

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



Polymorfismus v genu *MDR1* u border kolií

Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Alena Trýznová

Brno 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: **Polymorfismus v genu *MDR1* u border kolií** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č.121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za vedení práce, Ing. Čěnkovi Horeckému, Ph.D. za odborné konzultace a především Ing. Janu Wijackimu za nedocenitelnou pomoc při práci v laboratoři a cenné rady při psaní této práce.

ABSTRAKT

Práce je zaměřena na polymorfismus v genu *MDRI* c.-6-180T>G, který způsobuje rezistenci vůči fenobarbitalu. Fenobarbital je jedním z nejčastěji používaných léčiv pro potlačení projevů epilepsie, jež je jedním z nejčastějších neurologických onemocnění psů, s četností od 0,5 do 5 % v závislosti na plemenné příslušnosti. Tato mutace byla prozatím detekována pouze u plemene border kolie, u nichž je evidována až 30-ti procentní rezistence na léčbu epilepsie. V textu je popsáno plemeno border kolie, epilepsie psů a gen *MDRI*. V metodické části se pak práce zabývá detekcí polymorfismu s testováním vzorové populace 82 psů. Výsledky se shodují s dříve publikovanými pracemi a potvrzují frekvenci výskytu mutované alely u 32 % populace.

Klíčová slova

Gen *MDRI*, border kolie, fenobarbital, léková rezistence, P-glykoprotein

ABSTRACT

This thesis is focused on polymorphism of *MDRI* gene c.-6-180T>G, which causes phenobarbital resistance. Phenobarbital is one of the most commonly used drug against epilepsy, which is one of the most common neurological disease in dogs with frequency between 0.5-5 % according to breed. This mutation has so far been detected only in the border collie breed, which manifests up to 30 percent resistance to the treatment of epilepsy. In the text is subscribed border collie breed, dog epilepsy and gene *MDRI*. Methodical part is focused on detection of the polymorphism in model population of 82 dogs. The results agree with previous studies and confirm frequency of mutant alleles 32 % within the population.

Key words

Gene *MDRI*, border collie, phenobarbital, drug resistance, P-glycoprotein

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Plemeno border kolie	11
3.1.1	Systematické zařazení.....	11
3.2	Genetika v chovu psů.....	13
3.2.1	Genom psa	13
3.3	Geneticky determinovaná onemocnění psů	13
3.3.1	Geneticky determinované choroby u border kolíí	14
3.4	Epilepsie.....	16
3.4.1	Symptomatologie epilepsie.....	16
3.4.2	Idiopatická epilepsie	17
3.4.3	Genetické pozadí epilepsie	18
3.4.4	Diagnostika epilepsie.....	18
3.4.5	Léčba epilepsie	19
3.4.6	Frekvence výskytu epilepsie u psů	20
3.5	Mnohočetná léková rezistence.....	21
3.5.1	P-glykoprotein	21
3.6	Gen MDR1.....	24
3.6.1	MDR1 – delece	24
3.6.2	MDR1 – inzerce.....	25
3.6.3	MDR1 – jednonukleotidová substituce.....	26
3.7	Metody detekce polymorfismu c.-6-180T>G v genu MDR1	27

4	MATERIÁL A METODIKA.....	28
4.1	Sledovaná populace	28
4.2	Izolace DNA	28
4.2.2	Postup izolace DNA z chlupových cibulek	29
4.3	Měření koncentrace DNA	30
4.4.1	Design primerů	30
4.4.2	Reakční směs pro PCR	31
4.4.1	Teplotní profil	31
4.5	Polymorfismus délky restričních fragmentů.....	32
4.6	Gelová agarózová elektroforéza	32
5	VÝSLEDKY	34
5.1	Izolace DNA z tkání	34
5.2	Měření koncentrace DNA	35
5.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	36
5.4	Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP).....	36
6	DISKUZE	39
7	ZÁVĚR	41
8	POUŽITÁ LITERATURA	42
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	47
10	SEZNAM TABULEK	48

11	SEZNAM ZKRATEK	49
12	PŘÍLOHY	50

1 ÚVOD

Border kolie se v posledních letech staly jedním z nejoblíbenějších plemen psů chovaných v České republice, společně s počtem jedinců však vzrůstá i počet onemocnění, jimiž může toto plemeno trpět. Kromě již běžně známých a testovaných či klinicky diagnostikovatelných nemocí, jako je Onemocnění oka kolíí (CEA), Progresivní retinální atrofie (PRA), Ceroidní lipofuscinóza (CL), Syndrom uvězněných neutrofilů (TNS), Mnohočetná léková rezistence (MDR1), Dysplazie kyčelních a loketních kloubů (DKK, DLK) a Osteochondróza (OCD), se v posledních několika letech zvyšuje počet jedinců postižených epilepsií. Ač je epilepsie předmětem mnoha výzkumů, stále se nepodařilo objasnit její genetické pozadí, čímž se stává velmi obávanou mezi chovateli psů.

Snahou veterinárních lékařů je potlačit projevy epileptických záchvatů pomocí medikamentů. Mezi nejčastěji volené patří léky obsahující fenobarbital a bromid draselný, případně jejich kombinace. Právě na fenobarbital byla u plemene border kolie zjištěna rezistence, jejíž podstatou je mutace v genu *MDR1*.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce Polymorfismu v genu *MDR1* u border kolií je zpracování dostupné literatury zabývající se vztahem genu *MDR1* u border kolií k onemocněním a rezistencí na léčbu fenobarbituráty s následným testováním vzorové populace jedinců, analýzou jejich rodokmenu a klinického stavu v souvislosti s možným projevem epilepsie či reakcí na podaná léčiva, výpočet frekvencí alel a genotypů v tomto souboru zvířat a vyhodnocení asociace mezi polymorfismem v genu *MDR1* a fenotypem.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Plemeno border kolie

3.1.1 Systematické zařazení

Plemeno border kolie je středně velký ovčácký pes vyšlechtěný v 19. století na pomezí Anglie a Skotska. Jeho původním posláním bylo pasení ovcí. V dnešní době je k tomuto účelu využíváno především v zemi původu, případně rekreačně či soutěžně. Přestože u border kolií došlo k intenzivnímu šlechtění, spojenému s velkou oblibou v posledním desetiletí, stále si uchovaly vlohu k pasení, která z nich dělá nejlepší ovčácké psy (Priceová, 2014).

Dle rozdělení Fédération Cynologique Internationale (FCI) spadají border kolie do 1. skupiny – plemena ovčácká, pastevecká a honácká (Fogle, 2005)

3.1.2 Standard plemene border kolie

Border kolie je pes středního vzrůstu. Standard uvádí, že optimální kohoutková výška fen je 47-52 cm, u psů 50-55 cm. Jedná se o psa dobrých proporcí a ladných rysů ukazujících kvalitu, půvab a dokonalou vyváženost, které ve spojení s dostatečnou tělesnou stavbou demonstrují výkonnost (Tučimová, 2014).

3.1.3 Historie plemene border kolie

Již z doby pátého až prvního století před naším letopočtem jsou datovány první zmínky o používání psů, kteří by se dali označit za pastevecké. Keltové, tou dobou žijící na území dnešního Irsku, chovali psy na ochranu ovcí před predátory. S příchodem Římanů pak byli na ostrovy dovezeni psy vyznačující se „hypnotickým okem“, které je pro border kolie typické dodnes. Křížením těchto jedinců se psy původními vznikli prapředci dnešních border kolií (Priceová, 2014).

3.1.4 Historie border kolií v ČR

První border kolie byla do Plemenné knihy ČMKU (Českomoravská kynologická unie) zapsána v roce 1993. První vrh se narodil 22. 4. 1994. V roce 2001 přesáhl počet zapsaných jedinců sto, v roce 2004 přesáhl jeden tisíc. V současné době je v PK registrováno téměř 9000 jedinců. V posledních několika letech se počet každoročně narozených štěňat pohybuje kolem jednoho tisíce, čímž

se border kolie řadí mezi plemena s nejvyšším počtem štěňat v České republice. Známa jsou jen čísla jedinců chovaných pod Klubem border kolií České republiky (BCCCZ), případně pod Klubem chovatelů málopočetných plemen psů (KCHMPP). Počty jedinců bez průkazu původu jsou pravděpodobně stejné, nicméně nedohledatelné (Loučka, 2014).

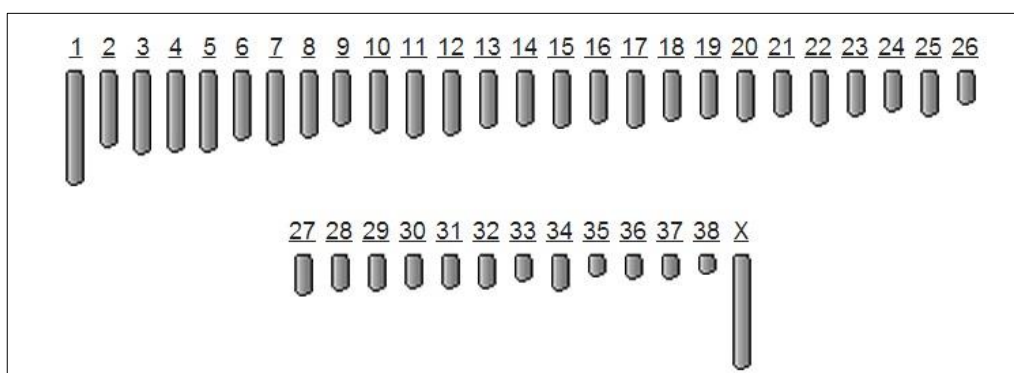
3.2 Genetika v chovu psů

Domestikovaný pes je považován za nejrozmanitější žijící druh na Zemi, jeho rozmanitost se projevuje ve velikosti, barvě srsti, proporcích těla i chování (Ruvinsky, Sampson, 2001). V současné době je evidováno 355 uznaných a 19 neuznaných plemen psů (fci.be, 2017).

Fosilní nálezy psovitých šelem, které by se daly považovat za předky dnešních psů, byly nalezeny na Sibiři a jejich stáří bylo datováno na 33 000 let (Freedman a kol., 2014). Domestikace pak pravděpodobně proběhla přes 16 000 lety, zasahuje tedy do doby před zemědělstvím, do období lovu a sběru (Freedman a kol., 2013). Freedman a kol. (2014) zároveň vyvrací hypotézu o společných předcích mezi psem domácím (*Canis familiaris*) a vlkem obecným (*Canis lupus*), s odkazem na odlišnou dobu bottlenecku – výrazné zmenšení populace, nepopírají však možnost společné prastaré line vlků, která by byla společným předkem pro oba druhy.

