hodnotících projevy činnosti kardiovaskulárního a respiračního systému na periférii. Výsledky vyšetření vlivu fyzické zátěže jsou nápomocné ke stanovení správné diagnózy a efektivní terapie. Můžou být využitelné i k hodnocení výkonnosti u dostihových koní nebo psů.

Zátěžová vyšetření se skládají z několika fází: (1) stanovení klidových hodnot po připojení probanda k monitorovacím přístrojům, (2) použití nízké intenzity zátěže – cílem je zvýšit prokrvení tkání a připravit kardiovaskulární systém na vyšší zátěž (aby se předešlo při vyšší zátěži poruchám činnosti srdce, například arytmiím), (3) provedení vlastního zátěžového testu, (4) snížení intenzity zátěže s cílem postupného návratu k hodnotám blízkým klidovým (aby se předešlo vzniku náhlých závrativých stavů, případně až ztrát vědomí, jejichž příčinou bývá snížení krevního tlaku, dále aby se umožnilo plynulé odstranění laktátu, který je odpovědný za únavu), (4) sledování nástupu klidového stavu.

Stanovení laktátu slouží k hodnocení zásobení organismu kyslíkem. Hlavním zdrojem jeho produkce je neoxidativní glykolýza, tzn. laktát je ukazatelem hodnocení stupně hypoxie (deficitu kyslíku v organismu). Mezi hlavní producenty laktátu patří kosterní svaly.

Upozornění

Zátěžový test prováděný na rotopedu je dobrovolný, rozhodující kritérium pro jeho absolvování je fyziologický zdravotní stav. Pro vyloučení úrazu je bezpodmínečně nutné dbát pokynů přítomného pedagogického personálu.

Cíle

- Stanovení sledovaných fyziologických parametrů za klidových podmínek
- Simulace fyzické zátěže
- Stanovení sledovaných fyziologických parametrů během zátěže a po zátěži
- Srovnání parametrů a jejich vyhodnocení
- Diskuse

Metody

Stanovení fyziologických parametrů

- ✓ Tělesná teplota: bezkontaktním teploměrem



Bezkontaktní teploměr

- ✓ Krevní tlak: digitálním tonometrem



Humánní digitální tonometr

- ✓ Počet pulzů: manuálně (palpací *arteria radialis*)
nebo využití pulzního oxymetru či u studentů (mužů) auskultací srdce
(fonendoskopem)



Pulzní oxymetr a jeho umístění

- ✓ Dechová frekvence: adspekci

- ✓ Dechový objem: digitálním spirometrem



Digitální spirometr

Simulace fyzické zátěže

- ✓ Jízda na bicyklovém ergometru (rotopedu): například 10 min podle návodu



Bicyklový ergometr

- ✓ Změna pozice těla: z polohy vodorovné (lehu) do svislé (sedu)

Výsledky

Fyziologické parametry za klidových podmínek (před zátěží)

Tělesná teplota:

Krevní tlak:

Počet pulzů:

Dechová frekvence:

Dechový objem:

Fyziologické parametry během zátěže a po zátěži

Během zátěže – například v 7. min:

Tělesná teplota:

Krevní tlak:

Počet pulzů:

Dechová frekvence:

Dechový objem:

Po zátěži – například 5 min:

Tělesná teplota:

Krevní tlak:

Počet pulzů:

Dechová frekvence:

Dechový objem:

Po zátěži – například 15 min:

Tělesná teplota:

Krevní tlak:

Počet pulzů:

Dechová frekvence:

Dechový objem:

Diskuse

Fyzická zátěž znamená zvýšené požadavky na funkci orgánů a orgánových systémů, zejména kardiovaskulárního a respiračního. Ty odpovídají rozhodující měrou na jedné straně za zásobení pracujících svalů kyslíkem a energetickými a stavebními substráty a na druhé straně za odvod odpadních metabolitů. Nahromaděním odpadních metabolitů (zejména laktátu) ve svalových buňkách vzniká **únava**. Při velmi vysoké zátěži může vzniknout únava i v důsledku dočasného vyčerpání transmiterů (přenašečů) v synapsích (zprostředkovávají přenos informace mezi neurony nebo mezi neuronem a svaem, tj. v nervosvalové ploténce). Svalová únava se projevuje snížením svalové síly a rychlosti, narušena může být koordinace pohybů.

Snížená perfuze (prokrvení) svalu během jeho kontrakce je provázená bolestí, bolest pomine, jakmile se stupeň perfuze opět obnoví.

Tělesná teplota s vysokou fyzickou zátěží stoupá. Svalová aktivita je významným producentem tepla (může činit až 50 % celkové energie). Primárním zdrojem energie pro svalovou práci je ATP. Energie vzniklá při jeho štěpení se využije na práci svalů, část se uvolní právě ve formě tepla. Toto teplo sehraává důležitou roli v aktivaci termoregulačních mechanismů.

Základním ukazatelem, který celkově vypovídá o činnosti srdce je **srdeční výdej** (cardiac output). Je to objem krve pumpovaný každou srdeční komorou za minutu. Matematicky vyjádřeno je to součin tepového (systolického) objemu a **srdeční frekvence** za minutu. Představuje základní determinantu dodávky kyslíku v organismu. Srdeční frekvence s narůstající fyzickou zátěží roste lineárně, systolický objem roste víceméně lineárně do 50% zátěže. Trénovaní jedinci mají v klidu oproti netrénovaným srdeční frekvenci nižší a systolický objem vyšší. U trénovaných jedinců při postupné zátěži se oproti netrénovaným srdeční frekvence zvyšuje pomaleji a systolický objem je vyšší.

Systolický objem lze zjistit nepřímo – výpočtem:

$$\text{Objem}_{\text{syst}} = \frac{\text{TK}_{\text{pulzový}}[\text{mm Hg}] \times 200}{\text{TK}_{\text{syst}}[\text{mm Hg}] + \text{TK}_{\text{diast}}[\text{mm Hg}]} \times \text{povrch těla} [\text{m}^2]$$

Vysvětlivky: TK = tlak krevní

Pulzový tlak (tlaková amplituda) je rozdíl mezi systolickým a diastolickým tlakem, pulzový tlak se směrem k periférii těla snižuje.

Systolický tlak vyjadřuje kontrakce srdce, diastolický tlak plnění srdce.

Systolický krevní tlak se při silové pohybové práci zvyšuje, diastolický krevní tlak se nemění nebo se může mírně snižovat.

Dechová frekvence s intenzitou zátěže stoupá lineárně. Významně ovlivňuje minutovou plicní ventilaci (dechový minutový objem, tj. objem vzduchu vdechnutý za minutu). Velikost minutové plicní ventilace závisí vedle dechové frekvence také na **dechovém objemu**, tj. množství vzduchu, které se dostane do plic při každém nádechu nebo je z plic vypuzeno při každém výdechu. Minutová plicní ventilace se rovněž s intenzitou zátěže až do nástupu anaerobních procesů zvyšuje lineárně. Potom je však s narůstající produkcí CO₂ vzestup strmý, a to v důsledku větší stimulace respiračních „center“ oxidem uhličitým.

Teplota těla je regulována termoregulačními mechanismy. Tyto mechanismy jsou řízené hypothalamem, kde se nachází „centrum“ **termoregulace**.

Respirační „centra“ jsou lokalizována v mozgovém kmeni (v prodloužené míše a ve Varolově mostu). **Kardiovaskulární „centra“** jsou v prodloužené míše. Tato „centra“ dynamicky reagují na změny a potřeby organismu.

Komunikaci s periferií zprostředkovává **autonomní nervový systém**, jeho sympatická a parasympatická část, případně se na kompenzaci podílí i nervový systém motorický, včetně změny chování. Změna sledovaných parametrů během zátěže je ukazatelem fyzického stavu organismu, stejně jako rychlost kompenzace a návrat ke klidovým hodnotám.

Pro řízení určitých funkcí vytváří mozek odpovídající funkční sítě (projekční oblasti, například projekční oblasti respirace), termín centrum, který vznikl v 19. století, je z pohledu fyziologie postupně opouštěn.

