

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Molekulární detekce mutace genu *MDR1* zodpovědné za neurotoxicitu některých léků u psů

Bakalářská práce

Autor práce: Denisa Lehnerová

Obor studia: Speciální chovy

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Molekulární detekce mutace genu *MDR1* zodpovědné za neurotoxicitu některých léků u psů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. 4. 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při konzultacích a psaní bakalářské práce. Velké díky patří Ing. Daniele Čílové za pomoc v laboratoři při praktické části bakalářské práce, za její ochotu a poskytnuté rady.

Molekulární detekce mutace genu *MDR1* zodpovědné za neurotoxicitu některých léků u psů

Souhrn

Bakalářská práce na téma "Molekulární detekce mutace genu *MDR1* zodpovědné za neurotoxicitu některých léků u psů" zahrnuje literární řešerši dané problematiky a experimentální část, která byla provedena na katedře genetiky a šlechtění. Literární řešerše je zaměřena hlavně na funkci efluxního transportéru P-glykoproteinu a poruchu této funkce způsobenou mutací kódujícího genu *MDR1*. Jsou zde uvedena nejčastěji postižená plemena a léky, které slouží jako substrát P-glykoproteinu a mohou se podílet na výše uvedené neurotoxicitě.

Z literární řešerše je jednoznačné, že mutace genu *MDR1* je způsobena delecí 4 nukleotidů ve 4. exonu na nukleotidové pozici 230. Důsledkem této mutace je posun čtecího rámce a vytvoření předčasného stopkodonu. Syntetizovaný P-glykoprotein není úplný a ztrácí svou ochrannou funkci, která mimo jiné spočívá v zabraňování penetrace xenobiotik do tkání mozku. Recesivní homozygoti s mutací genu *MDR1* po podání některých léčiv projevují známky neurotoxicity, které mohou zahrnovat pohybové poruchy, problémy s koordinací, chvění, zvracení, dezorientaci až úhyn zvířete.

Mutace genu *MDR1* postihuje mnoho plemen a jejich kříženců a vzhledem k bezpříznakovosti nosičů tohoto genetického postižení, není pro veterinární pracovníky a majitele psů jednoduché rozhodnout o případné léčbě.

Experimentální část je zaměřena na izolaci DNA z bukalních stěrů jedinců plemen border kolie, bearded kolie a československý vlčák a optimalizaci DNA primerů. Dále vytvoření PCR markerů, následnou fragmentační analýzu na kapilární elektroforéze a sekvenací PCR amplikonu.

Výsledky experimentální části v naší skupině psů nepotvrdily literárně udávanou alelickou frekvenci mutované alely *MDR1*, což může být způsobeno tím, že mutovaná alela se v českých chovech vyšetřovaných psů zatím nevyskytuje anebo je její výskyt velmi nízký.

Nicméně použitá metoda je neinvazivní a vhodná pro rychlou identifikaci psů, u kterých se předpokládá anebo je riziko výskytu mutované alely *MDR1* a to jak pro zahájení léčby nebo majitele chovných stanic k zabránění zavlečení mutované alely *MDR1* do chovu.

Klíčová slova: *Canis familiaris*, gen *MDR1*, mutace, P-glykoprotein, PCR, kapilární elektroforéza

Molecular detection of mutation in the *MDR1* gene responsible for the neurotoxicity of certain drugs in dogs

Summary

This bachelor paper named "Molecular detection of *MDR1* gene mutation responsible for neurotoxicity of certain dog medication" covers literary research of given matter and experimental part performed at the Department of Genetics and Breeding. The theoretical part is mainly focused on the function of efflux transporters of P-glycoprotein and its inhibition caused by *MDR1* coding gene mutation. The most commonly affected breeds are subjected to analysis as well as the medication functioning as a P-glycoprotein substrate that may be attributed for above-mentioned neurotoxicity.

Based on the literary research, it is clear that the *MDR1* gene mutation is caused by the deletion of 4 nucleotides in the 4th exon on the nucleotide position 230. The result of this mutation is shifted reading frame and creation of an premature stop codon. Synthesized P-glycoprotein is not complete and loses its protective function that involves preventing xenobiotics from brain tissue penetration. Recessive homozygote with *MDR1* gene mutation have neurotoxic symptoms after administration of certain medication that include movement disorders, coordination problems, shivering, nausea, disorientation and even death. *MDR1* gene mutation affects a number of breeds and their crossbreeds. With regard to unmarked character of carriers of this genetic defect, it is substantially difficult for veterinary workers and animal owners to determine an adequate treatment.

Experimental part is focused on isolation of DNA from buccal swabs of individual subjects from the test group composed by border collie, bearded collie and Czechoslovakian wolfdog breeds, and DNA primer optimization. Furthermore, PCR markers are created with subsequent fragmentation analysis on capillary electrophoresis and PCR amplicon sequencing. The results of the experimental part have not confirmed allelic frequency of mutated allele *MDR1* stipulated by the literary sources within the dog test group. This may result from absence of mutated allele across Czech breeding stations or its rare occurrence. Nevertheless, the used method is non-invasive and suitable for rapid identification of dogs with indication or animals with high inclination to mutated *MDR1* allele. This method is suitable for symptom examination prior to medical treatment or for preventing the introduction of a mutated *MDR1* allele into an existing breeding station.

Keywords: *Canis familiaris*, *MDR1* gene, mutation, P-glycoprotein, PCR, capillary electrophoresis

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Vědecké hypotézy a cíle práce.....	2
2.1	Vědecké hypotézy	2
2.2	Cíle bakalářské práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Původ a domestikace psa	3
3.2	Genom psa.....	5
3.2.1	Historie studií genomu psa	5
3.2.2	Stavba genomu psa	6
3.3	Molekulární charakteristika genu <i>MDR1</i>	6
3.3.1	Gen <i>MDR1</i>	6
3.3.2	Mutace genu <i>MDR1</i>	6
3.3.3	Model dědičnosti genu <i>MDR1</i>	8
3.4	ABC transportní proteiny	13
3.5	P-glykoprotein	14
3.5.1	Historie identifikace P-glykoproteinu.....	14
3.5.2	Struktura P-glykoproteinu.....	15
3.5.3	Mechanismus funkce P-glykoproteinu	16
3.5.4	Fyziologická funkce P-glykoproteinu.....	17
3.5.5	Substráty P-glykoproteinu	20
3.5.6	Inhibitory P-glykoproteinu	21
3.5.7	Farmakokinetika P-glykoproteinu	22
3.6	Problémové léky pro psy s mutací <i>MDR1</i>	23
3.6.1	Makrocyclické laktony	24
3.6.1.1	Ivermectin.....	27
3.6.1.2	Selamectin	28
3.6.1.3	Abamectin (Avermectin B ₁).....	29
3.6.1.4	Milbemycin.....	29
3.6.1.5	Doramectin, Eprinomectin a Nemadectin	30
3.6.1.6	Moxidectin.....	30
3.6.2	Loperamid	31
3.6.3	Ostatní léky	31
3.7	Nejčastější plemena postižená <i>MDR1</i> mutací	32
3.7.1	Bobtail, staroanglický ovčák.....	32
3.7.1.1	Historie	32
3.7.1.2	Celkový vzhled.....	32

3.7.1.3	Povaha	32
3.7.2	Kolie dlouhosrstá, krátkosrstá.....	33
3.7.2.1	Historie	33
3.7.2.2	Celkový vzhled.....	34
3.7.2.3	Povaha	34
3.7.3	Šeltie	35
3.7.3.1	Historie	35
3.7.3.2	Celkový vzhled.....	35
3.7.3.3	Povaha	35
3.7.4	Border kolie	36
3.7.4.1	Historie	36
3.7.4.2	Celkový vzhled.....	36
3.7.4.3	Povaha	36
3.7.5	Německý ovčák.....	37
3.7.5.1	Historie	37
3.7.5.2	Celkový vzhled.....	37
3.7.5.3	Povaha	38
3.7.6	Bílý švýcarský ovčák	38
3.7.6.1	Historie	38
3.7.6.2	Celkový vzhled.....	39
3.7.6.3	Povaha	39
3.7.7	Australský ovčák.....	39
3.7.7.1	Historie	39
3.7.7.2	Celkový vzhled.....	40
3.7.7.3	Povaha	40
3.8	Laboratoře vyšetřující mutaci genu <i>MDR1</i>	41
3.8.1	Laboratoř Genomia	41
3.8.2	Laboklin	41
3.9	Genetické metody nejčastěji používané pro detekci mutací	42
3.9.1	Polymerázová řetězová reakce.....	42
3.9.1.1	Průběh PCR	42
3.9.1.2	Složení reakční směsi	42
3.9.2	Horizontální gelová elektroforéza	44
3.9.2.1	Historie vzniku elektroforézy	44
3.9.2.2	Popis metody	44
3.9.2.3	Faktory ovlivňující průběh elektroforézy	45

3.9.2.4	Nejčastěji používané pufry	45
3.9.2.5	Velikostní marker	46
3.9.3	Kapilární elektroforéza	46
3.9.3.1	Popis metody	46
3.9.3.2	Elektroosmotický tok v kapiláře.....	47
4	Metodika	49
4.1	Plemena vybraná pro genetické testování.....	49
4.2	Izolace DNA	49
4.2.1	Postup izolace DNA.....	50
4.3	Stanovení kvantity a kvality izolované DNA	51
4.4	Optimalizace PCR amplifikace-primery <i>MDR1</i>-orig-F a <i>MDR1</i>-orig-R....	52
4.5	Detekce mutace <i>MDR1</i> pomocí kapilární elektroforézy.....	53
4.6	Optimalizace PCR amplifikace-primery <i>MDR1</i>-czu-F a <i>MDR1</i>-czu-R	55
4.7	Sekvenační analýza	56
4.7.1	Postup sekvenační analýzy	57
5	Výsledky	60
5.1	Vybraná plemena a jejich predispozice k mutaci genu <i>MDR1</i>	60
5.2	Kvalita a kvantita izolované DNA	65
5.3	Optimalizace anelačních teplot PCR markerů genu <i>MDR1</i>	67
5.4	Detekce kauzální mutace genu <i>MDR1</i> kapilární elektroforézou	68
5.5	Sekvenace ampliconů markeru genu <i>MDR1</i>	68
5.6	<i>In silico</i> bioinformatické analýzy	70
5.6.1	Ověření specifity použitých primerů <i>In silico</i> analýzou.....	70
5.6.2	<i>In silico</i> identifikace místa kauzální mutace genu <i>MDR1</i>	73
5.6.3	Sekvenční charakteristika genu <i>MDR1</i> u různých savců a ortology psiho genu <i>MDR1</i>	76
6	Diskuze	79
6.1	Volba modelových plemen při řešení bakalářské práce.....	79
6.2	Metody izolace DNA	79
6.3	Optimalizace PCR markeru genu <i>MDR1</i>	80
6.4	Detekce mutace genu <i>MDR1</i> pomocí kapilární elektroforézy.....	80
6.5	Sekvenační vyhodnocení PCR markeru genu <i>MDR1</i>	81
7	Závěr.....	82
8	Seznam použité literatury.....	84

1 Úvod

Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) je považován za nejstarší zdomácnělé zvíře. Domestikace psa započala před 15 000 lety. Člověk využíval vlastnosti psa ke své potřebě, a tak vznikl jedinečný vztah, který trvá dodnes. Žádný jiný savec nemá tak blízké spojení s člověkem. Psi se objevují ve všech světadílech v odlišných populacích a plemenech. Díky šlechtění psů člověkem existuje v dnešní době přibližně 400 psích plemen. V populaci čistokrevných psů je známo přes 350 dědičných chorob, které vznikly v inbridních programech pro zachycení speciálních morfologických znaků plemene.

MDR1 gen (multidrug resistant gene) je nezbytný pro tvorbu P-glykoproteinu, který je důležitým membránovým transportérem a je zařazován do rodiny ABC transportérů. Mutace v genu *MDR1* je označována *MDR1* nt230(del4) a jedná se o delecii čtyř párů bází ve 4. exonu, způsobující posun čtecího rámce, a tím vytvoření předčasného stop kodonu. Ukončí se syntéza P-glykoproteinu. P-glykoprotein se stává neúplným, ztrácí svou funkci a tím i obrannou schopnost. U psů tato mutace způsobuje neurotoxicitu po podání určitých léků, s typickými příznaky jako neurologická deprese, ataxie (porucha hybnosti způsobená poruchou v nervovém systému), mydriáza (rozšíření zornice), dočasná slepota, silné slinění, zvracení, chvění, kóma až smrt.

Metoda, která je dnes základem ke všem dalším molekulárně genetickým analýzám je PCR, polymerázová řetězová reakce. Metoda umožňuje namnožení konkrétního úseku DNA až do milionů kopií. Dále je možné navázat jinými metodami ke zjištění podrobnějších informací. Pro detekci PCR produktů je pak používána horizontální gelová elektroforéza, kapilární elektroforéza, sekvenační analýza a mnoho dalších metod.

Nejčasteji postižená plemena patří do skupin ovčáků. Patří sem např. border kolie, kolie krátkosrstá, kolie dlouhosrstá, německý ovčák, bílý švýcarský ovčák, bobtail, šeltie, australský ovčák a další příbuzná plemena.

V této bakalářské práci jsou vybrána taková plemena, u kterých lze předpokládat výskyt mutované alely *MDR1*. Jsou zde popsány různé metody ke zjištění delece *MDR1* nt230(del4) a jsou uvedeny postupy experimentu použité k detekci mutace *MDR1* genu zodpovědné za neurotoxicitu u těchto plemen psů.

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy

Cíle bakalářské práce vycházejí z následujících vědeckých hypotéz:

- Do skupin plemen s výskytem mutace genu *MDR1* patří nejčastěji kolie.
- Lze předpokládat výskyt této kauzální mutace i v populacích dalších plemen psů.
- Toto recesivní dědičné onemocnění je způsobeno 4bp delecí genu *MDR1* a lze předpokládat, že separace PCR amplikonů pomocí kapilární elektroforézy je dostatečně citlivá pro detekci alelických variant.

2.2 Cíle bakalářské práce

Konkrétní cíle práce vychází z uvedených hypotéz a jsou následující:

- Vypracovat ucelený literární přehled zaměřený na genetické příčiny vzniku přecitlivělosti psů k určitým lékům a antiparazitikům.
- Další část přehledu bude zaměřena na možnosti aplikace molekulárních markerů umožňujících příčinnou mutaci detekovat.
- Z praktického hlediska bude zpracován přehled laboratoří, které provádějí molekulární diagnostiku této mutace.
- Experimentální část práce bude zaměřena na izolaci genomické DNA u vybraných plemen psů, optimalizaci PCR amplifikace úseku *MDR1* genu s předpokládaným výskytem kauzální mutace, fragmentační analýzu s využitím kapilární elektroforézy a na sekvenaci navrženého markeru.

3 Literární rešerše

3.1 Původ a domestikace psa

Nejvíce rozšířenou hypotézou o původu psa, *Canis familiaris*, je domestikace psa z vlka šedého, *Canis lupus*, ve východní Asii (Koler-Matznic, 2002).

Vlk šedý byl dominantní predátor v Euroasii a Severní Americe. Jak člověk expandoval z Afriky a Euroasie, přišel do kontaktu s vlkem šedým a tak se stal pes prvním lidským společníkem. (Levi a Wilmers, 2012).

Genetické analýzy prokázaly, že pes domácí je geneticky bližší vlku šedému (*Canis lupus*), než šakalu zlatému (*Canis aureus*), kojotu (*Canis latrans*) nebo vlčku Etiopskému (*Canis simensis*), asijskému divokému psu (*Cuon alpinus*) nebo africkému divokému psu (pes hyenovitý) (*Lycaon pictus*), což jsou všechno členi jedné ze tří fylogenetických skupin druhu *Canis*, která patří pod čeleď psovitých šelem (*Canidae*). Tato čeleď se přibližně před 40 miliony lety vyvinula z velké skupiny savců zvaných šelmy (*Carnivora*) (Lindblad-Toh et al, 2005).

Studii Broad bylo také dokázáno, že během vývoje psa došlo dvakrát k velkému poklesu populace psa domácího tzv. bottleneck efekt. Poprvé tato situace nastala v rané fázi domestikace a podruhé před 50-100 generacemi při vzniku moderních plemen. Vzhledem k tomu, že v obou případech bylo k dispozici málo jedinců, muselo dojít při rozmnožování k příbuzenské plemenitbě (inbreedingu). Jedním z důsledků tzv. bottleneck efektu jsou také dědičná onemocnění (Sargan, 2004).

Pes se považuje za nejstarší zdomácnělé zvíře. Zachovalé kostry psů z vykopávek jsou staré 10 000 - 15 000 let (Najmanová a Humpál, 1981). Ovodov et al. (2011) publikovali, že nejstarší fosilní nález „psa“ je starý 33 000 let a byl nalezen na Sibiři. Není ale jisté, zda je tato fosilie předek dnes žijícího psa nebo reprezentuje nepovedené pokusy o domestikaci morfologicky podobného vyhynulého vlka.

Psi se vyvíjeli ve vzájemném prospěšném vztahu s lidmi. Sdíleli životní prostor a potravní zdroje. V posledních stoletích člověk selektivně šlechtil psy jako poslušné honiče a lovce. (Savolainen et al., 2002).

Ochočování vlka se dělo na různých místech a proto psi vykazují značnou variabilitu v barvě a druhu srsti, velikosti, stavbou kostry a vlastnostmi. Pes byl tedy první zvíře, jehož chov byl řízen člověkem. Člověk dlouho využíval dobrých vlastností psa a záměrný chov aniž

by znal vědecký genetický podklad. Vytvářel si taková plemena, která mu vyhovovala určitými vlastnostmi či tělesnými proporcemi. Vznikala tak různá plemena psů, která se chovají s malými obměnami dodnes a jiná zanikla. Až po objevení zákonů dědičnosti se člověk zaměřil na cílevědomý chov, kdy je využívána čistokrevná plemenitba a ne křížení (Najmanová a Humpál, 1981).

Na základě morfologických variací existuje v současné době přes 400 psích plemen, jako výsledek vývoje plemenných standardů a řízeného šlechtění. Zvýšení počtu psích plemen se dá považovat za jeden z největších genetických experimentů člověka. Přes 350 odlišných plemen bylo vyšlechtěno z původního genomu „wild wolf“. Morfologická variabilita předčí behaviorální. Každé plemeno je reprezentováno různou velikostí a proporcemi. Například dospělá čivava váží pouhých 1,5 kg, na rozdíl od skotského deerhouna, který dosahuje v dospělosti váhy 70 kg. Žádný jiný savec nevykazuje tak velkou fenotypovou variabilitu (Sadava et al., 2016).

