

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**CEA u plemen psů využívaných pro aktivity a terapie za
asistence zvířat**

Bakalářská práce

Autor práce: Zuzana Tipková

Vedoucí práce: Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "CEA u plemen psů využívaných pro aktivity a terapie za asistence zvířat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí práce Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D. za užitečné rady, pomoc a trpělivost, Ing. Anně Palánové, Ph.D. za velkou ochotu a poskytnutí materiálů, děkuji své rodině za velkou podporu a také všem lidem, co mi dovolili použít v této práci své krásné fotografie.

CEA u plemen psů využívaných pro aktivity a terapie za asistence zvířat

Souhrn

Anomálie oka kolií, v angličtině Collie Eye Anomaly (CEA), je dědičné onemocnění, které postihuje především pastevecká plemena psů, jako jsou dlouhosrstá a krátkosrstá kolie, border kolie, šeltie a australský ovčák, dále Nova Scotia duck tolling retrievera. Všechna tato plemena se mohou využívat při aktivitách za asistence zvířat, někteří jedinci jsou vhodní i pro terapie. V odborné literatuře jsem našla obecné informace o historii, příznacích, diagnostice, způsobu dědičnosti a genetickém testování predisponovaných plemen.

CEA byla poprvé popsána v 50. letech 20. století. Projevy CEA jsou velmi variabilní, a proto se dlouho nevědělo, že se jedná o různé příznaky jednoho onemocnění.

Charakteristickým příznakem CEA je hypoplazie cévnatky, dále se mohou vyskytovat kolobomy, zkroucení cév sítnice, nitrooční krvácení a odchlípení sítnice, které vede ke slepotě. CEA nelze vyléčit. Doporučuje se provést časnou diagnostiku, která je možná již od 6 do 8 týdnů věku štěňat, jelikož u starších štěňat může být defekt zakryt pigmentem a oční pozadí psa se jeví jako normální. Chovatelé psů zprvu nevěnovali této anomálii velkou pozornost, protože je malé procento jedinců, kteří v důsledku onemocnění úplně oslepnou. Přenašeči CEA nemají žádné příznaky, jejich potomci však mohou zdědit těžkou formu CEA. U plemen s vysokou prevalencí CEA nepřipadá v úvahu vyřazení postižených jedinců z chovu, protože by se tím snížila genetická rozmanitost.

Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v genu *NHEJ1*. Poté, co byla nalezena příčinná mutace pro CEA, byl vyvinut dvoukrokový test PCR, který využívá dva páry primerů k rychlé detekci mutace v chromozomech. Mezi nejnovější molekulární metody pro diagnostiku CEA patří zjednodušená analýza PCR bez izolace DNA a rychlá genotypovací technika založená na SYBR Green real-time PCR. Genetické testy jsou dnes dostupné v mnoha zemích a chovatelé tak mohou kontrolovat zdraví svých zvířat.

Klíčová slova: pes, *Canis lupus familiaris*, CEA, DNA, dědičnost.

CEA in breeds used for dog-assisted activities and therapies

Summary

Collie Eye Anomaly (CEA) is an inherited disease that primarily affects herding dog breeds such as Smooth and Rough Collie, Border Collie, Shetland Sheepdog and Australian Shepherd, as well as Nova Scotia Duck Tolling Retriever. All these breeds can be used for dog-assisted activities, some individuals are also suitable for dog-assisted therapies. In the literature I found general information about the history, symptoms, diagnosis, mode of inheritance, genetic testing of the predisposed breeds.

CEA was first described in the 50s of the 20th century. Manifestations of CEA vary widely and therefore it has not been known that a variety of symptoms is caused by one disease for a long time.

Choroidal hypoplasia is the characteristic sign, furthermore may be present: coloboma, tortuosity of the retinal blood vessels, intraocular hemorrhage and retinal detachment leading to blindness. CEA cannot be cured. It is recommended to perform an early diagnosis, which is possible from 6 to 8 weeks of age, because the defect can be covered by later pigmentation in older pups and ocular fundus of the dog then appears normal. At first dog breeders did not pay much attention to this anomaly, because it is a small percentage of individuals who become completely blind as a consequence of that disease. Carriers of CEA have no symptoms, but their offspring may inherit a severe form of CEA. We cannot exclude affected individuals from breeding program in the breeds with high prevalence of CEA since it would reduce genetic diversity.

It is an autosomal recessive disease caused by mutation in the *NHEJ1* gene. After the causative mutation was found, a two-step PCR assay, which uses two primer pairs to quickly detect the mutation in chromosomes, was developed. The latest molecular methods for the diagnosis of CEA include simplified analysis of the deletion without DNA isolation and rapid genotyping technique based on SYBR Green real-time PCR. Genetic tests are available in many countries now and so breeders can control the health of their dogs.

Keywords: dog, *Canis lupus familiaris*, CEA, DNA, heredity.

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Terapie za asistence zvířat a aktivity za asistence zvířat	10
3.2 Anatomie oka	11
3.2.1 Vnější obal oka (<i>tunica fibrosa</i>)	11
3.2.1.1 Bělina (<i>sclera</i>)	11
3.2.1.2 Rohovka (<i>cornea</i>)	11
3.2.2 Střední obal oka (<i>tunica vasculosa</i>).....	12
3.2.2.1 Živnatka (<i>uvea</i>).....	12
3.2.2.2 Duhovka (<i>iris</i>)	13
3.2.2.3 Cévnatka (<i>choroidea</i>)	13
3.2.2.4 Řasnaté těleso (<i>corpus ciliare</i>)	13
3.2.3 Vnitřní obal oka (<i>tunica interna</i>).....	13
3.2.3.1 Sítnice (<i>retina</i>).....	13
3.2.4 Vnitřní prostory očního bulbu.....	15
3.2.4.1 Sklivec (<i>corpus vitreum</i>)	15
3.2.4.2 Čočka (<i>lens cristallina</i>)	15
3.3 Anomálie oka kolí (Collie eye anomaly)	15
3.3.1 Historie.....	16
3.3.2 Příznaky	17
3.3.3 Diagnostika	19
3.3.4 Dědičnost CEA	19
3.3.5 Genetické testování.....	23
3.3.5.1 Polymerázová řetězová reakce	24
3.3.5.2 Genom psa	27
3.3.6 Plemena psů postižená CEA	28
3.3.6.1 Dlouhosrstá kolie (Rough Collie).....	29
3.3.6.2 Krátkosrstá kolie (Smooth Collie).....	31
3.3.6.3 Šeltie (Shetland Sheepdog, shetlandský ovčák)	32
3.3.6.4 Border kolie (Border Collie, farmářská kolie, hraniční ovčák).....	33
3.3.6.5 Australský ovčák (Australian Shepherd).....	35
3.3.6.6 Nova Scotia duck tolling retriever (kanadský retriever)	36
4 Diskuze	38
5 Závěr	40

6 Seznam literatury	41
7 Seznam tabulek	47
8 Seznam obrázků	47

1 Úvod

Pastevecká plemena psů jako je dlouhosrstá a krátkosrstá kolie, šeltie, australský ovčák a border kolie jsou velmi inteligentní psi věrní svým pánům, pracovití a aktivní. Totéž platí o nejmenším z retrieverů, Nova Scotia duck tolling retrieverovi, jenž byl vyšlechtěn k lákání a přinášení vodního ptactva. Jelikož to jsou přátelská a exteriérově krásná plemena, našla si cestu do měst, kde žijí převážně jako společníci. Je však důležité, aby jejich majitelé dbali na to, aby tito čínorodí psi měli co na práci. V dnešní době jsou různé psí sporty alternativou k původnímu účelu, která baví psa i jeho majitele.

V nedávné minulosti začali psi lidem pomáhat v další oblasti, kterou je psychická i fyzická léčba. Psi se svými psovody docházejí do nemocnic, léčeben, dětských domovů, zařízení pro seniory a do škol a rozdávají zde radost a duševní oporu, pomáhají rozvíjet komunikaci, jemnou i hrubou motoriku, kognitivní schopnosti, prohřívají svaly, aktivizují, nebo naopak zklidňují, dávají pocit jistoty, usnadňují začleňování do společnosti. Pokud se jedná o terapii, musí probíhat pod dohledem odborníka, návštěvní aktivity se psy provádí dobrovolníci.

Někteří jedinci těchto plemen mohou projít speciálním výcvikem a stát se pomocníky handicapovaných osob. Vodicí psi pro nevidomé, asistenční psi pro tělesně postižené nebo signální psi pro sluchově postižené osoby či osoby se záchvatovitým onemocněním – všichni tito psi musí být naprosto zdraví, protože na nich závisí život jejich majitele. Jako štěňata proto podstupují mnoho veterinárních i povahových testů.

Z důvodu narůstající poptávky po těchto plemenech se u nich začaly na základě nesprávného křížení vyskytovat dědičné vady. Jednou z nich je anomálie oka kolií, CEA, která byla v 60. letech v USA velice rozšířena. Poté, co vědci objevili způsob dědičnosti tohoto onemocnění, začali vytvářet programy selektivního šlechtění, které by snížily prevalenci anomálie. U některých plemen vyřazovali postižené jedince z chovu, u těch s vysokým výskytem CEA to však nešlo (krátkosrstá a dlouhosrstá kolie).

S rozluštěním genomu psa a objevem rychlých a jednoduchých metod analýzy DNA mají chovatelé možnost nechat své psy testovat a na základě výsledků k nim vybrat vhodného partnera, aby bylo zajištěno zdraví štěňat.

2 Cíl práce

Cílem práce je shromáždit, prostudovat a posoudit současné literárně prezentované poznatky o onemocnění anomálie oka kolí (CEA) se zaměřením na plemena psů využívaná při aktivitách za přímé asistence člověka (animal-assisted activity, animal-assisted therapy, animal-assisted education). Dílčím cílem bude podrobněji charakterizovat toto onemocnění zejména v návaznosti na aktuální trendy výzkumu s využitím moderních molekulárních metod analýzy nukleových kyselin.

3 Literární rešerše

3.1 Terapie za asistence zvířat a aktivity za asistence zvířat

V posledních desetiletích se terapie za asistence zvířat (animal-assisted therapy, AAT) a aktivity za asistence zvířat (animal-assisted activity, AAA) stávají čím dál oblíbenější. Narůstá i počet odborné literatury, která předkládá výhody AAT a AAA pro člověka (Hatch, 2007). AAT je forma terapie, která využívá zvíře – především psa – jako hlavní součást léčby lidí, je zde přítomen zdravotnický odborník. Pes pomáhá při léčbě celé řady psychických i fyzických problémů, nejčastěji při odstraňování příznaků souvisejících se stresem a emocionálním distresem. Dále se pes používá při zlepšování kognitivních funkcí, odstraňování problémů v sociálních interakcích, dokonce i u autistů. Působnost psů se rozšířila i do sféry vzdělávání, kde zlepšuje motivaci a pozornost dětí (Fine, 2010). AAA je neformální činnost, která bývá obvykle návštěvní a prováděná dobrovolníky, nemá žádné specifické léčebné cíle. Vzdělávání za asistence zvířat (animal-assisted education, AAE) je strukturované, s jasným cílem, zvířata jsou zde pomocníky odborníků ve školském sektoru (Fine et Mackintosh, 2015).

Fine et Mackintosh (2015) uvádějí zastřešující termín intervence za asistence zvířat (animal-assisted intervention, AAI), pod který spadá AAT, AAA i AAE. AAT zahrnuje psychoterapii, sociální práci, fyzioterapii, logopedii za asistence zvířat. Pod AAA si můžeme představit krizovou intervenci, návštěvy nemocnic, pečovatelských ústavů, ohrožené či delikventní mládeže nebo kampusu univerzity během zkouškového období. AAE obsahuje vzdělávání osob a čtecí programy. Přestože je pravděpodobné, že ve vzdálené budoucnosti věda zodpoví nevyjasněné otázky týkající se účinnosti AAI, možná nikdy zcela neobjasní význam terapeutického vztahu mezi lidmi a zvířaty (Fine et Mackintosh, 2015).

Tyto aktivity a terapie jsou prospěšné i pro zvířata. Na inteligentního psa působí stimulačně. Terapeutický pes je obvykle šťastnější a zdravější v důsledku zdravotních a výcvikových požadavků, které jsou na něj kladeny, a také proto, že stráví se svým majitelem spoustu času (Chandler, 2012). Odendaal et Meintjes (2003) ve své studii zjistili, že stejně jako u lidí se i u psů při pozitivní mezidruhové interakci zvyšuje hladina oxytocinu, endorfinu, prolaktinu, dopaminu a beta-fenylethylaminu. Hladina kortizolu se snižuje jen u lidí. Pes, který vykonává tyto psychicky náročné činnosti, by měl být v dobré kondici a nesmí trpět žádným závažným onemocněním.