Závěr, poznámky & komentáře

METABOLISMUS

Bazální metabolismus

Úvod

Bazální metabolismus je vyjadřován energetickým obratem nutným pro udržení normálních funkcí organismu za podmínek úplného klidu (fyzického i emočního), termoneutrality prostředí a v postabsorpčním stavu (tj. pro monogastry 14-16 h po nasycení, pro polygastry 32 h a více hodin po nasycení). Spotřeba energie je standardně vyjadřována za 24 h. Tato energie je spotřebovávána na zajištění funkcí zejména srdce, krve, plic, ledvin, jater, svalů, kůže, nervového, trávicího a reprodukčního systému. Stojí za zmínku, že jedna třetina až jedna polovina energie se spotřebuje na udržování funkce buněčných membrán. Bazální metabolismus se vyjadřuje jako **BMR** (Basal Metabolic Rate). U zdravého organismu závisí hlavně na jeho hmotnosti.

Pro výpočet BMR se používá hned několik rovnic. Pro člověka lze k odhadu BMR použít mj. Harrisovu-Benedictovu rovnici.

Cíle

- Výpočet metabolicky aktivní hmoty
- Srovnání metabolicky aktivní hmoty a BMR u různých živočišných druhů
- Výpočet bazálního metabolismu pomocí Harrisovy-Benedictovy rovnice
- Diskuse

Metody

Stanovení metabolicky aktivní hmoty

- ✓ Metabolicky aktivní hmotu lze orientačně vyjádřit jako hmotnost organismu umocněnou na $\frac{3}{4}$

Základní výpočtový vztah

- ✓ Bazální metabolismus představuje 293 kJ na 1 kg metabolicky aktivní hmoty
- ✓ Výpočet: $BMR = m^{\frac{3}{4}} \times 293$ [kJ]

Výpočet bazálního metabolismu pomocí Harrisovy-Benedictovy rovnice

1) Pro muže:

$$\text{BMR (kcal/d)} = 66,5 + (13,8 \times \text{hmotnost v kg}) + (5 \times \text{výška v cm}) - (6,8 \times \text{věk v rocích})$$

2) Pro ženy:

$$\text{BMR (kcal/d)} = 655 + (9,6 \times \text{hmotnost v kg}) + (1,8 \times \text{výška v cm}) - (4,7 \times \text{věk v rocích})$$

Poznámka: 1 kcal = 4,185 kJ

Harrisova-Benedictova rovnice byla revidována (Roza, Shizdal 1984).

Výsledky

Stanovení metabolicky aktivní hmoty a BMR na vybraných zvířecích modelech

Živočišný druh	Metabolicky aktivní hmota	BMR

Výpočet bazálního metabolismu pomocí Harrisovy-Benedictovy rovnice

Proband	BMR [kJ]

Diskuse

Bazální metabolismus u savců závisí na tělesné hmotnosti a sekundárně na dalších faktorech: druhu, plemeni, pohlaví, věku, graviditě, úrovni regulací (aktivitě nervového systému a systému vnitřní sekrece) atd. První (1932) přesnější stanovení metabolicky aktivní hmoty je známo jako **Kleiberův zákon**. Podle tohoto zákona BMR lineárně závisí na hmotnosti umocněné na $\frac{3}{4}$. Zákon je obecně platný zejména u homoiotermních živočichů. Změny metabolicky aktivní hmoty ale nejsou se změnami tělesné hmotnosti lineární. Metabolicky aktivní hmota koreluje spíše se změnami velikosti tělesného povrchu.

Mezidruhově na hodnotě BMR nepřímo úměrně závisí predikce krátko-, respektive dlouhověkosti. Nejde však o absolutní korelaci, uplatňuje se řada dalších faktorů včetně mezidruhové i individuální variace v produkci ATP, schopnosti reparace DNA atd. BMR se zvyšuje při stresu a onemocněních.

Stanoví-li se hodnota bazálního metabolismu (BM) na jednotku povrchu těla (1 m^2) rozdíly u jednotlivých druhů savců nejsou tak markantní.

Druh	Hmotnost [kg]	BM na kg ž. hm. [kJ/24 h]	BM na m² povrchu těla [kJ/24 h]
myš	0,018	887	4 958
pes	15	213	4 347
člověk	75	134	4 351
kůň	440	46	3 966

Podle Rubnera, cit. Trojan et al. (2003)

U člověka lze k odhadu BMR použít řadu rovnic, například Harrisovu-Benedictovu rovnici. Vedle tělesné hmotnosti se při výpočtu kalkuluje s tělesnou výškou a věkem. Rovnice je konstruovaná zvlášť pro muže a zvlášť pro ženy.

Závěr, poznámky & komentáře

TERMOREGULACE

Fyziologická produkce tepla

Úvod

Živočichové získávají energii převážně oxidativně, a to ze tří hlavních nutričních substrátů – sacharidů, tuků a proteinů. Energie je uvolňována katabolickým procesem, při kterém se spotřebovává kyslík a uvolňuje oxid uhličitý a voda.

Vzhledem k tomu, že mezi spotřebou kyslíku a množstvím uvolněné energie existuje lineární závislost a téměř veškerá energie (nad 95 %) je ze základních živin uvolňována oxidativně, je možné ze spotřeby kyslíku vypočítat energetický výdej. Této skutečnosti využívá metoda **nepřímé kalorimetrie**. S jejím využitím lze orientačně stanovit energetickou spotřebu v klidovém stavu i při zátěži. Poměr mezi výdejem CO_2 a spotřebou O_2 se označuje jako **respirační kvocient (RQ)**, nebo také R). Množství energie uvolněné při spalování živin při spotřebě 1 l kyslíku se označuje jako **energetický ekvivalent kyslíku (EE)**. EE kyslíku se liší při spalování jednotlivých živin, pokud dochází k simultánnímu spalování všech, pak EE odpovídá 20,1 kJ/1 O_2 .

Při nepřímé kalorimetrii se se dříve používaly přístroje, například Spirolyt, kdy se provádělo jímání vydechovaného vzduchu, stanovoval se jeho objem a v něm obsah kyslíku a oxidu uhličitého. Dnes se používají moderní telemetrické přístroje. Při přímé kalorimetrii se měří teplo vydávané organismem do prostředí, jeho stanovení je ale technicky náročnější.

Cíle

- Seznámení s metodou nepřímé kalorimetrie
- Výpočet RQ v klidovém stavu a během zátěže
- Určení tepelné produkce v klidovém stavu a během zátěže
- Diskuse

Metody

Využití přístroje pro nepřímou kalorimetrii

- ✓ Zásady práce s přístrojem
- ✓ Nastavení přístroje podle návodu

Měření tepelné produkce v klidu a během zátěže

- ✓ Napojit probanda v klidovém stavu na přístroj
- ✓ Provést záznam spotřeby a výdeje plynů po dobu 10 min
- ✓ Odečíst spotřebu O_2 a produkci CO_2 za jednotku času
- ✓ Proband napojený na kalorimetrický přístroj vykonává fyzickou práci, například jízdu na bicyklovém ergometru (zátěž nastavit) – například 10 min



Bicyklový ergometr

- ✓ Provést záznam spotřeby a výdeje plynů během zátěže
- ✓ Odečíst spotřebu O_2 a produkci CO_2 za jednotku času

Ergometrie je metoda, pomocí níž se stanovuje výkon a práce, lze jí hodnotit reakci a adaptaci organismu na zátěž.

Výpočet RQ

✓ $RQ = CO_2/O_2$

Výpočet tepelné produkce

✓ $O_2 [l/den] \times EE$

Výsledky

RQ u probanda v klidu

Spotřeba O_2 [%] =

Výdej CO_2 [%] =

RQ =

RQ u probanda během zátěže

Spotřeba O_2 [%] =

Výdej CO_2 [%] =

RQ =

Tepelná produkce u probanda v klidu

EE =

Ventilace v metabolické komoře [l/min] =

Spotřeba O_2 [l/min] =

Spotřeba O_2 [l/d] =

Tepelná produkce [kJ/d] =

Tepelná produkce u probanda během zátěže

EE =

Ventilace v metabolické komoře [l/min] =

Spotřeba O_2 [l/min] =

Spotřeba O_2 [l/d] =

Tepelná produkce [kJ/d] =

Diskuse

Životní pochody a jejich projevy jsou závislé na energii. Energie vzniká oxidací základních živin – sacharidů, proteinů a tuků. Vzniklá energie se v organismu uskládá v podobě řady sloučenin (zejména ATP, dále polysacharidů, proteinů, tuků). Energie se spotřebovává na

udržení základních funkcí organismu (50 % výdeje energie), trávení a vstřebávání živin, termoregulaci, tvorbu energetických zásob, udržení výkonnosti a užitkovosti.