Domestikovaný pes je unikátním genetickým počinem v lidské historii. Žádný jiný savec nemá tak blízké spojení s člověkem po tak dlouhou dobu. Různorodost psí morfologie existuje po tisíciletí a reprodukční izolace mezi nimi byla formalizována v polovině 19. století chovatelskými kluby a standardy. Od této doby je vyhlášeno pravidlo, že žádný pes se nemůže stát registrovaným plemenem, ledaže jeho matka a otec jsou registrováni, to zaručuje relativně uzavřený genofond v každém plemeni. V současnosti existuje více než 400 popsaných plemen, 152 z nich je uznáno klubem American Kennel Club (AKC) ve Spojených státech. Plemena a jejich standardy jsou uznány Mezinárodní kynologickou federací (FCI). V populaci čistokrevných psů je popsáno přes 350 dědičných chorob. Mnoho podobných chorob je známo u člověka. Choroby se vztahují na určité plemeno nebo skupinu plemen jako výsledek agresivních inbreedingových programů používaných pro ukotvení speciálních morfologických znaků (Parker et al., 2004).

První domestikovaní psi se rychle rozšířili po celé Zemi a výsledkem jsou odlišné populace a plemena, která se nacházejí v různých světadílech. Díky jednomu z největších genetických experimentů prováděném lidmi, došlo v minulých dvou stoletích přímo k explozi psích plemen, což v důsledku vedlo k rozšíření a uchování negativních genetických mutací a geneticky vázaných chorob.

K identifikaci genetických změn, které měly zásadní vliv na domestikaci psa a k rekonstrukci jejich časné evoluční historie byla generována kvalitní sekvence genomu od tří vlků šedých (Euroasie - Chorvatsko, Izrael, Čína), každý z jiného předpokládaného centra domestikace psa. Dále byly použity sekvence od základních psí linií. Basenji (Afrika), Dingo

(Austrálie) a šakal zlatý (*Canis aureus*) (Freedman et al., 2014). Bylo zjištěno, že žádný jedinec z linie vlků z hypotetického domestikacího centra nestojí za vznikem zdrojové linie psů, a že psi a vlci se odchýlili před 11 000 - 16 000 lety v procesu zahrnujícího extenzivní křížení, které bylo následováno bottleneck efektem u vlků.

Proces psí domestikace je stále málo prozkoumán z důvodu nedostatku studií celého genomu od vlků a psů z těchto center domestikace (Evropa, východní Asie, Blízký východ).

3.2 Genom psa

3.2.1 Historie studií genomu psa

Nejlepší přítel člověka, *Canis familiaris*, zaujímá speciální část v genomice. Unikátní šlechtitelská historie domestikovaného psa poskytuje jedinečnou příležitost pro zkoumání genetických základů náchylnosti k onemocnění, morfologické variaci a chování. Pozice psa v savčím evolučním vývoji také vytváří důležitý ukazatel pro srovnávací analýzu v lidském genomu.

Počáteční genetické změny vedoucí k fenotypu psa domácího (*Canis lupus familiaris*) jsou pravděpodobně spojeny se selekčním tlakem, který byl způsoben změnou životního stylu člověka.

Psí genom je důležitý pro porovnávací analýzy v savčí genomové biologii a evoluci. Intenzivně byly analyzovány čtyři savčí genomy (člověk, šimpanz, myš a potkan), které reprezentují pouze jednu vývojovou skupinu *Euarchontoglires* ze čtyř skupin placentálních savců (*Afrotheria*, *Xenarthra*, *Laurasiatheria*, *Euarchontoglires*). Pes reprezentuje sousední skupinu *Laurasiatheria* (Murphy, 2001). Poskytuje statistické údaje pro další výzkum lidského genomu (Thomas, 2003). Také pomáhá vyvozovat závěry o společných předcích těchto dvou skupin a poskytuje „most“ ke zbývajícím dvěma skupinám *Afrotheria* a *Xenarthra*, které by mohli pomoci ustálit málo známé genomové sekvence u druhů jako je slon a pásovec (Margulies, 2005).

V červenci roku 2004 byl dokončen projekt „Canine genome sequencing project“, jehož cílem bylo osekvenování celého genomu psa. Tento projekt byl řízen Broad Institute of MIT and Harvard (krátce zvaný „Broad“) v Cambridge, Massachusetts (USA). Tento úspěch poprvé publikovala Lindblad-Toth a její kolegové počátkem prosince 2005 v časopise Nature. V následujících měsících pokračovaly další výzkumy zaměřené například na lokalizaci genů, jejichž mutace vede u psů k těžkým onemocněním anebo na tvorbu nového přehledu evoluce psů a psích plemen (Parker et al, 2004).

K osekvenování prvního psího genomu byl použit vzorek DNA patřící feně Boxera jménem Tasha, další osekvenovaný genom náležel plemenu pudla a od té doby bylo sekvenováno a publikováno ještě několik psích genomů (Lindblad-Toh, 2005).

3.2.2 Stavba genomu psa

Psí genom obsahuje 2,8 bilionů párů bází v 39 párech chromozomů. Je zde 19 000 protein kódujících genů (Derrien et al., 2009). Celá genomová sekvence zjednodušila vytvoření mapy genetických markerů (specifické nukleotidy nebo krátké sekvence DNA v určitých lokacích na genomu). Genetické markery jsou používány k vyhledání lokace genů, které kontrolují určité vlastnosti. Např. Dr. Elaine Ostrander a její kolegové z National Institutes of Health pomocí genetických markerů zjistili, že u různých plemen závisí jejich velikost na genu IGF-1 (growth factor 1). U velkých psů obsahuje alelu kodující aktivní IGF-1 a u malých plemen je odlišná alela kódující méně aktivní IGF-1 (Sadava et al., 2016).

Genetické analýzy psích znaků jsou prováděny díky blízkému vztahu s člověkem v moderní společnosti. Snahy AKC (American Kennel Club) a podobných světových organizací umožnily vyhledání velkého počtu předků pro mnoho čistokrevných plemen. S výjimkou člověka je pes nejvíce studovaný organismus v medicínské praxi. Používáním genetických analýz vyvinutých v posledních 15 letech, vědci již identifikovali mutace v přibližně 25 genech, které způsobují onemocnění mendelovského typu (Galibert et al., 2004).

3.3 Molekulární charakteristika genu *MDR1*

3.3.1 Gen *MDR1*

Gen *MDR1* je lokalizován na chromozomu 14 a skládá se z 28 exonů. Transkript genu *MDR1* velký 3846 bp kóduje bílkovinu P-glykoprotein složenou z 1281 aminokyselin. Zvýšená citlivost k některým druhům léků u psa je způsobena mutací genu *MDR1* (Multidrug Resistance Gene).

3.3.2 Mutace genu *MDR1*

Existence mutace genu *MDR1* u psů byla zjištěna v roce 1980 (Campbell et al., 1983), kdy byla zavedena nová antiparazitika. Bylo zjištěno, že tato mutace způsobuje náchylnost zvířete k potenciálně smrtelné neurotoxicitě. Např. je-li zvířeti z homozygotně mutovaným *MDR1* genem podáno antiparazitikum ivermectin, je možné pozorovat pohybové poruchy,

problémy s koordinací, chvění, zvracení, zvíře může být dezorientované nebo může dojít až ke smrti.

Tato mutace se nachází ve 4. exonu. Jedná se o delecii 4 párů bazí v palindromické sekvenci **GATAG** (ATAG/GATA) na nukleotidové pozici 230. Důsledkem této mutace je posun čtecího rámce a vytvoření předčasného stop kodonu na pozici 75 aminokyseliny. Syntéza daného proteinu tzv. P-glykoproteinu (P-gp) je díky tomu ukončena předčasně. P-gp ztrácí svou ochrannou funkci a lék může procházet do nervových tkání psa. P-gp je tedy neúplný, na rozdíl od neporušeného P-gp obsahuje pouze 10% sekvence aminokyselin. Výsledný nefunkční protein je zkrácený z 1281 aminokyselin na 91 aminokyselin (Mealey et al., 2001).

Mutace je také označována jako *MDR1-1Δ*, *ABCB1-1Δ* nebo *MDR1 nt230(del4)* (Mizukami et al., 2012).

Vývoj vhodného diagnostického testu pro detekci *nt230(del4) MDR1* genu je důležitý pro predisponované psy před jejich léčebnou terapií (Gramer, 2010). Bylo popsáno několik odlišných metod pro detekci mutace *MDR1 nt230(del4)*. Tyto metody mají různé problémy včetně časové nebo finanční náročnosti a nedostatečné senzitivity. Většina metod je založena na PCR amplifikaci a následné detekci polymorfismu pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu.

V poslední době byla používána metoda fluorogenic 5' nuklease TaqMan allelic discrimination, která umožňuje *MDR1* genotypování bez předešlého PCR zpracování a je užitečná při rutinní diagnostice (Geyer a Janko, 2012).

Mutace *MDR1* genu byla detekována u více než 10 plemen čistokrevných psů a kříženců plemen. Mezi tato čistokrevná plemena patří kolie krátkosrstá, kolie dlouhosrstá, border kolie, šeltie, australský ovčák, bobtail (staroanglický ovčák), bílý švýcarský ovčák, dlouhosrstý vipet, anglický ovčák, wäller, německý ovčák a další. Protože je tato mutace široce rozšířená je velmi těžké pro veterinární lékaře a vlastníky psů rozpoznat, jestli daný pes je nositelem této mutace (Gramer et al., 2010).

Je vysoce pravděpodobné, že postižení tohoto genu pochází z jedné rodové mutace, tedy z jednoho jediného psa (který žil pravděpodobně ve Velké Británii kolem roku 1800) a rozšířila se (Geyer a Janko, 2012).

V roce 2011 byla publikována práce Gramer I. a kol. v časopise *The Veterinary Journal*. V této práci bylo vyšetřeno 7378 psů z Německa. Vyšetření bylo provedeno na vzorcích periferní krve. Genomová DNA byla izolována z 200μl krve odebrané do pufru EDTA. Vyšetření bylo provedeno na psech z devíti čistokrevných plemen (kolie, dlouhosrstý vipet,

šeltie, mini australský ovčák, australský ovčák, wäller, bílý švýcarský ovčák, staroanglický ovčák a border kolie). Do vyšetření bylo zahrnuto i mnoho příbuzných kříženců těchto plemen a jiných kříženců.

Tabulka 1 Výsledky z vyšetření 7378 psů na mutaci *MDRI* v Německu v roce 2011 (Gramer et al., 2010)

Pší plemena	Počet psů	Alelická frekvence (%) <i>MDRI</i> (+)	Genotyp (%)		
			<i>MDRI</i> (-/-)	<i>MDRI</i> (+/-)	<i>MDRI</i> (+/+)
Kolie*	2227	59	19	45	36
Dlouhosrstý vipet	20	45	25	60	15
Šeltie	960	30	49	43	8
Mini Australský ovčák	72	24	54	43	3
Australský ovčák	1980	22	62	32	6
Wäller	110	17	65	35	0
Bílý švýcarský ovčák-	274	14	75	23	2
Staroanglický ovčák	67	4	92	8	0
Border kolie	527	1	98,7	0,9	0,4
Příbuzná plemena**	261	8	86	12	2
Neznámí kříženci***	118	2	97	3	0

*Americká kolie, krátkosrstá a dlouhosrstá kolie a kolie byli všechny zařazeny do skupiny kolie.

** Psi, u kterých bylo známo plemeno alespoň jednoho z rodičů (kolie nebo border kolie).

***Psi, u kterých nebyl znám původ rodičů.

Z tabulky 1 je patrné, že byl v této studii nalezen velký počet heterozygotů *MDRI* (+/-) ale i recesivních homozygotů *MDRI* (+/+). Vzhledem k tomu že všechna tato plemena již byla vyšetřována na tuto mutaci v jiných studiích, byl tento výsledek očekáván. Bylo zajímavé, že u plemen, která byla příbuzná s predisponovanými čistokrevnými plemeny psů (bearded kolie, anatolský pastevecký pes, anglický chrt, belgian terveren, kelpie, australský honácký pes, barzoj a irský vlkodav) nebyla zjištěna žádná mutace v genu *MDRI*.

3.3.3 Model dědičnosti genu *MDRI*

Dědičnost genu *MDRI* je autozomálně recesivní (AR). V praxi to znamená, že postižení jedinci jsou recesivní homozygoti (aa), přenašeči jsou zdraví heterozygoti (Aa) a dominantní homozygoti (AA) jsou zdraví jedinci bez možnosti přenosu poruchy genu *MDRI*.

Postižení jedinci jsou nejčastěji označováni jako „affected“ nebo $+/+$, přenašeči jako „carrier“ nebo $+/-$ a zdraví jedinci jako „normal“ nebo $-/-$.

Tabulka 2 Autozomálně recesivní dědičnost (Laboklin 2007)

Otec	Matka	Potomci
$+/+$	$+/+$	100% $+/+$
$+/+$	$+/-$	50% $+/+$, 50% $+/-$
$+/+$	$-/-$	100% $+/-$
$+/-$	$+/+$	50% $+/+$, 50% $+/-$
$+/-$	$+/-$	25% $+/+$, 25% $-/-$, 50% $+/-$
$+/-$	$-/-$	50% $+/-$, 50% $-/-$
$-/-$	$+/+$	100% $+/-$
$-/-$	$+/-$	50% $+/-$, 50% $-/-$
$-/-$	$-/-$	100% $-/-$

Tabulka 3 Frekvence *MDRI* genotypu z celosvětových studií (Gramer et al., 2010) - 1. část

Plemena		USA (a)	USA (b)	Německo (c)	Velká Británie (d)	Francie (e)	Japonsko (f)	Německo (g)	Velká Británie (b)	Severo-západní USA (h)	Austrálie (i)
Kolie	<i>MDRI</i> (-/-)	22,60%	26%	23,90%	7,10%	20%	25%	50%	14,90%	22,50%	12,10%
	<i>MDRI</i> (+/-)	42%	46%	43,10%	40,50%	32%	33,30%	50%	51,10%	42,50%	63,60%
	<i>MDRI</i> (+/+)	35,40%	28%	33%	52,40%	48%	41,70%	0%	34%	35%	24,30%
	n	1424	161	578	42	25	12	14	94	40	33
	AF	56%	51%	55%	73%	64%	58%	25%	60%	56%	56%
Šeltie	<i>MDRI</i> (-/-)	88,20%	84,20%	45,70%	40,80%	-	97,60%	33,30%	-	-	57,10%
	<i>MDRI</i> (+/-)	10,50%	14,70%	48,60%	47,00%	-	2,40%	0%	-	-	42,90%
	<i>MDRI</i> (+/+)	1,30%	1,10%	5,70%	12,20%	-	0%	66,70%	-	-	0%
	n	448	190	140	49	-	42	3	-	-	7
	AF	7%	8%	30%	36%	-	1%	67%	-	-	21%
Australský ovčák	<i>MDRI</i> (-/-)	53%	68,50%	67,90%	32,10%	-	44,40%	33,30%	-	-	35,70%
	<i>MDRI</i> (+/-)	37%	29,80%	25,20%	42,90%	-	44,40%	66,70%	-	-	42,80%
	<i>MDRI</i> (+/+)	10%	1,70%	6,90%	25%	-	11,20%	0%	-	-	21,50%
	n	1421	178	333	28	-	9	3	-	-	14
	AF	29%	17%	20%	46%	-	33%	33%	-	-	43%
Border kolie	<i>MDRI</i> (-/-)	98,40%	100%	99,10%	95,30%	-	-	87,50%	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	1,30%	0%	0,60%	4,70%	-	-	12,50%	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/+)	0,30%	0%	0,30%	0%	-	-	0%	-	-	-
	n	306	222	334	43	-	-	8	-	-	-
	AF	1%	0%	1%	2%	-	-	6%	-	-	-

..

Tabulka 4 Frekvence *MDRI* genotypu z celosvětových studií (Gramer et al., 2010) – 2. část

Plemena		USA	USA	Německo	Velká Británie	Francie	Japonsko	Německo	Velká Británie	Severo-západní	Austrálie (i)
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(b)	USA (h)	
Staroanglický ovčák	<i>MDRI</i> (-/-)	97,50%	92,70%	87,50%	78,80%	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	2,50%	7,30%	12,50%	21,20%	-	-	-	-	-	-
	n	40	151	24	33	-	-	-	-	-	-
	AF	1%	4%	6%	11%	-	-	-	-	-	-
Mini Australský ovčák*	<i>MDRI</i> (-/-)	63,10%	51,80%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	33,70%	44,60%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/+)	3,20%	3,60%	-	-	-	-	-	-	-	-
	n	285	56	-	-	-	-	-	-	-	-
	AF	20%	26%	-	-	-	-	-	-	-	-
Dlouhosrstý Vipet	<i>MDRI</i> (-/-)	41,70%	32,60%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	58,30%	51,70%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/+)	0%	15,70%	-	-	-	-	-	-	-	-
	n	24	89	-	-	-	-	-	-	-	-
	AF	29%	42%	-	-	-	-	-	-	-	-
McNab kolie*	<i>MDRI</i> (-/-)	-	68,60%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	-	28,60%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/+)	-	2,80%	-	-	-	-	-	-	-	-
	n	-	35	-	-	-	-	-	-	-	-
	AF	-	17%	-	-	-	-	-	-	-	-
Silken Windhound*	<i>MDRI</i> (-/-)	68,80%	65,50%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	31,20%	33,30%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/+)	0%	1,20%	-	-	-	-	-	-	-	-
	n	16	84	-	-	-	-	-	-	-	-
	AF	16%	18%	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabulka 5 Frekvence *MDRI* genotypu z celosvětových studií (Gramer et al., 2010) – 3. část

Plemena		USA (a)	USA (b)	Německo (c)	Velká Británie (d)	Francie (e)	Japonsko (f)	Německo (g)	Velká Británie (b)	Severo-západní USA (h)	Austrálie (i)
Německý ovčák	<i>MDRI</i> (-/-)	89,80%	100%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	8,40%	0%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/+)	1,80%	0%	-	-	-	-	-	-	-	-
	n	166	95	-	-	-	-	-	-	-	-
	AF	6%	0%	-	-	-	-	-	-	-	-
Anglický ovčák	<i>MDRI</i> (-/-)	100%	85,70%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	0%	14,30%	-	-	-	-	-	-	-	-
	n	28	91	-	-	-	-	-	-	-	-
	AF	0%	7%	-	-	-	-	-	-	-	-
Wäller*	<i>MDRI</i> (-/-)	-	-	62,90%	-	-	-	-	-	-	-
	<i>MDRI</i> (+/-)	-	-	37,10%	-	-	-	-	-	-	-
	n	-	-	62	-	-	-	-	-	-	-
	AF	-	-	19%	-	-	-	-	-	-	-

*- Mini Australský ovčák- Americký původ, neuznané FCI (Fédération Cynologique Internationale)

- Silken Windhound- Americký původ, neuznané FCI (dlouhosrstý vipet + barzoi)

- McNab kolie- Americký původ, neuznané FCI

- Wäller- Německý původ, neuznané FCI

a) Mealey a Meurs (2008)

b) Neff et al. (2004)

c) Geyer et al. (2005b)

d) Tappin et al. (2008)

e) Hugnet et al. (2004)

f) Kawabata et al. (2005)

g) Baars et al. (2008)

h) Mealey et al. (2002)

i) Mealey et al. (2005)

3.4 ABC transportní proteiny

ABC transportéry, mezi které patří p-glykoproteiny, jsou rozšířenou skupinou transportérů vyskytujících se u prokaryotických buněk, rostlin a živočichů. ABC transportní proteiny v eukaryotických buňkách přenášejí ionty, cukry, aminokyseliny a další molekuly skrz všechny buněčné a organelové membrány (buněčná membrána, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a další). Výjimku tvoří jaderné membrány, které mají póry. Pohyb iontů a jiných molekul do buňky se nazývá *influx* a pohyb z buňky jako *efflux*.