3.2 Anatomie oka

Oko se skládá z oční koule, zrakového nervu a přídatných orgánů, které zahrnují oční víčka, spojivky, slzné ústrojí a okoohybné svaly (Reece, 2011).

Oko psa je podobně jako u člověka sférického tvaru. Body označující střed zakřivení rohovky a bělimy se nazývají přední a zadní pól oka. Anatomický rovník dělí oko na přední (anteriorní) a zadní (posteriorní) hemisféru. Vertikální osa, která prochází středem oka, rozděluje oční kouli na nasální a temporální část (Vít et Beránek, 1994).

Oční koule (*bulbus*) obsahuje tři odlišné vrstvy. První (fibrózní) je zevní vazivový obal, který má podpůrnou funkci a skládá se ze dvou částí. Vpředu je průhledná rohovka, jež přechází v neprůhlednou bělimu. Střední (vaskulární) vrstvu bulbu tvoří cévní obal (živnatka), který se skládá z cévnatky, rostrálně umístěného řasnatého tělesa a centrálně položené duhovky (Reece, 2011). Vnitřní (nervový) obal oka je tvořen sítnicí a pigmentovou vrstvou (Kvapilíková, 2000). Duhovka rozděluje dutinu oční koule na přední a zadní komoru. Oční komory vyplňuje komorová tekutina. Zadní komora je ohraničena od posteriorní části oka čočkou a řasnatým tělískem. Prostor oka mezi čočkou, řasnatým tělískem a sítnicí tvoří sklivcová oční komora, kterou vyplňuje sklivec (Vít et Beránek, 1994).

3.2.1 Vnější obal oka (*tunica fibrosa*)

3.2.1.1 Bělina (*sclera*)

Bělina, zaujímající 5/6 pevného obalu oka, je krytá řídkou pojivovou tkání. Ta je nejsilnější na zadním pólu a nejtenčí v oblasti rovníku a v místech úponu očních svalů. V místě, kde vychází optický nerv z oka, je síťovitě proděravělá. Histologicky se bělima skládá hlavně z bílých svazečků kolagenních vláken, skládajících se z nejjemnějších fibril. Elastických vláken obsahuje velice málo, a proto nemá bělima skoro žádnou možnost vyklenutí (Kvapilíková, 2000). Bývá zpravidla matně bílé barvy, u některých plemen psů ale může být i pigmentovaná (Vít et Beránek, 1994).

3.2.1.2 Rohovka (*cornea*)

Přední část oční koule je tvořena průhlednou rohovkou, která umožňuje vstup světla do nitra očního bulbu. Na příčném řezu rohovkou můžeme vidět pět vrstev: epitel, Bowmanova membrána, stroma, Descemetova membrána a endotel (Reece, 2011). V rohovce nejsou žádné krevní cévy, zato je bohatě zásobena nervovými vlákny (Vít et Beránek, 1994),

kteřá do ní vstupují z vnějšího obvodu duhovky a pronikají vnější epitelovou vrstvou (Reece, 2011). Má tak bohaté nervové zásobení, že je jednou z nejcitlivějších tkání těla. Výživu rohovky zajišťuje komorová voda a slzy (Kvapilíková, 2000).

Větší propustnosti pro světlo lze dosáhnout zvětšením poměru povrchu rohovky k bělimě. U psa rohovka zaujímá asi 17 % povrchu oční koule, zatímco u kočky představuje plocha rohovky přibližně 30 % celkového povrchu, jelikož se jedná o zvíře s noční aktivitou. Asi tak 90 % tloušťky rohovky tvoří vlákna kolagenu, která jsou součástí stromatu rohovky. Díky těmto pravidelně lamelárně seřazeným vláknům je rohovka průhledná (Reece, 2011).

Epitel je nerohovatějící mnohvrstevný dlaždicový a má dobrou regenerační schopnost. Bowmanova membrána je homogenní vrstva, která na vnitřní ploše splývá s rohovkovým stromatem. Rohovkové stroma (*substantia propria*) se skládá z vláken a velmi jemné struktury pojivové tkáně. Svazečky kolagenních vláken jsou složeny z fibril, jež vykazují pravidelnou tloušťku a vzdálenost mezi sebou, díky čemuž nejsou pronikající světelné paprsky ve svém průběhu skrz rohovku ovlivněny. Descemetova membrána sestává z elastických vláken, je velice odolná při infekcích i poraněních. Tuto membránu produkují buňky endotelu, který je složen z jedné vrstvy řídce rozprostřených polygonálních buněk (Kvapilíková, 2000).

Průhlednost rohovky je závislá na stupni hydratace. Normální, průhledná rohovka obsahuje méně vody, než je schopna do sebe absorbovat. Zvýšený příjem vody souvisí se snížením průhlednosti a může se objevit jako následek poškození rohovkového epitelu, endotelu nebo sníženého obsahu kyslíku. Pokud tento stav nastane, dojde ke změně v uspořádání vláken kolagenu a následně se rohovka zakalí či zbledá. Další příčinou zakalení nebo zbledení je ztenčení rohovky vlivem zvýšeného nitroočního tlaku, protržení v důsledku mechanického poranění oka a následné zjizvení (Reece, 2011).

3.2.2 Střední obal oka (*tunica vasculosa*)

3.2.2.1 Živnatka (*uvea*)

Střední obal oka je tvořen živnatkou, která je propletena hustou sítí cév a obsahuje četné chromatofory, což jsou buňky obsahující pigment. Obsahuje tři samostatné tkáně, jež mají vyživovací funkci. Duhovka spolu s řasnatým tělískem představuje přední uveu. Cévnatka se nachází převážně v zadní polovině bulbu. Uvea má po sítnici nejrychlejší látkovou výměnu a to v oblasti epitelu řasnatého tělíska a duhovky (Kvapilíková, 2000).

3.2.2.2 Duhovka (*iris*)

Množství světla, které vstupuje do oka, je řízeno duhovkou. Je to zbarvená část oka, jež je u psa kulatá. Otvor duhovky, který bývá různě velký, se nazývá zornice (pupila). Obsahuje dvě skupiny hladkých svalů: kruhovitě (cirkulárně) uspořádané hladkosvalové buňky, inervované parasympatickými vlákny autonomní nervové soustavy a paprskovitě (radiálně) uspořádané hladkosvalové buňky, jež jsou inervovány sympatikem. Smrštění kruhové svaloviny zmenšuje velikost zornice a tím dovoluje vstup menšího množství světla do oka. Kontrakce paprskovitě uspořádané svaloviny naopak zornici rozšiřuje a do oka pak může vstoupit více světla (Reece, 2011).

Duhovka je u většiny psů pigmentovaná a její barevné odstíny se pohybují mezi tmavě žlutou a tmavě hnědou barvou. Rozdílná pigmentace duhovek je označována jako heterochromie (Vít et Beránek, 1994).

3.2.2.3 Cévnatka (*choroidea*)

Hlavní funkcí cévnatky je výživa vnějších vrstev sítnice, tyčinek a čípků. Rozprostírá se od *ora serrata*, což je místo, kde přechází sítnice ve svou slepou část, a končí až u papily zrakového nervu, tedy v místě, kde zrakový nerv odstupuje z oka (Kvapilíková, 2000). V cévnatce se nachází velké množství krevních cév a pigmentových buněk – melanocytů (Vít et Beránek, 1994).

3.2.2.4 Řasnaté těleso (*corpus ciliare*)

Je určeno jednak k fixaci čočky a dále také ke změně tvaru čočky – akomodaci pomocí svalových vláken. Má tvar pravoúhlého trojúhelníku a dosahuje od báze duhovky až k *ora serrata* (Vít et Beránek, 1994). Řasnaté těleso se skládá ze tří skupin vláken hladké svaloviny (sval řasnatého tělesa), které jsou uspořádány různými směry. Vypadá to, že je schopnost akomodace oka u domácích zvířat omezená, což je pravděpodobně důsledek nedostatečnosti řasnatého svalu (Reece, 2011).

3.2.3 Vnitřní obal oka (*tunica interna*)

3.2.3.1 Sítnice (*retina*)

Sítnice tvoří vnitřní vrstvu oční stěny (Vít et Beránek, 1994). Jejím úkolem je přijímat dopadající světelné paprsky, ty poté mění chemickým procesem na elektrické impulzy, které

jsou dále vedeny do mozku (Kvapilíková, 2000). Sítnice se dělí na *pars optica* a *pars caeca*. Funkční *pars optica* se nachází mezi očním diskem (*papilla nervi optici*) a *ora serrata*. Receptory světla, které jsou umístěny v sítnici, jsou nervové buňky nazývané tyčinky a čípky. U psa a kočky nalezneme více tyčinek než čípků, což jim umožňuje dobré vidění při slabém osvětlení, ale omezenou ostrost vidění. *Pars caeca* je afunkční a rozprostírá se mezi ciliárním tělesem a duhovkou (Vít et Beránek, 1994). Tuto část nazýváme slepou částí sítnice (Kvapilíková, 2000). Opticky můžeme sítnici rozdělit na *tapetum lucidum* a *tapetum nigrum*. *Tapetum lucidum* neboli tapetální fundus je vysoce reflektivní zóna v horní části očního pozadí, kterou charakterizuje přítomnost cév, může obsahovat pigment. Ve spodní části očního pozadí se rozprostírá *tapetum nigrum*, nazývané non-tapetální fundus (Vít et Beránek, 1994).

Fotoreceptory, tj. tyčinky a čípky jsou umístěny poblíž vnějšího povrchu sítnice, těsně nad pigmentovým epitelem (Reece, 2011). Přijímají jako citlivá vrstva světelné impulzy (Kvapilíková, 2000). Přenos impulzů je vnitřně směřován ke sklivci. Ve dvou interpolovaných vrstvách gangliových buněk sítnice dochází ke střetnutí impulzů, které vycházejí z receptorů. Bipolární a multipolární neurony tvoří nejhlubší vrstvu a jejich axony se spojují na papile zrakového nervu a poté opouštějí oční kouli jako zrakový nerv (Reece, 2011). Sítnice je složena ze dvou neuronů, tj. nervových buněk s výběžky, prvním jsou bipolární buňky a druhým buňky gangliové. Dále v sítnici nalezneme buňky podpůrné a asociační (Kvapilíková, 2000).

Zraková ostrost je popisována jako schopnost zobrazit a vnímat detaily pozorovaného předmětu. Místo na sítnici, kterému se říká centrální kruhové políčko (u člověka žlutá skvrna), je místem nejostřejšího vidění. Část sítnice se souvisejícími strukturami, které jsou viditelné oftalmoskopem, se jmenuje oční pozadí (Reece, 2011).

Pigmentový epitel, který se skládá z jedné vrstvy kubických buněk, je důležitý pro metabolismus smyslových buněk sítnice (nemají vlastní krevní zásobení). V pigmentových buňkách se nachází pigment fuscín, který se podobá melaninu (Kvapilíková, 2000). Díky fuscínu má sítnice černou barvu. Tato černá pigmentace napomáhá absorpci světla, ale také zabraňuje vniknutí nekontrolovaných světelných odrazů, které se dostávají do ostatních částí oka (Reece, 2011).

3.2.4 Vnitřní prostory očního bulbu

3.2.4.1 Sklivec (*corpus vitreum*)

Sklivec je jasná, průhledná a polotekutá hmota, která se podobá želatině. Přibližně z 99 % je tvořen vodou (Vít et Beránek, 1994). Sklivec zaplňuje prostor mezi čočkou, řasnatým tělískem a sítnicí a vyplňuje tak 80 % obsahu oka. Pomáhá udržet tvar bulbu svým tlakem na jeho obaly. Složení sklivce připomíná složení komorové vody, obsahuje však speciální bílkovinu – vitrein, který vytváří jeho trámčinu. Skládá se z mnoha kolagenních vláken, na nichž jsou přichyceny makromolekuly kyseliny hyaluronové (Kvapilíková, 2000).

3.2.4.2 Čočka (*lens cristallina*)

Čočka se rozprostírá mezi duhovkou a sklivcem, má bikonvexní tvar, je elastická, s vysokou lomivostí světla. Je složena z povrchové pochvy, čočkového epitelu a vláken. Neobsahuje žádné cévy ani nervy, její povrchová pochva se však vyznačuje propustností pro výživné látky (Vít et Beránek, 1994). Je uchycena pomocí závěsného aparátu na řasnaté tělísko, jež se směrem k cévnatce zesiluje (Reece, 2011). Jak organismus stárne, dochází k fyziologickému zesílení vláken v čočce a zároveň se snižuje její průhlednost (Vít et Beránek, 1994).