Nepřímá kalorimetrie určuje množství tepla uvolněného oxidačními reakcemi na základě hodnot spotřeby kyslíku a uvolnění oxidu uhličitého a převádí tyto hodnoty na energetický ekvivalent kyslíku. Měření výdeje energie je důležité při hodnocení různých poruch zdravotního stavu, období rekonvalescence, poporodního období a výživy mláďat a také výkonnosti a užitkovosti zvířat.

Bylo prokázáno, že přibližné hodnoty energetické spotřeby lze stanovit na základě znalosti tělního povrchu, pohlaví, věku a spotřeby O₂ (respektive produkce CO₂) za časovou jednotku. Protože chemické složení u jednotlivých základních nutričních substrátů se liší, například u lipidů připadá méně atomů kyslíku na atomy uhlíku a vodíku, liší se také RQ při jejich oxidaci a EE kyslíku.

(1 g)	Lipidy	Proteiny	Sacharidy
RQ	0,7	0,8	1,0
EE [kJ]	19,6	18,0	21,1

Podle Silbernagla a Despopoulose (2016)

Hodnota RQ vyjadřuje souběžné zužitkování všech tří hlavních nutričních substrátů, což ztěžuje využití RQ k exaktnímu hodnocení spotřeby energie. Navíc hodnota RQ kolísá: ke zvýšení dochází při hyperventilaci, svalové námaze, konverzi sacharidů na lipidy nebo při metabolické acidóze, naopak ke snížení vede hypoventilace, konverze tuků na sacharidy, hrazení kyslíkového dluhu po svalové námaze nebo metabolická alkalóza.

Svalová námaha zvyšuje produkci tepla, což je dáno vlastní prací svalů a zvýšeným metabolismem, čímž se kryje spotřeba energie. Metabolismus svalové tkáně je velmi adaptabilní, zejména vlivem aerobního tréninku. To má za následek zvýšení počtu mitochondrií ve svalových buňkách a tím dlouhodobější využití kyslíku během svalové práce.

Závěr, poznámky & komentáře

Fyziologické ztráty tepla a jejich metabolická kompenzace

Úvod

K **tepelným ztrátám** dochází čtyřmi fyzikálními způsoby: konvekcí (prouděním), radiací (sáláním), evaporací (vypařováním) a kondukcí (vedením). Tepelné ztráty tedy závisí na řadě faktorů: teplotě prostředí, pohybu vzduchu, vlhkosti vzduchu atd. Ze strany zvířete hraje velkou úlohu tepelná izolace těla (zejména osrstění a podkožní tuková tkáň).

Fyzikální model pro navození tepelných ztrát představuje použití přístroje – **elektrického dynamického katatermometru**. Pomocí něj lze stanovit parametr – hustotu proudění tepla (HFG, Heat Flow Density), který se udává ve wattech na 1 m².

Katatermometr je přístroj na měření katahodnoty, tzn. hodnoty udávající ochlazovací účinek okolního prostředí. Ten je dán teplotou a rychlostí proudění okolního vzduchu a závisí také na teplotě okolních ploch.

Cíle

- Určení tepelné produkce u zvířat s odlišnou tělní izolací
- Demonstrace efektu tělní izolace na hodnotu tepelné produkce
- Zhodnocení změny tepelných vlastností prostředí s využitím katatermometru
- Diskuse

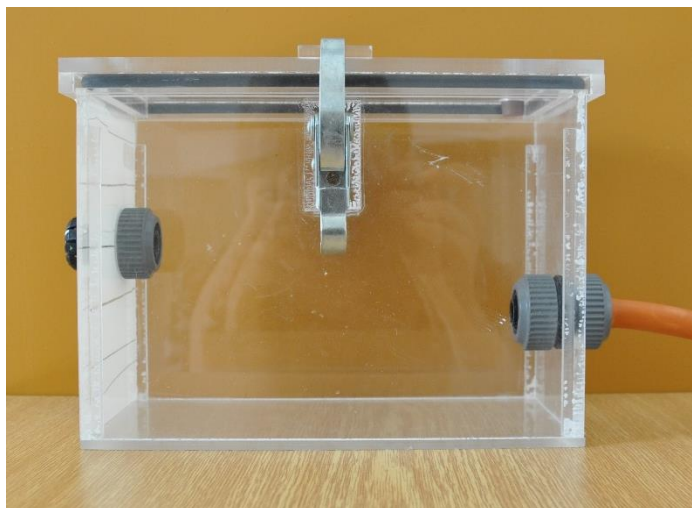
Metody

Využití přístroje k analýze vydechovaných plynů

- ✓ Zásady práce s přístrojem
- ✓ Nastavení přístroje podle návodu

Měření tepelné produkce u zvířete s různou tepelnou izolací

- ✓ Umístit zvíře s běžným tělním pokryvem, například králíka, do metabolické komory



Metabolická komora

- ✓ Nastavit teplotu na 10 °C
- ✓ Nastavit průtok vzduchu na základě hmotnosti zvířete
- ✓ Aklimatizace – 15 min
- ✓ Zapnout analyzátor, pořídit záznam
- ✓ Odečíst spotřebu O₂ a produkci CO₂
- ✓ Opakovat postup u zvířete, například králíka, o stejné hmotnosti, ale ostříhaného

Výpočet RQ

- ✓ $RQ = CO_2/O_2$

Výpočet tepelné produkce

- ✓ O₂ [l/den] × EE

Využití katatermometru

- ✓ Zásady práce s přístrojem
- ✓ Nastavení přístroje podle návodu

Určení HFD

- ✓ Při laboratorní teplotě
- ✓ Při zvýšeném proudění teplého vzduchu (pod infralampou)
- ✓ Při zvýšeném proudění chladného vzduchu (před ventilátorem)
- ✓ Při zvýšené vlhkosti (překrytí senzoru vlhkým tamponem)

Výsledky

RQ u zvířete s běžnou tepelnou izolací (srstí)

Spotřeba O₂ [%] =

Výdej CO₂ [%] =
RQ =

RQ u zvířete bez tepelné izolace (s ostříhanou srstí)

Spotřeba O₂ [%] =
Výdej CO₂ [%] =
RQ =

Tepelná produkce u zvířete s běžnou tepelnou izolací (srstí)

EE =
Ventilace v metabolické komoře [l/min] =
Spotřeba O₂ [l/min] =
Spotřeba O₂ [l/d] =
Tepelná produkce [kJ/d] =

Tepelná produkce u zvířete bez tepelné izolace (s ostříhanou srstí)

EE =
Ventilace v metabolické komoře [l/min] =
Spotřeba O₂ [l/min] =
Spotřeba O₂ [l/den] =
Tepelná produkce [kJ/d] =

Vyjádření metabolické (energetické) kompenzace tepelných ztrát

Rozdíl tepelné produkce u zvířete s běžným tělním pokryvem a bez tělního pokryvu:

HFD v různých podmínkách prostředí

	Teplota prostředí	HFD [W/m²]
Laboratorní teplota		
Zvýšená tepelná radiace		
Zvýšené proudění vzduchu		
Zvýšená evaporace		

Diskuse

Tepelná produkce se u zvířat zvyšuje v prostředí s teplotou pod zónou termoneutrality, neboť dochází ke zvýšeným **ztrátám tepla**. Tepelné podmínky prostředí ovlivňují metabolismus zejména u mláďat, které mají větší povrch vzhledem k objemu těla a současně

ne zcela vyvinutou tepelnou izolaci. Tepelné ztráty, které nemůžou být kompenzovány vyšší tvorbou tepla a menším výdejem tepla, vedou k podchlazení (hypotermii) organismu. Obecně platí, že malá zvířata mají relativně větší povrch těla, a proto jejich metabolismus musí kompenzovat vyšší tepelné ztráty.

Měření s využitím dynamického katatermometru umožňuje proti klasickému termometru objektivnější posouzení podmínek a také predikci tepelných ztrát v daném prostředí. Katatermometr je tedy obecně vhodným nástrojem pro hodnocení tepelných parametrů prostředí, a to i z hlediska welfare zvířat.

Jako zóna termoneutrality se označuje stav, kdy okolní teplota je pro homoiotermního živočicha optimální, tzn. je nastolena rovnováha mezi tvorbou a výdejem tepla.