ABC transportéry pro svou funkci spotřebovávají energii hydrolyzou ATP. Substráty pro tyto přenašeče jsou fosfolipidy, peptidy, steroidy, polysacharidy, aminokyseliny, nukleotidy, léčiva, toxiny a různé metabolity. Hlavní role ABC transportérů je ovlivnění absorpce, distribuce a exkrece toxických látek. Proto jsou lokalizovány v orgánech s bariérovou a exkreční funkcí (játrech, ledvinách, střevech, plicích, gonádách, mozku a placentě) (Dostálek a kol., 2006).

V současné době je již známo velké množství transportních proteinů. U většiny byl identifikován kódující gen včetně lokalizace na chromozomu. Z farmakologického hlediska patří mezi nejdůležitější efluxní transportéry p-glykoproteiny. Pro tyto přenašeče je typický jednosměrný přenos substrátu, vždy z intracelulárního prostředí do extracelulárního (Lehne, 2000).

ABC geny kódují transportní a kanálové proteiny, které se na buněčných membránách formují v póry a vnitrobuněčné nukleotid- vázané domény pro ATP závislý přenos substrátů nebo iontů přes buněčnou membránu (Hodges et al., 2011).

Do ABC transportérů (ATP Binding Cassette proteinů) je zařazován P-glykoprotein nebo také *MDR1* (Multi Drug Resistance protein 1). Do této skupiny patří řada dalších membránových bílkovin.

3.5 P-glykoprotein

P-glykoproteiny patří do rodiny ABC transportérů (ATP binding cassette's). Jsou tedy energeticky závislé. ABC transportéry se vyskytují u různých biologických druhů (Vlček et al., 2002).

3.5.1 Historie identifikace P-glykoproteinu

P-glykoprotein (zkráceně P-gp) byl objeven v Kanadě v roce 1976 Julianem a Lingem a izolován z ovariálních buněk čínského křečka (*Cricetulus griseus*), který byl rezistentní na chemoterapeutika. Byla zjištěna souvislost mezi sníženou prostupností membrány ovariálních nádorových buněk čínského křečka pro kolchicin (má cytostatické účinky- může tak zabránit nekontrolovatelnému dělení buněk při rakovinném bujení) a vzestupem exprese vysokomolekulárního glykoproteinu (170 000-180 000 Da), který byl označen jako P-glykoprotein. P-gp byl následně identifikován jako hlavní složka funkční rezistence těchto buněk. O mnoho let později byla izolována cDNA (komplementární DNA) z lékově rezistentní rakovinné buněčné linie. Tyto buňky byly vybrány pro jejich rezistenci na kolchicin, vinblastin a doxorubicin. Následně bylo použito označení *MDR1* pro gen kódující P-gp. Použitím bioinformatických analýz byl *MDR1* gen fylogeneticky klasifikován jako zástupce B1 z ABC transportní skupiny. *MDR1* (ABCB1) gen se vyskytuje u všech savců. Zvláštností je, že u hlodavců je tento gen duplikován (označen jako *MDR1a* a *MDR1b*) (Geyer a Janko, 2012). Vědci ho začali považovat za významnou a klíčovou strukturu zodpovědnou za rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapii (Geyer et al., 2005a).

Tento fosfoglykoprotein nebo „propustný“ glykoprotein byl identifikován jako příčina redukce působení léků na buňky tím, že aktivně vytlačuje lék z buňky. Fyziologický dopad této efluxní pumpy byl v roce 1994 využit Schinkelem a jeho kolegy, kteří zjistili zvýšenou penetraci antiparazitik (ivermectinu) v mozku geneticky upravených myší postrádající ABCB1. U zvířat, která přirozeně postrádala ABCB1, byla pozorována neurologická a plodová toxicita kvůli prostoupení léku přes bariéru mozek-krev a krev-placenta kde je P-gp normálně aktivní. Delece čtyř párů bazí (ABCB1-1Δ) byla později identifikována jako příčina nefunkční alely u psů. To vedlo k navržení změn v dávkách léků ve veterinární medicíně. U člověka nebyla tato spontánní delece u ABCB1 popsána, ale nefunkční varianta byla nalezena u dvou heterozygotních jedinců, u kterých byla nalezena změna ve druhé ATP vázající doméně u P-gp (Hodges et al., 2011).

Historie popisu funkce P-glykoproteinu se datuje od roku 1990. Vědci v laboratoři měli k dispozici dva typy myši. Knockout myši (v našem případě s inaktivovaným genem *MDR1*) a wild typ myši (s původním nezměněným genem *MDR1*). Tyto dva typy myši se od sebe nijak nelišily. Neměli žádné anatomické abnormality, byly zdravé i plodné. Z toho bylo vyvozeno, že P-glykoprotein není nezbytný pro základní životní funkce. Vzhledem k tomu, že u myši došlo k napadení roztoči, podle laboratorního protokolu byl použit lék ve spreji ivermectin. Druhý den byly knockoutované myši mrtvé a wild type myši byly zdravé bez jakýchkoli vedlejších příznaků. Bylo zjištěno, že u mrtvých myši koncentrace ivermectinu v mozku byla 100x vyšší než u myši s nemutovaným *MDR1* genem. Tímto náhodným zjištěním se otevřela cesta dalším studiím P-gp sledující jeho roli v systému transportu léků (Dowling, 2006).

3.5.2 Struktura P-glykoproteinu

Messenger RNA (mRNA) kódovaná *MDR1* genem je dlouhá 4872 párů bazí a dává podklad pro vznik proteinu, který obsahuje 1280 aminokyselin. Tento protein je označován jako P-glykoprotein (P-gp). Sekundární struktura P-gp obsahuje dvě homologní části, přičemž každá obsahuje šest transmembránových domén a nukleotid-vazebnou doménu. Existence a počet variant je nedeterminovaný. Bylo provedeno mnoho pozorování od nízkého rozlišení krystalické struktury P-gp u bakterií a ovariálních buněk čínského křečka, po vysoké rozlišení struktury u myši s prokázanou 87% sekvenční identitou s člověkem (Hodges et al., 2011).

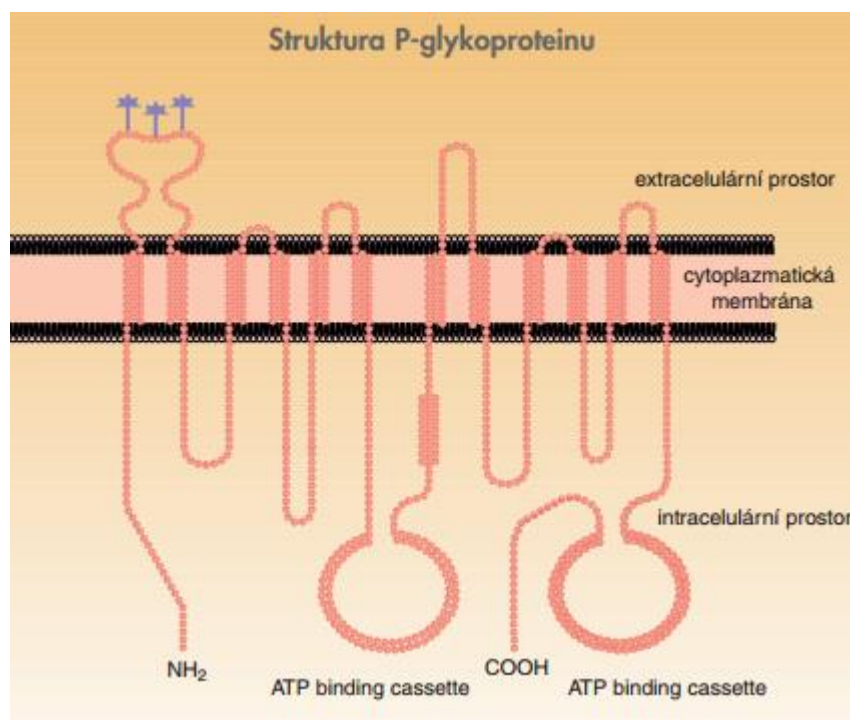
Struktura P-gp připomíná válec, který má průměr 10 nm a maximální výšku 8 nm. Je přibližně z poloviny ukrytý v buněčné membráně, která má průměrnou tloušťku fosfolipidové dvojvrstvy 4nm (Chin et al., 1989). Všechny transmembránové domény p-glykoproteinové molekuly vytváří obrovský vodní porus o průměru 5 nm (Nosková a kol., 2000).

P-gp vytváří velký vodní kanál uzavřený směrem k cytoplazmě a otevřený do extracelulárního prostoru (Rosenberg, M. F., 1997). Tvoří jej monomerní transmembránová bílkovina, která je tvořena dvěma analogickými částmi se 43% sekvenční homologií. Obě poloviny (označovány jako N- a C- konec) jsou složeny z 12-ti transmembránových α -helix šroubovic. Jsou odděleny šesti extracelulárními, hydrofilními smyčkami. Obě homologní poloviny jsou propojeny peptidovým segmentem složeným ze 75 aminokyselin. V cytosolu jsou dvě velké domény (smyčky) na kterých dochází k hydrolýze ATP, při níž se uvolňuje energie využívaná pro transport substrátu. Toto ATPázové místo je charakteristické pro ABC proteiny (Dean, 2001).

P-gp je pravděpodobně nejvíce prostudovaný MDR-ABC transportér. Je to polypeptid kódovaný genem složeným z 28 exonů. P-gp existuje ve větším počtu různých isoform, které jsou si podobné ve více jak 70% (Hennesy a Spears, 2007).

Molekulární hmotnost P-gp je udávána mezi 170-180 tisíci da (daltonů).

Obrázek 1 Struktura P-glykoproteinu (Lehne, 2000)



P-glykoprotein se nachází na apikální straně buněk. Ta je přivrácena k lumen řady orgánů. Tvoří ho dvě homologní poloviny aminokyselinového řetězce. Každá polovina obsahuje 6 hydrofobních transmembránových domén tvořících efluxní kanály a jednu hydrofilní intracelulární doménu schopnou vázat ATP (ATP binding cassette).

3.5.3 Mechanismus funkce P-glykoproteinu

Molekulární mechanismus funkce P-glykoproteinu není stále úplně jasný. Existuje mnoho teorií a modelů o funkci P-gp.

Propojení a funkční kooperace obou polovin P-gp je nutná pro správnou funkci P-gp a přenos substrátu. Jakmile je přerušen funkční vztah mezi oblastmi interagujícími se substráty a oblastmi na kterých se hydrolyzuje ATP, protein ztrácí svoji funkci (Loo a Clarke, 1994).

Jako první byl v roce 1988 popsán model pumpy. Specifická vazebná místa rozeznávají své substráty, které jsou pumpovány přes cytoplazmatickou membránu za využití energie uvolněné při hydrolýze ATP (Gottesman a Pastan, 1988).

Další teorie pokládá změny ve fyzikálně-chemických vlastnostech cytoplazmatických membrán vyvolaných P-gp za vlastní mechanismus funkce přenašeče umožňující transport jeho substrátů. Vzhledem k absenci změn fyzikálně-chemických vlastností membrán u řady buněk exprimujících *MDR1*, nemůže být tento mechanismus dostatečným vysvětlením jeho funkce (Ambudkar et al., 1999).

Podle jiné teorie pracuje P-gp mechanismem tzv. flipáz. Tento model podpořil objev, že produkt genu *MDR2* je fosfatidylcholin translokáza (tedy lipáza) potřebná k vypuzení fosfatidylcholinu do žluče (Ruetz a Gros, 1994).

Nejčastěji prezentovaná teorie funkce P-gp je katalytický cyklus. V tomto modelu N- a C- konec vytvářejí nejméně dvě různá vazebná místa nazývaná ON a OFF. Na ON místo se váže substrát, který přistupuje z vnitřní cytoplazmatické membrány. Po hydrolýze ATP dochází ke konformační změně, která způsobí pokles afinity substrátu k ON místu a látka se přemístí na OFF místo, tedy blíže k vnějšímu povrchu. Poté dojde k uvolnění látky z OFF místa. Existují dvě alternativy popisu tohoto transportního cyklu. V prvním modelu se předpokládá, že navázání substrátu snižuje aktivační energii a zvyšuje afinitu pro molekuly ATP a v druhém modelu se ATP a substrát váží nezávisle na sobě (Higgins, C. F., 2004; Sauna, Z. E., 2001).

Na každý transport pomocí P-gp jsou spotřebovány 2 jednotky ATP. Energie z jednoho ATP je po navázání substrátu využita ke konformační změně, která umožní přesunout substrát extracelulárně. Energie z druhé ATP je využita k návratu transportéru k výchozímu stavu s možností další aktivity. P-gp stejně jako ostatní bílkoviny je fyziologicky regulován prostřednictvím jaderných receptorů. Protože P-gp patří do první linie ochrany před toxickými lipofilními látkami, jeho zvýšená aktivita může být indukována jak léčivými nebo jinými chemickými látkami, tak i fyzickým stresem, UV zářením, rentgenovým zářením, tepelným šokem atd (Seelig, 1998).

3.5.4 Fyziologická funkce P-glykoproteinu

Lékové interakce významně ovlivňují farmakoterapii, a proto je důležité znát jejich mechanismus. Nejméně znalostí máme z oblasti transportních proteinů, které jsou zatím krátkodobě sledovány v souvislosti s lékovou interakcí. Transportéry v organismu (označované jako P-glykoproteiny) ovlivňují intestinální absorpci, hepatální a renální exkreci

mnoha léčiv. Známe již více než 60 substrátů P-glykoproteinů. Mezi jejich inhibitory patří více než 40 klinicky významných látek. Transportní proteiny (transportéry) odpovídají za transmembránový přenos. Přenáší mnoho strukturně odlišných endogenních i exogenních látek. Aktivně transportují ionty, cukry, aminokyseliny, peptidy, léčiva a jejich metabolity. Pozornost se zaměřuje hlavně na tzv. efluxní transportéry zvané P-glykoproteiny. P-glykoproteiny mohou léčbu komplikovat svými funkčními mechanismy, kdy jejich nadměrná exprese způsobuje „pumpování“ molekuly léčiva ven z buňky. Komplikují i protinádorovou léčbu kdy snižují akumulaci cytostatik v nádorových buňkách. Tyto jevy jsou označovány jako „MDR“ neboli „multidrug rezistence“. Nejvyšší množství mRNA pro translaci P-glykoproteinu byla pomocí metody RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) nalezena v ledvinách a adrenálních žlázách, menší množství pak v játrech, plicích, střevní sliznici, T lymfocytech a lymfoidních buňkách kostní dřeně. Nejméně ji bylo v prostatě, mozku, svalové tkáni, kůži, slinivce, žaludeční sliznici a ovariích. Zde plní P-glykoprotein exkretční a bariérovou funkci (Vlček et al., 2002).

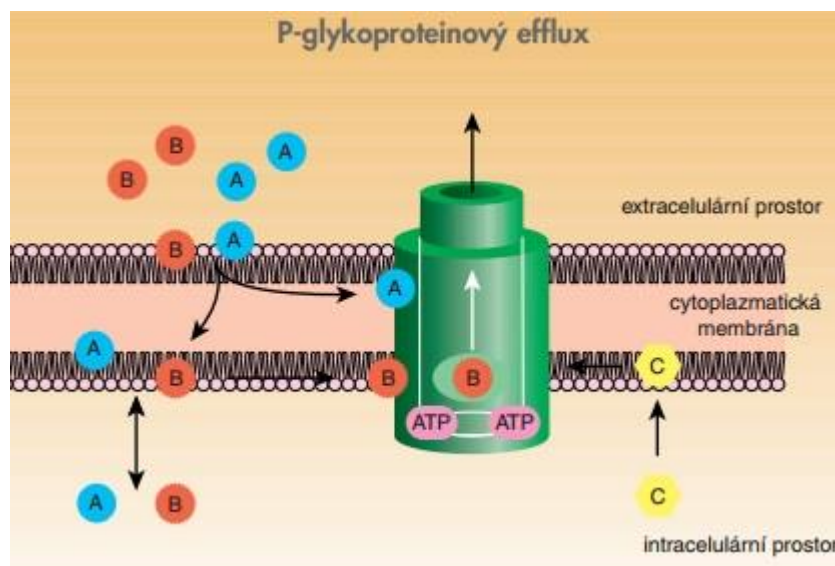
P-gp slouží k eliminaci léčiv cestou hepatální, renální a intestinální exkrece. U pokusných zvířat byla pozorována i vyšší akumulace léčivých látek v játrech, mozku a srdeční tkáni. Dochází ke snížené eliminaci a zvýšené biologické dostupnosti léčiv u pokusných zvířat (Vlček et al., 2002).

Je označován jako hydrofobní vakuový čistič kvůli schopnosti přemístit lipidy a léčiva přes buněčnou membránu. Tvoří obranu proti endogenním a exogenním toxinům. Jak napovídá funkce, P-gp je situován v epiteliálních buňkách orgánů podílejících se na absorpci a distribuci látek. Patří sem enterocyty, buňky hematoencefalické a testikulární bariéry a také na místech s čistě exkretční funkcí (v kanalikulární membráně hepatocytů, na apikální straně epitelových buněk žlučových kanálků a renálního proximálního tubulu) (Sun et al., 2004).

Za jednu z významných příčin rozvoje mnohočetné lékové rezistence, tzv. MDR (multi drug resistance), může vysoká aktivita P-gp vznikající nadměrnou expresí genu *MDR1* u nádorových buněk. První zmínka o indukované terapii u myších leukemických buněk je z roku 1950 (Burchenal a Robinson, 1950). V roce 1973 byla zjištěna spojitost mezi efluxním transportem daunomycinu s rezistencí k jiným chemoterapeutikům (např. vinca alkaloidům). (Dano, 1973). Každopádně souvislost s nadměrnou expresí P-gp byla nalezena až později. Zvýšená exprese genu *MDR1* může být také využita v predikci špatné prognózy u některých onemocnění lidí (např. u dětské akutní lymfoblastické leukémie nebo u rakoviny prsu) (Dhooge C., 1999, Trock, B.J., 1997).