3.2.1 Genom psa

K dekódování genomu psa došlo v roce 2005, od té doby bylo identifikováno 2 385 199 138 párů bází. Pes má 20 429 kódujících genů, které však činí pouze 5 % z celkové DNA, zbylých 95 % je nekódujících. V somatických buňkách je 39 párů chromozomů. Prozatím bylo popsáno více než 2,5 milionu polymorfismů, které způsobují rozdíly mezi jednotlivými plemeny, nebo jsou příčinou dědičných onemocnění - těch je popsáno přibližně 500 a jen 50 z nich je objasněno na molekulární úrovni (Dostál, 2007).



Obr. 1 Sada chromozomů psa, zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/85>

3.3 Geneticky determinovaná onemocnění psů

Dědičná onemocnění jsou zcela zásadním problémem v chovu psů, zpravidla jsou zapříčiněny úzkou chovatelskou základnou, která je u zrodu většiny plemen, a využíváním inbreedingu, jež vede ke snížení genetické rozmanitosti, čímž dochází ke zvýšení homozygotnosti v populaci a to včetně mutovaných alel.

Snaha chovatelů udržet typické plemenné vlastnosti po stránce vzhledové i behaviorální se omezuje na poměrně omezené šlechtitelské programy. Obzvláště významným problémem jsou pak onemocnění projevující se až v pokročilém věku, přičemž postižení jedinci se mohou po mnoho let jevit asymptomaticky, tudíž jsou zpravidla využíváni v chovu a mohou rozšířit nemoci na další generace (Ruvinsky, Sampson, 2001).

3.3.1 Geneticky determinované choroby u border kolií

Ani border kolie se v průběhu několika desetiletí šlechtění nevyhnuly zatížení genetickými mutacemi.

Mutace způsobující onemocnění, která jsou objasněná na molekulární úrovni u border kolií, jsou:

- Anomálie oka kolií (Collie Eye Anomaly-CEA)
- Syndrom uvězněných neutrofilů (Trapped Neutrophil Syndrom-TNS)
- Ceroidní lipofuscinóza (Ceroid Lipofuscinosis-CL)
- Mnohočetná léková rezistence 1 (Multi Drug Resistance 1-MDR1)

Tyto nemoci mají autozomálně recesivní dědičnost, jednotlivé vztahy jsou popsány v tabulce 1.

Choroby diagnostikovatelné klinicky:

- Progresivní retinální atrofie (Progressive Retinal Atrophy-PRA)
- Primární glaukom (Primary Glaucoma)
- Epilepsie

Dále jsou u border kolií zaznamenány výskyty onemocnění postihující pohybový aparát, a to:

- Dysplazie kyčelního kloubu (DKK)
- Dysplazie loketního kloubu (DLK)
- Osteochondróza ramenního kloubu (OCD)

Tyto vady mají genetický základ, nicméně na jejich projev má zásadní dopad vliv prostředí (především výživa a zátěž), proto je předpoklad jejich výskytu velmi obtížný.

Tab. 1 Tabulka dědičnosti

Genotyp a fenotyp OTCE	Genotyp a fenotyp MATKY		
	AA (klinicky zdravá, alely +/+, označení Normal)	Aa (klinicky zdravá, alely +/-, označení Carrier)	aa (klinicky nemocná, alely -/-, označení Affected)
AA (klinicky zdravý, alely +/+, označení Normal)	100 % AA (potomci klinicky zdraví, alely +/+, označení Normal)	50 % AA (potomci klinicky zdraví, alely +/+, označení Normal) 50 % Aa (potomci klinicky zdraví, alely +/-, označení Carrier)	100 % Aa (potomci klinicky zdraví, alely +/-, označení Carrier)
Aa (klinicky zdravý, alely +/-, označení Carrier,)	50 % AA (potomci klinicky zdraví, alely +/+, označení Normal) 50 % Aa (potomci klinicky zdraví, alely +/-, označení Carrier)	25 % AA (potomci klinicky zdraví, alely +/+, označení Normal) 50 % Aa (potomci klinicky zdraví, alely +/-, označení Carrier) 25 % aa (potomci klinicky nemocní, alely -/-, označení Affected)	50 % Aa (potomci klinicky zdraví, alely +/-, označení Carrier) 50 % aa (potomci klinicky nemocní, alely -/-, označení Affected)
aa (klinicky nemocný, alely -/-, označení Affected,)	100 % Aa (potomci klinicky zdraví, alely +/-, označení Carrier)	50 % Aa (potomci klinicky zdraví, alely +/-, označení Carrier) 50 % aa (potomci klinicky nemocní, alely -/-, označení Affected)	100 % aa (potomci klinicky nemocní, alely -/-, označení Affected)

3.4 Epilepsie

Epilepsie je skupina funkčních nervových poruch s nejasným původem, jejichž podstatou je vzruch vyvolaný bioelektrickým výbojem, jenž zasáhne skupinu neuronů, čímž dojde k vyvolání záchvatu (Stuchlý, 2015). Hülsmeier a kol. (2015) definují, že jedince bychom měli označit za epileptického, pouze pokud prodělá dva (nebo více) po sobě jdoucí záchvaty v rozmezí 24 hodin. Kromě psů je její výskyt popsán rovněž u lidí a koček.

Etiologicky je epilepsie dělena na:

- Idiopatickou formu epilepsie – vzniká bez zjevných příčin
- Strukturální formu epilepsie – zpravidla vzniká na základě úrazu či intoxikace
- Metabolická forma epilepsie – záchvaty způsobené metabolickou poruchou, obvykle jater či ledvin (Hamamoto a kol., 2016)

3.4.1 Symptomatologie epilepsie

Projevem epilepsie jsou záchvaty, jejichž projevy mohou mít rozdílný charakter. Projev závisí na části mozku, která je zasažena. Ve většině případů však dochází ke ztrátě vědomí, křečím, pomočování, mráкотám a třesu. U různých jedinců se průběh záchvatů může lišit – nemusí dojít ke ztrátě vědomí, pes se nemusí pomočit apod. (Stuchlý, 2015).

3.4.1.1 *Rozdělení záchvatů*

Všem záchvatům je společná nekontrolovatelná aktivita neuronů nebo celých neuronových svazků, přičemž podstata těchto paraxysmálních výbojů je intracelulární nebo synaptická. Příčiny mohou být rozličné, deficity energetického metabolismu či nerovnováha mezi excitačními a inhibičními neurotransmitery (Berendt a kol., 2015).

Dochází pak k nerovnováze iontů na buněčné membráně s masivním vstupem kalciových iontů do buňky následovanou paroxysmální depolarizací. Důležitou roli při rozvoji záchvat hraje synchronizace této abnormální aktivity jednotlivých neuronů a neuronových svazků, tím dojde k rozšíření na jednotlivé korové oblasti nebo celou mozkovou kůru (Šrenk a Jaggy, 2000).

Dle rozšíření pak rozdělujeme záchvaty na fokální a generalizované:

Fokální záchvaty - dochází k motorickým záchvatům prezentujícími se záškuby určitých svalových částí, jsou způsobeny ohraničenou aktivitou určitých neuronů či neuronových skupin

Generalizované záchvaty – postihují většinu svalových skupin, vyznačují se zvýšeným napětím všech kosterních svalů, postižený jedinec zpravidla leží na boku s prohnutými zády, hlavou směřující vzad (poloha označovaná jako opistoten). Na tuto fázi navazuje fáze klonická, při níž dochází k rytmickým pohybům končetin, žvýkacích svalů, mimických svalů a pohybům očního bulbu. Mohou se objevit případy snížení tepové frekvence, zvýšeného slinění, nekontrolovatelného močení a kálení (Šrenk a Jaggy, 2000).

3.4.1.2 Průběh záchvatů

Epileptický záchvat sestává ze tří fází:

První fáze, prodromální stádium (aura), bývá u psa obvykle snadno přehlédnutelná, trvá několik málo sekund, nejvýše 1 min., pes má při ní v obličeji strnulý, jakoby vylekaný výraz a působí neklidně.

Druhá fáze, konvulzivní stádium, neboli stádium křečí, naproti tomu nelze přehlédnout. Za předpokladu, že psa postihne záchvat ve stoje, ztrácí rovnováhu a padá. Postihne-li ho v leže, snaží se vstát, potácí se, dech se může na krátko zastavit a nastanou klonické křeče (záškuby svalstva), žvýkací pohyby dolní čelisti, zvracení, samovolný odchod moče a trusu. Toto stádium trvá 1-2 minuty.

Třetí fáze, poepileptické stádium, se vyznačuje tím, že pes zůstává chvíli ležet, je vylekaný, otupělý, jakoby unavený, pomalu vstává a vyhledává klidná místa, po odpočinku se jeho chování opět vrací do normálu. Poslední stádium trvá několik minut až půl hodiny.

Průběh jednotlivých záchvatů je velmi proměnlivý jak do délky, tak do způsobu projevu, někdy může prodromální stádium zcela chybět, stejně tak třetí fáze může chybět, pes se může začít po záchvatu chovat zcela normálně, křeče mohou mít různou intenzitu (Stuchlý, 2015).

3.4.2 Idiopatická epilepsie

Jedná se o formu epilepsie, při které jsou záchvaty vyvolány bez zjevné příčiny, bez doprovodných mikro- a makroskopických podnětů ať už se jedná o vnitřní poruchy metabolismu či přispění z vnějšího prostředí ve formě úrazů a intoxikací

(Svoboda a kol., 2001). První záchvaty se objevují u jedinců ve věku 6 měsíců až 4 let (různí autoři uvádějí odlišná rozmezí, shodují se však na spodním limitu věku 6 měsíců, horní limit se odchyluje do 6 let věku). Bylo vyzorováno, že některá plemena jsou predisponována více než jiná, patří mezi ně pudlové, jezevčáci, němečtí boxeři, ohaři, kokršpanělé, teriéři, šeltie, kolie, belgičtí ovčáci. I zde uvádějí odlišní autoři rozdílnou základnu plemen, neopomenutelné je rovněž, že kromě čistokrevných plemen se epilepsie vyskytuje i u kříženců. Záchvaty zpravidla probíhají typu *grand mal* (velký záchvat) – velmi dlouho trvající záchvat nebo rychle po sobě se opakující záchvaty bez úplného zotavení (Stuchlý, 2015).

3.4.3 Genetické pozadí epilepsie

Ač výzkumy na zjištění genetického pozadí probíhají v mnoha světových laboratořích, genetická podstata epilepsie zatím nebyla zcela objasněna.