Svalové kontrakce vyvolávají pohyb řasnatého tělesa vpřed a vzad, což snižuje napětí závěsného aparátu čočky a toto snížené napětí dovoluje čočce, aby nabyla normálního klidového tvaru (má elastické pouzdro), který je vypouklejší. Vyklenutá čočka má kratší ohniskovou vzdálenost, konverguje světelné paprsky (to je důležité pro dalekozraké oko), a tím se mění bod, ve kterém se vytvoří obraz. Tento proces, jenž je nezbytný pro vidění blízkých a vzdálených předmětů, se nazývá akomodace čočky. Vidění je vždy ostřejší, pokud vytvořený obraz leží přesně na sítnici (Reece, 2011).

3.3 Anomálie oka kolí (Collie eye anomaly)

Collie eye anomaly (CEA) je bilaterální vrozené onemocnění vyznačující se abnormálním vývojem oka. Závažnost defektu a vliv na kvalitu zraku jsou proměnlivé u každého jedince. U lehčích případů se může vyskytovat jen choroidální hypoplazie (nedostatečně vyvinutá cévnatka), u těžších se dále objevuje kolobom zrakového nervu, odchlípení sítnice a nitrooční krvácení (Gough et Thomas, 2010). Tato porucha je obvykle

neprogresivní a může být snadno diagnostikována v 6 až 8 týdnech věku štěněte (Hoskins et Glaze, 2001).

Anomálie oka kolií, syndrom sklerální ektázie kolií, šeltii a border kolií je jednoduše recesivně dědičné neprogresivní onemocnění (Beránek et al., 2000). Genetická mutace související s CEA probíhá jako delece 7,8 kb v intronu 4 genu *NHEJ1* a dá se detekovat u homozygotů i heterozygotů pomocí metody PCR (Maxie, 2015). Díky komerčně dostupným genetickým testům můžou chovatelé identifikovat geneticky zasažené recesivní homozygoty i klinicky zdravé přenašeče mutace, a vybrat si tak vhodné rodiče další generace. Dosud však nebyla zjištěna přesná příčina onemocnění, ani nebylo dokázáno, zda kauzální mutace ovlivňuje výskyt některých dalších onemocnění (například imunodeficienci) (Palánová, 2015). U nás je CEA předmětem genetické depistáže a postižení jedinci nejsou využíváni v plemenitbě. Léčba neexistuje (Beránek et al., 2000).

3.3.1 Historie

CEA poprvé popsal Magrane v roce 1953. Odhaduje se, že kolem roku 1953 bylo v Severní Americe až 90 % kolií trpících CEA. Během let 1975 až 1979 byla CEA přítomna u více než 70 % kolií z 20 000 vyšetřovaných. Prevalence v Evropě a Velké Británii nebyla tak vysoká (30 – 60 %) (Maxie, 2015).

Genetika nemoci byla předmětem mnoha spekulací. Někteří vědci považovali genetické příčiny CEA za komplexní, zatímco jiní se přikláněli k teorii jednoduché recesivní dědičnosti. Druhá hypotéza byla definitivně potvrzena Parkerem et al. v roce 2007 (Palánová, 2015).

Protože toto onemocnění bylo poprvé popsáno u kolií, bylo nazváno anomálie oka kolií. Neznamená to však, že tímto defektem jsou postiženy pouze kolie. V letech 1960 – 1970 bylo toto onemocnění značně rozšířeno. Yakely (1972) uvádí, že se vyskytovalo u 80 – 90 % všech jedinců. Postupně se výskyt této choroby snižuje, protože u kolií byl přijat účinný selekční program. Stále je však vysoké procento postižených jedinců, poněvadž jde o defekt recesivní (Dostál, 1995). Aby se u psa projevilo postižení, musí být pro mutantní gen homozygotní. Autozomálně recesivní onemocnění často přeskočí generaci a objeví se až u potomků heterozygotních přenašečů. Oba rodiče musí být heterozygotní přenašeči. Postižení zasahuje rovnoměrně psy i feny (Ruvinsky et Sampson, 2001).

Neurčité klinické příznaky a nízký výskyt osleplých jedinců v důsledku této choroby vedly některé chovatele k tomu se mylně domnívat, že řídit chov není nezbytné (Bedford, 1982b).

3.3.2 Příznaky

Onemocnění je způsobené vadnou mezodermální diferenciací vláknitých a cévních obalů v zadní části oka. Defekt postihuje bělimu, cévnatku, sítnici a optický disk (Bedford, 1982a).

Maxie (2015) mezi oftalmoskopické nálezy řadí pokřivení cév sítnice, choroidální a tapetální hypoplazii, kolobom optického nervu a odchlípení sítnice s nitroočním krvácením. Beránek et al. (2000) dále přidává centrální korneální opacity. U postižených psů se může vyskytovat více těchto lézí, ale jen zřídka jsou symetrické (Hoskins et Glaze, 2001). Dále se u postižených psů příležitostně objevuje enoftalmus (abnormálně vkleslé oko do očníce), mikroftalmus (zmenšené oko) nebo mineralizace rohovkového stromatu. Při makroskopickém vyšetření lze odhalit abnormální bledost posteriorního segmentu oční koule, bělima a cévnatka jsou průsvitnější, než je normální. Tyto znaky jsou typické pro choroidální hypoplazii (Maxie, 2015). Choroidální hypoplazie je běžný nález u postižených psů a zdá se, že má minimální vliv na zrakové funkce (Hoskins et Glaze, 2001). Může se projevit jako nedostatek pigmentu sítnice anebo cévnatky, nedostatek tapetální tkáně, pokud léze zasahuje tapetální fundus, nebo abnormalita choroidálních cév. Bělima se může jevit jako bílé pozadí, když je pigment cévnatky nedostatečný a choroidální cévy ztenčené nebo chybí (Bedford, 1982a). S choroidální hypoplazií se můžeme setkat také u různých plemen psů v souvislosti s geny pro zbarvení blue merle (mramorování), dapple (skvrnitých) nebo harlekýn, zejména u australského ovčáka (Maxie, 2015).

Dubielzig et al. (2010) uvádí, že se objevuje velká škála závažnosti fenotypického projevu, avšak ve všech případech rozeznáváme oblast choroidální hypoplazie a segmentální tapetální aplazie laterálně k optickému disku. Mezi další příznaky řadí zakřivené cévy sítnice, sklerální defekt (kolobom) s vnějším vyboulením nebo ektázií (rozšířením stěny), který je většinou jednostranný, odchlípení sítnice, taktéž bývá jednostranné a je obvykle spojeno s rozsáhlým kolobomem, dále dysplazie sítnice s ojedinělými nebo víceohniskovými záhyby a krvácení do posteriorního segmentu (Dubielzig et al., 2010).

Kolobomatózní defekt postihuje malé oblasti optického disku či okolního fundu, okrsky skléry (ektázie skléry) i rohovky. Ve většině případů jsou diagnostikovány společně s dalšími očními anomáliemi, samotný kolobom rohovky je vzácností (Beránek et al., 2000). Kolobom se jeví jako rozštěp povrchu optického disku, v některých případech zasahuje přilehlé oční pozadí. Rozsáhlé kolobomy vedou ke zhoršení vidění, ty malé však mají nepatrný či žádný vliv na zrak (Bjerkås, 1991).

Nejčastějšími příčinami oslepnutí jsou totální retinální ablace (odchlípení) a nitrooční krvácení. To pak může mít za následek sekundární glaukom. Krev obvykle nekoaguluje a sledujeme červenavé zabarvení sklivce (Beránek et al., 2000). Bedford (1982b) uvádí, že nitrooční krvácení se vyskytuje jen u 1 % psů, kterým byla diagnostikována CEA. Jeví se jako nekoagulovaná krev v přední oční komoře nebo jako preretinální krvácení a nejčastěji je důsledkem krvácení z abnormálních cév sítnice (Bedford, 1982b).

Klinické příznaky se většinou projeví v prvním roce života (Beránek et al., 2000). CEA je vždy bilaterální, avšak obvykle neprobíhá stejně na obou očích (Maxie, 2015).

CEA lze pozorovat už u pěti až sedmítýdenních štěňat (Tilley et Smith, 2011). Příznaky se mohou značně lišit mezi postiženými psy v rámci plemene, mezi rodiči a jejich potomky i mezi jednotlivými potomky, kteří pocházejí z jednoho vrhu (Dostál et al., 2010). Mnoho z nich nemá celý život žádné zjevné důsledky ani problémy se zrakem, naopak u těžce postižených jedinců se vyvíjí druhotné odchlípení sítnice, nitrooční krvácení až slepota (Lowe et al., 2003). Není dostupná žádná léčba (Dostál et al., 2010).

Je popisována střední a těžká forma CEA. Psi trpící střední formou CEA mají zachovalé zrakové funkce, jak bylo zjištěno pozorováním chování a klinickou elektroretinografií (Lowe et al., 2003). Hypoplazie cévnatky je zásadní defekt vyskytující se samostatně nebo v kombinaci s poškozením zrakového nervu a bělimy (Glaze, 2010). Výsledkem tohoto defektu je oftalmoskopicky detekovatelné „okno“ na očním pozadí, které se nachází temporálně ke zrakovému nervu (Lowe et al., 2003). Chybějící tapetum a pigment temporálně k optickému disku odhalují velké, nepravidelně rozmístěné choroidální cévy. Psi postižení střední formou CEA mají zachovalý zrak (Glaze, 2010). U mírně postižených štěňat se dá choroidální hypoplazie odhalit již ve 4 až 6 týdnech (Hoskins et Glaze, 2001).

Kolobom optického disku se objevuje u jedinců s těžkou formou CEA a postihuje až 35 % postižených jedinců. Jeví se jako jáma či zářez na povrchu disku, kde nejsou přítomny cévy sítnice. Podobné poruchy mohou zasáhnout také bělimu, často v blízkosti optického disku. Rozsáhlé kolobomy jsou pravděpodobně příčinou deficitů zorného pole (slepých míst), zrak však zůstává stále funkční (Glaze, 2010). Dále může docházet k nitroočnímu krvácení a novotvorbě cév sítnice nebo cévnatky, což způsobuje poškození fotoreceptorů, zjizvení sítnice a vážnou ztrátu zraku. Zvláště u psů, u kterých se vyskytují kolobomy, může vzniknout odchlípení sítnice vedoucí k oslepnutí (Lowe et al., 2003). Méně než 10 % postižených psů se narodí s odchlípením sítnice a přidruženým krvácením způsobujícím oslepnutí. Glaze (2010) píše, že ačkoliv je CEA obecně považována za neprogresivní onemocnění, rozsáhlé kolobomy mohou být důvodem vzniku odchlípení sítnice do dvou let věku.

3.3.3 Diagnostika

Bedford (1982b) píše, že lze provést ranou diagnostiku CEA díky tomu, že je to vrozené onemocnění.

Diagnóza u velmi mladých psů je náročná, protože mají malé, hluboko posazené oči, nicméně vyšetření v 6 až 8 týdnech věku se doporučuje (Glaze, 2010). Podle Gougha et Thomase (2010) je nejlepší doba pro diagnostiku 6 až 7 týdnů věku psa a je doporučeno postižené jedince vyřadit z chovatelského programu. Problémem při diagnóze je fenomén „go normal“, což znamená, že při oftalmoskopickém vyšetření vypadá fundus oka modře a přibližně ve třech měsících věku sítnice změní barvu na žlutou nebo zelenou jako u dospělých. Chorioretinální změny menšího rozsahu nalezené při prohlídce před uplynutím tří měsíců věku mohou být zamaskovány pozdější pigmentací sítnice. Tito jedinci, kteří se později jeví jako zdraví, bývají označováni jako „go normals“ (Bedford, 1982b). Nedostatečná pigmentace fundu u psů zbarvených merle také komplikuje diagnostiku, protože léze splývají s okolím (Glaze, 2010).

Oftalmoskopické vyšetření může odhalit jen postižené psy, nikoliv přenašeče, jelikož příznaky se dědí jako recesivní znaky. Z tohoto důvodu musí být test DNA definitivní diagnostickou metodou pro takováto onemocnění (Parker et al., 2007).

3.3.4 Dědičnost CEA

Od doby, kdy byla dokázána dědičnost CEA, se vědci snažili přijít na to, jak se onemocnění přenáší na další generace. S ohledem na variabilní příznaky onemocnění se někteří autoři domnívali, že se jedná o polygenní znak (Donovan et Wyman, 1965). Jiní vědci došli při studiu rodokmenů postižených psů k závěru, že nemoc je buď recesivní, nebo je podmíněna merle genem, který je považován za částečně dominantní s neúplnou penetrancí (Roberts, 1967).