Syntéza P-gp probíhá v endoplazmatickém retikulu a nachází se v epiteliálních buňkách (gastrointestinální trakt, játra, ledviny) a kapilárách (mozek, varlata, vaječníky, nadledvinky), kde zabraňuje absorpci xenobiotik (Filipits, 2004). Jeho nadměrná exprese a funkčnost je jednou z hlavních příčin lékové rezistence k terapii. Dále je součástí distribuce a transportu některých endogenních látek např. cholesterolu, kortisolu, glutation-S-konjugátů a podílí se i na syntéze steroidních hormonů. Pravděpodobně se účastní transportu některých cytosinů z periferních T-lymfocytů (Drach et al., 1996) a podílí se na mobilizaci dendritických buněk z periferie do lymfatických uzlin čímž iniciuje T-lymfocyty zprostředkovanou imunitu (Randolph et al., 1998).

Obrázek 2 Funkce P-glykoproteinu (Lehne, 2000)



Eflux exogenních (A,B) a endogenních látek (C)

- A- lipofilní léčivo je schopné procházet membránou pasivní difuzí a může být exkretováno v opačném směru P-glykoproteinem
- B- léčivo ve formě kladně nabitého iontu v plazmě je aktivním transportem transportováno na vnitřní stranu plazmatické membrány (zůstává zde zanořeno vzhledem k amfifilním vlastnostem) a může být transportováno zpět P-glykoproteinem do extracelulární tekutiny
- C- endogenní látka vlastnostmi podobná látkám A a B může být exkretována P-glykoproteinem

3.5.5 Substráty P-glykoproteinu

Pro P-gp je typické, že s ním interaguje velké množství látek funkčně i chemicky značně odlišných. Patří sem mnoho xenobiotik, různá léčiva, ale i endogenní hormony a jiné látky (Pechandová et al., 2006).

Mnoholetý výzkum P-gp byl zaměřen na chemoterapeutickou rezistenci nádorových buněk a jako první P-gp substráty byly identifikovány cytostatické léky. Dnes je známo, že P-gp má širokou substrátovou specifitu a transportuje velký počet strukturně nesouvisejících léků a xenobiotik zahrnujících protirakovinné léky (vinca alkaloidy, paclitaxel, doxorubicin), imunosupresiva (cyklosporin, tacrolimus), antiparazitika (ivermectin, moxidectin, selamectin, milbemycin), antimikrobiální léky (erytromycin, rifampicin, ketoconazol, levofloxacin), srdeční léky (dioxin, verapamil, diltiazem, quinidin, talinolol, losartan), opiáty (morphin, loperamid, butorphanol, fentanyl), steroidní hormony (kortisol, dexamethasone, aldosteron) a mnoho dalších (cimetidine, fexofenadin, acepromazin, domperidon, ondansetron). Většina P-gp substrátů jsou hydrofobní molekuly. Proto je P-gp označován jako hydrofobní vakuový čistič kvůli hydrofobním molekulám pevně usazených plazmatické membráně. Kromě nádorových tkání P-gp vykazuje vysokou expresi i v jiných tkáních. Navíc byla exprese P-gp nalezena v placentě, v kůře nadledvin a CD34⁺hematopoetických kmenových buňkách. Podle tohoto systému exprese bylo ukázáno, že P-gp limituje absorpci léků v gastrointestinálním traktu a podporuje jejich eliminaci v játrech, ledvinách a střevech. Navíc P-gp omezuje vstřebávání léků do buněk a tkání, konkrétně jejich přenosu přes bariéru mozek-krev. P-gp má tedy důležitou projektivní funkci pro organismus tím, že eliminuje potenciálně toxické složky z těla a zabraňuje jejich vstupu do mozku a orgánů pro reprodukci (Geyer a Janko, 2012).

Většina substrátů jsou hydrofobní nebo amfifilní (obsahují hydrofilní i hydrofobní části). Jejich molekulová hmotnost se pohybuje přes 400 Da a jsou kladně nabitě při pH 7,4. P-gp ale také přenáší méně často neutrální (např. dioxin) nebo negativně nabitě (např. atorvastatin) molekuly, popřípadě i molekuly hydrofilní povahy (např. metotrexát a jiné substráty s molekulovou hmotností nižší než 400 Da) (Sun, J. a kol., 2004). V P-gp je také větší procento aminokyselin, které jsou schopné vytvářet vodíkové vazby. Jsou na transmembránových doménách 4, 5, 6, 11 a 12 tudíž tam, kde dochází k interakci přenašeče se substráty (Seelig, 1998).

Tabulka 6 Příklady substrátů P-glykoproteinu (Pechandová et al., 2006)

Chemoterapeutika	doxorubicin, mitoxantron, paclitaxel, vinblastine, vincristine, actinomycin, etoposide, docetaxel, daunorubicin, epirubicin, etoposid, irinotecan, mitomycin C, tamoxifen, temiposide, teniposid, topotecan, vindesine
Antimikrobika	doxycyklin, erytromycin, itraconazol, ketoconazol, rifampin, tetracyklin, levofloxacin, sparfloxacin, celoprolol, talinolol
Steroidy	aldosteron, cortizol, dexamethason, estradiol, hydrocortison, methylprednisolon
Imunosupresiva	cyklosporin A, tacrolimus, antiemetika, domperidon, ondansetron, rapamycin
H1-antihistaminika	fexofenadin, terfenadin
H2-antihistaminika	cimetidin, ranitidin
Srdeční léky	digoxin, diltiazem, losartan, quinidine, verapamil, chinidin, amiodaron
Opiáty	morfium, loperamid
Ostatní	amitriptylin, butorphanol, ivermectin, moxidectin, phenothiazin, phenytoin, selamectin, acepromazin, doramectin, eprinomectin, milbemycin, ondasetron, fenytoin

3.5.6 Inhibitory P-glykoproteinu

Látky potlačující účinek P-gp jako antineoplastika, endotoxin, kobalamin a atorvastatin, zvyšují účinek substrátů. Naopak rifampin (rifampicin) a stresové buněčné signály vyvolávají P-gp řízenou lékovou rezistenci. Mnoho studií charakterizuje interakce mezi P-gp substráty. Výzkum se zaměřil na škodlivý i prospěšný efekt interakce mezi P-gp složkami: interakce potenciálně ovlivňující lékovou bezpečnost a účinnost využívající optimalizaci lékového přenosu (Hodges et al., 2011).

Inhibiční látky jsou nejvíce studovány v cytotoxických studiích. Bylo zjištěno, že při podávání inhibičních látek s cytostatiky lze dosáhnout částečného obnovení citlivosti dříve rezistentních nádorových buněk. Látky schopné inhibovat P-gp nazýváme reverzní léčiva. Jako první léčivo s inhibiční schopností byl potvrzen verapamil. Jeho inhibiční aktivita je ale spojena s jeho vyššími dávkami, které jsou kardiotoxické. Dále byl potvrzen dexverapamil,

který je méně kardiotoxický, ale nežádoucích účinků se nelze vyvarovat. Cyklosporin je také inhibitor P-gp, ale má imunosupresivní účinek a v onkologii ho nelze použít. Byla vyvinuta další léčiva a např. PSC-833 (neimunosupresivní ciclosporin) je klinicky nadějná reverzní látka (Vlček et al., 2002).

Nadměrná exprese P-gp u nádorových buněk zodpovídá za rezistenci těchto buněk na protinádorovou terapii. Mechanismem, jak tuto rezistenci narušit, je použití specifických inhibitorů P-glykoproteinů, které obnovují citlivost nádorových buněk na cytotoxický účinek cytostatik. Role P-gp v protinádorové léčbě je velmi podrobně prostudována. Úloha P-gp v absorpci, distribuci a lékových interakcích je však méně známá (Vlček et al., 2002).

3.5.7 Farmakokinetika P-glykoproteinu

Díky různé lokalizaci v anatomických tkáních, P-glykoprotein může chránit organismus před xenobiotiky třemi způsoby. P-glykoprotein limituje vstup léků do těla po podání orální cestou tím, že je exprimován v luminální (apikální) membráně enterocytů. Jakmile se lék dostane do krevního oběhu, P-glykoprotein podporuje jeho eliminaci do žluče a moči díky další expresi v membráně hepatocytů a v lumbální membráně proximálních tubulů v ledvinách. Navíc P-glykoprotein limituje penetraci xenobiotik do citlivých tkání (mozku, varlat, lymfocytů a do oběhu plodu). Zároveň P-glykoprotein zodpovídá za úspěšnost léčby vzhledem k tomu, že limituje intracelulární koncentraci léků (Fromm, 2004).

Z in vitro a in vivo studií na zvířecích modelech je známo, že P-gp mají významnou roli v lékových interakcích. Nejvíce studií je publikováno z humánní oblasti, hlavně oblasti chemoterapie, terapie inhibitory HIV proteáz a digoxinových lékových interakcí. Znalost substrátů a inhibitorů P-gp a pochopení jejich mechanismu působení je důležité pro klinickou praxi (Vlček et al., 2002).

Nejčastějším modelem využívaným pro studium jsou tzv. „knockout myši“. U myší se vyskytují dva geny pro P-gp transportér a to *MDR1a* a *MDR1b*. U knockout myší musí být pozměněn alespoň jeden z genů. Tato změna způsobí neschopnost exprimovat P-gp. U myší s mutovaným *MDR1a* byly pozorovány nežádoucí účinky po podání loperamidu, který se akumuloval v CNS i po nízkých dávkách. U kontrolních zvířat (nepozměněný gen) nebyly nežádoucí příznaky vyvolány. Při perorálním podání loperamidu se 8x snížila letální dávka a plazmatické koncentrace léčiva se 2x zvýšily (Vlček et al., 2002).

Podle různých studií se substrát váže na intracelulární straně lipidové dvojvrstvy na P-glykoprotein, který exkretuje substrát do extracelulárního prostoru. Klíčové pro tento přenos je hydrofobní nebo amfifilní vlastnost léčiva. Léčiva mají často vyšší molekulovou hmotnost

(>400 D), planární (rovinnou) strukturu v molekule a někdy NH₂ skupinu v postranním řetězci (Vlček et al., 2002).

Léková bezpečnost představuje hlavní zdravotní zájem, zejména u léků s přímým terapeutickým účinkem a velkým klinickým efektem. Interakce jsou substrátově specifické a závislé na koncentraci a tkáňové specifitě (Hodges et al., 2011).

Je také důležité poznamenat, že máme stále nedostatek modelů, které by spolehlivě předpovídaly afinitu léků k P-glykoproteinu, založené na chemické struktuře a chemicko-fyzikálních vlastnostech. Kromě P-glykoproteinu existuje široké spektrum dalších transportérů, zprostředkávajících přenos xenobiotik dovnitř buněk či ven z různých tkání (střevo, játra, ledviny). Tyto transportéry však nejsou tak dobře prostudované jako P-glykoprotein (Fromm, 2004).

3.6 Problémové léky pro psy s mutací *MDR1*

Na existenci mutace genu *MDR1* u psů se přišlo v roce 1980 při zavedení nových antiparazitik (Campbell, 1983).

Mutace *MDR1* genu pozmění farmakokinetické vlastnosti P-glykoproteinu pro přenos léků, což vede ke snížení eliminace léku přes játra, ledviny a střevo. Navíc je zvýšena propustnost mozku vzhledem k přenášeným lékům a tím vzniká neurotoxicita (Geyer a Janko, 2012).

Psi s mutací *MDR1* genu a tím změněnou funkcí P-glykoproteinu, se nemusí vyhýbat všem lékům. Mnoho léků může být bezpečně použito, aniž by byla upravena jejich dávka. Nicméně psi se špatnou funkcí P-gp můžou reagovat zvýšenou toxicitou na určité léky.

Tabulka 7 Příklady léků způsobujících problémy při mutaci genu *MDR1* (Laboklin, 2007)

Třída A	Nepoužívat u psů s <i>MDR1</i> genovou mutací	Ivermectin-antiparazitikum	Diapec®, Ecomectin®, Equimax®, Eqvalan®, Ivomec®, Noromectin®, Paramectin®, Qualimec®, Sumex®, Virbamec®
		Doramectin-antiparazitikum	Dectomax
		Loperamid- proti průjmové	Imodium
		Moxidectin-antiparazitikum	Cydectin, Equest
Třída B	Používat jen pod dohledem veterináře	Cytostatika-chemoterapie	Vinblastin, Vincristin, Doxorubicin, Paclitaxel, Docetaxel, Methotrexat
		Imunosupresiva	Cycklosporin A
		Srdeční glykosidy	Digoxin, Methylidigoxin
		Opiáty	Morfium
		Antiarytmika	Verapamil, Diltiazem, Chinidin
		Antiemetika	Ondansetron, Domperidon, Metoclopramid
		Antihistaminika	Ebastin
		Glukokortikoidy	Dexamethason
		Acepromazin- pre-anestetikum	
		Butorphanol-analgetikum	
Ostatní	Etoposid, Mitoxantron, Rifampicin		
Třída C	Používat jen v předepsaných dávkách a správné aplikaci	Selamectin	Stronghold®
		Milbemax®	
		Advocate®	

3.6.1 Makrocyclické laktony

Makrocyclické laktony (ML) jsou parazitika schopná zabít širokou škálu parazitů z kmenů *Nematoda* a *Arthropoda*. Ivermectin se stal jedním z nejvíce prodávaných antiparazitik ve světě. U psů různých plemen s defektem v *ABCB1* genu, dochází k akumulaci ML v centrálním nervovém systému (CNS) a ke zvýšení rizika nepříznivého účinku. S toxikózou nastupují příznaky jako ataxie, letargie, kóma, chvění, záchvaty, mydriáza a oslepnutí. ML mají dlouhý poločas rozpadu a proto se projevy léčby ukazují za

delší dobu i když byla podána nadměrná dávka. Neexistuje žádná specifická protilátka na ML toxikózu (Merola a Eubig, 2014).

ML se rozděluje na dvě skupiny: avermectiny a milbemyctiny. Mezi avermectiny patří abamectin, ivermectin, eprinomectin, doramectin a selamectin. Milbemyctiny zahrnují moxidectin, milbemyctin a nemadectin. Tyto strukturně podobné sloučeniny jsou derivované z přírodních složek produkovaných půdními houbami z rodu *Streptomyces*. Přírodní složka avermectinu je složena z osmi blízkce souvisejících složek. 4 A- a B- složky (A₁, A₂, B₁, B₂) a každá se dále rozděluje na dvě homologní a- a b- komponenty (např. B_{1a}, B_{1b}). Abamectin a ivermectin jsou oba složeny z avermectin B₁ složek a jediný rozdíl je v ivermectinu absence dvojnásobné vazby. Další modifikace B₁ vytváří eprinomectin. Doramectin a selamectin jsou si více podobné a obsahují A₁ a B₁ složky. Moxidectin je produkován z fermentačního produktu nemadectinu u *Streptomyces* (Vercruyse a Rew, 2002).

Protože jsou ML často používány jako parazitika u různých druhů zvířat, jsou k dostání v celé řadě variant. Některé z nejvíce běžných veterinárních produktů zahrnujících tablety s ivermectinem, moxidectinem nebo milbemyctinem a lokální léky se selamectinem jsou používány jako prevence proti srdečním červům (vlasovec psi). Ivermectin, moxidectin, milbemyctin a doramectin jsou také používány mimo jiné pro léčbu kožních onemocnění způsobených parazity *Demodex* a *Sarcoptes* a léčbu jiných ekto- i endoparazitů. Psi mohou být také vystaveni lékům pro větší zvířata a to náhodně anebo záměrně. Mnoho přípravků pro velká zvířata má vyšší koncentraci a je lehké neúmyslně psa předávkovat. Znaky intoxikace s ML jsou spojené s vlivem na CNS. Neurologická deprese, ataxie, mydriáza, slepota, chvění a silné slinění mohou být pozorovány u postiženého zvířete. Mohou se objevit i záchvaty. Slepota je většinou dočasná a je spojována se sítnicovým edémem. Toxikóza může trvat i několik dní až týdnů v závislosti na podané dávce a individualitě zvířete (Merola a Eubig, 2014).

U savců se ML vážou na gama-aminomáselnou kyselinu typu A- receptorů chloridových kanálů (GABA_A receptory). GABA je primární inhibitor neurotransmiterů v mozku a postsynapticky se GABA váže na receptory sloužící k modulaci propouštění excitačních neuronů. Protože jsou GABA_A receptory pouze v CNS, navázání ML je zabraňováno mozek-krev bariérou (blood-brain barrier, BBB). Nicméně při předávkování proniká dostatek ML přes BBB. Následně chloridový influx způsobí hyperpolarizaci a zvýšení propustnosti excitačních neuronů. Tím dochází k projevu klinických příznaků (Bloomquist, 2003).

BBB reguluje vstup endogenních substancí a xenobiotik z krevního oběhu do mozku. Těsné vazby mezi endoteliálními buňkami chrání proti paracelulární difúzi substancí do CNS. Také jsou endoteliální buňky v mozku specializovány na ovlivňování propustnosti BBB. Substance, které vstupují do mozku, musí být přeneseny difúzí přes endoteliální buňky nebo být aktivně transportovány do endoteliálních buněk transportéry. Jak substance vstoupí do endoteliálních buněk v mozku, může být vytlačena zpět přes apikální membránu P-glykoproteinem nebo dalšími efluxními proteiny (Bernacki et al., 2008).

Výsledkem ABCB1-1 Δ mutace je akumulace P-gp substrátů v mozku, které by normálně měli být odstraněny funkčním P-gp. Tudíž se BBB stane propustná pro substráty P-gp, zahrnujících ML. U psů s tímto defektem se může lék akumulovat v CNS a způsobit tak neurologický efekt (Merola a Eubig, 2014).

ML mají relativně vysokou orální absorpci ale mnohem pozvolnější rychlost absorpce po podání podkožní injekcí (McKellar a Benchaoui, 1996). Jsou také vysoce rozpustné v tucích a hromadí se v tukových tkáních. Výsledkem je jejich dlouhý poločas rozpadu. Vědci nebyli schopni zajistit specifické informace o metabolismu a metabolitech eliminovaných do žluči a moči u psů. Data z druhů, kde jsou tyto informace známy naznačují, že veliké procento ML je eliminováno do žluči s proměnlivým metabolismem (Vercruyse a Rew, 2002).

P-gp teoreticky limituje lékovou absorpci tím, že přenáší substráty ven z enterocytů a zpět do intestinálního traktu a zlepšuje eliminaci substrátu jeho uložením do žluči, střeva a ledvinových tubulů. Několik faktorů může ovlivnit schopnost P-gp změnit kinetiku ML. Jeden z faktorů je afinita ML na P-gp. Ivermectin, abamectin, doramectin a eprinomectin mají všechny vyšší afinitu na P-gp ve srovnání se selamectinem a moxidectinem. Koncentrace ML je další potenciální důležitý faktor (Mealey, 2008).