Psi trpí mnohem častěji než jiná zvířata pravou (idiopatickou, primární) neboli vrozenou, spontánní („samovolně“ vznikající) epilepsií. Obecně se počítá, že v jejich populaci je asi 1% nositelů vlohy (či vloh) pro toto onemocnění, ovšem u některých plemen a liniích je jich mnohem více. Přestože výzkum u plemene bígl prokázal častější výskyt epilepsie u psů-samců, nepředpokládá se vazba na pohlaví. Z dosud zjištěných poznatků se dá předpokládat, že epilepsie je podmíněna dvěma alelickými páry, přičemž první je pár vlohový („sklon pro epilepsii“) a druhý je tzv. represorový, který se dědí jako vázaný na pohlaví, existence tohoto represoru však prozatím není dostatečně ověřena. Druhá předpokládaná teorie spočívá na polygenní dědičnosti, kdy podmínění nemoci je ovlivněno mnoha vlohami malého účinku, kdy při sčítání účinků jednotlivých alel dochází k aditivnímu působení alel, které pak ovlivní četnost záchvatů. Zejména pak u tzv. malých záchvatů (*petite mal*) je předpokládána polygenní dědičnost s prahovým charakterem, to znamená, že vlohové založení (genotyp) určuje jistý práh snášenlivosti vůči vlivům vnějšího prostředí, který nesmí být překročen, jinak propukne záchvat (Stuchlý, 2015).

3.4.4 Diagnostika epilepsie

Při diagnostice epilepsie je třeba nejprve zjistit, zda symptomy, jež zvíře demonstruje, jsou skutečnými projevy epileptického záchvatu, nebo jde o jiné druhy záchvatů - identifikovat pozadí, které epileptickým záchvatům předchází. Pokud se

prokáže, že se skutečně jedná o epileptické záchvaty, je třeba definovat, zda se jedná o epilepsii idiopatickou či nikoli, k tomuto účelu byl definován tří stupňový systém kritérií.

Stupeň 1 je prezentován dvěma a více nevyprovokovanými záchvaty v rozsahu 24 hodin ve věku 6 měsíců až 6 let a doprovázenými negativními nálezy abnormalit v krevních a močových testech.

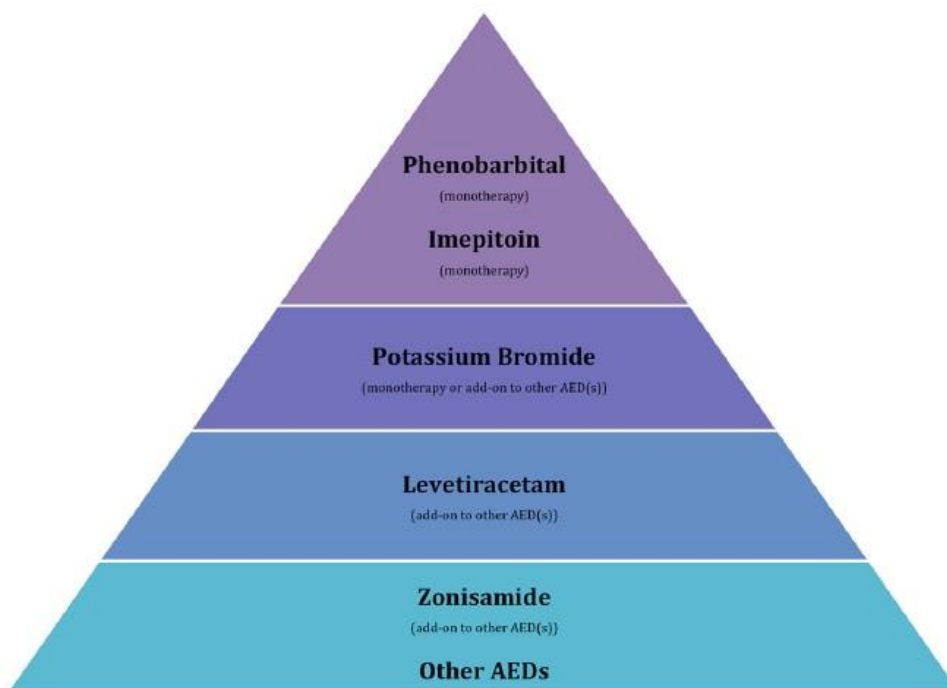
Stupeň 2 závisí na výsledcích ze stupně 1 provázenými dalšími testy, mezi které patří magnetická rezonance mozku (MRI) a analýza mozkomíšního moku (CSF).

Stupeň 3 závisí na faktorech zjištěných ve stupních 1 a 2 a je doplněn vyšetřením abnormalit na elektroencefalografu (De Risio a kol., 2015).

3.4.5 Léčba epilepsie

Cílem terapie není prozatím kompletní vyléčení pacienta, nýbrž prevence záchvatů. Bez adekvátní léčby hrozí stupňování záchvatů a za předpokladu, že pacient upadne do tzv. velkého záchvatu (*grand mal*), může nastat život ohrožující, generalizovaný stav *status epilepticus*. V takovémto případě je potřeba zvíře neprodleně dopravit k veterinárnímu lékaři (Stuchlý, 2015).

Charalambous a kol. (2014) sestavili seznam nejčastěji používaných antiepileptik (AEP), která se užívají samostatně či v kombinaci dvou a více léčit. Dávkování a poměr jednotlivých složek se určuje individuálně v závislosti na reakci pacienta na léčbu. Celosvětově nejčastěji používaná AEP jsou znázorněna na obrázku 2.



Obr. 2 Nejčastěji využívaná antiepileptika u psů, upraveno podle Charalambous a kol., 2014

Problém u 25-30 % psů je, podobně jako u lidí, špatná, případně nulová reakce na léčbu. Zpravidla se projevuje neadekvátní odezvou na podání léčiv nebo úplnou rezistencí (Charalambous a kol., 2014)

3.4.6 Frekvence výskytu epilepsie u psů

U psů je výskyt epilepsie v rozmezí 0,5 - 5,7 % (Ekenstedt a kol., 2011). U plemene border kolie v současné době funguje online databáze epileptických jedinců (<http://bcepilepsy.weebly.com/>), kam mohou majitelé či chovatelé ohlásit jedince s epilepsií společně s doplňkovými informacemi o jakou formu epilepsie se jedná, kdy došlo k prvnímu projevu, případně jaká byla zvolena léčba. V ČR je aktuálně evidováno 48 border kolií s projevy epilepsie, z nichž u 17-ti byla diagnostikována idiopatická epilepsie (IE), dalších 7 jedinců s diagnostikovanou IE je evidováno po smrti. Vzhledem k počtu téměř 9 000 jedinců plemene border kolie v ČR se toto číslo může zdát zanedbatelné, riziko je však dáno projevem epilepsie v pozdějším věku u jedinců, kteří byli hojně použiti v chovu a tudíž je možné, že rozšířili geny pro epilepsii do několika dalších generací. Zápis do databáze je dobrovolný a čistě na uvážení majitelů, skutečné počty jedinců tak mohou být vyšší (Tvrdá, 2017).

3.5 Mnohočetná léková rezistence

MDR1 neboli *multi drug resistance* (mnohočetná léková rezistence) je gen pro kódování bílkovinných transportérů prezentovaných P-glykoproteinem (označován P-gp) jež patří do skupiny membránově vázaných ABC transportérů, proto je tento gen někdy označován jako *ABCB1* (Greyer a kol., 2005). Tyto transportéry se vyskytují v cytoplazmatických membránách buněk vedlejší populace (tzv. SP buňky – side population) a slouží k odstraňování látek z intracelulárního prostředí (Craig a kol. 2014).

3.5.1 P-glykoprotein

P-glykoprotein je efluxní transmembránová pumpa s nezastupitelnou rolí v absorpci, distribuci a eliminaci některých léčiv, stejně tak je obraným mechanismem před vstupem xenobiotik do organismu (Miller, 2010). Při nadměrné expresi genu kódující tento protein často dochází k rezistenci na podávaná léčiva (Pechandová a kol, 2006).

3.5.1.1 *Funkce membránových transportérů*

ABC proteiny patří mezi primární aktivní transportéry, které využívají ATP k průchodu kanálů i transportu molekul – transportují širokou škálu substrátů (aminokyseliny, peptidy, sacharidy, proteiny, ionty kovů, hydrofobní sloučeniny a metabolické produkty) přes extra- a intracelulární membránu (Dean a kol., 2001).

3.5.1.2 *Struktura membránových transportérů*

Každý ABC transportér obsahuje jeden pár ATP-vázaných domén – NBF (nucleotide binding folds). Tyto domény pak obsahují několik konzervovaných sekvenčních motivů, jež slouží pro správnou orientaci molekuly ATP a dvě sady transmembránových domén, které se skládají se šesti šroubovic (α -helix) procházejících membránou. ABC transportéry mohou být buď tzv. celé (full transporter) nebo poloviční (half transporter), kdy celý transportér obsahuje dvě NBF a dvě TM domény, přičemž NBF je lokalizována v cytoplazmě. Poloviční transportér obsahuje vždy jednu z domén a zpravidla je seskupen jako homodimer nebo heterodimer, čímž vytváří funkční transportér (Dean a kol, 2001).

3.5.1.3 *Funkce P-glykoproteinu*

P-glykoprotein se nachází v tkáních se sekretickou i exkretickou funkcí, a to v ledvinách (membrána lumenu proximálních tubulů), játrech (membrány hepatocytů), a ve střevě (kartáčový lem enterocytů), dále v kapilárách mozku a varlat, v hematopoetických kmenových buňkách a trofoblastech embrya. V těchto tkáních P-glykoprotein snižuje absorpci léků ze střeva a jejich vstup do centrálního nervového systému (CNS), podporuje jejich vylučování do žluče a moči (Greyer a kol., 2005). Rovněž má transportní funkci v oblasti endokrinního systému - ovlivňuje přestup hormonů nadledvinek kortizolu a kortikosteronu do mozku – pokud tato výměna není zajištěna, dochází k poruchám regulace zpětnovazebního mechanismu hypotalamus-hypofýza. Důsledkem toho může být snížená bazální hladina kortizolu a s tím související útlum produkce hormonů štítné žlázy (Labokin, 2017).

3.5.1.4 *Struktura P-glykoproteinu*

Struktura P-glykoproteinu připomíná válec o průměru 10 nm s výškou 8 nm, z poloviny uložený v buněčné membráně. Lze jej tedy přirovnat ke kanálu, který je otevřen do extracelulárního prostoru a uzavřen k cytoplazmě buňky (Aller, 2009).

V posledních letech se stává P-glykoprotein předmětem studia ve vztahu mechanismu rezistence nádorových buněk proti dávkám chemoterapeutik. Tento jev je označován jako mnohočetná léková rezistence (multiple drug resistance-MDR). Mutací v genu *MDR1* dochází k zablokování syntetizování P-gp, čímž dochází k hromadění léčiv v mozku a následným komplikacím (Lehne, 2000).