Závěr, poznámky & komentář

Homoiotermní a poikilotermní živočichové

Úvod

Homoiotermní živočichové jsou ve velké míře schopni kompenzovat rozdíly v okolní tělesné teplotě se zachováním konstantní teploty těla (tělesného jádra) v rámci svých termoregulačních mechanismů. U **poikilotermních** živočichů tělesná teplota kolísá v závislosti na teplotě okolí. Následkem snížení teploty dochází k inhibici, případně až zastavení funkce neuroendokrinních regulačních mechanismů. Jako **heterotermní** se označují homoiotermní živočichové, kteří mají schopnost přečkat nepříznivé období ve stavu strnulosti (dormance). Dormance je souhrnné označení pro přechodné zastavení nebo omezení fyziologických procesů v živých organismech a zahrnuje u savců hibernaci („zimní spánek“) a estivaci („letní spánek“).

Cíle

- Stanovení energetického metabolismu u homoiotermních a poikilotermních živočichů v konstantních teplotních podmínkách prostředí
- Určení energetického metabolismu u homoiotermních a poikilotermních živočichů v měnících se teplotních podmínkách prostředí
- Diskuse

Metody

Využití přístroje pro nepřímou kalorimetrii

- ✓ Zásady práce s přístrojem
- ✓ Nastavení přístroje podle návodu

Měření tepelné produkce u homoiotermních a poikilotermních živočichů

- ✓ Umístit zvíře do metabolické komory (zástupce homoiotermních zvířat, zástupce poikilotermních živočichů)
- ✓ Změřit teplotu těla
- ✓ Odečíst spotřebu O₂ a produkci CO₂ při laboratorní teplotě
- ✓ Nastavit teplotu na 10 °C
- ✓ Aklimatizace – 15 min

- ✓ Změřit teplotu těla
- ✓ Odečíst spotřebu O₂ a produkci CO₂
- ✓ Vypočítat produkci tepla

Výsledky

Záznam tepelné produkce

	Homoiotermní živočich	Poikilotermní živočich
Teplota těla při laboratorní teplotě		
Produkce tepla při laboratorní teplotě		
Teplota těla při 10 °C		
Produkce tepla při 10 °C		

Diskuse

Metabolické procesy u homoiotermních živočichů se v chladnějším prostředí zintenzivňují, tzn. zvyšuje se tvorba tepla. To vede ke zvýšení příjmu potravy v chladnějších podmínkách. V chladu se rovněž snižuje výdej tepla. Těmito pochody dochází ke kompenzaci tepelných ztrát a zachování konstantní tělesné teploty.

V různých částech těla homoioterma je rozdílná teplota: (1) teplota tělesného jádra (tj. teplota v tělních dutinách – hrudní, břišní, lebeční) je relativně stabilní, nevykazuje výrazné kolísání, (2) teplota tělesné slupky (tj. teplota kůže, podkoží, svalstva na povrchu těla) je ovlivňována okolním prostředím. Jsou-li termoreceptory lokalizované v orgánech slupky (nebo i v orgánech jádra) stimulovány, jsou indukovány termoregulační mechanismy (jejich „centrum“ je v hypothalamu). Ty jsou buď aktivovány chladem (zvyšuje se tvorba tepla, snižuje se výdej tepla), nebo jsou aktivovány teplem (zvyšuje se výdej tepla, snižuje se tvorba tepla).

U poikilotermních živočichů v chladném prostředí dochází k minimálnímu nárůstu metabolismu a rychlému poklesu teploty. Následkem je snížení aktivity organismu přecházející do stavu netečnosti. Poikilotermové jsou tedy méně závislí na přísunu živin (potravy), ale mnohem více na externích zdrojích tepla. Z evolučního hlediska se jedná také o rozdíly v tepelné izolaci těla homoiotermních a poikilotermních živočichů.

Závěr, poznámky & komentáře

Tuková tkáň

Úvod

Tuková tkáň je složena z adipocytů, fibroblastů, cév, nervových zakončení, kolagenních a retikulárních vláken a extracelulární tekutiny. V poslední době v ní byly nalezeny kmenové buňky, což otevírá řadu možností využití této tkáně pro terapeutické účely. Hlavním úkolem tukové tkáně je vytváření energetických zásob a zabezpečování s nimi souvisejících metabolických procesů. Tuková tkáň patří také do systému vnitřní sekrece. Ovlivňuje významně funkce jiných orgánů, negativně se její vliv uplatňuje za obezity. Obezita se podílí na vzniku metabolického syndromu (je jeho součástí).

Orientačně lze podíl tukové tkáně na celkové hmotnosti stanovit **tukoměrem**.

Metabolický syndrom je soubor projevů, zahrnujících obezitu, zvýšený krevní tlak, rezistenci na inzulin, poruchy metabolismu lipidů aj.

Cíle

- Stanovení procentuálního podílu a hmotnosti tukové tkáně v lidském organismu
- Výpočet indexu tělesné hmotnosti (BMI, Body Mass Index) a srovnání s mezinárodními doporučeními
- Posouzení skóre tělesné kondice (BCS, Body Condition Score) u psa
- Diskuse

Metody

Využití měřiče tělesného tuku Omron

- ✓ Zásady práce s přístrojem (viz návod)
- ✓ Zásady správného měření (viz návod)



Tukoměr

Měření procentuálního podílu a hmotnosti tukové tkáně

- ✓ Nastavit individuální parametry probanda (výška, věk, pohlaví)
- ✓ Provést měření
- ✓ Odečíst hodnotu podílu tukové tkáně a absolutní hmotnosti tuku v těle

Výpočet BMI

- ✓ Hodnota BMI vychází z tělesné hmotnosti a výšky
- ✓ $BMI = \text{hmotnost v kg} / \text{výška v m}^2$
- ✓ Srovnání s orientačními referenčními hodnotami (kategorie BMI)

Využití krokoměru s tukoměrem

- ✓ Zásady práce s přístrojem (viz návod)
- ✓ Zásady správného měření (viz návod)



Krokoměr/tukoměr

Měření podílu tukové tkáně

Měření tloušťky kožní řasy přístrojem Digital Body Fat Caliper

- ✓ Zásady práce s přístrojem (viz návod)
- ✓ Zásady správného měření (viz návod)



Digital Body Fat Caliper

Z tabulky s pomocí zadaných hodnot (věk, pohlaví) určit podíl tělesného tuku

Výsledky

Hmotnost a procentuální podíl tukové tkáně v organismu, BMI

	Hmotnost těla [kg]	Výška těla [m]	Tuková tkáň [%]	Tuková tkáň [kg]	BMI [kg/m ²]
Proband č. 1					
Proband č. 2					
Proband č. 3					

Orientační srovnání s mezinárodně doporučenými základními kategoriemi BMI

Kategorie	BMI [kg/m ²]
Podváha	<18
Normální váha	18,5–24,9
Nadváha (preobézní stav)	25–29,9
Obezita I. stupně	30–34,9
Obezita II. stupně	35–39,9
Obezita III. stupně	≥40

Podle WHO, 1997

Falešně pozitivní diagnóza obezity podle BMI může nastat například u jedinců s vysokým podílem svalové hmoty.

Skóre tělesné kondice (BCS) u psa

	Žebra	Ocasní báze	Pohled z boku	Pohled shora
Pes č. 1				
Pes č. 2				

Základní kategorie BCS u psa

	Žebra	Ocasní báze	Pohled z boku	Pohled shora
Těžké zhubnutí (kachexie)	snadno hmatná, bez pokrytí tukem	kosti vystupují, bez hmoty mezi kostí a kůží	tvrdé abdominální záhyby kůže	vzhled přesýpacích hodin
Hubenost	snadno hmatná, s malým pokrytím tukem	kosti viditelné, hmatná tenká vrstva hmoty mezi kůží a kostí	abdominální záhyby kůže	náznak přesýpacích hodin
Normální stav	snadno hmatná, ale pokrytá tukem	kosti hmatné pod vrstvou hmoty mezi kůží a kostí	abdominální záhyby kůže	dobře tvarovaná abdominální prohlubeň

Obloulost	těžko hmatná přes vrstvu tuku	kosti hmatné pod silnou vrstvou tuku	bez abdominálních záhybů	rozšířená záď
Obezita	téměř nehmatná	kosti obtížně hmatné pod silnou vrstvou tuku	převis tuku v abdominálních oblastech, bez zúžení trupu	velmi znatelně bočně rozšířené tělo