První studii, která ukázala recesivní typ dědičnosti tohoto onemocnění, provedl Yakely et al. v roce 1968. Křížili postižené feny kolie s fenotypově zdravými dobrmany. U F_1 generace se nevyskytovaly žádné oční abnormality. F_2 generace vznikla pářením samců z F_1 s různými F_1 samicemi a u dvou z patnácti potomků se objevily charakteristické poruchy. Pro zpětné křížení bylo použito šest F_1 psů a fenotypově postižené kolie. Dvacet z 33 štěňat vzešlých z těchto páření bylo zcela bez očních vad. U zbývajících třinácti štěňat se objevily příznaky anomálie. Poté vyšetřili 362 kolí od různých chovatelů a zjistili, že se CEA vyskytuje u přibližně 70 % jedinců. Nebyly nalezeny významné rozdíly mezi psy a fenami, což ukazuje, že CEA není vázána na pohlaví. Není dosud známo, proč je exprese této

anomálie u jedinců odpovídajícího genotypu tak proměnlivá, i když je možné, že geny na více než jednom lokusu mají vliv na přítomnost nebo vyjádření CEA. Projev s velkou pravděpodobností závisí na negenetických faktorech, jako je nitroděložní prostředí (Yakely et al., 1968).

Yakely (1972) uskutečnil studii, která se zaměřovala na možnost snížení výskytu CEA selektivním křížením, jakož i na udržení tělesného typu výstavních kolíí podle Amerického klubu chovatelů (American Kennel Club). Vyšetřovaných kolíí bylo 370 a pocházely z oblasti východního Washingtonu, severního Idaha a západní Montany. Po testovacích kříženích, která ukázala recesivitu onemocnění, bylo doporučeno pářit spolu pouze fenotypově zdravé jedince, nebo zdravé jedince s postiženými. Z těchto styků však může vzejít postižené potomstvo kvůli skrytým alelám CEA, které se vyskytují u fenotypově zdravých přenašečů. Již po třech letech došlo k poklesu prevalence CEA z 97 % na 59 %, čehož bylo dosaženo díky zavedení přesného oftalmologického posouzení a informování chovatelů o morfologických, fyziologických a dědičných aspektech CEA. Tyto výsledky dokazují recesivní způsob dědičnosti (Yakely, 1972).

Wallin-Håkanson et al. (2000) získali mírně odlišné výsledky. Mezi roky 1989 a 1997 bylo 8204 dlouhosrstých kolíí shledáno pozitivních pro CEA, vyšetřovány byly v 5 až 10 týdnech věku a výsledky byly následně registrovány do programu genetického zdraví Švédského klubu chovatelů. Zjistili, že počet postižených a klinicky zdravých potomků neodpovídá očekávanému počtu založenému na Mendelových zákonech. Pro vyhodnocení výsledků byli psi rozděleni do dvou skupin podle hlavních klinických příznaků CEA – kolobom a choroidální hypoplazie (CRD). Zohledněny byly pouze vrhy, jejichž rodiče i potomstvo byli postižení CEA. Prevalence kolobomu u potomků z různých páření se výrazně nelišily (zdravý x zdravý, zdravý x CRD, CRD x CRD, kolobom x CRD). Významně se však lišil výskyt CRD u štěňat, která vzešla z křížení zdravých jedinců (43 %), zdravých s jedinci s CRD (53 %) a CRD s CRD (85 %). Jelikož je prevalence choroidální hypoplazie u štěňat narozených z páření CRD x CRD (85 %) podstatně odlišná od 100 %, vyvrací to dřívější myšlenku, že jsou oba rodiče homozygotní pro jednoduše autozomálně recesivní znak. Kolobom může mít kromě dopadu na zdravotní stav očí také vliv na velikost vrhu. Výsledky ukazují, že vrhy vzniklé pářením jedinců s kolobomem s těmi zasaženými CRD byly méně početné než vrhy zdravých jedinců (zdravý x zdravý) a jedinců s CRD (CRD x CRD). Výsledky této studie se neslučují s teorií jediného genu řídícího CRD i kolobom, jelikož z páření jedinců s kolobomem a jedinců s CRD se narodili potomci s jiným statutem CEA než

z páření CRD x CRD. Mimoto je polygenní způsob dědičnosti kompatibilní s většinou, ne-li se všemi publikovanými výsledky (Wallin-Håkanson et al., 2000).

Bjerkås (1991) provedl jako první studii zabývající se prevalencí CEA v Norsku. Ze 741 dlouhosrstých kolií mělo 40,8 % CEA ve většině případů spojenou s chorioretinální dysplazií (CRD). U 7,7 % psů byl objeven kolobom optického disku a u 3,5 % se vyskytovalo odchlípení sítnice nebo nitrooční krvácení. Neobjevil žádný rozdíl v četnosti výskytu mezi pohlavími ani barvou srsti. Psi byli rozděleni do dvou skupin podle věku, ve kterém byli poprvé vyšetřeni, a to od sedmi týdnů do tří měsíců a od tří měsíců věku výš. Ve skupině psů vyšetřených v ranějším věku trpělo CEA 48,9 %, zatímco ve druhé skupině to bylo 25,6 %. Všechna štěňata s kolobomem vykazovala také znaky CRD, zatímco u starších jedenácti psů z 66 s CEA se vyskytoval kolobom bez CRD. 22 psů, kteří byli vyšetřeni jako štěňata a byla jim diagnostikována CEA s menšími chorioretinálními změnami, bylo přezkoumáno v pozdějším věku. Z těchto psů mělo patnáct při opětovné prohlídce oftalmoskopicky normální fundus, kdežto sedm jich bylo beze změny od prvního vyšetření. U těchto štěňat došlo k zakrytí defektu zarůstáním tapetální vrstvy nebo pigmentací pigmentového epitelu sítnice. Toto zdánlivé zmizení léze se nazývá fenotyp „go normal“ (Bjerkås, 1991).

Sargan (2001) tvrdil, že zatímco výsledky, které získali Wallin-Håkanson et al. (2000), nejsou v rozporu s některými polygenními modely, prý také odpovídají autozomálně recesivnímu modelu dědičnosti, a to kvůli možné neúplné penetranci vyvolávajícího genu. Lowe et al. (2003) podporují tyto myšlenky ve svých segregačních studiích, které ukázaly, že výskyt fenotypu CEA u psů homozygotních pro choroidální hypoplazii je menší než 100 %. Pozorovali neúplnou penetranci fenotypu CEA u homozygotních postižených jedinců a částečnou penetranci u některých heterozygotů. Z jejich výsledků vyplývá, že u některých heterozygotů se může projevit fenotyp postižený CEA.

V roce 2007 byla zveřejněna studie Parkera et al., která osvětlila náš pohled na CEA. Provedli rozsáhlou shlukovou (clusterovou) analýzu vycházející z genotypových dat vytvořených 96 mikrosatelitními markery. Rozdělili do pěti skupin 132 plemen psů a pokusili se v rámci těchto skupin nalézt menší podskupiny, které by prokázaly dodatečný stupeň příbuznosti mezi některými plemeny. Dokázali, že plemena často trpící CEA, jako je dlouhosrstá a krátkosrstá kolie, border kolie a australský ovčák, patří do stejné skupiny. Použitím genetických metod (fine-mapping, analýza mutace) našli delecii 7799 párů bází ve čtvrtém intronu genu *NHEJ1* (*Non-homologous end-joining factor 1*) chromozomu 37. Tato mutace byla potvrzena jako způsobující CEA u zmíněných plemen spolu s šeltii (má úzký genetický vztah s kolií) a dále byl tento fenotyp dokázán u lancashirského pataře,

dlouhosrstého vipeta a Nova Scotia duck tolling retrievera. U boykin španěla byl objeven haplotyp asociovaný s CEA a zjištění, že postižení jedinci byli homozygotní pro tuto mutaci, je utvrdilo v tom, že toto plemeno segreguje CEA stejně jako mutaci a haplotyp (Parker et al., 2007).

Podle Dostála et al. (2010) je dědičnost CEA autozomálně recesivní s variabilním projevem a pleomorfismem, což znamená, že se klinické příznaky onemocnění u jednotlivců velmi liší. Tato skutečnost však nebyla dosud z genetického hlediska objasněna (Dostál et al., 2010).

Studie, kterou provedli Lowe et al. (2003), se zabývala vadnou embryogenezí oka, která u těžce postižených jedinců může vést až k oslepnutí, a také zavedla psa jako zvířecí model pro studium embryonálního vývoje oka. V této studii provedli mapování genomu založeném na segregaci CEA použitím psích rodokmenů. Použili hlavní fenotyp CEA, hypoplazii cévnatky, jako jediné diagnostické kritérium a zjistili umístění lokusu CEA v místě CFA37 blízko markeru FH1452 s LOD skóre 22,17 při rekombinačním zlomku 0,076. Uspořádání mnoha genů v CFA37 na RH mapě (radiation hybrid map) naznačuje, že tento region genomu odpovídá lidskému chromozomu 2q35. Označení odpovídající oblasti v genomu člověka naznačilo více kandidátních genů, které budou předmětem další studie lidských a psích rodin (Lowe et al., 2003).

Chovatelé dlouhosrstých kolií v České republice by se měli snažit zlepšit genetické zdraví těchto psů, přestože může být v současnosti obtížné najít geneticky zdravého homozygotního psa vhodného pro krytí. Ze začátku by bylo vhodné pářit spolu přenašeče, kteří by produkovali průměrně 25 % zdravých štěňat, 25 % štěňat postižených CEA a 50 % přenašečů. Frekvence onemocnění by klesala a nedocházelo by ke ztrátám jiných cenných vlastností kolií, kdyby probíhalo genetické testování a páření geneticky zdravých homozygotů s přenašeči nebo postiženými psy. Šlechtění u krátkosrstých kolií a šeltií by probíhalo snadněji, bylo by totiž možné pářit mezi sebou zdravého jedince s přenašečem nebo postiženým a průběžně testovat potomstvo. Jelikož je u australského ovčáka a border kolie výskyt defektní alely nízký, postižení jedinci by se neměli vůbec využívat k chovu. U plemene Nova Scotia duck tolling retriever se situace komplikuje kvůli častějšímu dědičnému očnímu onemocnění, kterým je progresivní degenerace tyčinek a čípků (progressive rod-cone degeneration) a selekce proti oběma vadám by vyžadovala pečlivě stanovenou politiku chovu, která by upřednostňovala potřeby plemene (Dostál et al., 2010).

3.3.5 Genetické testování

Přenašeči, kteří se obvykle vyskytují v mnohem větším počtu než postižení jedinci, nevykazují žádné příznaky onemocnění, ale mohou produkovat postižená mláďata, a proto by měli být vyřazeni z chovu. Vzhledem k tomu, že genetické testování může být provedeno v kterémkoliv věku, měla by být testována již štěňata určená k budoucímu uchovnění. Genetický stav psa může chovatel zjistit ještě předtím, než se projeví příznaky, a defektní gen by tak mohl být z této linie odstraněn (Suriyaphol, 2011). Vzhledem k vysoké prevalenci CEA u dlouhosrsté a krátkosrsté kolie nepřipadá v úvahu vyřazení postižených zvířat z chovu (Hoskins et Glaze, 2001).

V posledních letech byla označena mutace způsobující CEA jako homozygotní intronová delece 7799 párů bází v genu *NHEJ1* (*nonhomologous end joining factor 1*), což umožňuje detekci přenašečů i homozygotů pomocí diagnostického testu založeného na polymerázové řetězové reakci (Parker et al., 2007).

Dostál et al. (2010) použil přímou metodu PCR pro analýzu *NHEJ1* genu, kterou provedl pomocí PikoTM termocykleru. Tato metoda je jednoduchá, vhodná zejména pro testování malých a toy plemen psů, je zde potřeba velmi malé množství krve (0,5 µl pro reakci).

Dostál et al. (2010) provedl studii, ve které prozkoumal populace šesti plemen psů (australský ovčák, dlouhosrstá a krátkosrstá kolie, border kolie, šeltie, Nova Scotia duck tolling retriever) v České republice a jejímž cílem bylo zavést jednodušší, rychlejší a vhodnější metodu testování genotypů *NHEJ1* pro praktické účely chovatelů. Amplikony získané pomocí dvou sad primerů polymerázovou řetězovou reakcí byly analyzovány agarózovou elektroforézou, a tak došlo k identifikaci genotypů *NHEJ1* u jednotlivých psů. Použitím první sady primerů (F17 a R17) byly PCR fragmenty amplifikovány u zdravých homozygotů a u přenašečů. U postižených homozygotů nebyl amplifikován žádný fragment. Když byla použita druhá sada primerů (F20 a R23), byly fragmenty PCR pozorovány u přenašečů a u postižených homozygotů (Tabulka 1.). Vysoké frekvence mutantní alely byly zjištěny u kolí (mezi 37 vyšetřovanými dlouhosrstými koly nebyl žádný zdravý jedinec), naopak u australského ovčáka byli nalezeni jen tři přenašeči a žádný postižený z 33 psů (Dostál et al., 2010).