Pro P-gp je typická interakce s mnohými látkami a to jak chemicky tak funkčně odlišnými. Může se jednat o látky přírodní či jejich syntetické deriváty. Patří sem xenobiotika, léčiva různých farmakoterapeutických skupin, endogenní hormony a další látky, pro přehlednost byly lékové substráty P-gp přepsány do tabulky 2 (Dowling, 2006).

Tab. 2 Seznam substrátů P-gp, převzato a upraveno podle Dowling, 2006

Chemoterapeutika	Srdeční léky
Doxorubicin	Digoxin
Mitoxantrone	Diltiazem
Paclitaxel	Losartan

Vinblastine	Quinidine
Vincristine	Verapamil
Antimicrobials/Antifungals	Steroids
Doxycycline	Aldosterone
Erythromycin	Cortisol
Itraconazole	Dexamethasone
Ketoconazole	Estradiol
Rifampin	Hydrocortisone
Tetracycline	Methylprednisolone
Immunosuppressants	Miscellaneous
Cyclosporin A	Amitriptyline
Tacrolimus	Butorphanol
Antiemetics	Ivermectin
Domperidone	Morphine
Ondansetron	Moxidectin
H1-antihistamines	Phenothiazines
Fexofenadine	Phenytoin
Terfenadine	Selamectin
H2-antihistamines	
Cimetidine	
Ranitidine	

3.6 Gen *MDR1*

P-glykoprotein byl poprvé izolován v roce 1976 z ovariálních buněk křečka čínské (*Cricetulus griseus*), který jeví známky rezistence na chemoterapeutika. Tento protein byl pak identifikován jako hlavní součást funkčního MDR proteinu buněk (Greyer a kol., 2005).

V 90. letech byl náhodou zjištěn vztah mezi knockoutovaným genem *MDR1* u myši a jedním ze substrátů P-gp - Ivermectinem. Byly drženy dvě skupiny myši, z nichž jedněm byl uměle vyřazen gen *MDR1*, druhé byly ponechány beze změny. Ani jedna ze skupin nejevila známky zdravotních potíží, anatomických abnormalit či problémů s plodností, z čehož bylo vyvozeno, že P-gp je pro organismus postradatelný. Obě skupiny však byly napadeny parazity, proti nimž byl použit ivermectin ve spreji; druhý den skupina s neupraveným genotypem nevykazovala žádné známky potíží, avšak téměř všechny myši s knockoutovaným genem byly nalezeny mrtvé. Po provedené pitvě byla zjištěna koncentrace ivermectinu v mozku stokrát vyšší než u myši z druhé skupiny (Dowling, 2006).

V roce 1982 byl u kolinek poprvé popsán „fenomén Ivermectinové toxicity“ (Preston, 1983), nicméně až veterinární lékařka Katrina Mealey z Washingtonské státní univerzity rozpoznala podobné znaky, které vykazovaly myši, u kolinek a dalších plemen ovčáckých psů. V roce 2001 pak identifikovala kauzální mutaci – delecii 4 párů bází, která způsobuje posunutí čtecího rámce, čímž dojde k vytvoření stop kodonu a tím k předčasnému ukončení syntézy P-gp (Mealey a kol., 2001).

3.6.1 *MDR1* – delece

Gen *MDR1* je lokalizován na 14. chromozomu a skládá se z 28 exonů. Na exonu 4 je lokalizována mutace nt230 (del4), rovněž označována jako *MDR1-1A*. Takto mutovaný gen postrádá 4 páry bází (Geyer a kol., 2005). Tato mutace byla detekována u plemen kolie dlouhosrstá i krátkosrstá, sheltie, australský ovčák, border kolie, bearded kolie, maďarský ohař viszla, labradorský retrívr, zlatý retrívr, německý ovčák, husky, bobtail, dlouhosrstý whipet, bílý švýcarský ovčák a některých kříženců. U jedinců postižených touto mutací dochází k posunutí čtecího rámce, který způsobí vytvoření stop kodonu a tím předčasnému ukončení syntézy P-glykoproteinu, proto je nutné při klinické diagnostice léků vyloučit léčiva ze skupiny substrátů P-gp (viz Tabulka 2) (Baars a kol., 2008).

Delece má jednoduchou autozomálně recesivní dědičnost, postižení se tedy projeví jen u recesivních homozygotů (označení (-/-, n/n, Affected), jednotlivé vztahy jsou podrobněji popsány v Tabulce 1.

Frekvence výskytu se poměrně výrazně liší v závislosti na jednotlivých zemích světa a rovněž na plemenné příslušnosti. Například v Německu prokázala analýza výskyt mutované alely (počítáno s heterozygotním a recesivně homozygotním typem) u 81 % kolií a 75 % vipetů. U šeltií byla frekvence výskytu 51 %, u miniaturních australských ovčáků 46 % a u australských ovčáků 38 %. U bílých švýcarských ovčáků a border kolií se vyskytovala výjimečně (Gramer a kol, 2011).

Jiná studie, provedená v USA, ukazuje podobné rozložení, a to konkrétně 22,6 % dominantních homozygotů, 42 % heterozygotů a 35,4 % recesivních homozygotů v testované populaci (Mealey a kol., 2002).

Poněkud odlišné jsou výsledky analýzy pocházející z Austrálie, kde 12 % populace bylo definováno jako dominantní homozygoti, 64 % jako heterozygoti a 24 % jako recesivní homozygoti. Z toho lze vyvodit významnou odlišnost ve výsledcích z USA a Austrálie, např. frekvence mutované alely u plemene australský ovčák v USA (testováno 178 jedinců) byla 17 %, zatímco v Austrálii 69 %. Podobné rozdíly vykazují analýzy u plemene šeltie, v USA (testováno 190 jedinců) byla frekvence výskytu 8,4 %, zatímco v Austrálii 43 %. Tato zjištění vedla ke změně léčebných metod u ovčáckých psů v Austrálii (Mealey a kol., 2005).

3.6.2 MDR1 – inzerce

V roce 2010 byla objevena nová inzertní mutace u skupiny border kolií, které vykazovali přecitlivělost na ivermectin, ale nebyla u nich prokázána přítomnost delece. Kódující sekvence genu *MDR1* border kolií byla porovnána se sekvencí získanou od plemene bígl, bylo zjištěno 8 rozdílných SNP (Single Nucleotide Polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus), jež byly u všech zástupců plemene border kolie zařazených do testu, nikoli však v sekvenci plemene bígl. Dále byla objevena inzerce 3 nukleotidů (AAT) mezi 72. a 73. nukleotidem *ABCBI* kódující sekvence, která se vyskytovala pouze u border kolií přecitlivělých na ivermectin. Z toho lze usuzovat, že sekvence v genu *MDR1* mohou být plemenně odlišné, autoři článku proto doporučují kompletní sekvenaci u všech plemen

zatížených touto mutací (Han a kol., 2010). Další testování této mutace však nebylo v literatuře nalezeno.

3.6.3 *MDRI* – jednonukleotidová substituce

Další mutace byla detekována u border kolií, jež vykazovali rezistenci na fenobarbital, během léčby epilepsie. U těchto jedinců byla objevena jednonukleotidová substituce guaninu na místo thyminu v intronu 1 v blízkosti 5' konce genu *MDRI/ABCB1* (c.-6-180T>G), kde jsou lokalizovány nejdůležitější prvky promotoru. Jedinci nesoucí tuto mutaci jeví známky rezistence či citlivosti na podávaná léčiva obsahující fenobarbital (Alves a kol., 2011).

Ač byla u tohoto SNP předpokládána autozomálně recesivní dědičnost - podobně jako u delece, Alves a kol. (2011) uvádějí, že v jimi testované populaci se projeví příznaky senzitivity na fenobarbital i u jedinců s genotypem T/G z čehož lze usuzovat spíše autozomálně dominantní dědičnost. Autoři rovněž uvádějí, že projev citlivosti na fenobarbital se ukázal i u 3 jedinců s genotypem T/T, což je pravděpodobně způsobené umístěním mutace v regulační oblasti. Rovněž je však možné, že tuto rezistenci ovlivňují i jiné mutace, nebo se jedná o ne zcela penetrující polymorfismus.

Frekvence výskytu mutantní alely je překvapivě vysoká, např. Mizukami a kol. (2013) uvádí, že v jimi testované populaci 472 border kolií bylo 60 % dominantních homozygotů, 30,3 % heterozygotů a 9,7 % recesivních homozygotů, z čehož vyplívá absolutní frekvence mutantní alely 24,9 %. Oproti tomu např. delece nt230 (del4) má frekvenci výskytu v populaci border kolií extrémně nízkou, zpravidla do 1 %.

Právě vysoká frekvence výskytu by mohla dát odpověď na velmi častou rezistenci epileptických jedinců na léčbu fenobarbitalem, která je uváděna až 30 % (Charalambous a kol., 2014).

3.7 Metody detekce polymorfismu c.-6-180T>G v genu *MDR1*

Metody detekce slouží k rozlišení mutantní alely od alely zdravé (wild type) a tím zjištění genotypu jedince.

Ze vzorků chlupů či krve je izolována DNA pomocí vhodného izolačního kitu. DNA je následně amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) za použití nasyntetizovaných primerů a poté štěpena konkrétním enzymem (polymorfismus délky restrikčních fragmentů – RFLP). Výsledky jsou vyhodnoceny na základě gelové elektroforézy.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Sledovaná populace

Do sledované populace bylo zařazeno 82 jedinců plemene border kolie, z toho 55 vzorků bylo použito z archivu Akademie věd v Liběchově, s laskavým svolením prof., Ing. Antonína Stratila, DrSc., v rámci magisterské praxe. Ostatní vzorky byly zaslány majiteli či odebrány na akcích pořádaných Klubem border kolií České republiky. Celkem se jednalo o 29 psů (samců) a 48 fen.

4.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla u 58 vzorků provedena z krve za využití GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprekit (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, USA). 24 vzorků bylo izolováno z chlupových cibulek za využití tkáňového kitu Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) GB100/GB300. Po izolaci byla ověřena koncentrace izolované DNA na spektrofotometru NanoDrop 2000 od společnosti Thermo Scientific, koncentrace byla měřena při absorbanci 260/280, která udává čistotu DNA. Kontrola kvality izolované DNA byla provedena pomocí agarózové elektroforézy na 2% agarózovém gelu s napětím 130V po dobu 15 minut.