Diskuse

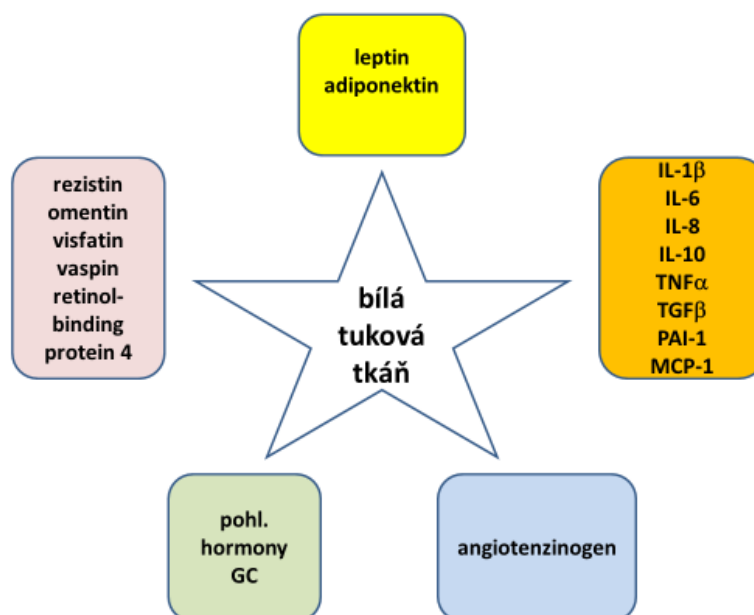
Tuková tkáň obsahuje adipocyty, endotelové buňky, makrofágy, fibroblasty, leukocyty aj. Volné mastné kyseliny jsou uvolňovány z krevních lipoproteinů aktivitou lipáz a po vstupu do adipocytů tukové tkáně dochází k jejich esterifikaci. Tuková tkáň obsahuje kolem 80 % lipidů, podíl se liší u jednotlivých druhů zvířat. Lipogeneze (tvorba lipidů) je stimulována hormonálně – inzulinem, u monogastrů se uplatňuje rovněž leptin. Lipolýza (štěpení zásobních lipidů) je stimulována hormonsenzitivní lipázou, jejíž aktivitu ovlivňují adrenalin, noradrenalin, glukagon, somatotropin (STH), kortikotropin (ACTH), hormony štítné žlázy aj. Leptin (hormon sytosti) inhibuje příjem potravy a spolupodílí se tak na regulaci příjmu potravy. Metabolismus tukové tkáně není v celém těle shodný, například adipocyty lokalizované v abdominální tukové tkáni vykazují vyšší rezistenci k inzulinu.

Akumulace tělesného tuku představuje energetickou zásobu organismu, nadměrná akumulace však znamená zdravotní riziko (vznik obezity, metabolického syndromu).

S přibývajícím věkem je svalová tkáň nahrazována tukovou. Relativně nízká tělesná hmotnost nemusí znamenat normální obsah tukové tkáně v organismu, a naopak nadváha nemusí svědčit pouze o nadměrné akumulaci tuku (alespoň část nadměrné hmotnosti může být tvořena tkání svalovou). Z tohoto důvodu je měření podílu tělesného tuku velmi důležité. Tuková tkáň obsahuje poměrně málo vody, proto má nízkou elektrickou vodivost.

Tuková tkáň je významnou **strukturou vnitřní sekrece**: produkuje adipokiny – leptin, adiponektin, mezi adipokiny patří také faktory ovlivňující rezistenci k inzulinu, například rezistin, omentin aj., dále tvoří prozáněťové cytokiny, angiotenzinogen aj. Probíhá zde konverze prekurzorů steroidních hormonů. Je jednou z cílových tkání pro působení inzulinu, adrenalinu, hormonů štítné žlázy, metabolitů kyseliny arachidonové (ikosanoidů).

Vnitřně sekreční role tukové tkáně:



Vysvětlivky: IL = interleukiny, $\text{TNF}\alpha$ = faktor nekrotizující tumory α , $\text{TGF}\beta$ = transformující růstový faktor, PAI-1 = inhibitor plazminogenového aktivátoru (působí protrombogenně).
MCP-1 = monocytový chemotaktický protein, GC = glukokortikoidy

U člověka se k hodnocení výživného stavu používá **index tělesné hmotnosti** (BMI, Body Mass Index). Je dán vzorcem: tělesná hmotnost v kg/tělesná výška v m^2 . Za normální váhu se považuje hodnota BMI 18,5-24,9.

U zvířat se stanovuje parametr **skóre tělesné kondice** (BCS, Body Condition Score). Jedná se o subjektivní, semikvantitativní hodnocení. Na základě hodnocení pohledem (adspekci) a pohmatem (palpací) lze psa zařadit do jednoho z 5 stupňů: (1) těžké zhubnutí, sešlost (kachexie), (2) hubenost, (3) normální stav, (4) obtloustlost, (5) obezita. Palpuje se žeberní oblast, zúžená část trupu („pas“) a ocasní báze (krajina nasazení ocasu). Psi s optimálním BCS by měli mít hladké obrysy, kosti by měly být hmatné pod tenkou vrstvou podkožního tuku. Stanovení BCS u psa má význam pro zhodnocení správné hmotnosti, začínající obezity, případně souvislosti s onemocněními. Při hodnocení je třeba respektovat plemenné rozdíly.

U dojnic se hodnotí výběžky bederních obratlů, oblast mezi kyčelními hrboly, kyčelní hrboly, pánevní jáma s kořenem ocasu aj., měří se i tloušťka podkožní tukové tkáně, k jejímu hodnocení se využívá i ultrasonografické vyšetření. Hodnotící škála zahrnuje: (1) extrémní vyhublost, (2) hubenost, (3) střední kondici, (4) vykrmenost, (5) přetučenost.

Měřič tělesného tuku Omron BF511 využívá metodu bioelektrické impedance. Měří tělesný tuk (v %), viscerální tuk (v %), kosterní svalovinu (v %). Ze zadaných hodnot – tělesná výška, věk, pohlaví, a měřených hodnot – tělesná hmotnost, se počítá klidový metabolismus a BMI.

Krokoměr s tukoměrem A-3003 měří množství tuku v těle (v %) rovněž na základě bioelektrické impedance.

Digital Body Fat Caliper měří tloušťku kožní řasy v milimetrech. Podle naměřené hodnoty a věku a pohlaví osoby lze z přiložené tabulky orientačně určit procentuální zastoupení tuku v těle.

Měření podílu tuku metodou bioelektrické impedance se nedoporučuje provádět po intenzivním cvičení, po požití alkoholu nebo většího množství vody.

Bioelektrická impedance měří množství tuku nepřímo – na základě odporu těla při průchodu elektrického proudu o nízké intenzitě a vysoké frekvenci (tuková tkáň má nízkou vodivost).

Závěr, poznámky & komentáře

EPONYMA v učebních textech Fyziologie I pro VFU Brno

Eponyma v medicíně jsou termíny týkající se zákonů, fenoménů, pravidel, nemocí, symptomů, syndromů a různých struktur, jež byly pojmenovány po těch, kteří je objevili, formulovali nebo zavedli, nesou také pojmenování po pacientech. Vybrali jsme ta, která jsou uvedena v Přehledu fyziologie I pro VFU Brno (Doubek J, Matalová E, Váňová I, 2019) a ve studijních materiálech pro praktická cvičení v letním semestru.