Avermectiny a milbemyciny jsou důležitá antiparazitická léčiva. Mají široké spektrum aktivity, jsou dostatečně silná a mají unikátní mechanismus účinku. U kmenu *Arthropoda* a kmenu *Nematoda* způsobují tyto léky letální paralýzu otevřením chloridových kanálů v buněčných membránách periferní nervové tkáně u parazita, které způsobí narušení membránového potenciálu. U bezobratlých jsou vazebná místa pro avermectiny v periferní tkáni, u savců jsou vazebná místa pro tyto léky pouze v centrálním nervovém systému. Bezpečnost těchto léků u savců umožňuje schopnost bariéry BBB efektivně odstranit léky z centrálního nervového systému. Existují rozdíly mezi a v rámci savčích druhů pro toleranci různých avermectinů a milbemycinů. Mezi psími plemeny jsou kolie více senzitivní na toxicitu v centrálním nervovém systému způsobenou avermectiny (Novotny et al., 2000).

Avermectiny a mylbemyciny mají menší rozdíly ve stavebních složkách, ale sdílejí stejnou strukturu potřebnou pro navázání chloridových receptorů v chloridových kanálech. Ty jsou specifické u bezobratlých (*Invertebrate*) a způsobují průtok chloridových iontů do neuronů parazita a vedou k jeho hyperpolarizaci, paralýze a smrti (Merola a Eubig, 2014).

3.6.1.1 Ivermectin

Ivermectin je k dostání v početných formách pro velká zvířata a to ve formě injekčních tekutin, past, orálních léků a krmných premixů. Pro malá zvířata je vyráběn jako lék proti srdečním červům ve formě tablet. Je také vyráběn ve formě 3 mg tablet (Stromectrol) v humánní medicíně pro léčbu gastrointestinálních strongyloidů. Složení léku pro velká zvířata obsahuje poměrně vysokou koncentraci, od 1% až po 1,87% (10-18,7 mg/ml), a tím může lehce dojít k nechtěnému předávkování (Perez et al., 2001).

Ivermectin je používán pro prevenci srdečních červů v dávce od 0,006 do 0,012 mg/kg u psů. Je také používán u psů proti mikrofiláriím (drobné larvy filárií cirkulující v krevním oběhu) od 0,05 do 0,2 mg/kg a k léčbě ektoparazitů od 0,3 do 0,6 mg/kg (Plumb, 2005).

Klinické příznaky byly zjištěny u plemen s ivermectinovou senzitivitou v dávkách od 0,08 do 0,34 mg/kg. Nicméně žádný z těchto psů nebyl testován na ABCB1 genovou delecí. Slabé klinické příznaky byly zdokumentovány v dávce začínající od 0,2 mg/kg u plemen u nichž se předpokládala normální odpověď na ivermectin. Jedním z plemen byl německý ovčák, který vykazoval klinické příznaky při relativně nízké dávce ivermectinu. Malé procento tohoto plemene nese ABCB1 genový defekt, který může částečně vysvětlovat přítomnost příznaků u „normálních“ psů při relativně nízké dávce (Merola et al., 2009).

Ivermectin senzitivní kolie byly léčeny vyšší preventivní dávkou proti srdečním červům (0,06 mg/kg) aniž by vykazovaly klinické příznaky. Nicméně když byl ivermectin použit ve vyšších dávkách u mikrofilárií nebo demodikóz, objevily se problémy u psů s ABCB1 mutací a někdy i u psů s normálním ABCB1 genotypem. Předávkování způsobuje letargii, ataxii, silné slinění, chvění, mydriázu, slepotu a bradykardii (zpomalení srdeční frekvence). U postižených zvířat může nastat kóma, záchvaty až smrt (Merola a Eubig, 2014).

Několik intoxikací způsobuje podání antiparazitika ivermectinu a dalších avermectinů u kolií a ostatních příbuzných plemen. Je předpokládáno, že náchylnost na ivermectin je spojena geneticky podmíněným nedostatkem P-gp, vedoucí ke zvýšené permeabilitě přes bariéru BBB. To dovoluje ivermectinu vstoupit do mozku a ovlivnit tak kyselinu γ -amino-

máselnou (GABA-gated chloride channels). Tato mutace byla také detekována u australského ovčáka. Neff a kol. 2004 detekoval mutantní alelu v subpopulaci šesti dalších plemen, zahrnujících anglického ovčáka, dlouhosrstého vipeta, McNab, bobtaila, šeltie a Silken Windhound (plemeno chrta). U těchto plemen by měli být veterináři opatrní s používáním léků, které jsou známy jako substráty P-gp. Nicméně léčivo může být použito u naléhavých případů (Baars et al., 2008).

U psů trvá přibližně 4 hodiny ($t_{\max} = 4$) po orálním podání ivermectinu dosažení maximální plazmatické úrovně. Absorbce po podkožní injekci je pomalejší (32-36 hodin). Poločas rozpadu po orálním podání je 3,3 dny a po podkožní injekci 3,2 dny (Gokbulut et al., 2006).

3.6.1.2 Selamectin

Selamectin je širokospektrý avermectinový endectocid (lék proti endoparazitům i ektoparazitům), který se používá pro léčbu psích parazitů. Cíl studie Novotného a kol. (2000) bylo vyhodnotit klinickou bezpečnost selamectinu po lokálním použití u štěňat ve věku 6 týdnů a starších, u avermectin-senzitivních kolií a psů kteří byli pozitivní na srdeční parazity. Studie zjišťovala stupeň bezpečnosti selamectinu po podání v doporučené dávce 6-12 mg kg⁻¹ tělesné hmotnosti. Štěňata nevykazovala žádné klinické nebo patologické důkazy toxicity. Selamectin neměl také žádné nepříznivé účinky na reprodukci dospělých psů a fen. Žádné negativní účinky se neobjevily ani u selamectin-senzitivních kolií a u psů se srdečními parazity. Selamectin je tedy bezpečný při lokálním použití u psů s doporučenou minimální dávkou 6 mg kg⁻¹ (6-12 mg kg⁻¹) (Novotny et al., 2000).

Selamectin je nový avermectin, strukturně podobný doramectinu, který je vysoce efektivní proti endoparazitům i ektoparazitům u psů. Při vysoké dávce avermectinů se mohou projevit klinické znaky avermectinové toxikózy zahrnující neurologické, dýchací a gastrointestinální změny a změny v chování. Neurologické znaky zahrnují depresi, ataxii, abnormální mydriázu (rozšíření zornice), abnormální salivaci a abnormální svalovou fascikulaci (samovolné záškuby svalových vláken). Ve studii bylo ale prokázáno, že vyšší dávky selamectinu jsou u psů dobře snášeny. Selamectin je tedy bezpečný lék.

Selamectin je k dostání jako lokální lék pro psy, který se používá pro prevenci srdečních červů a pro zabití blech a ušních roztočů v minimální dávce 6 mg/kg s koncentrací 60-120 mg/ml. Protože není k dostání ve vyšších koncentracích, předávkování je méně časté.

Mezi obvyklé příznaky vystavení silné dávce patří zvracení, slinění, dávení, olizování, letargie, nervozita, anorexie a ataxie (Merola a Eubig, 2014).

Selamectin je u psů používán jen lokálně. Poločas rozpadu je 11,1 dní po lokálním použití na kůži a 1,1 dní po orálním podání (Merola a Eubig, 2014).

3.6.1.3 Abamectin (Avermectin B₁)

Abamectin je všeobecně používán pro hubení mravenců, švábů a ostatního hmyzu. Někdy jsou produkty abamectinu popsány jako avermectin B₁. Ty jsou obvykle nalézány v různých formách plastických pastí (návnad) pro mravence a šváby, granulcích nebo tekutých formách ve sprejích pro vnitřní i venkovní použití. Koncentrace v tekutých přípravcích se pohybuje mezi 0,01% až 0,05%. U mnoha druhů zvířat (psi, kočky, králíci a myši) mají abamectin a ivermectin podobný stupeň toxicity a abamectin je o něco více toxický než ivermectin. Psi jsou primárně vystaveni těmto insekticidům, protože obsahují atraktanty jako arašídové máslo, které je určené pro lákání hmyzu, ale je také velice přitažlivé pro psy. Mezi klinické příznaky související s vystavením se abamectinu patří zvracení, ataxie, silné slinění, letargie, mydriáza a průjem (Woodward, 1993).

3.6.1.4 Milbemycin

Milbemycin je k dostání v tabletách (2,3-27 mg) proti srdečním červům u psů a v 0,1% roztoku proti ušním roztočům. Není k dostání ve vyšších koncentracích a předávkování je velice vzácné. Terapeutické dávky milbemycinu na srdeční červy jsou 0,5 mg/kg u psů. Mezi slabé klinické příznaky patří ataxie, silné slinění, mydriáza a letargie. Tyto příznaky byly pozorovány u ivermectin senzitivních psů po dávce 5 až 10 mg/kg (Tranquilli et al. 1991).

U dvou psů s ABCB1 defektem byly pozorovány mírné znaky ataxie poté, co jim byla podána dávka s milbemycinem na demodikózu; první pes dostal 0,8 mg/kg 2 dny za sebou a druhý pes dostával 1,5 mg/kg denně po 13 dní (Barbet et al., 2009).

Mírné klinické příznaky byly nahlášeny u normálních psů po dávce 10 až 20 mg/kg a u psů pravděpodobně mutovaných v ABCB1 genu v dávce 5 až 10 mg/kg. Mezi obvyklé příznaky patří ataxie, chvění, letargie, zvracení, mydriáza, disorientace a silné slinění (Merola a Eubig, 2014).

3.6.1.5 Doramectin, Eprinomectin a Nemadectin

Doramectin je dostupný v injekčních formách (10 mg/ml) a používá se na léčbu demodikózy u psů v dávce 0,6 mg/kg jednou za týden (Plumb, 2005). Eprinomectin je používán experimentálně k léčbě parazita *Toxocara canis* v dávce 0,1 mg/kg u psů a nemadectin k léčbě gastrointestinálních helmintů v dávce 0,2 až 0,6 mg/kg u psů (Doscher et al., 1989). Vedlejší příznaky nebyly pozorovány.

Další informace o eprinomectinu a nemadectinu u malých zvířat nejsou známy. Vystavení malých zvířat těmto produktům se objevuje méně, ale tyto produkty mají vysokou koncentraci a je možné, že náhodné vystavení může způsobit toxikózu. Byly zjištěny dva případy vystavení psa doramectinu. V prvním případě byla podána dávka 0,2 mg/kg doramectinu kolii a ve druhém případě byli vystaveni dva švýcarští ovčáci dávce 0,7 mg/kg doramectinu. Později bylo zjištěno, že tyto psi mají ABCB1 defekt. Klinické znaky zahrnují slepotu, neklid, časté uléhání, silné slinění, chvění, tachypneu (rychlé dýchání), ataxii, desorientaci, bradykardii a sníženou vnímavost. Je očekávané, že klinické znaky u eprinomectinu a nemadectinu u zvířat s normálním P-gp budou podobné, ale není známo, při jaké dávce se objeví (Merola a Eubig, 2014).

Doramectin dosahuje krevního řečiště do 2 hodin po orálním podání a poločas rozpadu je 3- 3,7 dní. Kinetická informace u malých zvířat není zjištěna pro eprinomectin a nemadectin (Merola a Eubig, 2014).

3.6.1.6 Moxidectin

Moxidectin je absorbovaný rychleji než ivermectin. $t_{max} = 2-3$ hodiny. Moxidectin má vysokou absorpční rychlost: až 90% léku je u psů absorbováno. Poločas rozpadu je 13,9-25,9 dní. Tento vysoký rozdíl je způsobený kondicí psa (Merola a Eubig, 2014).

Moxidectin je k dostání v mnoha formách jako lokální preparáty, podkožní injekce a tablety pro prevenci srdečních červů u malých zvířat. Stejně jako u ivermectinu má moxidectin u velkých zvířat vysokou koncentraci (0,5%-2%, 5-20 mg/ml), takže mohou být malá zvířata vystavena vysokým dávkám při podání malého množství léku. U psů je moxidectin používán orálně v dávce 0,003 mg/kg každý měsíc nebo podkožní injekcí v dávce 0,17 mg/kg jednou za půl roku. Je také používán lokálně v dávce 2,5 mg/kg. Při orálním podání v dávce od 1,9 do 2,8 mg/kg byly pozorovány nepříznivé účinky u psů s normálním P-gp genotypem. Tyto účinky zahrnují ataxii, chvění, záchvaty, hypertermii (vysoká teplota),

tachykardii (zvýšená tepová frekvence), slepotu, silné slinění, bradykardii (snížení tepové frekvence), koma a respirační problémy (Perez et al., 2001).

3.6.2 Loperamid

Klinické použití loperamidu může být kriticky závislé na přítomnosti P-gp v BBB. Strukturně je loperamid typický opiát, jako morfin a podobné sloučeniny. Nicméně u zvířecích modelů a u člověka se loperamid výlučně zaměřuje na gastrointestinální trakt, způsobující zácpu, zatímco farmakologické účinky na CNS nebyly pozorovány. Loperamid je z tohoto důvodu používán jako relativně neškodný protiprůjmový lék. Výsledky z tohoto výzkumu prokazují, že P-gp v BBB bariéře je hlavní faktor zodpovědný za toto selektivní farmakologické chování loperamidu (Schinkel et al., 1996).

3.6.3 Ostatní léky

Ve výzkumu Schinkela a kol. bylo testováno několik léků u *MDR1a*(+/+) myši. Domperidon a haloperidol, oba antagonisté dopaminu, ale každý s jinou klinickou aplikací. Domperidon nevstupuje do CNS a haloperidol vstupuje do CNS. Dále phenothiazin (lék používaný ve vysokých dávkách u lékově rezistentní schizofrenie), phenytoin (antiepileptický lék), ondansetron (lék proti zvracení, často používaný u pacientů v chemoterapii). Bylo prokázáno, že domperidon je dobrý substrát, který projevuje zvýšený transport v apikálním směru a snížený transport ve směru bazálním. Haloperidol je horší substrát, u kterého nebyl zjištěn transport do CNS. Jako další vhodné substráty se projeví ondansetron a loperamid.

Klinické výzkumy indikují, že kromě makrocyclických laktonů i protiprůjmový lék loperamid, který je normálně vyloučen z mozku pomocí P-gp, způsobuje neurologickou toxicitu u *MDR1* (+/+) psů při normálních terapeutických dávkách. Zvýšená mozková penetrace pro mnoho dalších léků byla zjišťována u *MDR1* knockout myši. Byl testován vinblastin, doxorubicin, paclitaxel, quinidine, ondansetron, cyklosporin a verapamil. Ačkoliv nebyl lékový transport analyzován u psího P-gp, u většiny těchto léků se předpokládá zvýšená penetrace do mozku a nepříznivé účinky hlavně u *MDR1* (+/+) psů. Plazmatická farmakokinetika ostatních léků je změněna u psů s *MDR1* mutací a může tak vyvolat zvýšené nepříznivé účinky u těchto psů. Např. toxicita dioxinu byla zdokumentována u *MDR1* (+/+) kolie. Navíc byla pozorována zvýšená senzitivita po podání acepromazinu a butorphanolu *MDR1* (+/+) psům, kteří na rozdíl od normálních psů trpěli výraznou a dlouhou depresí. Nedávné klinické studie ukázaly, že *MDR1* genotyp je velice důležitý pro veterinární onkologii (Geyer a Janko, 2012).

3.7 Nejčastější plemena postižená *MDR1* mutací

3.7.1 Bobtail, staroanglický ovčák

3.7.1.1 Historie

Přibližně od 19. století byl bobtail ve Velké Británii považován za samostatné plemeno. Jeho cesta do Velké Británie započala už 5000 let př.n.l., kdy započal chov ovcí a v této době se dostali do Británie první ovčáci asijského původu. V dnešní podobě byl znám už od poloviny 17. století v příhraničních oblastí Anglie. Dokazují to obrazy M. Dixona (portrét vévody z Buccleugh, 1771). Starobylé ovčácké psy v typickém zbarvení šedém a bílém do chovu přivedl Dr. Edwards-Ker z Cessfordu u Kelso. Na výstavě byl bobtail poprvé předveden v roce 1865 v Islingtonu. V roce 1881 bylo toto plemeno jako *English Short Tailed Colie* zapsáno *Kennel Club* plemenné knize a později bylo plemeno zapisováno jako člen ovčáků jako *Old English Sheepdog*. V roce 1890 byl založen *Old English Sheepdog Club*. *American Kennel Club* toto plemeno uznal v roce 1888 (Císařovský, 2008).

3.7.1.2 Celkový vzhled

Silný pes, symetrický, se všemi částmi těla bohatě osrstěnými. Kohoutková výška psa je 61 cm a kohoutková výška feny 56 cm. Zbarvení může mít odstíny šedé, grizzly nebo modré. Hlava je proporční, mozkovna prostorná, nad očima dostatečně klenutá. Nos mají velký a černý, se širokými nozdrami. Oči jsou posazené daleko od sebe, tmavé nebo tzv. wall eyes. Uši jsou malé a nesené po stranách hlavy. Tělo bývá kratší, kompaktní s hlubokým a prostorným hrudníkem. Staroanglický ovčák je vrozeně nebo v důsledku kupírování označován jako tzv. bobtail, neboli bezocasý. Od roku 2004 ale standard připouští i delší ocas. Kromě bohaté srsti se bobtail vyznačuje zvláštním typem chůze - mimochodem. Tento styl chůze je u psů neobvyklý a způsobuje nápadný houpavý pohyb (Císařovský, 2008).

3.7.1.3 Povaha

Jeho povaha je veselá a hravá. Jako pracovní pes byl oblíben hlavně ve Skotsku v oblasti se zpracovatelským průmyslem ovčí vlny (Císařovský, 2008).

Obrázek 3 Bobtail



Dostupné z: <http://www.racedechien.fr/a-z/bobtail>

3.7.2 Kolie dlouhosrstá, krátkosrstá

3.7.2.1 Historie

Tak dlouho, jako se v Británii chovají ovce, tak dlouho se zde chovají i ovčáčí psi. Jde o plemeno velmi starobylé. Na vývoj ovčáckých plemen evropského původu patřil příchod Keltů v období 3. až 1. století př.n.l. Kmeny postupily do Skotska a odsud pocházejí dvě ostrovní formy původních evropských ovčáckých plemen. V roce 1879 se o dlouhosrsté kolii (rough) zmínil J.H. Walsh ve své knize *The Dog in Health and Disease*. Píše zde o kolii jako o jednom z nejkrásnějších a nejužitečnějších psů. Byla ceněna pro svůj elegantní vzhled a inteligenci. Krátkosrstá kolie byla křížena s hlídacími molossoidními psy a od tohoto spojení se odvozuje mimořádná všestrannost kolii. Rozdělení dvou rázů srsti kolie bylo ovlivněno prostředím a pracovním použitím. Kolie dlouhosrstá se používala na svazích u stád, kde ji srst chránila před nepříznivým počasím. Kolie krátkosrstá se uplatňovala při převádění ovcí na trhy. Ačkoliv srst dlouhosrstých kolii působí na pohled jemně, standard vyžaduje srst hrubou.