Izolační soupravy Geneaid jsou založeny na principu absorpce DNA na silikátovou membránu. Izolovaný materiál je nejprve lyzován pomocí lyzačního pufru a enzymu proteinázy K. Později se buněčný lyzát přenesse na izolační kolonu. DNA adhezuje na silikát za přítomnosti chaotropních solí. Kolona je opakovaně promyta pufrů a DNA je následně uvolněna ze silikátové membrány pomocí elučního pufru.

4.2.1 Postup izolace DNA z krve

Krevní vzorky byly izolovány pomocí specializovaného GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kitu.

K 200 μ l krve v 1,5 ml zkumavce bylo přidáno 200 μ l LS-C pufru a 20 μ l proteinázy K, vše vortexováno po dobu 15 sekund, následováno inkubací 15 minut při teplotě 55 °C. Do připravené kolony bylo napipetováno 500 μ l CPS pufru a následně centrifugováno při 13 000 rpm 1 minutu, po vyjmutí byl vylit odpad z centrifugační zkumavky a kolona vrácena zpět. K lyzátu bylo přidáno 200 μ l

ethanolu a vortexováno 10 sekund. Takto získaná směs byla přepipetována do připravené kolony a centrifugována při 8200 rpm 1 minutu. Kolona byla vyjmuta z centrifugy a odpad vylit, kolona vrácena zpět, do ní bylo napipetováno 500 µl WS pufru, opět proběhla centrifugace při 8200 rpm 1 minutu. Předchozí krok byl zopakován. Po vyjmutí a vylití odpadu ze sběrné zkumavky byla kolona vrácena a centrifugována při 13 000 rpm 1 minutu, tím došlo k vysušení. Sběrná zkumavka byla odstraněna a kolona umístěna do nové 2 ml zkumavky, do kolony bylo napipetováno 100 µl elučního pufru a inkubováno při pokojové teplotě po dobu 5 minut, poté centrifugováno při 8200 rpm 1 minutu. V tomto kroku byla DNA uvolněna do zkumavky, kolona odstraněna a vzorek byl uložen k dalším analýzám.

4.2.2 Postup izolace DNA z chlupových cibulek

K izolaci DNA z chlupových cibulek byl použit Geneaid Genomic DNA Mini Kit, pro tkáňové kultury.

Do 1,5 ml eppendorfovy zkumavky bylo nastříháno alespoň 20 chlupových cibulek, přičemž cibulky by měly být umístěny na dně zkumavky, k nim bylo přidáno 200 µl GT pufru a 20 µl proteinázy K, vzorky byly vloženy do termálního bloku zahřátého na 60 °C a ponechány zde jednu hodinu. Poté bylo přidáno 200 µl GBT pufru a vzorky vortexovány, aby došlo k rovnoměrnému rozložení chlupů v roztoku, vzorky byly opět uloženy do termálního bloku a ponechány 20 minut. K vzorkům bylo přidáno 200 µl ethanolu a opět vortexováno. Mezitím byly připraveny centrifugační zkumavky do nichž byly vloženy kolony, které slouží k zachycení DNA na křemičité membráně. Do kolon byl přepipetován celý obsah tekutin z předchozích kroků a centrifugováno při 13 000 rpm 1,5 minuty. Obsah centrifugační kolony byl vylit a kolona umístěna zpět, bylo přidáno 400 µl W1 pufru a centrifugováno 13 000 rpm 1 minutu. Opět byl slit odpad a kolona vložena zpět do centrifugační zkumavky, bylo přidáno 600 µl promývacího pufru (WS) a centrifugováno 13 000 rpm 1 minutu. Odpad byl slit a vzorky byly centrifugovány bez přidání pufru při 13 000 rpm 3 minuty. Centrifugační zkumavka byla odstraněna a kolona umístěna do čistě 1,5 ml eppendorfovy zkumavky. Bylo přidáno 100 µl elučního pufru, předem vytemperovaného na 60 °C a vzorky inkubovány při pokojové teplotě 5 minut. Poté centrifugovány při 13 000 rpm 1 minutu. Izolovaná DNA byla uložena pro další analýzy.

4.3 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru *NanoDrop 2000* od společnosti Thermo Scientific, který měří absorbanci světelného záření o vlnové délce 260 nm. Čistota DNA je vyjádřena podílem absorbancí záření i 260 a 280 nm. Optimální hodnoty A260/A280 jsou 1,8-2,0; jestliže jsou naměřené hodnoty v tomto rozpětí, jedná se o čistou DNA. Koncentrace DNA je udávána v ng/μl, pozadí pro měření byl použit eluční pufr z kitu. Koncentrace byla měřena z objemu 2 μl.

4.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerase Chain Reaction – PCR slouží k získání požadovaného a specifického úseku genomové DNA bez předchozího klonování. Princip je založen na replikaci nukleových kyselin a cyklicky se opakující enzymové syntéze nových řetězců daných úseků DNA ve směru 5' → 3' za využití DNA polymerázy. Konkrétní část sekvence je vymezena nasednutím dvou primerů (přímý a zpětný), které se vážou na protilehlé konce úseku DNA tak, že 3' konce směřují proti sobě. Po přidání DNA polymeráz a volných nukleotidů probíhá syntéza nových vláken od obou matricových řetězců.

4.4.1 Design primerů

Primery jsou navrhovány za využití programu *OLIGO v4.0* či podobného programu se stejným účelem. Při navrhování je třeba dodržet obecné zásady:

1. Délka primeru – optimální délka primeru je v rozmezí 18-25 bp
2. Teplota tání dvouřetězce primer-teplát (T_m) – optimální teplota je kolem 50 °C, oba primery by měly mít podobné teploty – v ideálním případě rozdíl do 1 °C
3. Teplota annealingu (T_a) – vyžaduje se rozpětí 55 – 75 °C, nejčastěji však dosahuje hodnot 55 – 60 °C
4. Specifita primeru – je žádoucí co největší komplementarita na 3' konci, sekvence by neměla obsahovat repetitivní sekvence – riziko nasednutí primeru na více místech a vznik nespecifit
5. Obsah G+C bází – optimální zastoupení 55-56 %
6. Konce primeru – začátek i konec primeru by měl obsahovat 1 -2 purinové báze (A, G), 3' konec by měl končit bází G nebo C, což dodá primeru pevnější vazbu k templátu.

4.4.1.1 Použité primery

Sekvence požadovaného genu byla společně s primery použita dle Mizukami a kol. (2013) a následně ověřena v internetové databázi GENE dostupné ze stránek Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI, National Centre for Biotechnology Information).

Tab. 3 Seznam použitých primerů

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Sekvence primeru 5'→3'</i>	<i>Velikost (bp)</i>	<i>GC (%)</i>	<i>Velikost PCR (bp)</i>
<i>MDR1</i>	MDR1; T/G, F	GCA GTG GGG TGA GAA CTA GA	20	55	416
<i>MDR1</i>	MDR1; T/G, R	CGC AAG CCA TGT AAG GTA TG	20	50	416

4.4.2 Reakční směs pro PCR

Reakční PCR směs byla namíchána do zkumavek o objemu 0,2 ml. Pro urychlení postupu byl použit komerčně dodávaný PPP mix, který obsahuje PCR pufr, směs nukleotidů, Mg²⁺ ionty, polymerázu a nanášecí marker. Další výhodou mixu je, že před nanášením vzorků na gel není potřeba každý vzorek smíchat s nanášecím markerem.

Tab. 4 Složení reakční směsi PCR

<i>Celkem</i>	<i>PPP mix</i>	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<i>DNA</i>	<i>dH₂O</i>
15 μl	6 μl	0,3 μl	0,3 μl	2 μl	6,4 μl

4.4.1 Teplotní profil

Pro testování byl použit teplotní profil využitý Mizukami a kol. (2013). Do termálního cyklu byl zadán následující program:

1. *Úvodní denaturace* při teplotě **95 °C** po dobu **3 minuty** – došlo k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a vzniku ssDNA
2. *Denaturace* při **95 °C** po dobu **30 sekund** – doba se odvíjí na základě délky amplifikovaného úseku a obsahu párů GC
3. *Annealing* **60 °C** po dobu **30 sekund** – primery nasedají na specifická místa DNA, teplota se odvíjí podle teploty tání primerů

4. *Elongace* **72 °C** po dobu **45 sekund** – DNA je syntetizováno od 5' konce primeru
5. *Finální extenze* **72 °C** po dobu **7 minut** – dochází ke konečnému dosyntetizování řetězců
6. *Chlazení* **4 °C** do vypnutí cyklu.

Krok 2-4 je **45x** opakován.

Výsledek byl následně kontrolován na 3% agarózovém gelu za použití elektroforézy.

4.5 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) slouží ke štěpení sekvence DNA v místě konkrétního pořadí nukleotidů. Pro potřeby této diplomové práce byl využit enzym *MboI*, jehož štěpící aktivita je v sekvenci GATC zatímco sekvenci GAGC neštěpí.

Do štěpící reakční směsi bylo namícháno 3,4 µl vody, 1,5 µl pufru, 0,1 µl enzymu a 10 µl vzorku z PCR reakce. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 12 hodin. Výsledek byl vyhodnocen po provedení agarózové elektroforézy na 3 % gelu.

4.6 Gelová agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza je založena na prostupnosti molekul agarózovým gelem. Molekuly DNA jsou na gelu separovány na základě velikosti (délce sekvence, počtu párů bází), rychlost separace je přitom závislá na velikosti napětí, které je v elektrolytu mezi dvěma elektrodami. Molekuly DNA putují směrem k anodě, protože DNA je záporně nabitá, díky negativně nabitým kyslíkovým atomům na fosfátové skupině. Z takto separovaných fragmentů DNA se pořizuje fotodokumentace pod UV zářivkami.

Tato metoda byla použita pro ověření úspěšnosti izolace DNA – 2% agarózový gel, jež vznikne smícháním 1,2 g sacharózy se 60 ml TBE pufru, je následně povařen a jsou do něj přidány 2 µl EtBr (ethidium bromid), který se naváže na DNA a slouží k emisi světla při ozáření UV světlem. Takto vzniklý roztok je následně vylit do vaničky s předem umístěnými hřebínky a po zatuhnutí umístěn do elektroforetické vany s nanášecím pufrům. Po vyjmutí hřebínek jsou do jamek nanášeny jednotlivé

vzorky, obarvené 2 μ l sacharózy a hmotnostní marker, pro porovnání velikosti sekvencí. Po izolaci jsou molekuly ještě relativně velké, proto je používán gel s nižší koncentrací.