Addisonova nemoc Nedostatečná činnost kůry nadledvin projevující se nedostatkem hormonů mineralo- a glukokortikoidů, například v důsledku její imunitní destrukce. Nazvána podle skotského lékaře T. Addisona (*1793-†1860).
Addisonská krize Stav, který nastává u pacienta trpícího Addisonovou nemocí při poklesu koncentrace sodíku pod 140 mmol/l plazmy, chloridů pod 105 mmol/l plazmy a vzestupu koncentrace draslíku nad 6 mmol/l plazmy (u psa). Mezi projevy patří obrny končetin, průjem, zvracení, poruchy srdečního rytmu, oběhové selhání. Nazvána podle skotského lékaře T. Addisona (*1793-†1860).
Alzheimerova nemoc Degenerativní onemocnění části mozku projevující se ztrátou kognitivních (poznávacích) funkcí (tj. myšlení, paměti, úsudku). Pojmenována podle německého neuropatologa a psychiatra A. Alzheimerera (*1864-†1915).
Auerbachův plexus Myenterický plexus, nervová pletěň nacházející se mezi <i>str. circulare</i> a <i>str. longitudinale tunicae muscularis</i> dutých orgánů trávicí trubice. Pojmenován po německém anatomovi a neuropatologovi L. Auerbachovi (*1828-†1897).
Bergmannovo pravidlo Zvířata žijící v chladnějších oblastech mají ve srovnání s jedinci stejného nebo příbuzného druhu, kteří žijí v teplých oblastech, menší povrch těla ve vztahu k jeho objemu, tudíž i menší tepelné ztráty. Zvířata žijící v teplých oblastech mají ve srovnání s jedinci stejného nebo příbuzného druhu, kteří žijí v chladných oblastech, větší povrch těla ve vztahu k jeho objemu, tudíž i větší tepelné ztráty. Nazváno podle německého anatoma, fyziologa a biologa C. Bergmanna (*1814-†1865).
Billrothovy provazce Retikulární vazivo, osídlené imunitními buňkami, tvořící podklad červené pulpy sleziny. Pojmenovány po německo-rakouském lékaři T. Billrothovi (*1829-†1894).
Bohrův efekt Afinita hemoglobinu vůči kyslíku klesá při zvýšené koncentraci CO₂, zvýšené teplotě, sníženém pH a zvýšené koncentraci 2,3-bisfosfoglycerátu. Nazván po dánském lékaři Ch. Bohrovi (*1855-†1911).
Brambellova komise

Tato komise roku 1965 ve Velké Británii formulovala tzv. 5 svobod zvířat (předcházení stresu): svoboda od hladu a žízně, svoboda od diskomfortu, svoboda od bolesti, zranění nebo nemoci, svoboda k vyjádření normálního chování a svoboda od strachu a úzkosti. Nazvána podle irského přírodovědce R. Brambella (*1901-†1970).
Brecherova-Cronkitova metoda Manuální metoda stanovení počtu trombocytů: EDTA krev se naředí štávelanem amonným a trombocyty jsou počítány ve 20 obdélnících Bürkerovy komůrky při zvětšení 400×. Pojmenována po americkém hematologovi G. Brecherovi (*1913-†2004) a americkém biologovi E. P. Cronkitovi (*1914-†2001).
Bürkerova komůrka Počítací komůrka s přesně definovanou mřížkou sloužící ke stanovení počtů erytrocytů, leukocytů a trombocytů v objemu krve. Pojmenována podle německého fyziologa K. Bürkera (*1872-†1957).
Bürkerovo pravidlo o hraničních čarách Určuje, že při počítání buněk v Bürkerově komůrce jsou započítávány všechny buňky, které se dotýkají, uvnitř i vně, dvou předem určených na sebe kolmých stran geometrických útvarů (čtverců či obdélníků), nejsou však počítány buňky, které se dotýkají (uvnitř i vně) zbývajících dvou stran geometrických útvarů. Pojmenováno podle německého fyziologa K. Bürkera (*1872-†1957).
Coombsův test Vyšetření používané pro diagnostiku imunitně zprostředkované hemolytické anémie. Zjišťuje se přítomnost autoprotilátek navázaných na erytrocyty pacienta (přímý antiglobulinový test). Pojmenován po anglickém imunologovi a patologovi, veterinárním lékaři R. C. Coombsovi (*1921-†2006).
Coriho (Coriův) cyklus Glukózo-laktátový cyklus, zahrnuje neoxidativní glykolýzu v pracujícím kosterním svalu a erytrocytech, vzniklý laktát je transportován do jater a ledvin, kde se znovu tvoří glukóza, ta se prostřednictvím krve dostává do tkání, kde je využívána. Pojmenován podle amerického biochemika C. F. Coriho (*1896-†1984).
Cushingova nemoc Zvýšená činnost kůry nadledvin projevující se nadbytkem hormonů glukokortikoidů. Pojmenována po americkém neurochirurgovi a patologovi H. Cushingovi (*1869-†1939).
Döhleho tělíčka Modré (modrošedé) útvary v neutrofilních granulocytech obsahující RNA, vyskytují se při těžkých infekcích. Pojmenována podle německého patologa K. G. P. Döhleho (*1855-†1928).
Ductus arteriosus Botalli Součást fetálního krevního oběhu, která spojuje aortu a plicnici, po porodu se rychle uzavírá. Nazván podle italského chirurga L. Botalla (*1530-†1600).
Dulbeccovo médium Médium užívané ke kultivaci buněk, obsahuje aminokyseliny, anorganické soli, glukózu a vitaminy. (Dulbecco modifikoval Eagleho medium.) Nazváno po italsko-americkém lékaři a molekulárním biologovi R. Dulbeccovi (*1914-†2012).
Fabriciova burza Ptačí kloakální burza, primární lymfatický orgán, v němž dochází k vývoji B-lymfocytů. Pojmenována po italském anatomovi a chirurgovi H. Fabriciovi (*1533-†1619).

Fåhræusova-Westergrenova kolona Kolona sloužící ke stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů, po naplnění kolony nesrážlivou krví, odebranou na citrát, je krev vytlačena po vyznačenou číselnou hodnotu 0 a v pravidelných časových intervalech (15 min, 30 min, 1 h, 2 h) se odečítá pokles sloupce erytrocytů (v mm). Nazvána podle švédského patologa a hematologa R. Fåhræuse (*1888-†1968) a švédského internisty A. V. A. Westergrena (*1891-†1968).
Fitzgeraldův faktor Kofaktor, je to vysokomolekulární kininogen (HMWK, High Molecular Weight Kininogen), je zapojený do koagulace krve: napomáhá přeměně prekallikreinu na kallikrein. Pojmenován podle A. Fitzgeralda, pacienta, u něhož byla deficeience tohoto faktoru poprvé popsána (1973).
Fletcherův faktor Prekallikrein, patří mezi serinové proteinázy, je zapojený do koagulace krve: aktivuje faktor XII (Hagemanův faktor) a podílí se na vzniku bradykininu. Pojmenován podle rodiny Fletcherových, u níž byla poprvé popsána deficeience tohoto faktoru (1963).
Gibbsova-Donnanova rovnováha Rovnováha mezi koncentracemi kationtů a aniontů v krevní plazmě a intersticiální tekutině, daná změnou nábojů plazmatických proteinů v závislosti na difuzi látek přes kapilární stěnu. Nazvána po americkém matematikovi, fyzikovi a chemikovi J. W. Gibbsovi (*1839-†1903) a irském biochemikovi F. G. Donnanovi (*1870-†1956).
Giemsky-Romanowského roztok Barvicí roztok používaný v protokolu pro panoptické (přehledné) barvení krve podle Pappenheima. Pojmenován podle německého patologa G. Giemsky (*1867-†1948) a ruského parazitologa D. L. Romanowského (*1861-†1921).
Golgiho aparát (komplex) Soubor cisteren tvořících přechod mezi endoplazmatickým retikulem a cytosolem, syntetizuje polysacharidy a glykoproteiny, probíhá v něm úprava proteinů vytvořených ribozomy granulárního endoplazmatického retikula. Nazván podle italského patologa C. Golgiho (*1843-†1926).
Goldmanova rovnice Lze podle ní vypočítat membránový potenciál na základě koncentrací intra- a extracelulárních iontů, vychází z propustnosti klidové buněčné membrány pro ionty. Nazvána podle amerického fyziologa D. E. Goldmana (*1910-†1998).
Hagemanův faktor Faktor XII, patří mezi serinové proteinázy, je zapojený do koagulace krve, k jeho aktivaci dochází po kontaktu s kolagenem cévní stěny, čímž je zahájena vnitřní koagulační kaskáda, aktivuje koagulační faktor XI (Rosenthalův faktor) a prekallikrein (Fletcherův faktor). Pojmenován podle J. Hagemana, pacienta, u něhož byla poprvé popsána deficeience tohoto faktoru (1955).
Haldaneův efekt Vliv oxygenace na disociační křivku hemoglobinu pro CO₂: čím je menší parciální tlak kyslíku (pO₂), tím více CO₂ se váže na hemoglobin. Nazván podle skotského fyziologa J. S. Haldaneho (*1860-†1936).
Hamburgerův přesun (Hamburgerův shift)