Tabulka 1. Sekvence primerů

F17	5'-TCTCACAGGCAGAAAGCTCA-3'
R17	5'-CCATTCATTCCTTTGCCAGT-3'
F20	5'-TGGGCTGGTGAACATTTGTA-3'
R23	5'-CCTTTTTGTTTGCCCTCAGA-3'

Chang et al. (2010) měl za cíl vyvinout rychlou a cenově efektivní techniku genotypování pomocí SYBR Green-based real-time PCR, která by byla vhodná pro budoucí rozsáhlé průzkumy a pomohla by tak vymýtit CEA selektivním šlechtěním. Metoda byla vyvinuta a vyhodnocena za použití purifikovaných vzorků DNA border kolíků zdravých, postižených a přenašečů, jejichž genotypy byly dříve stanoveny konvenční metodou PCR. Tato real-time PCR analýza prokázala vhodnou amplifikační schopnost u všech genotypů a výsledky odpovídaly výsledkům konvenční PCR. Dále byl zhodnocen FTA card (Flinders Technology Associates filtrační papír) jako DNA templát pro real-time PCR použitím vzorků krve a slin, aby se rozhodlo o tom, zda je vhodný pro screening CEA. Roztok obsahující DNA, připravený z disku FTA card poskvrněného krví nebo slinami, byl vhodný pro real-time PCR pokud jeho objem zaujímal 2,5 % směsi pro PCR. SYBR Green-based real-time PCR kombinovaná s FTA card je rychlou technikou genotypizace pro CEA, která může markantně zkrátit celkový čas potřebný pro genotypizaci a zároveň zjednodušit přípravu vzorků. Z toho důvodu je nově vyvinutá technika vhodná pro screening při šlechtění kolíků a příbuzných plemen (Chang et al., 2010).

3.3.5.1 Polymerázová řetězová reakce

Metodu PCR (polymerase chain reaction) zavedl Kary Mullis a roku 1993 za tuto práci získal Nobelovu cenu za chemii (Snustad et Simmons, 2009). Polymerázová řetězová reakce je v dnešní době široce používána, například v diagnostice při analýze genetických chorob nebo pro namnožení jakéhokoliv genu z malého vzorku DNA. PCR probíhá zcela v podmínkách *in vitro*, tedy bez použití buněk (Alberts, 1998). Replikace DNA zahrnuje polymerizaci nukleotidů použitím templátového řetězce DNA, která probíhá s pomocí enzymu DNA polymeráza. K této reakci je však vždy zapotřebí vláknko primeru, na které se mohou připojit další nukleotidy. V živých buňkách není primer vláknko DNA, ale malá jednořetězová molekula RNA syntetizovaná primázou nebo RNA polymerázou (Gupta, 2009).

PCR se provádí v jediné mikrozkuhavce jednoduše tak, že se DNA smíchá se souborem reagensů a mikrozkuhavka se vloží do termálního cyklu (termocyklu), což je zařízení, které umožňuje inkubování směsi při různých teplotách střídajících se ve shodě s tím, jak byly předem naprogramovány (Brown, 2007).

PCR sestává ze tří kroků. Prvním je denaturace prováděná při 94 °C, při níž dojde k rozdělení dvouřetězcové templátové DNA. V následující fázi je teplota snížena na cca 55 °C, přičemž proběhne připojení oligonukleotidových primerů, které jsou přítomny v nadbytku, k odděleným řetězcům templátové DNA (Mülhardt, 2010). Ideální teplota pro připojení primerů závisí na tom, z kolika a z jakých bází jsou primery složeny. Ve třetím kroku je použita DNA-polymeráza pro replikaci úseku DNA mezi místy komplementárními k oligonukleotidovým primerům. Primer poskytuje volnou 3'-OH skupinu potřebnou pro kovalentní navázání dalšího nukleotidu a následné prodlužování řetězce. Denaturovaná genomová DNA přitom zajišťuje funkci templátu. K polymeraci obvykle dochází při 70 – 72 °C po dobu 1,5 minuty (Snustad et Simmons, 2009). Jelikož komplementace nastane u obou vláken DNA, dostaneme v průběhu jednoho cyklu dvojnásobný počet templátových DNA (Mülhardt, 2010).

Další cyklus je pak znovu zahájen denaturací zvýšenou teplotou, v němž dojde k oddělení nasyntetizovaných řetězců DNA (Alberts, 1998). Proces se opakuje tolikrát, dokud není dosaženo potřebného stupně amplifikace. Amplifikace je exponenciální, po 30 amplifikačních cyklech vznikne více než miliarda kopií detekované sekvence DNA (Snustad et Simmons, 2009).

Jelikož primery musí být chemicky syntetizovány, může být PCR použita pouze pro klonování takové DNA, u které známe alespoň začáteční a koncovou nukleotidovou sekvenci. PCR je velmi citlivá metoda, která umožňuje detekci jediné kopie DNA ve vzorku. Tuto sekvenci namnoží do té míry, až ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detekovat (Alberts, 1998).

Hlavní zlepšení v PCR-amplifikaci DNA přišlo s objevem termostabilní DNA-polymerázy v termofilní bakterii *Thermus aquaticus*. Tato polymeráza, které se říká *Taq*-polymeráza, zůstává během teplotně denaturačního kroku aktivní, a nemusí se tedy přidávat po každém denaturačním cyklu (Snustad et Simmons, 2009).

3.3.5.1.1 Studium produktů PCR

Z PCR vychází celá řada experimentů, které se zaměřují na studium amplifikovaného produktu a snaží se získat informace o molekule DNA, která sloužila jako původní templát (Brown, 2007).

1. Agarózová elektroforéza PCR produktu.

Výsledky většiny PCR experimentů se ověřují elektroforézou části amplifikované reakční směsi v agarózovém gelu. Po obarvení ethidium bromidem se amplifikovaná DNA objeví jako pruh. Pokud je výtěžek DNA nízký, produkt detekujeme pomocí Southernovy hybridizace. Jestliže se očekávaný proužek neobjeví, nebo se objeví také proužky jiné, znamená to, že se někde stala chyba, a experiment budeme muset zopakovat (Brown, 2007).

Agarózové gelové elektroforézy se užívá nejen k potvrzení správného průběhu experimentu, ale také k získání dalších informací. Ty získáme například tak, že dřív než přistoupíme k elektroforéze, na produkt PCR aplikujeme restriční endonukleázu, a tak zjistíme přítomnost restričních míst na amplifikovaném úseku templátové DNA. Jde o tzv. analýzu polymorfizmu délky restričních fragmentů (RFLP analysis), která má význam při konstrukci genomových map a také při studiu genetických chorob (Brown, 2007).

2. Klonování PCR produktů.

Úspěch klonování fragmentů vytvořených PCR závisí na několika faktorech, mezi něž patří čistota produktu, výběr restričních enzymů, návrh primeru a volba plazmidu. Byly vyvinuty nové zdokonalené postupy, které zvyšují účinnost klonování. V podstatě každý klonovací vektor může být použit pro klonování produktu PCR, ačkoli větších úspěchů se obvykle dosáhne s relativně malými vektory (2,5 – 5 kbp) (McPherson et Møller, 2007).

3. Sekvenování PCR produktů.

Sekvenování DNA umožňuje zjistit pořadí nukleotidů. Reakční směs, kterou při sekvenování teplotním cyklem připravujeme, je – až na dvě výjimky – stejná jako směs PCR. První rozdíl spočívá v tom, že do reakce přidáváme jen jeden primer, což znamená, že amplifikační proces charakteristický pro PCR nenastává a kopíruje se pouze jedno vlákno templátové DNA. Toto kopírování se však mnohokrát opakuje, protože reakce je teplotně cyklována a enzym indukující kopírování je termostabilní. Druhý rozdíl představuje skutečnost, že se do reakční směsi přidávají dideoxynukleotidy, nově syntetizované molekuly jsou proto ukončenými vlákny (Brown, 2007).

3.3.5.1.2 Real-time PCR

Real-time PCR se začala čím dál víc používat v diagnostických laboratořích veterinární i humánní medicíny. Od roku 1992, ve kterém byla real-time PCR poprvé popsána, došlo k významnému zlepšení v chemii, analýze dat a cenové dostupnosti platform real-time PCR. Základní rozdíl mezi real-time a konvenční PCR je, že produkty real-time reakce se měří v "reálném čase", v němž se PCR reakce provádí, spíše než po ukončení reakce. V real-time PCR je přidán fluorescenční detektor a fluorescence každého vzorku se měří v průběhu každého cyklu amplifikace. Použití fluorescence pro detekci ampliconů PCR zlepšuje dynamický rozsah real-time PCR (Wang et al., 2012).

Tato technologie je flexibilní, bylo vynalezeno mnoho alternativních přístrojů a systémů fluorescentních sond, které jsou v současné době dostupné. Real-time PCR může být rychle dokončena, neboť nejsou potřeba žádné postamplifikační manipulace. Identifikace amplifikovaných produktů pomocí sondy v real-time je velmi přesná ve srovnání s gelovou elektroforézou. Analýza postupu reakce umožňuje přesnou kvantifikaci cílové sekvence ve velmi širokém dynamickém rozsahu. Dalším hodnocením produktů real-time PCR v původní reakční směsi za použití sond a analýzy bodu tání lze detekovat sekvenční polymorfismus včetně mutací jedné báze (Logan et al., 2009).

3.3.5.2 Genom psa

Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) je taxonomicky zařazen do domény *Eukaryota*, říše *Metazoa* (živočichové), kmene *Chordata* (strunatci), podmenu *Vertebrata* (obratlovci), třídy *Mammalia* (savci), nadřádu *Eutheria* (placentálové), řádu *Carnivora* (šelmy), podřádu *Caniformia* (psotvární), čeledi *Canidae* (psovití), rodu *Canis*, *Canis lupus* (vlk obecný) (NCBI).

Odhaduje se, že genom psa sestává z 3000 megabází DNA v 38 párech autozomů a chromozomech X a Y. Odhady počtu genů se pohybují okolo 35000 až 40000, nicméně skutečný počet může být vyšší. Většina psiho genomu se skládá z nekódující DNA, která je tvořena převážně opakujícími se sekvencemi. Tyto sekvence jsou důležité pro genetické mapování, individuální identifikaci, testování rodičovství i pro studium domestikace psa (Ruvinsky et Sampson, 2001). Všechny autozomy jsou akrocentrické, chromozom X je submetacentrický a metacentrický chromozom Y je ze všech nejmenší (Switonski et al., 1996).

Switonski et al. (2004) píše, že organizace psiho genomu byla studována v posledních deseti letech. Mezi nejdůležitější objevy patří genomová mapa zahrnující přes 3200 lokusů

markerů a průzkum sekvence DNA genomu. Na tomto základě může být provedena srovnávací analýza lidských a psích dědičných chorob, pes tak poslouží jako modelový organizmus pro studium geneticky podmíněných onemocnění člověka (Switonski et al., 2004).

Psí genom obsahuje 2254.63 megabází (Mb) (NCBI). Menší velikost genomu oproti lidskému je způsobena nižším výskytem opakujících se sekvencí (v genomu psa 334 Mb, u člověka 609 Mb), což ukazuje nižší aktivitu endogenních retrovirových a DNA transpozonů a také skutečnost, že SINE element je u psa menší. Psí genom má více než 2,5 milionu SNP (Single Nucleotide Polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus), to odpovídá hustotě přibližně jeden polymorfismus na kb (Lindblad-Toh et al., 2005).

3.3.6 Plemena psů postižená CEA

Anomálie oka kolie je dědičnou poruchou nejběžněji postihující především ovčácká plemena psů příbuzná koliím (Lowe et al., 2003). Mezi tato plemena patří dlouhosrstá a krátkosrstá kolie, border kolie, australský ovčák, šeltie a lancashirský patař (Bedford, 1982). Podle molekulární studie DNA, kterou provedl Parker et al. (2007), byla CEA nalezena u plemen: australský ovčák a jeho miniatura, border kolie, boykin španěl, kolie krátkosrstá a dlouhosrstá, lancashirský patař, dlouhosrstý vipet, Nova Scotia duck tolling retriever, šeltie a hedvábný chrt. Všechna tato plemena jsou příbuzná koliím. Poškození, která se podobají CEA, jsou klinicky pozorována také u některých psů s fenotypem merle jako je např. louisianský leopardí pes, jezevčík a německá doga (Parker et al., 2007).