První klub chovatelů byl založen v roce 1885. Oba rázy byly na výstavách předváděny společně, ale později byl každý ráz převeden do své vlastní třídy.

Na rozdíl od ovčáků asijské vývojové větve se vyznačují hladkým osrstěním obličejové partie, klínovitým tvarem hlavy a vzpřímenými ušima.

Jméno kolie může být odvozeno od keltského slova ve významu „užitečný“, ale spíše je získala podle zvláštního druhu tmavě zbarvených ovcí colleys (Císařovský, 2008).

3.7.2.2 Celkový vzhled

Stavba těla se vyznačuje silou a aktivitou a je dokonale vyvážená. Výška v kohoutku u psů je 56-61 cm, u fen 51-56 cm. Zbarvení může být světle zlaté po sytě mahagonovou, trikolor (převládající černá se sytými, tríslově zbarvenými znaky na hlavě a končetinách) nebo blue-merle (převažuje jasná, stříbřitá modrá s černými skvrnami nebo s černě mramorovanou kresbou). Hlava je vyvážená v poměru k velikosti psa, s hladkými vnějšími liniemi. Lebka je plochá, zužující se od uší ke špičce nosu. Nos je černý. Oči jsou mírně šikmo uložené, barvy tmavě hnědé nebo blue-merle, u kterých jsou oči modré nebo modře skvrnité. Uši jsou malé, nasazené ani blízko, ani příliš daleko od sebe. V klidu jsou položeny dozadu a při pozornosti psa otočeny dopředu. Tělo je trochu delší, hrudník hluboký. Ocas je dlouhý, dosahující nejméně k hlezennímu kloubu. U dlouhosrstých je srst velmi hustá, hladká a tvrdá na dotek. U krátkosrsté je krátká, přiléhavá s hustou podsadou (Císařovský, 2008).

3.7.2.3 Povaha

Kolie je inteligentní, věrná a oddaná svému pánu. Chová se láskyplně a mile a k cizím může být mírně zdrženlivá, ale nikdy ne agresivní (Císařovský, 2008).

Obrázek 4 Kolie dlouhosrstá



Dostupné z: <http://www.svetpejsku.cz/plemena/1-plemena-ovcacka-pasteveck-a-honacka/114-kolie-dlouhosrsta>

3.7.3 Šeltie

3.7.3.1 Historie

Šeltie představuje typ ovčáka se všemi průvodními exteriérovými znaky (klínovitou hlavou, zašpicatělým čenichem). Je možné předpokládat, že šeltie se dostala do Británie také s keltskými přistěhovalci. Poprvé to mohlo být už kolem roku 1200 př.n.l. Šeltie je starší forma skotské kolie, díky ostrovní izolaci Shetland byla dlouho utajovaná světu. Poprvé se shetlandský ovčák objevil na výstavě až v roce 1906. V roce 1909 ho uznal *The Kennel Club* a v téže době byl založen *Shetland Collie Club* (Císařovský, 2008).

3.7.3.2 Celkový vzhled

Malý, dlouhosrstý pes. Ideální výška v kohoutku je u psů 37 cm, u fen 35,5 cm. Zbarvení je od světle zlaté po sytě mahagonovou, dále trikolor a blue-merle. Barva stínování je velice sytá. Hlava tvoří dlouhý tupý klín. Mozkovna je plochá s nevýrazným týlním hrbolem. Nos je černý. Oči jsou šikmo uložené, tmavě hnědé nebo blue-merle. Uši jsou malé, blízko sebe a v klidu položené dozadu. Tělo má hluboký hrudník a hřbet rovný (Císařovský, 2008).

3.7.3.3 Povaha

Shetlandský ovčák je živý, energický, vytrvalý pracovní pes. Má přátelskou a společenskou povahu, kvůli které je vyhledáván po celém světě (Císařovský, 2008).

Obrázek 5 Šeltie



Dostupné z: <https://www.rogz.cz/seltie/>

3.7.4 Border kolie

3.7.4.1 Historie

Zástupci ovčáckých plemen nalézáme ve všech oblastech světa. Před 4000 př. n. l. dorazili na britské ostrovy kočovní pastevci, ale se psy asijské vývojové větve. Původ border kolie je podle kosterních pozůstatků na kontinentech, kde v prehistorických dobách žila typická forma psa, jejíž variety se nacházejí téměř v každé evropské zemi. Má blízko k plemenům špicovitým. Border kolie z pomezí mezi Angli a Skotskem, tzv. *Border Counties*, je považována za nejlepšího ovčáckého psa na světě. Již od roku 1873 dokazuje své schopnosti na soutěžích *sheep herding trails*. Mimo Velkou Británii nebyla do 90. let 20. století moc známá. Pak však obliba velice rychle stoupla a dnes patří k oblíbeným plemenům (Císařovský, 2008).

3.7.4.2 Celkový vzhled

Pes dobrých proporcí, délka trupu by měla přesahovat kohoutkovou výšku. Ideální výška u psů je 53 cm, u fen poněkud nižší. U zbarvení srsti je povolena široká škála barev, ale bílá nesmí nikdy převládat. Lebka je poměrně široká. Nos je černý s výjimkou hnědých nebo čokoládově zbarvených psů, u nichž může být hnědý. Oči jsou široce posazené, hnědé nebo blue-merle. Uši střední velikosti jsou široce posazené, nesené vzpřímeně nebo částečně vzpřímeně. Tělo má atletický vzhled, hrudník hluboký a poměrně široký. Ocas dosahuje nejméně ke hleznu (Císařovský, 2008).

3.7.4.3 Povaha

Border kolie se vyznačuje enormní inteligencí. Vyžaduje smyslplnou práci s možností vlastní iniciativy. Učí se velmi rychle a na svého pána je velice fixovaná. Má naprosto neagresivní povahu a je velice dobrý společník (Císařovský, 2008).

Obrázek 6 Border kolie



Dostupné z: <https://www.rogz.cz/border-kolie/>

3.7.5 Německý ovčák

3.7.5.1 Historie

Toto plemeno je ve vzniku relativně mladé. V důsledku úsilí chovatelů se z rustikální a hrubé formy plemena stalo plemeno nejpropracovanější. Rodokmen německého ovčáka se dá odvozovat od prvních evropských zemědělců. Ovčáci se vyskytovali v celé Evropě a jejich lokální formy známe jako ovčáky holandské, ovčáky belgické, ovčáky pikardské, anglickou kolii nebo border kolii. Klub chovatelů německých ovčáků Verein für Deutsche Schäferhunde (SV), byl založen v roce 1899 ve Stuttgartu. V této době se plemeno používalo k práci u stád ovcí a k hlídání venkovských stavení. Spolek a plemenná kniha byly založeny 20. září 1899. Prvním zapsaným byl ovčák Hektor vom Linksrhein a po 20 letech bylo v knize zapsáno již 100 tisíc ovčáků (Císařovský, 2008).

3.7.5.2 Celkový vzhled

Pes střední velikosti, silný a dobře osvalený, pevné konstituce. Výška v kohoutku dosahuje u psů 60-65 cm, u fen 55-60 cm. Zbarvení je typické černé s červenohnědými, hnědými, žlutými až světlešedými znaky. Nos musí být vždy černý. Hlava je poměrně dlouhá, mezi ušima přiměřeně široká. Oči jsou středně velké, mandlovitého tvaru. Jejich barva odpovídá celkovému zbarvení srsti a je nejlépe tmavá. Uši jsou u kořene široké, vysoko nasazené, špičaté a postavené vzpřímeně směrem dopředu. Tělo délkou přesahuje

kohoutkovou výšku, hrudník není příliš široký. Ocas dosahuje nejméně k hlezňům a nepřesahuje však polovinu nártů. Je silně osrstěný a při pohybu zvednutý (Císařovský, 2008).

3.7.5.3 Povaha

Povaha německého ovčáka je vyrovnaná, sebevědomá a absolutně přirozená. Pes je pozorný a dobře ovladatelný. Musí mít odvalu, bojovnost a tvrdost, aby se mohl stát služebním psem a psem k obraně (Císařovský, 2008).

Obrázek 7 Německý ovčák



Dostupné z: <http://www.abides.cz/no/no.html>

3.7.6 Bílý švýcarský ovčák

3.7.6.1 Historie

Bílý švýcarský ovčák, dříve známý jako americko-kanadský bílý ovčák, je v podstatě bílá varieta německého ovčáka. V chovu německých ovčáku je však tato barva nepřipustná. Obdivovatelka bílých ovčáků Geraldine Rocketfeller měla chovatelskou stanici The Giralda Shepherds odkud pocházeli zcela bílí, ale i zcela černí ovčáci. Z bílých ovčáků se v Kanadě a ve spojených státech se vyvinulo samostatné plemeno. Na počátku 70. let byli první jedinci tohoto plemene importováni do Švýcarska. Od roku 1991 bylo plemeno zapsáno do plemenné knihy ve Švýcarsku. Na konci roku 2002 bylo plemeno švýcarský bílý ovčák uznáno Mezinárodní kynologickou federací (FCI) (Císařovský, 2008).

3.7.6.2 Celkový vzhled

Plemeno je silné, dobře osvalené. Kohoutková výška u psů dosahuje 60-66 cm, u fen 55-61 cm. Lebka je málo klenutá, se znatelnou rýhou ve středu. Nos je černý, ale tolerují se světlejší skvrny na nose. Oči jsou středně velké, mandlovitého tvaru, zbarveny hnědě. Uši jsou vysoko nasazené, nesené vzpřímeně. Ušní boltce směřují dopředu. Tělo je dobře osvalené, středně dlouhé. Ocas je hustě osrstěný, ke špičce zužující, nízko nasazený a dosahuje nejméně k hlezennímu kloubu (Císařovský, 2008).

3.7.6.3 Povaha

Švýcarský ovčák je podle standardu temperamentní, bez nervozity, pozorný a ostražitý. K cizím lidem je zdrženlivý, ale nikdy ne agresivní. Je vhodný jako společenský pes pro rodiny s dětmi. Je to pozorný hlídač, přátelský a učenlivý (Císařovský, 2008).

Obrázek 8 Bílý švýcarský ovčák



Dostupné z: <http://www.chovzvirat.cz/zvire/474-bily-svycarsky-ovcak/>

3.7.7 Australský ovčák

3.7.7.1 Historie

Australský ovčák se objevil teprve na konci 20. století. I přes jeho název je plemenem americkým. V roce 1990 byla založena United States Australian Shepherds Association, chovatelská organizace akceptovaná AKC (American Kennel Club). Za spoluzakladatele tohoto plemena se považuje Ernest Hartnagle, majitel chovatelské stanice Las Rocosa. Jeho chov začal už v roce 1955. V USA je chována menší varieta pod názvem Miniature Australian

Shepherd, který od roku 1976 spadá pod Australian Shepherd Club of America (ASCA) (Císařovský, 2008).

3.7.7.2 Celkový vzhled

Plemeno je střední velikosti, pevné a svalnaté, bez známek těžkopádnosti. Výška u psů je 51-58 cm, u fen 46-53 cm. Zbarvení je podle standardu blue-merle, černé, červená merle nebo červená s bílými či hnědými znaky. Hlava je úměrná tělu, lebka nahoře plochá až mírně klenutá. Nos u blue-merle je černý, u red-merle s červenou pigmentací. Oči jsou mandlovitého tvaru. Blue-merle mají černou pigmentaci kolem očí, red-merle a červení mají hnědou pigmentaci kolem očí. Uši jsou trojúhelníkovitého tvaru, poměrně vysoko posazené. Tělo je pevně stavěné, hřber rovný a silný. Ocas rovný, kupírovaný nebo přirozeně krátký, nepřesahující délku 10 cm (Císařovský, 2008).

3.7.7.3 Povaha

Přirozená je pro plemeno vyrovnaná povaha. Může být zdrženlivý, ale svému majiteli je oddaný. Je to inteligentní pes se silným pasteveckým a ochránářským instinktem (Císařovský, 2008).

Obrázek 9 Australský ovčák



Dostupné z: <http://www.mu-j-pes.cz/plemena/australsky-ovcak-366.html>

3.8 Laboratoře vyšetřující mutaci genu *MDR1*

3.8.1 Laboratoř Genomia

Genomia je soukromá akreditovaná laboratoř sídlící v Plzni. Zabývá se genetickým testováním osob, zvířat a patogenů. Nabízí odborné testování psů a provádí genetická vyšetření na detekci mnoha genetických chorob, patogenů, testy na alergie u psů, parentitu a také testy na určení barvy a kvality srsti.

Genomia je jediná laboratoř v České republice vyšetřující defekt genu *MDR1*. Nabízí kombinaci testů pro ovčácké psy, bobtaily a border kolie.

Izolaci DNA provádí většinou z krve nebo stěru sliznice ústní dutiny, méně pak z vlasových cibulek nebo jiné tkáně (kůže, placenta, sval, vnitřní orgány).

U výsledků vyšetření používá jednotný systém. N= negativní- hledaný znak (např. mutace, delece) není přítomen, P= pozitivní- hledaný znak (např. mutace, delece) je přítomen.

Více informací lze získat na stránkách www.genomia.cz

3.8.2 Laboklin

Laboratoř Laboklin(www.laboklin.de) se nachází v Německu. Nabízí široké spektrum laboratorních vyšetření včetně genetických vyšetření dědičných chorob, barvu srsti, parenitou a mnoho dalších. U psů vyšetřují víc než 60 dědičných nemocí. Patří mezi ně i vyšetření *MDR1* genu.

Pro DNA test je DNA izolována z krve. Metoda PCR získaný gen nareplikuje a pomocí molekulárně- genetických metod je zjišťována genomová sekvence související s mutací nt230 (del4).

Výsledky vyšetření *MDR1* genu v Laboklinu za roky 2006 až 2009 ukazují, že 57% všech vzorků bylo pro mutaci genu negativních, 32% byli přenašeči a 11% byli postižení jedinci. Největší počet postižených homozygotních jedinců byl u dlouhosrstých kolíí.

3.9 Genetické metody nejčastěji používané pro detekci mutací

3.9.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR), je metoda rychlého zmnožení (amplifikace) vybraného úseku DNA.

Amplifikace DNA se provádí in vitro a během několika hodin se sekvence mohou replikovat milionkrát i vícekrát. Metodu PCR vyvinul Kary Mullis, který za tuto práci obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii (Snustad a Simmons, 2009).

3.9.1.1 Průběh PCR

Metoda zahrnuje tři kroky, které se mnohokrát opakují.

1) Denaturace templátové(genomové) - DNA je denaturována zahřátím na 92-95 °C po dobu přibližně 30 sekund (počáteční denaturace se provádí při 95°C po dobu 2-5 minut). Denaturovaná genomová DNA má funkci templátu. Dojde k uvolnění vodíkových vazeb mezi bázemi komplementárních nukleotidů a přechod dvoušroubovicových DNA ve volné polynukleotidové řetězce.

2) Annealing - denaturovaná DNA je hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů tak, že se inkubují společně při 50-60 °C (v závislosti na sekvenci primerů) po dobu 30 sekund. Dochází k připojení primerů na komplementární úsek templátu.

3) Elongace - použita je DNA-polymeráza pro replikaci (syntézu) nového úseku DNA od primeru do konce templátu ve směru 5-3 Primer umožňuje kovalentní navázání dalšího nukleotidu a následné prodlužování řetězce. K polymeraci dochází při 70-72 °C po dobu 1,5 minuty (u 500 bp produktu potrvá přibližně 1 minutu). Tímto je ukončen první cyklus a jeho produkty se stávají substráty druhého cyklu, ve kterém jsou již vytvářeny molekuly DNA, jejichž velikost je definována vzdáleností vazebných míst primerů.

Cykly se opakují (např. z původně jedné molekuly DNA po 32 cyklech vzniká 1 miliarda molekul DNA) (Snustad a Simmons, 2009).

3.9.1.2 Složení reakční směsi

Templátová DNA obsahuje gen (cílovou sekvenci), který chceme amplifikovat a slouží jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců. Množství templátové DNA může být nepatrné, ale příliš velké množství DNA naopak způsobuje v reakci problémy, jako např.

nespecifické nasedání primerů. Lze ji izolovat z různých vzorků (z různých mikroorganismů, bioptických vzorků, stěrů, z buněk z tkáňových kultur, z tělních tekutin atd.) (Bustin, 2004). Primery jsou oligonukleotidové úseky jednovláknové DNA o délce 20 – 30 nukleotidů. Dvě různé primerové sekvence se váží na vlákna templátové DNA a ohraničují tak oblast, která má být amplifikována (Bustin, 2004).

Dříve se používala DNA-polymeráza I. z *Escherichia coli*, ale tento enzym se během denaturačního kroku inaktivoval teplotou a musel se proto opětovně přidávat čerstvý enzym (Snustad a Simmons, 2009).

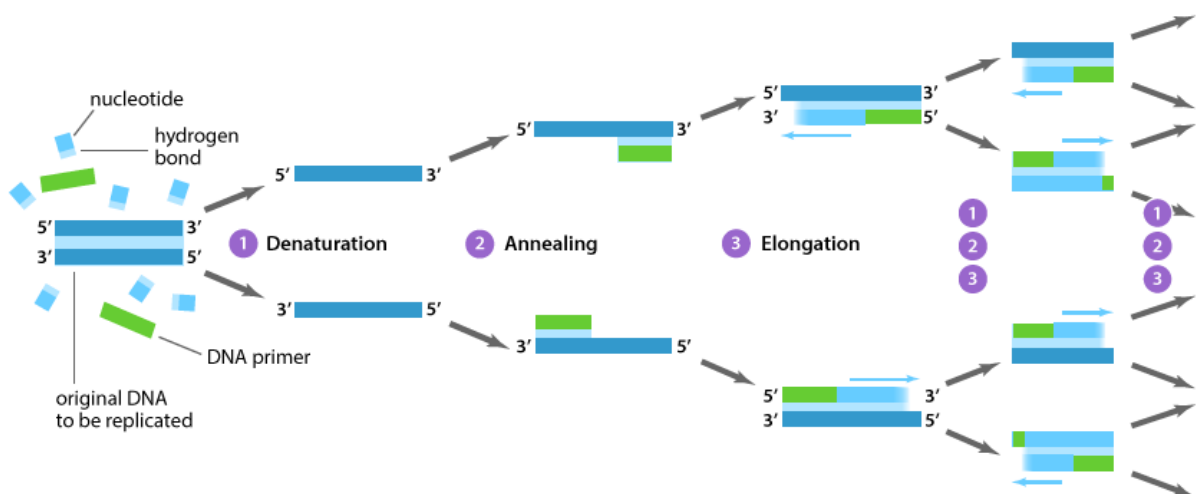
Posléze byla izolována termostabilní DNA-polymeráza z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Tato polymeráza se nazývá *Taq*-polymeráza. *Taq*-polymeráza enzym o molekulové hmotnosti 94 kDa. Optimální teplota je 75-80 °C. Je termostabilní a uchovává si enzymatickou aktivitu i při opakovaném zahřátí na 95 °C.