Výměna hydrogenuhlíkatových aniontů (HCO_3^-) přestupujících do plazmy za chloridové anionty (Cl^-) probíhající v buňkách (erytrocytech). Nazván podle nizozemského fyziologa H. J. Hamburgera (*1859-†1924).
Harderova žláza Hluboká žláza třetího víčka (<i>gl. palpebrae tertiae profunda</i>), exokrinní (slzná) žláza ústící do spojivkového vaku, vyskytuje se u skotu a prasat. (U ostatních domácích savců je vytvořena pouze povrchová žláza třetího víčka, která se Harderovou žlázou nazývá nesprávně.) U ptáků je její součástí i lymfatická tkáň. Nazvána podle švýcarského anatoma J. J. Hardera (*1656-†1711).
Harrisova-Benedictova rovnice Rovnice sloužící u člověka k odhadu bazálního metabolismu, vyjádřeného jako BMR (Basal Metabolic Rate). Při výpočtu se uvažuje tělesná hmotnost, tělesná výška a věk. Rovnice je konstruovaná zvlášť pro muže a zvlášť pro ženy. Nazvána po amerických chemících J. A. Harrisovi a F. G. Benedictovi (*1870-†1957).
Hayemův roztok Roztok používaný pro ředění krve a eliminaci leukocytů a trombocytů při manuálním stanovení počtu erytrocytů v Bürkerově komůrce. Nazván podle francouzského lékaře a hematologa G. Hayema (*1841-†1933).
Hayflickův limit Určuje maximální počet dělení buňky. Pojmenován podle amerického fyziologa a biologa L. Hayflicka (*1928).
Heinzova tělíska Shluky denaturovaného hemoglobinu nacházené v erytrocytech obarvených brilantkrezolyovou modří v případě některých intoxikací (otrav). U koček se ojediněle vyskytují i fyziologicky. Pojmenována po německém lékaři R. Heinzovi (*1865-†1924).
Hendersonova-Hasselbalchova rovnice (pro hydrogenuhlíkatový pufr) Koncentrace vodíkových iontů (protonů) je přímo úměrná poměru koncentrací nedisociované kyseliny uhlíčitě k uhlíkatovému aniontu. Nazvána po americkém fyziologovi, chemikovi a biologovi L. J. Hendersonovi (*1878-†1942) a dánském fyzikovi a chemikovi K. A. Hasselbalchovi (*1874-†1962).
Henleho (Henleova) klička Medulární úsek nefronu spojující proximální a distální ledvinový tubulus. Na základě osmotického gradientu v jeho tenkém segmentu (sestupném raménku) probíhá zpětná resorpce vody. Nazvána podle německého lékaře, patologa a anatoma F. Henleho (*1809-†1885).
Howellova-(Jollyho) tělíska Zbytky jádra vyskytující se v nezralých savčích erytrocytech. Typický je jejich výskyt v případě regenerativních anémií (z příčin nadměrné hemolýzy nebo ztrát krve). Pojmenována po americkém fyziologovi W. H. Howellovi (*1860-†1945) a francouzském lékaři J. M. Jollym (*1870-†1953).
Hynkovo číslo Udává stáří (zralost) neutrofilních granulocytů, určuje se počet jaderných segmentů na 100 neutrofilů, přičemž fyziologická hodnota se blíží 3. Nazváno podle českého internisty K. Hynka (*1879-†1960).
Christmasův faktor Faktor IX, patří mezi serinové proteinázy, je zapojený do koagulace krve, je aktivován aktivovaným faktorem XI (Rosenthalovým faktorem) spolu s faktorem IV (Ca^{2+}),

aktivovaný faktor IX následně aktivuje faktor X (faktor Stuartův-Prowerové). Pojmenován podle S. Christmase, pacienta, u něhož byla poprvé popsána deficeience tohoto faktoru (1952).
Jacobsonův orgán Označovaný také vomeronazální orgán, slouží u nižších obratlovců a některých druhů savců (hlodavců, kočky, koně, člověka) k vnímání feromonů. Nazván podle dánského chirurga L. L. Jacobsona (*1783-†1843).
Kleiberův zákon Se vzrůstajícím objemem organismu se jeho metabolismus zvyšuje s exponentem 0,75. Nazván podle švýcarsko-amerického fyziologa M. Kleibera (*1893-†1976).
Korotkovův fenomén Fenomén prokazatelný fonendoskopem nad periferní tepnou při měření krevního tlaku pomocí manžety. Šelest je slyšitelný při poklesu tlaku manžety pod hodnotu systolického tlaku, vymizí při snížení diastolického tlaku. Nazván podle ruského chirurga N. S. Korotkova (*1874-†1920).
Krebsův cyklus Citrátový cyklus, cyklus trikarboxylových kyselin, je řada reakcí v mitochondriích, při nichž dochází ke katabolismu acetylových zbytků (vystupují ve formě acetyl-CoA), k uvolnění redukčních ekvivalentů, jež po oxidaci dovolují výdej volné energie (spolu s dýchacím řetězcem hraje K. cyklus zásadní roli pro získání energie v buňce). Pojmenován po německo-anglickém lékaři a biochemikovi H. A. Krebsovi (*1900-†1981).
Kupfferovy buňky Součást mononukleárního fagocytárního systému, vyskytují se v perisinusoidálním prostoru jater. Nazvány podle německého anatoma K. W. von Kupffera (*1829-†1902).
Kurloffovy buňky Patří do populace mononukleárních leukocytů, vyskytují se u morčat (<i>Cavia sp.</i>) a kapybar (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>), v jejich cytoplazmě je přítomná inkluze, tvořená glykosaminoglykany. Pojmenovány podle ruského lékaře M. G. Kurloffa (*1859-†1932).
Langerhansovy buňky Dendritické buňky vyskytující se ve <i>str. basale</i> a <i>str. spinosum</i> pokožky, jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému, po fagocytóze antigenu působí v mízních uzlinách jako buňky prezentující antigen. Pojmenovány podle německého patologa, fyziologa a biologa P. Langerhanse (*1847-†1888).
Mareyův zákon Tepová frekvence je nepřímo úměrná krevnímu tlaku. Nazván podle francouzského lékaře, fyziologa a chronofotografa É.-J. Mareye (*1830-†1904).
Mayův-Grünwaldův roztok Barvicí roztok používaný v protokolu pro panoptické (přehledné) barvení podle Pappenheima. Nazván podle německého internisty R. Maye (*1863-†1936) a německého lékaře L. Grünwalda (*1863-†1927).
McFarlanův model koagulace krve Klasický model srážení krve, podle něho koagulace probíhá jako sled reakcí (koagulační kaskáda) srážecích faktorů (serinových proteináz) s vnitřní a vnější cestou jejich aktivace, jež „ústí“ do společné cesty aktivace.

Nazván podle anglického hematologa R. G. McFarlana (*1907-†1987).
Pappenheimovo barvení Panoptické (přehledné) barvení krevního nátěru sloužící k hodnocení morfologie krevních buněk. Pojmenováno podle německého hematologa A. Pappenheima (*1870-†1916).
Parkinsonova nemoc Degenerativní onemocnění mozku, oblasti <i>substantia nigra</i> , spojené se sníženou tvorbou neurotransmiteru dopaminu a projevující se poruchami pohybu (klidovým třesem, ztuhlostí svalů, sníženou hybností aj.). Nazvána podle anglického chirurga J. Parkinsona (*1755-†1824).
Peyerovy plaky Organizovaná lymfatická tkáň (<i>lymphonoduli aggregati</i>) v distálním jejunu a ileu. Pojmenovány podle švýcarského anatoma J. C. Peyera (*1653-†1712).
Ponderova chyba Chyba nerovnoměrného rozložení (δ), například buněk při jejich kvantifikaci, vypočítá se podle vzorce: $\delta = \frac{\sqrt{p}}{p} \times 100 [\%],$ kde p znamená napočítané buňky (například krvinky). Při vyhodnocení malého počtu krvinek je chyba nerovnoměrného rozložení velká, což znamená nesprávný výsledek.
Price-Jonesova křivka Grafické znázornění závislosti průměrů erytrocytů na jejich četnosti. Slouží k diferenciaci anémií. Nazvána podle britského hematologa C. Price-Jonese (*1863-†1943).
Purkyňovy buňky Neurony hruškovitého tvaru, jejichž těla se nacházejí ve <i>str. gangliosum</i> kůry mozečku. Jedná se o inhibiční neurony, jejichž axony tvoří jediný výstup mozečkové kůry, z níž vedou přímo k jádrům mozečku. Pojmenovány podle českého fyziologa a lékaře J. E. Purkyně (*1787-†1869).
Quickův test Protrombinový čas, test sloužící k ověření funkčnosti vnější koagulační kaskády. Pojmenován podle amerického lékaře, fyziologa a biochemika A. J. Quicka (*1894-†1978).
Rosenthalův faktor Faktor XI, patří mezi serinové proteinázy, je zapojený do koagulace krve, je aktivován faktorem XII (Hagemanovým faktorem), aktivuje faktor IX (Christmasův faktor). Pojmenován podle amerického hematologa R. L. Rosenthala (*1923-†2013).
Selyeho koncepce stresu Vyjadřuje obecnou, uniformní odpověď organismu na působení různých stresorů, odpověď byla nazvána obecný adaptační syndrom. Formulována byla rakousko-maďarsko-kanadským endokrinologem H. Selyem (*1907-†1982).
Schillingova křivka Vyjadřuje změny v převažujících populacích leukocytů během zánětu: bojová fáze (neutrofilie s posunem doleva), obranná fáze (monocytóza) a ozdravná fáze (lymfocytóza). Pojmenována podle německého internisty a hematologa V. Schillinga (*1883-†1960).
Schillingův index Průměrný počet segmentů jader neutrofilních granulocytů, vyjadřuje stáří populace neutrofilů. Pojmenován podle německého internisty a hematologa V. Schillinga (*1883-†1960).