Parker et al. (2007) dále uvádí, že klinické příznaky připomínající CEA se příležitostně vyskytují i u jiných plemen, která nejsou příbuzná koliím. Jsou jimi např. bígl, německý ovčák, miniaturní nebo toy pudl a kříženci. Molekulární příčiny těchto fenotypů však dosud nebyly stanoveny (Parker et al., 2007).

Mizukami et al. (2012) poprvé prozkoumal CEA u japonského tradičního plemene Hokkaido-Kena (Hokkaido dog). U devítiměsíční feny s bílou srstí bylo nalezeno entropium spodního víčka a přidružená pigmentace rohovky, nebyly však pozorovány žádné zrakové obtíže. Rutinní oftalmoskopické vyšetření odhalilo vážnou bilaterální hypoplazii cévnatky. Delece byla potvrzena pomocí zkoušky SYBR Green-based real-time PCR. Autoři provedli vyšetření 17 psů, z nichž bylo 12, včetně rodičů postižené feny, heterozygotními přenašeči a zbývajících pět psů bylo mutantními homozygoty, tedy psy postiženými CEA. Analýza rodokmenů ukázala, že třináct psů mělo genetický vztah k postižené feně, nicméně ostatní čtyři psi s ní příbuzní nebyli, ačkoli byli příbuzní navzájem. Otázkou je, jak se alela spojená

s CEA segregovala u Hokkaido-Kena. Možné příčiny jsou: (i) v historii mohlo dojít k přimísení krve plemen příbuzných koliím, (ii) mutace spojená s CEA může být u Hokkaido-Kena nezávislá delece, (iii) mutace spojená s CEA by mohla pocházet od dávného předka společného koliím a Hokkaido-Kenovi. První možnost můžeme vyloučit kvůli velkému rozdílu ve vzhledu mezi Hokkaido-Kenem a koliemi a stejně tak je nepravděpodobné, aby náhodně vznikla identická delece uvedená ve druhé spekulaci. Z toho důvodu je nejpravděpodobnější poslední teorie, kterou mohou podpořit zprávy o příznacích podobných CEA u plemen nepříbuzných koliím, přestože tyto nálezy dosud nebyly molekulárně definované. Otázku by mohla vyřešit pečlivá SNP genotypovací technika, haplotyp a analýza vazebné nerovnováhy (Mizukami et al., 2012).

Rampazzo et al. (2005) popsal příznaky CEA u pětiletého křížence (zlatý retriever a německý ovčák) s černou barvou srsti, který trpěl progresivní tetraparézou. Podstoupil oftalmologickou zkoušku, oči vykazovaly mírný dorzomediální strabismus a mírnou anizokorii (pravá zornice byla rozšířenější). Byl odhalen rozsáhlý kolobom narušující optický disk na obou očích a bilaterální choroidální hypoplazie jeví se jako bělavé oblasti postrádající cévy. Jelikož se stav psa zhoršoval, majitelé se rozhodli pro eutanazii. Byl u něj objeven lymfom zasahující míchu, nebyl však považován za související s poruchami připomínajícími CEA. Protože anomálie zadního segmentu způsobila jen mírné zhoršení zraku, byla to náhoda, že se u tohoto křížence vyskytly poruchy podobné CEA (Rampazzo et al., 2005).

3.3.6.1 Dlouhosrstá kolie (Rough Collie)

Mooreová (2001) předkládá dvě hypotézy o původu kolie. První možností je skotský původ a jde o potomky starověkých pasteveckých psů. Druhou hypotézou je, že předchůdci kolie pocházejí z dalších různých typů pasteveckých psů, přivedených do Británie Římany. Kolie byly chovány pro sílu, výdrž, inteligenci a spolehlivost. Plemeno bylo ve svých počátcích mnohem menší než dnešní kolie, i když se už tehdy využívalo k hlídání a pasení ovcí, ochraně svých pánů a jejich majetku. Mooreová (2001) předpokládá, že zbarvení těchto psů bylo především trikolorní nebo blue merle.

Jméno plemene je odvozeno od plemene ovcí, jež bylo ve Skotsku chováno v 18. století. Těmto ovcím s černým obličejem a nohama se říkalo „colley“ a psi, kteří tato stáda hlídali a pásli, se nazývali „colley-dogs“ (Dobroruka, 2001). Další teorie naznačují, že slovo „collie“ pochází z keltského výrazu pro „užitečný“ (Mooreová, 2001). První vyobrazení těchto psů, kteří na rozdíl od dnešních kolií neměli tak dlouhou a krásnou srst, pochází z roku

1790. Colley-dogs byli kříženi s irskými setry a barzoi, po kterých zdělili úzký hrudní koš i charakter pohybu. Postupně tak vznikaly kolie dnešní podoby. Ještě na začátku 19. století byly kolie poměrně neznámým plemenem (Dobroruka, 2001).

Císařovský (1997) uvádí, že do celosvětového povědomí dostala skotského ovčáka, jak se také kolii někdy říká, anglická královna Viktorie až v roce 1860, kdy navštívila skotský Balmoral a odvezla si odtud několik ovčáckých psů do královského paláce. Podle Fogla (2000) získal kolii mezinárodní věhlas film „Lassie se vrací“, v němž Hollywood ukázal majestátnost tohoto plemene. Ve své domovině však dlouhosrstá varieta kolie tvrdě pracovala u tisícíhlavých stád ovcí pasoucích se na svazích klimaticky dosti nevlídného Skotska (Císařovský, 1997).

Dnes je kolie převážně plemenem společenským, známým svou inteligencí a oddaností, ovšem i jistou odměřeností vůči neznámým lidem a ostrostí k vetřelcům (Císařovský, 1997). Je to výborný společník, dobrý hlídač, lehce se učí základům poslušnosti, navíc je spolehlivá, aktivní a velice přátelská k dětem i k ostatním psům. Kvůli rychle rostoucí popularitě se však u kolie objevily zdravotní potíže a dědičné vady (Fogle, 2000).

Kolie jsou učenliví a věrní psi s důstojným a vznešeným vzezřením. Díky těmto vlastnostem se staly vyhledávanými společníky. Mají vrozené vlohy pro zahánění a hlídání stád a jejich hustá, dlouhá srst je chrání před nepohodou (Dobroruka, 2001). Bohatá srst vyžaduje denní česání, jelikož se v ní snadno tvoří chuchvalce (Fogle, 2000). Pro kolie je pohyb velice důležitý. Je silně orientována na práci, i při hře používá některé ze svých „pracovních návyků“, například příkrčené plížení, jako když se přibližuje k ovci, kterou nechce vyplašit (Hausman et Hausmanová, 1999).

Kolie mohou mít zbarvení jednobarevné (např. sable bez bílých odznaků, blue merle), dvoubarevné (černé s pálením, černé s bílými odznaky, sable s odznaky) i třibarevné (černé s pálením a bílými odznaky). Jsou přípustná všechna zbarvení s jakýmikoliv odznaky (Obrázek 1.). Oči mají mít tmavě hnědou barvu, výjimkou jsou modré (popř. modře skvrnitě) oči u zbarvení blue merle. Kohoutková výška je u psů 56 - 61 cm, u fen 51 – 56 cm (Dobroruka, 2001).

Obrázek 1. Dlouhosrstá kolie
Autor: Zuzana Tipková



3.3.6.2 Krátkosrstá kolie (Smooth Collie)

Fogle (2000) uvádí, že původ krátkosrsté kolie lze vystopovat až k tříbarevnému štěněti jménem Trefoil, které se narodilo roku 1873. U tohoto plemene je možné najít i stopy krve greyhoundů. Krátkosrstá varieta kolie byla používána především při převádění stád na trhy (Císařovský, 1997).

Původně se oba typy kolií vystavovaly současně, nicméně FCI uznala plemeno krátkosrsté kolie až o řadu let později (Fogle, 2000).

Jelikož se ve vrzích dlouhosrstých kolií objevovala štěňata s krátkou srstí, byla krátkosrstá kolie po většinu své historie hodnocena společně s dlouhosrstými. Povaha těchto plemen však není shodná, což je způsobeno zejména tím, že vzácnější krátkosrstá kolie má chudší genetickou výbavu a více než k práci u stáda se používala jako honák. Není tak oblíbená jako dlouhosrstá a je vzácná dokonce i ve Velké Británii. Mezi její negativní stránky patří větší sklon k plachosti a kousavosti, i přesto je to však dobrý společník, který se hodí i k životu ve městě (Fogle, 2000).

Kolie mají velikou inteligenci, ostražitost a aktivitu. Zbarvení a kohoutková výška jsou stejné jako u dlouhosrsté kolie (Obrázek 2.) (Dobroruka, 2001).

Obrázek 2. Krátkosrstá kolie
Autor: Linda Gondeková



3.3.6.3 Šeltie (Shetland Sheepdog, shetlandský ovčák)

V chladném a nehostinném klimatu Shetlandských ostrovů dokáže vyrůst jen nenáročná, přizemní vegetace, na níž se mohou pást pouze malí shetlandští poníci a malé ovce, které byly hlídány malými ovčáckými psy, jimž se říkalo peerie nebo toomie – skřítkci (Císařovský, 1997). Šeltie lidem pomáhaly v mnoha oblastech. Hlídaly dům, pásly stáda ovcí i poníků a odháněly dobytek od neohrazených políček (Dobroruka, 2001). Díky ostrovní, dlouhá staletí trvající izolaci se toto plemeno upevnilo do podoby, v níž ho v roce 1906 poprvé spatřil svět na výstavě (Císařovský, 1997). Původně nejednotný typ shetlandských ovčáckých psů se od roku 1909 postupně sjednocoval. Chovateli v Lerwicku byl založen Shetland Collie Club a oficiální uznání toto plemeno získalo roku 1914 (Dobroruka, 2001).

Podle Fogla (2000) je šeltie menší obdoba velkých pracovních ovčáků ze Skotska, ale dodává, že je pravděpodobně starobylejší a původnější než oni. Miniaturizace s sebou přináší zvýšené riziko zlomenin dlouhých tenkých kostí nohou a také vysoký sklon k dědičným trávicím problémům a očním vadám.

Fogle (2000) dále píše, že toto plemeno je považováno za výsledek křížení dlouhosrstých kolií s domácími psy na Shetlandských ostrovech, ale zřejmě má více genů původních keltských ovčáků. Dobroruka (2001) uvádí, že šeltie vznikla v dávných dobách jako produkt křížení kolií z britské pevniny s islandskými psy, nazývanými také „yakki“. Tito psi byli dovezeni na ostrovy na velrybářských lodích. Von Hahnová (2001) udává, že se na vzniku plemene podíleli špic a King Charles španěl.

V současnosti se šeltie chovají spíše jako společenší než pastevečtí psi. Povahou jsou milé, inteligentní, přítulné, ale nepřáteli se s každým. Jsou to ostražití hlídači, kteří vyžadují dostatek pohybu, aby uspokojili svůj živý temperament (Dobroruka, 2001). Vyzařuje z nich mírnost a dobrosrdečnost. Šeltie patří mezi nejcitlivější psy. Vyznačuje se oddaností a poslušností. Tihle psi jsou velmi věrní své rodině, ale vůči cizincům jsou nedůvěřiví. Jelikož jsou roky pastevectví, hlídání a práce zakódovány v její krvi, nepotřebuje tohle plemeno zvláštní pracovní výcvik. Jejich pracovní morálka je tak vyvinutá, že hlídání nebo pasení ovcí musejí nutně nahradit jinou činností (Hausman et Hausmanová, 1999). Jejich dlouhá srst s hustou a měkkou podsadou vyžaduje docela náročnou péči, časté pročešávání a každodenní kartáčování (Dobroruka, 2001).

Výška může být v rozmezí mezi 32 – 38 cm, ideální je však 34 cm. U šeltie se objevují zbarvení jednobarevné – sable nebo blue merle, dvoubarevné – černé s pálením (black and tan), černé nebo sable s bílými odznaky, třibarevné – černé s tříslovými a bílými odznaky (Obrázek 3.). Barva očí je tmavohnědá, jen u blue merle je modrá (Dobroruka, 2001).

Obrázek 3. Šeltie
Autor: Eliška Nekardová



3.3.6.4 Border kolie (Border Collie, farmářská kolie, hraniční ovčák)

Verhoef-Verhallen (2002) uvádí, že předkem border kolie byla tzv. Working Colley, která pocházela ze staroněmeckého kuli, skandinávského sobího špice a římského pracovního psa, k níž se později přidali setři a pointři.