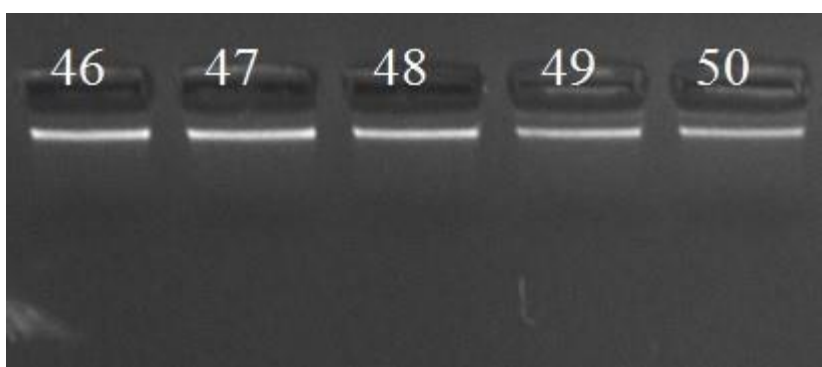
Podobně byla gelová elektroforéza použita i pro ověření úspěšnosti PCR, zde však byl použit 3% agarózový gel – molekuly jsou již menší, tudíž je potřeba hustější síť vláken pro pomalejší postup. Gel je připraven smícháním 1,8 g sacharózy a 60 ml TBE pufru. Jelikož při PCR byl použit PPP mix, není třeba jednotlivé vzorky před umístěním do jamky gelu obarvovat.

Jak již bylo zmíněno výše, elfo byla využita i pro vyhodnocení RFLP. Zde již sloužila pro detekci jednotlivých alel či alelických párů, podle zobrazení jednotlivých fragmentů viditelných po vyfotografování gelu. Pro tuto potřebu byl použit 3% gel.

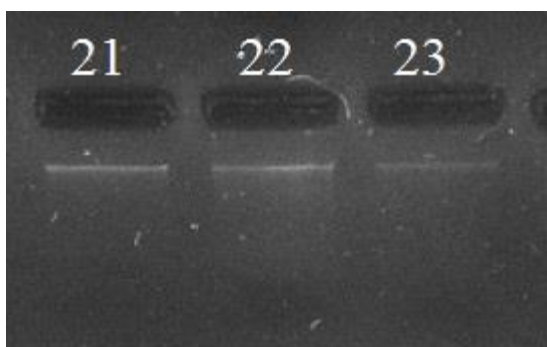
5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA z tkání

Izolovaná DNA z tkání (krev či chlupové cibulky) byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 2% gelu s vizualizací fragmentu pomocí EtBr a UV záření. 2% gel byl zvolen proto, že fragmenty izolované DNA jsou poměrně dlouhé a v 3% gelu by se obtížně separovaly. Pro potřeby kontroly úspěšnosti izolace stačí průběh elektroforézy po dobu 10 minut.



Obr. 3 Foto gelu - DNA izolovaná z krve, 2% agarózový gel vizualizovaný EtBr



Obr. 4 Foto gelu - DNA izolovaná z chlupových cibulek, 2% agarózový gel vizualizovaný EtBr

Z přiložených fotografií gelu je patrné, že izolace DNA z krve měly lepší úspěšnost – fragmenty na gelu svítí silněji. To je pravděpodobně způsobené především nedostatečným počtem chlupových cibulek při zasílání vzorků majiteli, ve většině případů obsahoval vzorek přibližně polovinu z požadovaného počtu 20 cibulek a zpravidla obsahoval převážně chlupy podsady bez kořínků.

5.2 Měření koncentrace DNA

Tab. 5 Naměřené koncentrace jednotlivých vzorků a jejich čistota

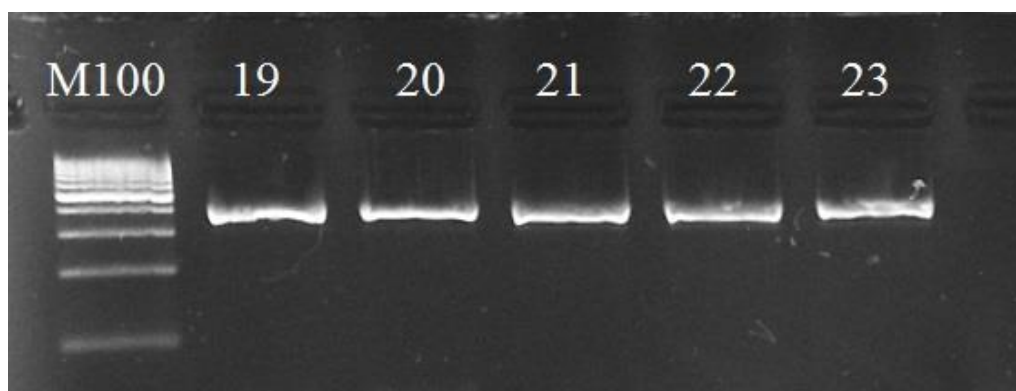
Vzorek	Koncentrace DNA	A260	A280	A260/280
46	22,75 ng/μl	0,4555	0,236	1,93
47	25,3 ng/μl	0,5055	0,2895	1,745
48	13,7 ng/μl	0,274	0,137	2,01
49	19,35 ng/μl	0,387	0,1955	1,975
50	39,15 ng/μl	0,783	0,41	1,91
51	28,45 ng/μl	0,369	0,184	2,005
52	1,3 ng/μl	0,026	0,003	0,065
53	8,85 ng/μl	0,178	0,0765	2,33
54	36,15 ng/μl	0,7225	0,4125	1,75
55	25,95 ng/μl	0,5195	0,2735	1,895
56	24,7 ng/μl	0,94	0,248	1,995
57	23 ng/μl	0,4605	0,24	1,915
58	15,35 ng/μl	0,308	0,1635	1,88
59	16,5 ng/μl	0,3295	0,164	2,01
60	48,9 ng/μl	0,977	0,5555	1,76
61	2,85 ng/μl	0,058	0,026	2,23
62	48,25 ng/μl	0,9655	0,4675	2,065
63	142,6 ng/μl	2,852	1,386	2,06
19	4,1 ng/μl	0,081	0,028	2,92
20	3,15 ng/μl	0,0635	0,0205	3,235
21	4,65 ng/μl	0,093	0,046	2,01
22	10,3 ng/μl	0,2065	0,1005	2,06
23	6,35 ng/μl	0,1265	0,059	2,145
Průměr	24,42 ng/μl	0,488	0,249	1,99

Měření bylo provedeno dvakrát a výsledky průměrovány, pro získání přesnějších hodnot.

Vzorky 46-63 byly izolovány z krve, jejich koncentrace je podstatně vyšší, což je opět způsobeno nedostatkem materiálu pro izolaci DNA z chlupových cibulek (vzorky 19-23). Čistota DNA je však ve většině případů v optimálním rozmezí, pouze vzorek 52 měl velmi nízké hodnoty jak koncentrace DNA, tak čistoty DNA, důvodem je pravděpodobně nesprávný postup během izolace.

5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jelikož byly použity primery i teplotní profil dle publikovaných článků, nebyla prováděna optimalizace PCR, pouze byl proveden pilotní screening pro ověření funkčnosti metody.

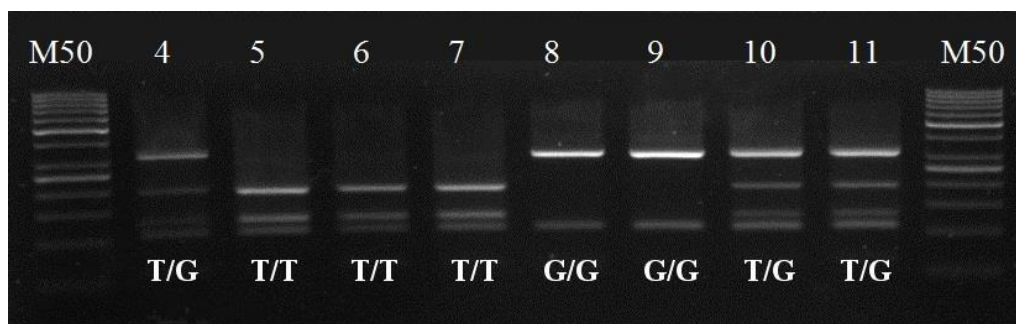


Obr. 5 Foto gelu - PCR produkt, 3% agarózový gel vizualizovaný EtBr

Sekvence získané izolací DNA byly amplifikovány pomocí přímých a zpětných primerů, čímž byly získány fragmenty o délce 416 bp. Na fotografii jsou vzorky izolované z chlupových cibulek; přestože koncentrace DNA byla nižší (viz tabulka 4), PCR reakce byla úspěšná. Marker 100 byl použit pro ověření velikosti fragmentů.

5.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

PCR produkty byly štěpeny enzymem *MboI* při teplotě 37 °C podobu 12 hodin, což je dostatečně dlouhá doba pro naštěpení všech PCR produktů.



Obr. 6 Foto gelu – RFLP, 3% agarózový gel vizualizovaný EtBr

Z fotografie je patrné, že restrikce byla úspěšná a je možné určit genotypy jednotlivých psů.

PCR produkt má dvě štěpná místa pro daný enzym [\downarrow GATC]. Jedno z nich je přítomné u všech genotypů, a nemá spojitost s hledanou cílovou sekvencí, druhé štěpné místo je pro hledanou mutaci c.-6-180T>G. U recesivního homozygota (G/G) se nachází jen jedno štěpné místo, proto je produkt štěpen na dva fragmenty – 103 a 313 bp, u heterozygota (T/G) jsou 3 štěpná místa, produkt byl proto štěpen na 4 fragmenty – 102, 122, 191 a 313 bp, a u dominantního homozygota (T/T) jsou 2 štěpná místa, produkt byl štěpen na 3 fragmenty – 103, 122 a 191 bp.

Pro lepší odlišení menších fragmentů (103 a 122 bp) byl použit marker 50 a čas elektroforézy byl 45 minut.

Na fotografii jsou zobrazeny genotypy jedinců z jedné rodiny – vzorek č. 1 je matka (T/G), vzorek č. 8 (T/G) otec vrhu. Jelikož rodiče nesou obě alely, dle předpokladu je mezi potomky zastoupení všech genotypů.

5.5 Výpočet frekvence alel a genotypů

Celkem bylo testováno 82 jedinců, u 5 vzorků nebyla úspěšná izolace DNA.