Taq-DNA polymeráza má pouze 5'-3' exonukleázovou aktivitu, ale postrádá tuto aktivitu ve směru 3'-5'. Z toho plyne relativně vysoká frekvence chyb. Pokud je vyžadována vysoká přesnost, provádí se PCR s použitím teplotně stabilních polymeráz, které vykazují 3'-5'- korekční aktivitu, např. *Pfu* (z *Pyrococcus furiosus*) nebo *Tli* (z *Thermococcus litoralis*) (Snustad a Simmons, 2009).

Základní reakční roztok obsahuje všechny čtyři deoxynukleosidtrifosfáty (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), dále se přidává pufovací roztok (vytvoření potřebných podmínek pro aktivitu DNA polymerázy) a soli (hlavně MgCl₂).

Přístroje pro PCR se nazývají termální cyklery a mohou pojmout velké množství vzorků.

Obrázek 10 Polymerázová řetězová reakce (Shafique, 2012)



3.9.2 Horizontální gelová elektroforéza

3.9.2.1 Historie vzniku elektroforézy

V roce 1892 byl popsán pohyb anorganických částic v elektrickém poli v koloidním roztoku. Později se ukázalo, že tak putují i proteiny ve vodných roztocích. Arne Tiselius, švédský elektrochemik, zkonstruoval zařízení, umožňující rozdělit proteiny na základě jejich rozdílných rychlostí pohybu v elektrickém poli (roku 1948 byl oceněn Nobelovou cenou) (Gaš, 2001).

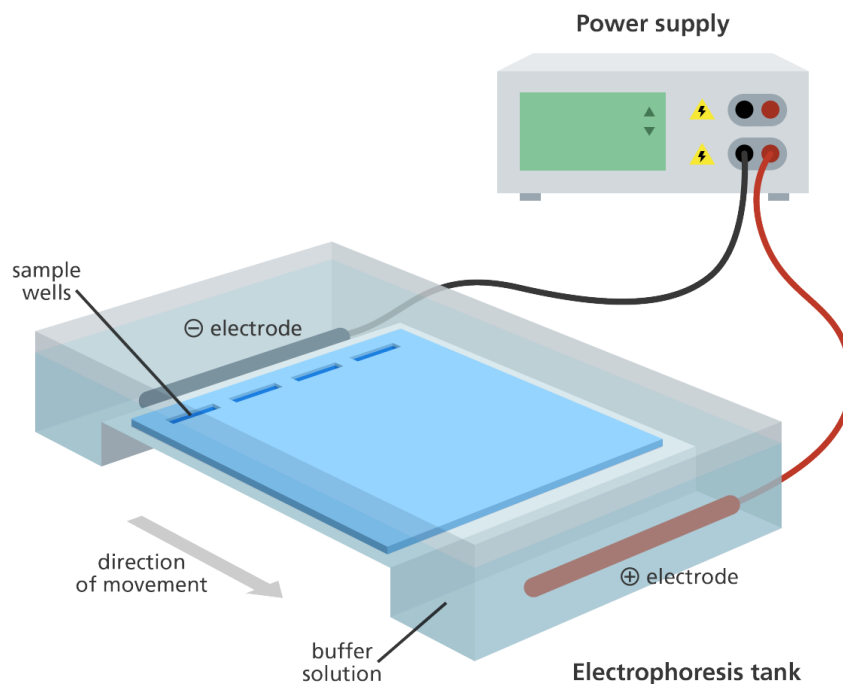
3.9.2.2 Popis metody

Elektroforéza patří mezi nejpoužívanější separační techniky při izolaci a analýze nukleových kyselin (NK). Je to velmi rychlá a relativně levná metoda.

Principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nukleové kyseliny nesou záporný náboj (nosičem je fosfátová skupina). Pohybují se tedy k anodě-kladně nabitě elektrodě.

Elektroforéza probíhá v nosičích-gelech-umístěných v tzv. elektroforetickém pufru. Gel slouží jako síť polymerních molekul s póry, kterým molekuly putují. Velikost pórů je možné ovlivnit složením a koncentrací polymeru. Nejčastěji používané látky jsou agaróza a polyakrylamid. V agaróze bývá velikost separovaných molekul 100 - 50 000 bp a v polyakrylamidu 10 - 100 bp (Lee et al., 2012).

Obrázek 11 Horizontální gelová elektroforéza (<http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis>)



3.9.2.3 Faktory ovlivňující průběh elektroforézy

Elektroforetickou mobilitu ovlivňuje mnoho faktorů. Jednou z nich je velikost molekuly, kdy větší molekuly migrují pomaleji v důsledku tření. Dále je ovlivněna koncentrací gelu. Čím vyšší koncentrace, tím hustší gel a pomalejší pohyb molekul. Při vyšší koncentraci analýza trvá déle. Dalším faktorem je konformace DNA. Kružnicová konformace DNA migruje pomaleji než lineární DNA téže velikosti. Důležité je aplikované napětí (V/cm). Rychlost migrace lineární DNA je přímo úměrná použitému napětí. V tomto případě je napětí 100 V. Při vysokém napětí se gel zahřívá a fragmenty migrují nerovnoměrně, DNA se může poškodit. Interkalační barviva používaná k detekci NK, např. EtBr (ethidium bromid), mohou snížit mobilitu asi o 15%. Elektroforetické pufrý tvoří prostředí, ve kterém elektroforéza probíhá. Je to roztok soli, kterým je vyplněna tzv. elektroforetická vana. Gel musí být zcela ponořen v tomto pufru. Je vodivý a umožňuje tok elektronů mezi elektrodami. Udržují stálé pH a jsou netoxické a levné (Lee et al., 2012).

3.9.2.4 Nejčastěji používané pufrý

TBE (Tris, Borate, EDTA) - tris (hydroxymethyl) aminometan, kyselina boritá a EDTA (nejpoužívanější)

TAE (Tris, Acetate, EDTA) - tris (hydroxymethyl) aminometan, kyselina octová a EDTA (rychlejší)

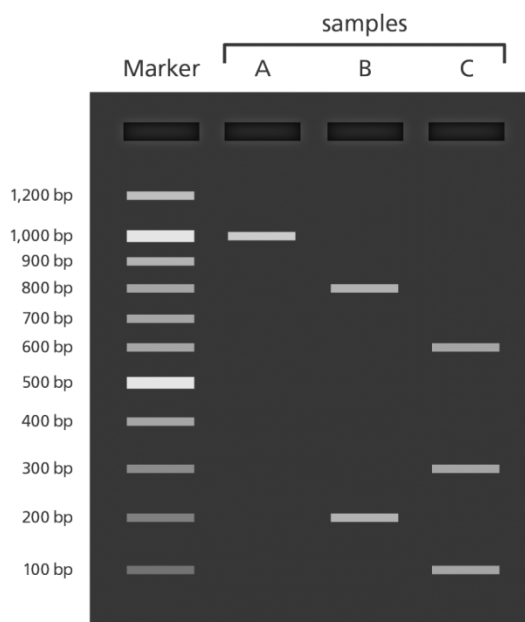
SB (Sodium/Borate)- roztok NaOH a kyselina boritá (umožňuje použít vyšší napětí)

LB (Lithium/Borate)

3.9.2.5 Velikostní marker

Velikostní marker (hmotnostní standard, „ladder“) slouží pro odhad velikosti separovaných fragmentů nukleových kyselin. Nanáší se do jedné jamky v gelu. Jedná se o plazmidovou DNA štěpenou několika restrikčními enzymy. Pro fragmenty s očekávanou velikostí 100-1000 bp se používá 100 bp ladder, pro fragmenty od 1kb do 10 kb používáme 1kb laddery (Lee et al., 2012).

Obrázek 12 PCR marker (<http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis>)



3.9.3 Kapilární elektroforéza

3.9.3.1 Popis metody

Kapilární elektroforézou se označuje separační metoda využívající pohyb nabitých částic v elektrickém poli, a to ve volném roztoku elektrolytu nebo v nosném médiu (např. gel) (Gaš, 2001).

Kapilární elektroforéza (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE) je elektromigrační separační metoda realizovaná v kapilárním formátu. Kapilární elektroforéza

spadá do velké rodiny podobných metod jako např. zoňová elektroforéza (CZE), elektroforéza v síťovacích prostředcích klasických agarozových i polyakrylamidových gelů (CGE) nebo bioafinitní elektroforéza. Díky jejich citlivosti jsou HPCE techniky považovány za nejúčinnější analytické separační metody. Mají široké uplatnění ve výzkumu i v praxi mnoha oborů jako např. chemie, biochemie, molekulární biologie, klinická chemie, biotechnologie a další. Největší využití je spojeno s analýzami proteinů a nukleových kyselin (Pazourek, 2003).

Elektroforézu můžeme provádět v různých prostředích. V agarozovém gelu (agarosa-polysacharid z mořských řas- rod *Rhodophyceae*), polyakrylamidu (chemicky síťovaný polymer, $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) či v kapiláře (Pazourek, 2003).

Kapilární elektroforéza probíhá v křemenné kapiláře (průměr 20-200 μm), která je naplněná elektrolytem nebo gelem. Množství vzorku musí být přizpůsobeno velikosti separační kapiláry. Objem kapiláry je 1-10 μl a objemy vzorku nepřekračují 0,1-1% této hodnoty. K detekování takového malého množství se používají optické detektory (UV-VIS nebo fluorescenční). Separační kapilára není určena na jedno použití. Po každé analýze musí být vnitřek kapiláry vyčištěn. U této metody je výhodou jednoduchá příprava vzorku i separační aparatury (Pazourek, 2003).

Kapilární elektroforézou lze analyzovat a separovat všechny typy rozpustných ionogenních nízko- i vysokomolekulárních látek, např. anorganické i organické kyseliny a zásady, kovové ionty, aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, sacharidy, nukleosidy, nukleotidy a nukleové kyseliny, syntetické polymery a nabitě (bio)částice jako viry, buňky a buněčné organely (Pazourek, 2003).

3.9.3.2 Elektroosmotický tok v kapiláře

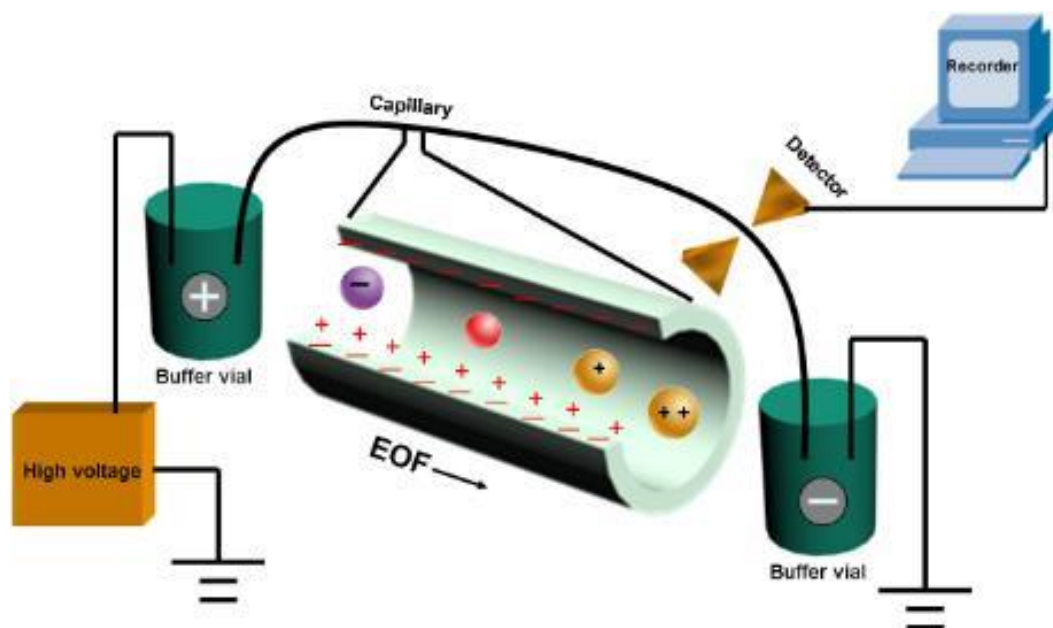
Povrch kapiláry obsahuje negativně nabitě funkční skupiny, které přitahují pozitivně nabitě ionty. Tyto ionty migrují k negativní elektrodě a unášejí molekuly rozpouštědla stejným směrem. Tento pohyb kapaliny se nazývá elektroosmotický tok. Během separace se neutrální molekuly pohybují stejným směrem jako elektroosmotický tok. Pozitivně nabitě ionty se díky elektroosmotickému toku pohybují rychleji a negativní jsou zpomalovány (Pazourek, 2003).

Na vnitřním povrchu kapiláry se stýká kapalným roztok s pevnou stěnou kapiláry. Na tenkém místě styku vzniká elektrická dvojvrstva. Pevnou část dvojvrstvy tvoří vnitřní stěna kapiláry a bývá nabitá plošným elektrickým nábojem, který je „přilepen“ na stěně a je tedy nepohyblivý. Pohyblivou část dvojvrstvy tvoří vrstva (asi 10nm silná) opačného náboje v kapalně části.

Tato pohyblivá vrstva podléhá působení napětí a dává se do pohybu směrem k příslušnému pólu, čímž strhne celý průřez kapaliny v kapiláře. Tomuto jevu se říká elektroosmóza. Na rozdíl od elektroforézy, při které putují pouze nabité ionty a zbytek roztoku je v klidu, teče při elektroosmóze celý roztok najednou. Elektroosmózu lze ovlivnit složením roztoku, hlavně přísady tzv. tenzidů (povrchově aktivní látky), které mohou změnit rychlost nebo i směr toku (Gaš, 2001).

Elektroforéza může využít gel jako nosné médium, ale i jako síto, přes které malé molekuly procházejí lépe a rychleji než velké. Lze tedy dělit nabitě molekuly podle velikosti. Používá se např. při separaci různých dlouhých sekvenčních fragmentů DNA. Před separací jsou fragmenty označeny čtyřmi fluorescenčními značkami (barvivy), které odpovídají čtyřem nukleotidovým bázím tvořícím řetězec DNA (cytosin, guanin, adenin, thymin). Na kapiláru se svítí laserovým svazkem a světlo při průchodu fragmentů se snímá čtyřmi detektory, z nichž každý rozpozná své barvivo přes příslušný optický filtr (Gaš, 2001).

Obrázek 13 Kapilární elektroforéza (Yu et al., 2012)



4 Metodika

4.1 Plemena vybraná pro genetické testování

K testování mutace genu *MDR1* v laboratoři byla vybrána taková plemena, u kterých se podle dostupných zdrojů mutace *MDR1* objevuje nejčastěji. Bylo testováno 100 border kolií (58 fen, 42 psů), dále 113 bearded kolií (63 fen, 50 psů) a 40 vzorků československých vlčáků. Ve všech případech se jednalo o psy a feny s průkazem původu. Přehled jednotlivých hodnocených zvířat včetně pohlaví a zbarvení je uveden v tabulkách xx xx xx. Bearded kolie a českoslovenští vlčáci nebyli zařazeni v celosvětových výzkumech, ale vzhledem k tomu, že jsou to referenční plemena ovčáků, kteří touto mutací nejvíce trpí, byli zařazeni do této bakalářské práce. Lze u nich předpokládat výskyt mutace.

4.2 Izolace DNA

Genomická DNA byla izolována z buklálních buněk, které byly odebrány pomocí speciálního sterilního cytologického kartáčku. Po odebrání vzorků a jejich vysušení ve sterilním prostředí byl kartáček vložen do mikrozumavky.

Následovala samotná izolace DNA pomocí izolačního postupu uvedeného v NucleoSpin® Tissue Kitu od firmy Macherey-Nagel. Použita byla metoda adsorpce na silikát.

Kit obsahuje: 100 ml T1 a 75 ml B3 pufrů (pro lýzu buňky), 150ml BW a 50ml B5 pufrů (k promývání), Elution Buffer-BE (uvolnění DNA ze silikátového sítka), EtOH, Proteináza K.

Obrázek 14 Mikrozumavka se silikátovým filtrem a použité pufrы



4.2.1 Postup izolace DNA

- 1) Vzorek z bukální sliznice na cytologickém kartáčku byl vložen do mikrozkušavky a jeho horní část byla odstřižena desinfikovanými nůžkami tak, aby se mikrozkušavka dala zavřít.
- 2) Ke vzorku bylo přidáno 180 μ l T1 pufru a 25 μ l Proteinázy K. Následně byl vzorek promíchán na vortexu. Vzorek byl vložen do termoboxu na dobu 30 minut při teplotě 56 °C a při zahřívání byl ještě 4x promíchán na vortexu.
- 3) Dále se přidalo 4 μ l RNAzy, následně bylo přidáno 200 μ l B3 pufru. Vzorek byl znovu promíchán a ponechán v termobloku po dobu 10 minut v teplotě 70 °C.
- 4) Kartáček byl vyndán a do zkumavky bylo přidáno 210 μ l 96% etanolu. Vzorek byl jemně promíchán.
- 5) Obsah zkumavky byl přepipetován do zkumavky se silikátovým filtrem. Zkumavka byla odstředěna centrifugou při 11 000 x g po dobu 1 minuty. Tak byla DNA zachycena na filtru. Zbytek tekutiny protekl skrz filtr a byl vylit.
- 6) Silikátový filtr byl promyt 500 μ l pufru BW a znovu odstředěn na centrifuze při 11 000 x g po 1 minutu a dále bylo promyt 600 μ l pufru B5 a znovu odstředěn na centrifuze při 11 000 x g po 1 minutu. Tekutina byla vylita.
- 7) Vzorek byl ještě jednou odstředěn na centrifuze při 11 000 x g, aby protekla všechna nepotřebná tekutina.
- 8) K uvolnění DNA ze silikátového filtru byl použit pufr BE v množství 100 μ l. Následně se centrifugoval při 11 000 x g po dobu 2 minut. Roztok s uvolněnou DNA byl znovu přepipetován na filtr a znovu centrifugován při 11 000 x g po dobu 30 sekund.
- 9) Takto izolovaná DNA byla skladována v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

Obrázek 15 Termoblok a vortex

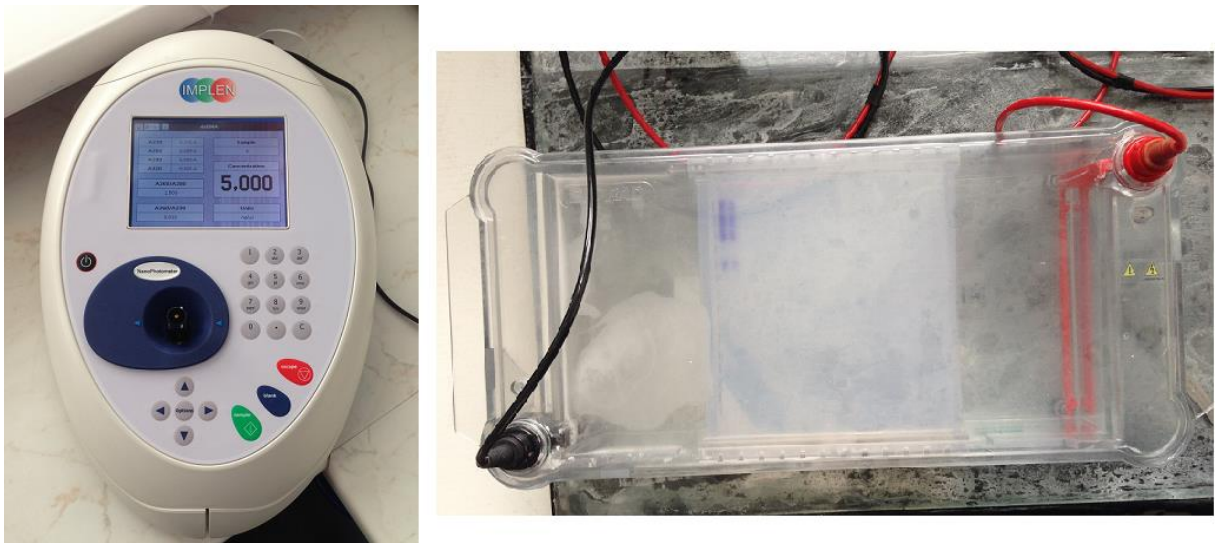


4.3 Stanovení kvantity a kvality izolované DNA

Stanovení kvantity izolované DNA bylo provedeno přístrojem NanoPhotometer (Implen), který zjistí kvantitu pomocí UV-spektrofotometru. Přístroj byl kalibrován 3 μ l pufru BE a následně byly postupně přidávány vzorky na čtecí místo spektrofotometru také v množství 3 μ l. Přístroj určil kvantitu DNA a provedl zhodnocení parametru A260/A280. A260 a A280 představují změřené absorbance roztoku při příslušné vlnové délce. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při 280 nm odráží její čistotu (míru přítomnosti proteinů). Hodnota by se měla pohybovat od 1,8-2,1.