V pozdější době byla chována především v hraničních oblastech mezi Skotskem a Anglií, zvaných Border Counties. Při chovu byli zohledňováni především psi, kteří byli

nápadní svou vynikající schopností pást. Border kolie dokázaly působivé kousky nejen při pasení stád, jsou cvičeny také například jako záchranářští nebo jako vodící psi (von Hahnová, 2001).

Ovčáci v hornatém skotském pohraničí používali tyto kolie po celá staletí, dnešní jméno však toto plemeno získalo až roku 1915, přestože v ovčáckých soutěžích vynikala již od roku 1873, ovšem pod různými názvy (Fogle, 2000). Podle von Hahnové (2001) pochází označení „border kolie“ z roku 1918. Přestože se border kolie registrují od konce 19. století, kynologické organizace je uznaly až roku 1976 (Verhoef-Verhallen, 2002).

Nejpopulárnější pracovní ovčák ve Velké Británii a v Irsku může sloužit i jako přítulný, i když poněkud obtížný společník, a to zejména ve městech. Pracovní border kolie mají silný instinkt k pronásledování škodné, který byl chovem a výcvikem přetvořen v úžasné pastýřské schopnosti. Nemá-li však vhodné vyžití, především práci a dostatečný pohyb, může se chovat destruktivně, shánět dohromady jiné psy a lidi nebo kousat (Fogle, 2000). Mezi vlastnosti těchto psů patří pracovitost, inteligence, bystrost, houževnatost, neunavitelnost, živost a citlivost (Verhoef-Verhallen, 2002).

Osrstění může být krátké nebo středně dlouhé. Povoluje se jakékoli zbarvení, ale nesmí převažovat bílá (Obrázek 4.). Výška v kohoutku se udává u psů 53 cm, u fen o něco méně (Verhoef-Verhallen, 2002).

Obrázek 4. Border kolie
Autor: Eliška Nekardová



3.3.6.5 Australský ovčák (Australian Shepherd)

Kořeny australského ovčáka jsou z větší části spojeny se psy, kteří se dostali na západ Spojených států amerických v letech 1940 až 1970. V důsledku druhé světové války zde byl nedostatek pracovních sil, a byly proto najímány stovky baskických pasáků ovcí ze Španělska, kteří přijížděli i se svými ovčáckými psy. „Malí modří psi“ se začali objevovat ve významném počtu, díky čemuž začali být bráni na vědomí. Z původně neznámého plemene se během několika málo desítek let stalo plemeno velmi oblíbené (Hartnagle-Taylorová, 2013).

Původ jména plemene se pojí s jinou historií. Někteří španělští Baskové připluli i se svými psy do Austrálie, protože doufali, že zde seženou práci na velkých farmách s ovce. Zjistili však, že zdejší ovce jsou chovány na stálých pastvách a není nutné je přesouvat mezi letní a zimní pastvou. Přijali proto práci na nákladních lodích a starali se o ovce po dobu jejich přepravy do USA. A jelikož se jejich psi dostali do Ameriky na lodích z Austrálie, začalo se jim říkat „australští ovčáci“ (Hartnagle-Taylorová, 2013). Podle Coile (2009) však název pravděpodobněji pochází od imigrantů, kteří dorazili z Austrálie již kolem roku 1850.

V letech 1950 až 1960 byla veřejnosti představena nesmírná inteligence australských ovčáků, protože se objevovali na rodeích, kde předváděli nejrůznější triky. Dále jejich obliba vzrostla díky filmovému průmyslu (Coile, 2009).

Tito psi měli silné ovčácké schopnosti a byli velice oddáni svým pánům. Byli mimořádně učenliví, ale dostatečně samostatní a schopní se o sebe postarat v téměř každé situaci. Mezi jejich přednosti patřila i nebojácnost, inteligence a spolehlivost. Vyznačovali se vytrvalostí a měli dostatek sil, aby hnali velká stáda ovcí na otevřeném prostoru (Hartnagle-Taylorová, 2013). Mezi jejich další vlastnosti patří poslušnost, hravost, věrnost. Dokáže být způsobilým a klidným psem v domě, pokud má přiměřené pracovní vyčerpání přes den – fyzické i psychické. Jsou dobrými hlídači (Coile, 2009).

V současnosti se využívá jako služební pes, především při pátrání a záchraně osob (Fogle, 2000). Australští ovčáci se začínají používat i jako vodící psi, ti musí být přátelští, středního temperamentu, dostatečně velcí, spolehliví a schopní pracovat i v náročných situacích. Můžou se využívat také jako psi signální pro neslyšící, tyto psi jsou inteligentní, pozorní ke svému majiteli a touží mu vyhovět. Přizpůsobivý, snadno vycvičitelný pes se může stát asistentem handicapovaných osob. Vyrovnaný a přátelský pes také může se svým psovodem docházet do nemocnic, pečovatelských domů apod. a přinášet zdejším lidem radost a potěšení, takovýto pes musí umět snášet nečekané chování i přehnanou pozornost (Hartnagle-Taylorová, 2013).

Zbarvení je přípustné blue merle (Obrázek 5.), černé, red merle a červené (Obrázek 6.). Kohoutková výška se pohybuje mezi 46 a 58 cm (Fogle, 2000).

Obrázek 5. Australský ovčák blue merle s bílými znaky a hnědým pálením
Autor: Zuzana Tipková



Obrázek 6. Australský ovčák červený s bílými znaky a hnědým pálením
Autor: Zuzana Tipková



3.3.6.6 Nova Scotia duck tolling retriever (kanadský retriever)

Plemeno Nova Scotia duck tolling retriever vzniklo v Novém Skotsku v Kanadě na počátku 19. století. Říká se, že bylo vyšlechtěno z červeného Decoyova psa, který byl dovezen z Evropy a křížen se španěly, setry a farmářskými koly (Clark, 2014).

Prošlechtění probíhalo v 80. letech 20. století a plemeno bylo v Kanadě uznáno v roce 1945. Název tohoto plemene byl odvozen od staroanglického slova „tollen“, které znamená lákat. Tito retrieveři se vypouštěli na pobřeží, zatímco lovci kráčeli rovnoběžně s břehem, a když kachny a husy, přilákané aktivitou psa, připluly na dostřel, lovci své psy odvolali, počkali, až ptáci vzlétnou, a poté stříleli. Dále pes pracoval jako přinášeč (Fogle, 2000).

Je to velmi ostražitý a aktivní pes, nejmenší z retrieverů. Práce pro něj představuje zábavu a vzrušení, potřebuje být nějak zaměstnán každý den (Clark, 2014).

Srst je střední délky a její barva může mít jakýkoli odstín červené a oranžové. Ideální velikost tohoto plemene je 43 – 51 cm (Fogle, 2000).

4 Diskuze

Příčinnou mutaci pro CEA objevili Lowe et al. (2003) jako delecii 7799 bp v intronu genu *NHEJ1* chromozomu 37. Od té doby se vědci snažili přijít na molekulární genetické metody, které by odhalily mutaci a zároveň byly rychlé, snadno proveditelné a cenově dostupné pro veřejnost.

Parker et al. (2007) ve své studii vytvořili dvoukrokový test PCR, který využívá dva páry primerů k rychlé detekci mutace v chromozomech. Také zjistili, že primární mutace CEA se objevila jako alela jednoho onemocnění u společného předka ovčáckých plemen.

Dostál et al. (2010) provedli jednoduchou metodu PCR pomocí PikoTM termocykleru, použili nekoagulované vzorky krve v malém množství pro analýzu genu *NHEJ1*. Nebyla potřeba izolace DNA ze vzorků krve. Tato metoda je jednoduchá a šetří čas, je vhodná i pro malá a toy plemena. Dále doporučili chovatelský program chovatelům v České republice pro plemena dlouhosrstá kolie, šeltie, border kolie a australský ovčák, který by odstranil alelu onemocnění. Jelikož v populaci vyšetřovaných dlouhosrstých kolií nenalezli žádného zdravého jedince, usoudili, že by se zprvu měli vzájemně křížit přenašeči a z těchto psů by vzešlo v průměru 25 % zdravých štěňat, 25 % postižených CEA a 50 % přenašečů. Tím by nedocházelo k velkým ztrátám jiných vlastností plemene, které chovatelé chtějí zachovat. Muselo by současně probíhat testování všech psů a dále by pářili zdravé homozygoty s přenašeči nebo postiženými jedinci. Dále uvádějí, že chov krátkosrstých kolií a šeltií bude snadnější, jelikož u těchto plemen není frekvence CEA tak vysoká, lze tedy spolu rozmnožovat zdravé psy s postiženými nebo přenašeči.

U plemene Nova Scotia duck tolling retriever je vytvoření správného šlechtitelského programu složitější, protože se u tohoto plemene vyskytuje další dědičné onemocnění (progresivní degenerace tyčinek a čípků).

Chang et al. (2010) vyvinuli rychlou genotypovací techniku založenou na SYBR Green real-time PCR, která by sloužila k rozsáhlým průzkumům a měla by pomoci vymýtit CEA z chovu psů. Tato metoda v kombinaci s FTA card (Flinders Technology Associates filter paper) je rychlá a umožňuje jednodušší přípravu vzorků.

V současnosti mohou chovatelé využít dostupných genetických metod detekce CEA a na základě výsledků naplánovat selekci. U plemen s nízkým výskytem CEA, jako je border kolie a australský ovčák, se doporučuje nezařazovat postižené jedince do chovu vůbec (Dostál et al., 2010). Může tak dojít k vymýcení choroby, ale na druhou stranu plemeno může také přijít o jinak vynikající jedince, čímž dochází ke ztrátám genetického materiálu a snižování

genetické variability. Genetickými testy lze zjistit i stupeň příbuzenské plemenitby, což se dá využít pro zlepšení heterozygotnosti plemene (Wachtel, 1998).

Genetická kontrola variability klinických příznaků není dosud známa, a proto by se mělo pokračovat ve zkoumání tohoto onemocnění. Důležité je studium CEA i pro humánní medicínu. Lowe et al. (2003) zavedli psa jako zvířecí model pro výzkum embryonálního vývoje oka. Srovnávací mapy lidského a psího genomu mohou být použity k nalezení mutací způsobujících onemocnění. Uvažuje se také o myši jako transgenním modelu pro studium chorob, jelikož genom všech savců je velmi podobný a myš má krátkou generační dobu (Palánová, 2015).

CEA je vrozená vada, a tak je podle Palánové (2015) možným objasněním její příčiny důležitost některých transkripčních faktorů, které se vážou na části genu podléhající deleci, pro embryonální vývoj postižené části oka. Dosud však nebyla provedena žádná studie, která by se zabývala embryonální či postnatální expresí těchto bílkovin.

Protože jsou psi bráni jako domácí mazlíčci, jejich majitelé nejsou povinni hlásit dědičné choroby žádnému úřadu. Z toho důvodu není možné ověřit, jestli je u recesivních homozygotů např. zvýšený výskyt rakoviny či poruch imunity. Bylo by záhodné zjistit, zda psi postižení CEA netrpí nějakými dalšími zdravotními problémy. Je nutné stanovit, jak se delece podílí na vývoji klinických příznaků CEA (Palánová, 2015).

5 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala onemocněním CEA (anomálie oka kolíí) u plemen psů využívaných pro aktivity a terapie za asistence zvířat. Sepsala jsem literární rešerši obsahující anatomii oka, vymezení pojmů AAA (animal-assisted activity), AAT (animal-assisted therapy), AAE (animal-assisted education) a AAI (animal-assisted intervention). V kapitole Anomálie oka kolíí jsem shrnula příznaky, diagnostiku, genetiku, genetické testování, popsala jsem metodu PCR a genom psa, plemena predisponovaná k tomuto onemocnění a ta častěji používaná v AAA a AAT jsem přiblížila více.

Cílem mé kompilační práce bylo shromáždit a prostudovat současnou literaturu zabývající se anomálií oka kolíí (CEA) a zaměřit se na plemena psů využívaná při aktivitách za přímé asistence člověka (AAA, AAT, AAE). Dále jsem se snažila ve vědeckých článcích nalézt nejnovější metody analýzy DNA, které by usnadnily detekci mutantního genu zodpovědného za CEA. Metoda Changa et al. založená na SYBR Green real-time PCR je rychlá a efektivní, mohla by se proto používat na rozsáhlé průzkumy. Technika PCR, vyvinutá Dostálem et al., je jednoduchá a rychlá, vhodná i pro malá plemena, protože na ni postačí malé množství krve. Jelikož byla tato metoda vypracována v České republice, bude vyhovující pro naše podmínky. U nás však zatím neprobíhá komerční testování na CEA.