Z počtu 77 vzorků bylo 39 dominantních homozygotů (T/T), 27 heterozygotů (T/G) a 11 recesivních homozygotů (G/G), z toho lze vypočítat frekvenci genotypů a alel podle vzorců:

Tab. 6 Vzorec pro výpočet frekvence genotypů

Genotyp	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
AA	D	$d=D/N$
Aa	H	$h=H/N$
Aa	R	$r=R/N$
Celkem	$D+H+R=N$	$d+h+r=1$

Tab. 7 Vzorec pro výpočet frekvence alel

Alely	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
A	$P=2D+H$	$p=d+\frac{1}{2}h$
A	$Q=2R+H$	$q=r+\frac{1}{2}h$
Celkem	$P+Q=2N$	$p+q=1$

Do těchto vzorců byly dosazeny počty zjištěných genotypů s následujícími výsledky:

Tab. 8 Frekvence genotypů

Genotyp	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
AA	39	0,51
Aa	27	0,35
Aa	11	0,14
Celkem	77	1

Tab. 9 Frekvence alel

Alely	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
A	105	0,68
A	49	0,32
Celkem	154	$p+q=1$

6 DISKUZE

Pro mutaci v genu *MDR1* c.-6-180T>G byla napsána pilotní studie (Alves a kol., 2011), ve které autoři testovali populaci border kolií, jež projeví rezistenci k fenobarbitalu, vzorová populace tudíž neměla náhodný výběr a proto nebyla počítána frekvence výskytu mutantní alely. Druhou práci zabývající se tímto tématem publikovali Mizukami a kol. (2013), kteří testovali populaci 472 border kolií. Jimi zjištěné výsledky uvádějí frekvenci mutantní alely 24,9 %, což je mnohonásobně vyšší frekvence než např. u hojně testované delece, kdy frekvence výskytu u border kolií je celosvětově pod 1 %. Tyto výsledky by odpovídaly zjištění, že 25-30 % border kolií je rezistentních na léčbu epilepsie (Charalambous a kol., 2014). Lze tedy předpokládat souvislost mezi touto mutací a špatnou či nulovou odezvou na zvolenou léčbu, jelikož zpravidla je primárním přípravkem předepisován právě fenobarbital. Nicméně již Alves a kol. (2011) uvádějí, že rezistence na fenobarbital se projevila i u 3 jedinců s genotypem T/T, kteří by měli mít adekvátní odezvu na podaná léčiva. To může být způsobeno umístěním mutace v regulační oblasti genu, nebo kontrolou další mutace, která prozatím nebyla identifikována. Další práce na toto téma prozatím nebyly publikovány, výsledky lze proto srovnávat pouze s výzkumem provedeným v Japonsku (Mizukami a kol., 2013). Do budoucna by bylo přínosné zvětšit testovanou populaci a to především o fenobarbital rezistentní jedince, případně jedince nereagující na léčbu, což by mělo vést k prohloubení znalostí o vztahu mezi danou mutací a rezistencí na fenobarbital.

V ČR funguje databáze epileptických border kolií (<http://epilepsybc.weebly.com/>), kde je v současné době evidováno 28 jedinců, kteří byli uspani, případně zemřeli v epileptickém záchvatu, většina z nich právě z důvodu neadekvátní odezvy na léčbu, která mohla být způsobena touto mutací.

Pro vznik této práce bylo testováno 82 jedinců plemene border kolie, u 77 z nich byl zjištěn genotyp (u 5 vzorků nebyla úspěšná izolace DNA), celkem bylo v populaci 39 dominantních homozygotů (T/T), 27 heterozygotů (T/G) a 11 recesivních homozygotů (G/G). Frekvence výskytu mutantní alely byla 32 % což je srovnatelné se zjištěním Mizukami a kol. (2013). Při testování větší populace lze předpokládat odlišné výsledky.

Ač se v posledních několika letech zvyšuje počet psů postižených epilepsií, nebyl součástí vzorové populace ani jeden jedinec s epilepsií, proto nelze

jednoznačně určit vztah mezi genotypem a fenotypem popsany autory piotní studie. Majitelé před poskytnutím vzorků pro testování předávali dotazník zdravotního stavu jedince (viz Příloha), který měl napomoci detailnějšímu popisu jedince, především ve vztahu k epilepsii či citlivosti na léčiva. Ani v tomto případě nebyl zařazen žádný jedinec s historickou anamnézou obsahující takovou příhodu, což je ale pravděpodobně způsobené nulovou frekvencí výskytu delece v populaci border kolíí v ČR. Studium rodokmenů jednotlivých psů zařazených do studie neodhalilo žádné přímě pokrevní vazby na psy z databáze epilepsie, i přesto je možné, že se v budoucnu vyskytnou u některých jedinců epileptické záchvaty a v takovém případě si budou majitelé psů s genotypem G/G dopředu vědomi rizika použití přípravků obsahujících fenobarbital a mohou se takovému použití vyvarovat. Podobně bylo doporučeno majitelům psů s genotypem T/G preferovat v takovém případě medikamenty obsahující jiné účinné složky. Tato opatření by měla významně uspišit proces hledání vhodného medikamentu a optimální dávky, což by mělo urychlit proces potlačení projevů epilepsie na minimum a tím snížit riziko úmrtí psa následkem záchvatu typu *grand mal*.

Obecně lze říci, že zájem majitelů o testování byl poněkud nižší, a to především z důvodu nedostatečného povědomí o genetickém pozadí nemocí postihujících plemeno. Z důvodu anonymity nemohou být výsledky zveřejněny se jmény jedinců, proto je v příloze práce přiložen alespoň seznam kompletních výsledků testované populace.

7 ZÁVĚR

Na základě odborných článků byly sepsány informace o epilepsii u psů, P-glykoproteinu a membránových proteinech obecně, genu *MDR1* a jeho vztahu k rezistenci na léčiva. Popsány byly jednotlivé mutace, které byly prozatím objeveny v genu *MDR1* u psů se zaměřením na mutaci c.-6-180T>G způsobující rezistenci na fenobarbital.

Cílem práce bylo zjištění genotypů u vzorové populace psů za využití molekulárně genetických metod – izolace DNA, PCR a RFLP. Celkem bylo v populaci zjištěno 39 dominantních homozygotů, 27 heterozygotů a 11 recesivních homozygotů, výsledky však mohou být zkresleny menším souborem psů zařazených do analýzy. Zjištěná frekvence mutantní alely (32 %) je relativně shodná s informacemi z předchozí studie pocházející z Japonska (24,9 %), další práce pro srovnání frekvencí nebyly prozatím publikovány ani v ČR, ani v zahraničí.

8 POUŽITÁ LITERATURA

ALLER S. G., YU J., WARS A., WENG Y., CHITTABOINA S., ZHUO R., a kol., 2009: *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding* [online]. Science. 323(5922), s. 1718-1722. doi: 10.1126/science.1168750. Dostupné z: <http://science.sciencemag.org/content/323/5922/1718>

ALVES L., HÜLSMEYER V., JAGGY A., FISCHER A., LEEB T., DRÖGEMÜLLER M., 2011: *Polymorphisms in the ABCB1 Gene in Phenobarbital Responsive and Resistant Idiopathic Epileptic Border Collies* [online]. Journal of Veterinary Internal Medicine. 25(3), s. 484-489 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2011.0718.x. ISSN 08916640. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.2011.0718.x>

BAARS C., LEEB T., VON KLOPMANN T., TIPOLD A., POTSCSKA H., 2008: *Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs* [online]. The Veterinary Journal. 177(3), s. 394-397 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.05.020. ISSN 10900233. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023307001992>

BERENDT M., FARQUHAR R. G., MANDIGERS P. J. J., 2015: *International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals* [online]. BMC Veterinary Research. 11(1), - [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1186/s12917-015-0461-2. ISSN 1746-6148. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/182>

CRAIG N. L., GREEN R., GREIDER C., STORZ G., WOLBERGW R. C., COHEN-FIX O., 2014: *Molecular biology: principles of genome function*. Oxford University Press, Second edition. 944 s. ISBN 9780198705970.

DE RISIO L., BHATTI S., MUÑANA K., PENDERIS J., STEIN V., TIPOLD A., a kol., 2015: *International veterinary epilepsy task force consensus proposal: diagnostic approach to epilepsy in dogs* [online]. BMC Veterinary Research. 11(1), - [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1186/s12917-015-0462-1. ISSN 1746-6148. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/148>

DEAN M., HAMON Y., CHIMINI G., 2001: *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. Journal of Lipid Research, Volume 42, s. 1007-1017

DOSTÁL J., 2007: *Genetika a šlechtění plemen psů*. České Budějovice: Dona. 261 s. ISBN 9788073221041.

DOWLING P., 2006: *Pharmacogenetics: It's not just about ivermectin in collies*. Can Vet J. vol 47, s. 1165-1168.

EKENSTEDT K. J., PATTERSON E. E., MINOR K. M., MICKELSON J. R., 2011: *Candidate genes for idiopathic epilepsy in four dog breeds* [online]. BMC Genetics. **12**(1), 38- [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1186/1471-2156-12-38. ISSN 1471-2156. Dostupné z: <http://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-12-38>

Fédération Cynologique Internationale (FCI): *Breeders nomenclature* [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www.fci.be/en/nomenclature/>

FOGLE B., 2012: *Velká encyklopedie psů: kompletní průvodce světem psů*. Praha: Slovart. 415 s. ISBN 978-80-7391-481-3.

FREEDMAN A. H., GRONAU I., SCHWEIZER R. M., ORTEGA-DEL VECCHYO D., HAN E., a kol., 2014: *Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs*. PLoS Genet, 10(1), 41s, e1004016. doi:10.1371/journal.pgen.1004016

FREEDMAN A. H., SCHWEIZER R. M., GRONAU I., HAN E., VECCHYO D. O., SILVA P. M., a kol., 2013: *Genome Sequencing Highlights Genes Under Selection and the Dynamic Early History of Dogs*. Plos Genetics.

GEYER J., DÖRING B., GODOY J. R., LEIDOLF R., MORITZ A., PETZINGER E., 2005: *Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany* [online]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. **28**(6), s. 545-551 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2005.00692.x. ISSN 0140-7783. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2885.2005.00692.x>.

GRAMER I., LEIDOLF R., DÖRING B., KLINTZSCH S., KRÄMER E., YALCIN E., PETZINGER E., GEYER J., 2011: *Breed distribution of the*

nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. The Veterinary Journal. 189(1), s. 67-71. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.06.012.