Starlingova rovnováha Rovnováha hydrostatických a onkotických sil určujících výměnu tekutin mezi intravazálním a intersticiálním prostorem. Nazvána po britském fyziologovi E. H. Starlingovi (*1866-†1927).
Starlingovy síly Síly ovlivňující pohyb tekutiny přes kapilární stěnu, jedná se o hydrostatický tlak v cévách a intersticiu a onkotický tlak v krevní plazmě a intersticiu. Nazvány po britském fyziologovi E. H. Starlingovi (*1866-†1927).
Starlingův zákon Vyjadřuje vztah mezi krevní plazmou a intersticiem, závisí na: krevním tlaku (hydrostatickém tlaku) v cévách, hydrostatickém tlaku v intersticiu, koncentračním gradientu proteinů mezi krevní plazmou a intersticiem (onkotickým tlaku v plazmě a intersticiu) a na permeabilitě kapilár. Nazván po britském fyziologovi E. H. Starlingovi (*1866-†1927).
Stuartův-Prowerové faktor Faktor X, patří mezi serinové proteinázy, je zapojený do koagulace krve, je aktivován aktivovaným faktorem IX (Christmasovým faktorem) a aktivovaným faktorem VII (konvertinem), spolu s aktivovaným faktorem V (akcelerinem) aktivuje faktor II (protrombin) na trombin. Pojmenován podle R. Stuarta a A. Prowerové, prvních pacientů, u nichž byla popsána deficeience tohoto faktoru (50. léta 20. století).
Tammův-Horsfallův glykoprotein Glykoprotein tvořený v buňkách ledvinných tubulů, jehož precipitací vznikají válce, které lze detekovat v močovém sedimentu. Nazván podle amerického virologa I. Tamma (*1922-†1995) a amerického lékaře a virologa. F. L. Horsfalla (*1906-†1971).
Tonelliho příznak Jeden z průkazů biologické smrti, založený na existenci deformace zornice: pokud se stiskne oko dvěma prsty, je zornice oválná, pokud třemi, je trojhranná (objevuje se již několik okamžiků po smrti a trvá asi 2 h, tento příznak se neobjevuje u smrti z udušení (například z utonutí)).
Türkův roztok Roztok používaný pro ředění krve a eliminaci erytrocytů a trombocytů při manuálním stanovení počtu leukocytů v Bürkerově komůrce. Pojmenován podle rakouského hematologa W. Türka (*1871-†1916).
Von Willebrandova nemoc Krvácivé onemocnění způsobené vrozeným deficitem nebo nefunkčností von Willebrandova faktoru. Nazvána podle finského internisty E. A. von Willebranda (*1870-†1949).
Von Willebrandův faktor Plazmatický glykoprotein produkovaný megakaryocyty, endotelem, játry aj., jehož úlohou je adherence krevních destiček na kolagen cévní stěny a zpomalení odbourávání faktoru VIII (antihemofilního faktoru A). Pojmenován podle finského internisty E. A. von Willebranda (*1870-†1949).
Wintrobův hematokrit Metoda stanovení hematokritu, kdy je krev šetrně centrifugována ve zkumavce s vyznačenou stupnicí. Nazván podle rakousko-amerického lékaře M. Wintrobea (*1901-†1986).
Wrightovo barvení

Panoptické (přehledné) barvení krevního nátěru sloužící k hodnocení morfologie krevních buněk.

Pojmenováno podle amerického patologa J. H. Wrighta (*1869-†1928).

REFERENCE

(česká vydání)

- Doubek J et al. 2003: Veterinární hematologie. Noviko, Brno. ISBN 80-86542-02-5.
- Doubek J et al. 2010: Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. Noviko, Brno. ISBN 978-80-86542-22-5.
- Doubek J et al. 2014: Základy laboratorní diagnostiky neinfekčních nemocí. VFU Brno. ISBN 978-80-7305-136-5.
- Doubek J, Matalová E, Váňová, I. 2019: Přehled fyziologie I, II pro VFU Brno. VFU, Brno. ISBN 978-80-263-1457-8, 978-80-263-1484-8.
- Doubek J, Řeháková K, Uhríková I et al. 2014: Hematologický a cytologický atlas. VFU, Brno. ISBN 978-80-7305-137-2.
- Doubek J, Uhríková I et al. 2014: Laboratorně diagnostické algoritmy pro klinickou praxi. VFU, Brno. ISBN 978-80-7305-135-8.
- Ganong W. 2005: Přehled lékařské fyziologie. 20. vyd. Galén, Praha. ISBN 80-7262-311-7.
- Jelínek P, Koudela K et al. 2003: Fyziologie hospodářských zvířat. MZLU, Brno. ISBN 80-7157-644-1.
- Kittnar O et al. 2011: Lékařská fyziologie. Grada Publ. a. s., Praha. ISBN 978-80-247-3068-4.
- Kittnar O, Mlček M. 2009: Atlas fyziologických regulací. Grada Publ., Praha. ISBN 978-80-247-2722-6.
- Knotek, Z., Jekl, V., Hauptman, K. et al. 2017: Nemoci zvířat zájmových chovů. Drobní savci. ProfiPress, Praha. ISBN 978-80-86726-81-6.
- Langmeier M et al. 2009: Základy lékařské fyziologie. Grada Publ., Praha. ISBN 978-80-247-2526-0.
- Reece WO. 2011: Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. 2. vyd. Grada Publ., Praha. ISBN 978-80-247-3282-4.
- Rokyta R et al. 2015: Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi. Grada Publ., Praha. ISBN 978-80-247-4867-2.
- Rosypal S et al. 2001: Terminologie molekulární biologie. St. Rosypal, Brno. ISBN 80-902562-3-6.
- Silbernagl S, Despoupoulos A. 2016: Atlas fyziologie člověka. 8. vyd. Grada Publ., Praha. ISBN 978-80-247-4271-7.
- Šmarda J et al. 2005: Metody molekulární biologie. MU, Brno. ISBN 80-210-3841-1.
- Toman M et al. 2000: Veterinární imunologie. Grada Publ., Praha. ISBN 80-7169-727-3.
- Toman, M., Faldyna, M., Nechvátalová, K., Nesňalová, E. 2008: Praktická cvičení z imunologie. 2. vyd. VFU Brno, VÚVeL Brno.
- Trojan S et al. 2003: Lékařská fyziologie. 4. vyd. Grada Publ., Praha. ISBN 80-247-0512-5.

Nejaktuálnější informace

- Web of Knowledge

<http://apps.webofknowledge.com>

- www.pubmed.com

FYZIOLOGIE I

Praktická cvičení

(druhé rozšířené vydání)

Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.

Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.

MVDr. Pavla Hamouzová, Ph.D.

MVDr. Šárka Stehlíková, Ph.D.

MVDr. Ivana Veselá, Ph.D.

MVDr. Kristína Řeháková, Ph.D.

MVDr. Ivana Váňová, Ph.D.

MVDr. Lucia Černá

Ústav fyziologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

Klinická laboratoř pro malá zvířata Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.

Brno 2020

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ÚŽFG, v.v.i.

2020

2. rozšířené vydání