V současnosti mohou chovatelé predisponovaných plemen využít služeb laboratoří, které provedou analýzu DNA jejich psa a zjistí, zda je přenašeč, zdravý či postižený CEA. Podle toho by měl zodpovědný chovatel najít k tomuto psovi vhodného partnera, nebo může postiženého psa (recesivního homozygota) vyřadit z plemenitby, aby nepřenášel na potomstvo defektní alelu. Jelikož je ale v ČR jen málo zdravých jedinců (dominantních homozygotů), nelze CEA pozitivní psy vyřadit z chovu úplně, došlo by tak ke ztrátě cenného genetického materiálu jinak výborných jedinců a snížila by se genetická variabilita, což je problémem čistokrevných plemen psů.

Jedinci postižení střední formou CEA mohou být využíváni pro aktivity a terapie za asistence zvířat, pokud mají vhodnou povahu, protože jejich zdraví není příliš zasaženo, ve většině případů si udrží normální zrakové funkce po celý život.

Jsou potřeba provést další studie, které by odhalily skutečnou příčinu rozmanitosti příznaků CEA. Také by bylo užitečné vést evidenci čistokrevných plemen a zjistit, zda s CEA nesouvisí i jiná onemocnění (imunodeficiencie, rakovina).

6 Seznam literatury

Alberts, B. 1998. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. Espero. Ústí nad Labem. 630 s. ISBN: 8090290604.

Bedford, P. G. C. 1982a. Collie eye anomaly in the border collie. *Veterinary Record*. 111 (2). 34-35.

Bedford, P. G. C. 1982b. Collie eye anomaly in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 111 (12). 263-270.

Beránek, J., Spiess, B. M., Vít, P. J. 2000. Nemoci očí a víček. In: Svoboda, M., Senior, D. F., Doubek, J., Klimeš, J. (eds). *Nemoci psa a kočky*. Noviko. Brno. s. 553-610. ISBN: 8090259529.

Bjerkås, E. 1991. Collie eye anomaly in the rough collie in Norway. *Journal of Small Animal Practice*. 32 (2). 89-92.

Brown, T. 2007. Klonování genů a analýza DNA: úvod. Univerzita Palackého. Olomouc. 389 s. ISBN: 9788024417196.

Císařovský, M. 1997. Plemena psů. Aventinum. Praha. 256 s. ISBN: 8071510327.

Clark, R. D. 2014. *Medical, Genetic & Behavioral Risk Factors of Nova Scotia Duck Tolling Retrievers*. Xlibris Corporation. p. 24. ISBN: 9781799084900.

Coile, D. C. 2009. *Australian Shepherds: Everything about Purchase, Care, Nutrition, Behavior, and Training*. 2nd ed. Barron's Educational Series. Hauppauge, NY. p. 111. ISBN: 0764141376.

Dobroruka, L. J. 2001. *Psi*. 5. vyd. Aventinum. Praha. 223 s. ISBN: 8071511846.

Donovan, E. F., Wyman, M. 1965. Ocular Fundus Anomaly in the Collie. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 50 (12). 1465-1469.

Dostál, J. 1995. Chov psů: genetika v kynologické praxi. Dona. České Budějovice. 206 s. ISBN: 808546358X.

Dostál, J., Horák, P., Hrdlicová, A., Stratil, A. 2010. Simplified PCR analysis of a mutation in the *NHEJ1* gene causing Collie eye anomaly in some dog breeds. Czech Journal of Animal Science. 55 (8). 346-350.

Dubielzig, R. R., Ketring, K. L., McLellan, G. J., Albert, D. M. 2010. Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review. Elsevier Health Sciences. Philadelphia. p. 800. ISBN: 9780702044427.

Fine, A. H. 2010. Handbook on Animal-Assisted Therapy: Theoretical Foundations and Guidelines for Practice. 3rd ed. Academic Press. San Diego. p. 588. ISBN: 9780123814548.

Fine, A. H., Mackintosh, T. K. 2015. Animal-Assisted Interventions: Entering a Crossroads of Explaining an Instinctive Bond under the Scrutiny of Scientific Inquiry. In: Friedman, H. S. (ed.). Encyclopedia of Mental Health. 2nd ed. Academic Press. San Diego. p. 68-72. ISBN: 0123977533.

Fogle, B. 2000. Atlas psů do kapsy. Cesty. Praha. 431 s. ISBN: 8071814563.

Glaze, M. B. 2010. The Eye. In: Peterson, M. E., Kutzler, M. A. (eds.). Small Animal Pediatrics: The First 12 Months of Life. Elsevier Health Sciences. St. Louis, Missouri. p. 493-526. ISBN: 9781437701951.

Gough, A., Thomas, A. 2010. Breed Predispositions to Disease in Dogs and Cats. 2nd ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa. p. 330. ISBN: 1405180781.

Gupta, P. 2009. Cell and Molecular Biology. Rastogi Publications. Meerut, India. p. 963. ISBN: 9788171338177.

Hahnová, D. von. 2001. Kolie a šeltie: správná péče a porozumění: rady odborníků pro výchovu, péči a výživu. Nakladatelství Vašut. Praha. 63 s. ISBN: 8072361503.

- Hatch, A. 2007. The View from All Fours: A Look at an Animal-Assisted Activity Program from the Animals' Perspective. *Anthrozoös*. 20 (1). 37-50.
- Hartnagle-Taylorová, J. J. 2013. *Australský ovčák od A do Z*. Plot. Praha. 379 s. ISBN: 9788074281983.
- Hausman, G., Hausmanová, L. 1999. *Historie psích plemen: legendy a zprávy o psech z dob dávných a nedávných: mytologie psů: historie, mytologie, tradice a současnost jednotlivých plemen*. Beta-Dobrovský. Praha. 276 s. ISBN: 8086278085.
- Hoskins, J. D., Glaze, M. B. 2001. The Eye. In: Hoskins, J. D. (ed.) *Veterinary Pediatrics: Dogs and Cats from Birth to Six Months*. Saunders. Philadelphia. p. 270-299. ISBN: 0721676650.
- Chandler, C. K. 2012. *Animal Assisted Therapy in Counseling*. 2nd ed. Routledge. New York. p. 424. ISBN: 1136833994.
- Chang, H. S., Mizukami, K., Yabuki, A., Hossain, M. A., Rahman, M. M., Uddin, M. M., Arai, T., Yamato, O. 2010. A novel rapid genotyping technique for Collie eye anomaly: SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction method applicable to blood and saliva specimens on Flinders Technology Associates filter paper. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22 (5). 708-715.
- Kvapilíková, K. 2000. *Anatomie a embryologie oka: učební texty pro oční optiky a oční techniky, optometristy a oftalmology*. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně. Brno. 206 s. ISBN: 8070133139.
- Lindblad-Toh, K. (ed). 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438 (7069). 803-819.
- Logan, J., Edwards, K. J., Saunders, N. A. 2009. *Real-time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press. Norfolk. p. 284. ISBN: 9781904455394.

- Lowe, J. K., Kukekova, A. V., Kirkness, E. F., Langlois, M. C., Aguirre, G. D., Acland, G. M., Ostrander, E. A. 2003. Linkage mapping of the primary disease locus for collie eye anomaly. *Genomics*. 82 (1). 86-95.
- Maxie, G. 2015. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals - E-Book: 3-Volume Set. 6th ed. Elsevier Health Sciences. Edinburgh. p. 2456. ISBN: 0702063193.
- McPherson, M. J., Møller, S. G. 2007. PCR The Basics. 2nd ed. Garland Science. Hoboken. p. 292. ISBN: 9780203002674.
- Mizukami, K., Chang, H. S., Ota, M., Yabuki, A., Hossain, M. A., Rahman, M. M., Uddin, M. M., Yamato, O. 2012. Collie eye anomaly in Hokkaido dogs: case study. *Veterinary Ophthalmology*. 15 (2). 128-132.
- Mooreová, S.. 2001. Kolie. Fortuna Print. Praha. 157 s. ISBN: 8086144704.
- Mülhardt, C. 2010. Molecular Biology and Genomics. Elsevier Academic Press. Boston. p. 272. ISBN: 0080467660.
- Odendaal, J. S. J., Meintjes, R. A. 2003. Neurophysiological Correlates of Affiliative Behaviour between Humans and Dogs. *The Veterinary Journal*. 165 (3). 296-301.
- Palánová, A. 2015. Collie eye anomaly: a review. *Veterinarni Medicina*. 60 (7). 345-350.
- Parker, H. G., Kukekova, A. V., Akey, D. T., Goldstzein, O., Kirkness, E. F., Baysac, K. C., Mosher, D. S., Aguirre, G. D., Acland, G. M., Ostrander, E. A. 2007. Breed relationships facilitate fine-mapping studies: A 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Research*. 17 (11). 1562-1571.
- Rampazzo, A., D'Angelo, A., Capucchio, M. T., Sereno, S., Peruccio, C. 2005. Collie eye anomaly in a mixed-breed dog. *Veterinary Ophthalmology*. 8 (5). 357-360.
- Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada. Praha. 473 s. ISBN: 9788024732824.

Roberts, S. R. 1967. Color dilution and hereditary defects in collie dogs. *American Journal of Ophthalmology*. 63 (6). 1762–1775.

Ruvinsky, A., Sampson, J. 2001. *The Genetics of the Dog*. CAB International. New York. p. 571. ISBN: 9780851990781.

Sargan, D. S. 2001. Collie eye anomaly in the rough collie. *Journal of Small Animal Practice*. 42 (4). 204.

Snustad, D., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*. Masarykova univerzita. Brno. 871 s. ISBN: 9788021048522.

Suriyaphol, G. 2011. Genes Associated with Genetic Diseases in Collies, Shetland Sheepdogs and Border Collies. *Thai Journal of Veterinary Medicine*. 41 (2). 135-142.

Switonski, M., Reimann, N., Bosma, A. A., Long, S., Bartnitzke, S., Pienkowska, A., Moreno-Milan, M. M., Fischer, P. 1996. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. *Chromosome Research*. 4 (4). 306-309.

Switonski, M., Szczerbal, I., Nowacka, J. 2004. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. *Journal of Applied Genetics*. 45 (2). 195-214.

Tilley, L. P., Smith, F. W. K. Jr. 2011. *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Canine and Feline*. 5th ed. John Wiley & Sons. Chichester. p. 1600. ISBN: 9780470961056.

Verhoef-Verhallen, E. 2002. *Border kolie: koupě, péče, krmení, výchova, chov*. Rebo. Čestlice. 127 s. ISBN: 8072342142.

Vít, P. J., Beránek, J. 1994. *Praktická oftalmologie psa*. Medicus veterinarius. Brno. 89 s.

Wachtel, H. 1998. *Chov psů v roce 2000*. Dona. České Budějovice. 277 s. ISBN: 8086136299.

Wallin-Håkanson, B., Wallin-Håkanson, N., Hedhammar, A. 2000. Collie eye anomaly in the rough collie in Sweden: genetic transmission and influence on offspring vitality. *Journal of Small Animal Practice*. 41 (6). 254-258.

Wang, C., Kaltenboeck, B., Freeman, M. D. 2012. *Veterinary PCR Diagnostics*. Bentham Science Publishers. Sharjah. p. 144. ISBN: 9781608053483.

Yakely, W. L. 1972. Collie Eye Anomaly: Decreased Prevalence Through Selective Breeding. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 161 (10). 1103-1107.

Yakely, W. L., Wyman, M., Donovan, E. F., Fechheimer, N. S. 1968. Genetic Transmission of an Ocular Fundus Anomaly in Collies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 152 (5). 457-461.

Elektronické zdroje

National Center for Biotechnology Information [online]. [cit.2016-04-02]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid9612%5borgn>>.

7 Seznam tabulek

Tabulka 1. Sekvence primerů. Str. 24.

8 Seznam obrázků

Obrázek 7. Dlouhosrstá kolie. Autor: Zuzana Tipková. Str. 31.

Obrázek 8. Krátkosrstá kolie. Autor: Linda Gondeková. Str. 32.

Obrázek 9. Šeltie. Autor: Eliška Nekardová. Str. 33.

Obrázek 10. Border kolie. Autor: Eliška Nekardová. Str. 34.

Obrázek 11. Australský ovčák blue merle s bílými znaky a hnědým pálením. Autor: Zuzana Tipková. Str. 36.

Obrázek 12. Australský ovčák červený s bílými znaky a hnědým pálením. Autor: Zuzana Tipková. Str. 36.