HAMAMOTO Y., HASEGAWA D., MIZOGUCHI S., YU Y., WADA M., KUWABARA T., FUJIWARA-IGARASHI, A. a FUJITA, M., 2016: *Retrospective epidemiological study of canine epilepsy in Japan using the International Veterinary Epilepsy Task Force classification 2015 (2003–2013): etiological distribution, risk factors, survival time, and lifespan* [online]. BMC Veterinary Research. **12**(1), - [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1186/s12917-016-0877-3. ISSN 1746-6148. Dostupné z: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0877-3>

HAN J.-I., SON H.-W., PARK S.-Ch., NA K.-J., 2010: *Novel insertion mutation of ABCB1 gene in an ivermectin-sensitive Border Collie* [online]. *Journal of Veterinary Science*. **11**(4), 341- [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.4142/jvs.2010.11.4.341. ISSN 1229-845x. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2010.11.4.341>

HÜLSMEYER, V.-I., FISCHER A., MANDIGERS P. J. J, a kol., 2015: *International Veterinary Epilepsy Task Force's current understanding of idiopathic epilepsy of genetic or suspected genetic origin in purebred dogs* [online]. BMC Veterinary Research. **11**(1), - [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1186/s12917-015-0463-0. ISSN 1746-6148. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/175>

CHARALAMBOUS M., BRODBELT D., VOLK H. A., 2014: *Treatment in canine epilepsy – a systematic review* [online]. BMC Veterinary Research. **10**(1), - [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1186/s12917-014-0257-9. ISSN 1746-6148. Dostupné z: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-014-0257-9>

LABOKLIN, 2014. *Defekt MDR1 u psů*. [online] [cit. 2017-04-20]. Dostupné na: http://www.laboklin.de/pages/html/cz/VetInfo/aktuell/lab_akt_0912_cz.htm

LEHNE G., 2000: *P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer*. Current drug targets, s. 85-99.

LOUČKA R., 2014: *Úvod k českému vydání*, s. 9-16. In: Priceová C. (ed.), *Border kolie od A do Z*. Praha: Plot. 340 s. ISBN 978-80-7428-209-6

MEALEY K. L., BENTJEN S.A., GAY J.M. & CANTOR G.H., 2001: *Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion station of the MDR1 gene*. Pharmacogenetics. Vol 11, No 8, s. 727-733

MEALEY K.L., BENTJEN S.A., WAITING D.K., 2002: *Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of Collies from the northwestern, United States*. American Journal of Veterinary Research 63, s.479–481.

MEALEY K. L., MUNYARD K. A., BENTJEN S. A., KLINTZSCH S., KRÄMER E., YALCIN E., PETZINGER E., GEYER J., 2005: *Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia*. Veterinary Parasitology. 131(3-4), s. 193-196. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.05. 004. ISSN 03044017

MILLER D. S., 2010: *Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood–brain barrier* [online]. Trends in Pharmacological Sciences. **31**(6), s. 246-254 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1016/j.tips.2010.03.003. ISSN 01656147.

Dostupné

z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614710000581>

MIZUKAMI K., YABUKI A., CHANG H.-S., UDDIN M. M., RAHMAN M. M., KUSHIDA K., a kol., 2013: *High Frequency of a Single Nucleotide Substitution (c.-6-180T>G) of the Canine MDR1/ABCB1 Gene Associated with Phenobarbital-Resistant Idiopathic Epilepsy in Border Collie Dogs* [online]. Disease Markers. **35**, s. 669-672 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1155/2013/695918. ISSN 0278-0240. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2013/695918/>

NCBI: *Canis lupus familiaris* (dog). [online]. [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/85

PECHANDOVÁ K., BUZKOVÁ H., SLANAŘ O., PERLÍK F., 2006: *Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein*. Klin. Biochem. Metab., **35**(14), s. 196-201.

PRESTON J., 1983: *Adverse reactions to unapproved applications* [online]. *Veterinary Record*. **112**(12), s. 286-286 [cit. 2017-04-20]. DOI:

10.1136/vr.112.12.286. ISSN 0042-4900. Dostupné z:
<http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.112.12.286>

PRICEOVÁ C., 2014: *Border kolie od A do Z*. Praha: Plot. 340 s. ISBN 978-80-7428-209-6.

RUVINSKY A., SAMPSON J., 2001: *The Genetics of the Dog*. CABI Publishing, New York, 564 s. ISBN 08-519-9520-9.

STUHLÝ I., 2015: *Velká ilustrovaná kynologická encyklopedie: naučný slovník kynologický*. Praha: vlastním nákladem autora, 936 s. ISBN 9788026051190.

SVOBODA M., SENIOR D. F., DOUBEK J., KLIMEŠ J., 2001: *Nemoci psa a kočky*. Brno: Noviko, 1026 s. ISBN 8090259537.

ŠRENK P., JAGGY A., 2000: *Klinická neurologie*. Brno: Noviko, 123 s. ISBN 80-902676-5-3.

TVRDÁ V., 2017: *Databáze epilepsie BOC* [online]. Border collie epilepsy. [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://epilepsybc.weebly.com/>

TUČÍMOVÁ J., *O plemeni* [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www.bcccz.cz/oplemeni.htm>

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Sada chromozomů psa

Obr. 2 Nejčastěji využívaná antiepileptika u psů, upraveno podle Charalambous a kol., 2014

Obr. 3 Foto gelu - DNA izolovaná z krve, 2% agarózový gel vizualizovaný EtBr

Obr. 4 Foto gelu - DNA izolovaná z chlupových cibulek, 2% agarózový gel vizualizovaný EtBr

Obr. 5 Foto gelu - PCR produkt, 3% agarózový gel vizualizovaný EtBr

Obr. 6 Foto gelu – RFLP, 3% agarózový gel vizualizovaný EtBr

10 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Tabulka dědičnosti

Tab. 2 Seznam substrátů P-gp, převzato a upraveno podle Dowling, 2006

Tab. 3 Seznam použitých primerů

Tab. 4 Složení reakční směsi pro PCR

Tab. 5 Naměřené koncentrace jednotlivých vzorků a jejich čistota

Tab. 6 Vzorec pro výpočet frekvence genotypů

Tab. 7 Vzorec pro výpočet frekvence alel

Tab. 8 Frekvence genotypů

Tab. 9 Frekvence alel

11 SEZNAM ZKRATEK

AEP-Antiepileptika
BCCCZ- Border kolie klub České republiky
bp-base pair, párů bází
CEA-Collie Eye Anomally
CL-Ceroid Lopofuscinosis
CSF-Vyšetření mozkomíšního moku
ČMKU-Česko-moravská kynologická unie
DKK-Dysplazie kyčelního kloubu
DLK-Dysplazie loketního kloubu
DNA-Deoxyribonukleová kyselina
FCI-Fédération Cynologique Internationale
KCHMPP-Klub chovatelů málopočetných plemen psů
IE-Idiopatická epilepsie
MDR1-Multi Drug Resisance 1
MRI-Magneticka rezonance
NCBI-Národní centrum pro živošišné biotechnologie
OCD-Osteochondróza
PCR-Polymerázová řetězová reakce
PK-Plemenná kniha
PRA-Progresivní retinální atrofie
RFLP-Polymorfismus délky restričních fragmentů
TNS-Trapped Neutrophil Syndrom

12 PŘÍLOHY

Dotazník zdravotního stavu jedince poskytnutého k testování polymorfismu v genu MDR1 u plemene border kolie

Obecná část

Jméno a název chovatelské stanice:

Pohlaví:

Datum narození:

Majitel (jméno, příjmení, e-mail pro zaslání výsledků):

Klinická část

Byl u jedince v minulosti zaznamenán epileptický záchvat? ANO – NE

Je u jedince diagnostikována idiopatická epilepsie? ANO - NE

Je v rodině jedince znám výskyt epilepsie? ANO – NE

Projevila se v minulosti u jedince nepřiměřená reakce po podání léčiv
(odčervení, antibiotická léčba, apod.)? ANO – NE

Byl u jedince proveden test na MDR1? ANO – NE

Pokud ano, s jakým výsledkem?

Poznámky:

Souhlas s použitím výsledků v diplomové práci

Níže podepsaný souhlasí s použitím výsledků svého psa v diplomové práci
Aleny Trýznové na téma Detekce polymorfismu v genu MDR1 u border kolií.

Dne:

Podpis:.....

Přehled vzorků:

<i>číslo vzorku</i>	<i>DNA izolována z</i>	<i>Pohlaví</i>	<i>Genotyp</i>
1	Krev	Fena	T/T
2	Krev	Fena	T/G
3	Krev	Fena	T/T
4	Chlupy	Fena	T/G
5	Chlupy	Pes	T/T
6	Chlupy	Fena	T/T
7	Chlupy	Pes	T/T
8	Chlupy	Fena	G/G
9	Chlupy	Fena	G/G
10	Chlupy	Fena	T/G
11	Chlupy	Pes	T/T
12	Chlupy	Pes	Neúspěšná izolace
13	Chlupy	Pes	T/G
14	Chlupy	Fena	T/G
15	Chlupy	Fena	T/G
16	Chlupy	Fena	T/G
17	chlupy	Fena	T/G
18	chlupy	Fena	T/T
19	chlupy	Fena	T/T
20	chlupy	Fena	T/T
21	chlupy	Fena	T/G
22	chlupy	Fena	T/T
23	chlupy	Fena	T/G
24	krev	Pes	T/T
25	krev	Pes	Neúspěšná izolace
26	krev	Pes	T/T
27	krev	Pes	T/T
28	krev	Fena	T/T
29	krev	Fena	T/T
30	krev	Fena	T/T
31	krev	Pes	T/T
32	krev	Pes	T/G
33	krev	Fena	T/G
34	krev	Fena	T/T
35	krev	Pes	T/G
36	krev	Fena	T/G
37	krev	Pes	T/G
38	krev	Fena	Neúspěšná izolace
39	krev	Fena	G/G

40	krev	Pes	G/G
41	krev	Fena	G/G
42	krev	Pes	T/G
43	krev	Fena	T/T
44	krev	Pes	T/G
45	krev	Fena	T/T
46	krev	Pes	Neúspěšná izolace
47	krev	Pes	T/G
48	krev	Pes	T/T
49	krev	Pes	T/T
50	krev	Pes	T/T
51	krev	Pes	T/T
52	krev	Fena	G/G
53	krev	Pes	T/G
54	krev	Fena	T/G
55	krev	Pes	T/G
56	Krev	Fena	G/G
57	Krev	Fena	G/G
58	Krev	Fena	T/G
59	Krev	Fena	T/G
60	Krev	Pes	T/G
61	Krev	Fena	T/G
62	Krev	Fena	T/T
63	Krev	Pes	G/G
64	Krev	Fena	T/T
65	krev	Fena	G/G
66	krev	Fena	T/T
67	krev	Fena	G/G
68	krev	Pes	T/G
69	krev	pes	T/T
70	krev	Pes	T/T
71	krev	Fena	T/G
72	krev	Fena	T/T
73	krev	Fena	T/T
74	krev	Fena	T/T
75	krev	Pes	T/T
76	krev	Fena	T/T
77	krev	Fena	Neúspěšná izolace
78	krev	Fena	T/T
79	krev	Fena	T/T
80	krev	Fena	T/T
81	krev	Pes	T/T
82	krev	Fena	T/T