Pro zhodnocení kvality DNA byla použita gelová elektroforéza SubCell (BioRad). Izolovaná DNA byla nanesena do kolonek 1% agaróзовého gelu, do kterého byl přidán ethidium bromid (EtBr). Ethidium bromid detekuje DNA při agaróзовé elektroforéze. Pod UV EtBr navázaný na DNA emituje světlo díky vmezeřením mezi jednotlivé báze DNA. Elektroforéza probíhala v prostředí 1x TBE pufru po dobu 30 minut a napětí 120 V. Výsledné elektroforeogramy byly pomocí programu QuantityOne systému GelDoc archivovány v počítači.

Obrázek 16 NanoPhotometer a elektroforéza v agarózovém gelu



4.4 Optimalizace PCR amplifikace-primery *MDR1*-orig-F a *MDR1*-orig-R

Pro detekci kauzální mutace genu *MDR1* byla použita dvojice primerů, které byly publikovány v práci Firdové et al. (2016). Primery byly následující: *MDR1*-orig-F 5` CCTCTCATGATGCTGGT 3` a *MDR1*-orig-R 5` TGAAATTCCTGCATTTGCA 3`. Primer *MDR1*-orig-F byl na 5` konci označen fluorescenční barvou 6-FAM. Pomocí termocykleru byl sestaven teplotní gradient pro vybrání optimální anealingové teploty. Teplotní gradient byl tvořen následujícími anelačními teplotami: 56 °C, 56,8 °C, 57,9 °C, 59,2 °C, 61 °C, 62,5 °C, 63,5 °C, 64 °C.

Tabulka 8 Složení premixu pro PCR amplifikaci primerů *MDR1*-orig-F a *MDR1*-orig-R

Složka	Koncentrace
DNA	30ng/12,5µl
Tris KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 µM
<i>MDR1</i> -orig-F	0,4 µM
<i>MDR1</i> -orig-R	0,4 µM
Enhancer (TOP-BIO)	2 mM
BSA	5 µg/ 12,5 µl
<i>Taq</i> polymeráza	0,7 U/ 12,5 µl

K amplifikaci byl použit termocykler C1000TM Thermal Cycler od firmy BioRad a program MDRGR2. Časový a teplotní profil je uveden v tabulce 9.

Tabulka 9 Časový a teplotní gradient PCR amplifikace

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	180	1
Denaturace	95	30	30
Annealing	Grad*	30	30
Elongace	72	40	30
Závěrečná elongace	72	420	1
Chlazení	12	∞	

*T₁=56 °C, T₂=56,8 °C, T₃=57,9 °C, T₄= 59,2 °C, T₅= 61 °C, T₆=62,5 °C, T₇= 63,5 °C, T₈= 64 °C

Po amplifikaci po dobu 1 hodiny a 48 minut byla provedena detekce PCR produktů pomocí horizontální gelové elektroforézy SubCell (BioRad). Po proběhnutí všech cyklů v termocykleru bylo ke vzorkům přidáno 2μl nanášejícího pufru s barvivem. Dále byl připravený vzorek s Gen Rulerem 100bp Plus DNA Lader (Thermofisher Science), ke kterému bylo také přidáno barvivo (8 μl H₂O, 1 μl DNA Lader, 2 μl nanášecí pufr s barvivem).

Amplifikace byla ověřena na horizontální gelové elektroforéze. Fragменты byly separovány v předem připraveném 5% agarózovém gelu s ethidium bromidem v prostředí 1x TBE po dobu 40 minut při napětí 120 V. Následně byla DNA vizualizovaná pomocí ethidium bromidu v systému GelDoc (BioRad) a byla provedena archivace elektroforeogramů v počítači.

Jako nejvhodnější teplota pro annealing byla podle výsledků gelové elektroforézy vybrána teplota 56 °C.

4.5 Detekce mutace *MDR1* pomocí kapilární elektroforézy

Po amplifikaci PCR produktů s fluorescenčně značenými primerovými páry *MDR1*-orig-F a *MDR1*-orig-R byly produkty připraveny pro kapilární elektroforézu. PCR produkty byly naředěny PCR vodou v poměru 1:29, byl přidán velikostní standard Liz600 a Hi-Di

formamid. Zmíněné látky a PCR produkty byly nepipetovány do polypropylenových zkumavek pro fragmentační analýzu.

Tabulka 10 Příprava směsi pro kapilární elektroforézu

Naředěný PCR produkt 1:29 (μl)	1
Liz600 (μl)	0,2
Hi-Di formamid (μl)	12

Takto připravené vzorky byly následovně denaturovány při 95 °C v termocykleru C1000 (BioRad) po dobu 5 minut a poté byly zchlazeny na teplotu 4 °C. K separaci a identifikaci jednotlivých alel byla použita kapilární elektroforéza probíhající v přístroji ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). U nemutované alely byla předpokládána velikost ampliconu 60 bp, u mutované alely 54 bp. V tabulce 11 je uveden přehled parametrů fragmentační analýzy.

Tabulka 11 Parametry fragmentační analýzy přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Parametry fragmentační analýzy	Hodnoty přístroje
Délka kapiláry	36
Modul	GS STR POP4 (1ml) G5
Polymer	POP4
Virtuální filtr	G5
Doba nástřiku (s)	5
Napětí při nástřiku (kV)	15
Teplota při separaci (°C)	60
Napětí při separaci (kV)	15
Doba separace (min)	24

4.6 Optimalizace PCR amplifikace-primery *MDR1*-czu-F a *MDR1*-czu-R

Pro sekvenační analýzu byla pomocí programu PRIMER3 input V.0.4.0 (Untergasser et al., 2012) navržena dvojice primerů *MDR1*-czu-F 5`GGTTGGACCAGGATGGTAATAG3` a *MDR1*-czu-R 5`TTTCCCCCAGAAATAAACACAC3`. Pomocí termocykleru byl vytvořen teplotní gradient pro vybrání optimální anealingové teploty. Teplotní gradient byl tvořen následujícími anealingovými teplotami: 60°C, 60,8 °C, 61,9 °C, 63,2 °C, 65 °C, 66,5 °C, 67,5 °C, 68 °C.

Tabulka 12 Složení premixu pro PCR amplifikaci primerů *MDR1*-czu- F a *MDR1*-czu-R

Složka	Koncentrace
DNA	30ng/12,5µl
Tris KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 µM
<i>MDR1</i> -orig-F	0,4 µM
<i>MDR1</i> -orig-R	0,4 µM
Enhancer (TOP-BIO)	2 mM
BSA	5 µg/ 12,5 µl
<i>Taq</i> polymeráza	0,7 U/ 12,5 µl

K amplifikaci byl použit termocykler C1000TM Thermal Cycler a program MDRGrad. Časový a teplotní profil je uveden v tabulce 13.

Tabulka 13 Časový a teplotní profil gradient PCR amplifikace

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	180	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	Grad*	30	35
Elongace	72	60	35
Závěrečná elongace	72	420	1
Chlazení	12	∞	

$T_1=60$ °C, $T_2=60,8$ °C, $T_3=61,9$ °C, $T_4=63,2$ °C, $T_5=65$ °C, $T_6=66,5$ °C, $T_7=67,5$ °C, $T_8=68$ °C

Po amplifikaci byla provedena detekce substrátů DNA na horizontální gelové elektroforéze SubCell (BioRad). Po proběhnutí všech cyklů bylo ke vzorkům přidáno 2 μ l nanášejícího pufru s barvivem a byl připraven vzorek s GenRulerem 100 bp Plus (1 μ l DNA Lader, 2 μ l nanášecí pufr, 8 μ l H₂O).

Fragmenty byly separovány v horizontální gelové elektroforéze v předem připraveném 2% agarózovém gelu s ethidium bromidem v prostředí 1x TBE. Elektroforéza probíhala 40 minut při napětí 120V.

DNA byla následně vizualizovaná pomocí systému GelDoc (BioRad) a výstupní elektroforeogramy se archivovaly v počítači.

Jako nejlepší teplota pro annealing byla podle výsledků gelové elektroforézy hodnota 60 °C.

4.7 Sekvenační analýza

Cílem sekvenační analýzy bylo zjistit přítomnost či absenci 4 nukleotidové delece v PCR amplikonu. Pro sekvenační analýzu byly použity primery *MDR1-czu-F* a *MDR1-czu-R*. Pro sekvenační analýzu byli použiti dva zástupci plemene border kolie (vzorek číslo 1 a 56), dva zástupci bearded kolie (vzorky číslo 6 a 92) a dva zástupci plemene československý vlčák (vzorky 906 a 927).

4.7.1 Postup sekvenační analýzy

1) PCR amplifikace

Složení PCR reakce a teplotní a časový profil jsou uvedeny v tabulkách 12 a 13. Byla použita anelační teplota 60 °C.

Po proběhnutí amplifikace bylo ke vzorkům přidáno 2µl nanášecích pufru. Byl připraven vzorek s Gen Rulerem 100bp Plus s přidáním barvivem (2 µl) a vodou (8 µl). Následně byly vzorky vloženy do kolonek horizontální elektroforézy po dobu 40 minut a napětí 120V. Fragmenty se separovaly v 2% agarózovém gelu s přidáním ethidium bromidem v prostředí 1x TBE.

2) Přečištění (purifikace) PCR produktů

Zbylé primery a neinkorporované nukleotidy je potřeba odstranit pomocí komerčního kitu. Byl použit MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen). Postup je uveden v tabulce 14.

Tabulka 14 Postup přečištění

Krok	Postup
1	Byly vyříznuty části gelu obsahující DNA, použitím čistého skalpelu. Tyto části byly vloženy do zkumavky a zváženy (tab.)
2	Ke vzorkům byl přidán v poměru 1:1 Binding pufr.
3	Vzorky byly po dobu 10 minut ponechány v termoboxu při teplotě 50 °C. Byly ještě několikrát promíchány na vortexu. Gel musel být zcela rozpuštěn. Nutná byla i kontrola pH pomocí barvy vzorku. Žlutá barva označovala optimální pH. Pokud byla barva oranžová nebo fialová, ke vzorkům se přidalo 10µl octanu sodného.
4	Dále byl použit 100% isopropanol v poměru 1:1 ke srážení a přečištění produktu.
5	800 µl vzorku bylo přeneseno do zkumavek s přečišťujícím filtrem. Vzorek byl centrifugován 1 minutu při 14 000 x g. Proteklá tekutina byla vylita.
6	Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl Binding pufru a po dobu 1 minuty byly vzorky centrifugovány při 14 000 x g a proteklá tekutina byla znovu vylita.
7	Dále bylo přidáno 700 µl Wash pufru obsahujícího etanol. Vzorky byly znovu centrifugovány 1 minutu při 14 000 x g, proteklá tekutina byla vylita.
8	Vzorky se znovu zcentrifugovaly 1 minutu při 14 000 x g, aby se zbavily přebytečného Wash pufru.
9	Zkumavka s filtrem se přenesla do čisté zkumavky. Přidalo se 25 µl H ₂ O (pH= 8,1) k uvolnění DNA na filtru. Vzorek se 1 minutu centrifugoval 14 000 x g.

Následně byla DNA kvantifikována pomocí NanoPhotometer podle stejného postupu jako při izolaci DNA. Produkt byl naředěn H₂O na koncentraci DNA 10 ng/μl.

3) Příprava sekvenační reakce

Sekvence amplikonu *MDR1* genu byla provedena pomocí kitu od firmy Applied Biosystems, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. V tabulce 15 jsou uvedeny objemy použitých komponentů.

Tabulka 15 Objemy komponentů pro sekvenační reakci

Složka	Objem	Koncentrace
PCR produkt	7,5 μl	6,5 ng/ μl
Primer F (R)	3,2 μl	3,2 pikomolu . 20 μl ⁻¹
5x sequencing Buffer	4 μl	1x
Terminator Ready Reaction mix	2 μl	2 μl . 20 μl ⁻¹

4) Čištění produktů sekvenační reakce

Ke vzorku bylo přidáno 2μl roztoku glykogenu, 2 μl 3M octanu sodného a 50 μl 96% etanolu. Směs byla promíchána a ponechána v klidu 15 minut při pokojové teplotě. Dále byla centrifugována po dobu 15 minut a při 13 200 x g. Přebytná tekutina byla odpipetována a vysrážené produkty byly zachyceny na dně zkumavky.

K vysráženému produktu bylo přidáno 250 μl 70% etanolu, byl znovu centrifugován 15 minut při 13 200 x g a přebytná tekutina znovu odpipetována. Tento krok se ještě jednou zopakoval.

Vzorek byl řádně vysušen vložením do termobloku na 30 minut. Termoblok byl vyhřátý na teplotu 50 °C. Následně bylo přidáno 15 μl Hi-Di formamidu.

Vzorek byl přepipetován do polypropylenových zkumavek a denaturován v termocykleru C1000 (BioRad) při 95 °C po dobu 5 minut. Dále byl vzorek ochlazen na teplotu 4 °C a přenesen do podávacího systému kapilární elektroforézy. V tabulce 16 jsou uvedeny parametry sekvence na kapilární elektroforéze.

5) Parametry kapilární elektroforézy pro sekvenci PCR produktů

V tabulce 16 jsou uvedeny parametry sekvenační analýzy pomocí kapilární elektroforézy. Ta byla provedena pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Tabulka 16 Parametry sekvenační analýzy pomocí kapilární elektroforézy

Parametry	Hodnoty
Délka kapiláry (cm)	50
Modul	SeqPOP6 (1ml) E
Polymetr	POP6
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku (s)	30
Napětí nástřiku (kV)	2,5
Teplota při separaci (°C)	50
Napětí při separaci (kV)	11,3
Doba separace (minuty)	120

5 Výsledky

5.1 Vybraná plemena a jejich predispozice k mutaci genu *MDR1*

V tabulkách 17 - 23 jsou vypsáni zástupci tří plemen, kteří byli hodnoceni v této bakalářské práci. Plemena byla vybrána podle výsledků různých autorů, kteří také zjišťovali přítomnost této mutace při svých experimentech. U vybraných plemen (border kolie a bearded kolie) bylo teoreticky předpokládáno, že bude prokázán výskyt mutované alely genu *MDR1*. Dále bylo testováno plemeno československý vlčák, které zatím nebylo u jiných autorů zmiňováno, ale přesto bylo použito díky jeho příbuznosti s jinými ovčáckými plemeny.

V tabulkách jsou uvedena čísla, pohlaví a barva srsti vyšetřovaných psů. Vyšetřování jedinci neprokázali výskyt mutované alely. Všech 100 jedinců border kolií, 113 jedinců bearded kolií a 40 jedinců československých vlčáků bylo dominantně homozygotních (-/-), tedy 100% jedinců bylo negativních pro mutaci genu *MDR1*.

Tabulka 17 Border kolie a výsledky detekce mutace genu *MDR1* – 1. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Barva	Mutace
1	fena	černo-bílá	-/-
3	pes	černo-bílá	-/-
5	pes	hnědo-bílá	-/-
13	fena	černo-bílá	-/-
16	fena	černo-bílá	-/-
20	fena	černo-bílá	-/-
21	pes	černo-bílá	-/-
22	fena	černo-bílá	-/-
23	pes	hnědo-bílá s pálením	-/-
24	fena	černo-bílá	-/-
25	fena	černo-bílá	-/-
26	fena	blue merle	-/-
27	pes	černo-bílá	-/-
28	fena	černo-bílá	-/-
29	fena	černo-bílá	-/-
30	pes	černo-bílá	-/-
31	fena	černo-bílá	-/-
32	pes	tricolor	-/-
33	pes	černo-bílá	-/-
34	pes	černo-bílá	-/-
35	fena	černo-bílá	-/-
36	pes	černo-bílá	-/-
37	pes	tricolor	-/-
38	fena	černo-bílá	-/-
39	pes	modro-bílá	-/-
40	fena	hnědo-bílá s pálením	-/-
41	fena	černo-bílá	-/-
42	fena	blue merle	-/-
43	pes	černo-bílá	-/-
44	fena	černo-bílá	-/-
45	pes	černo-bílá	-/-
46	fena	černo-bílá	-/-
47	fena	černo-bílá	-/-
49	pes	černo-bílá	-/-
50	pes	černo-bílá	-/-
51	pes	hnědo-bílá	-/-
52	fena	černo-bílá	-/-
53	fena	černo-bílá	-/-

Tabulka 18 Border kolie a výsledky detekce mutace genu *MDR1* – 2. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Barva	Mutace
55	pes	blue merle s pálením	-/-
56	fena	tricolor	-/-
57	fena	černo-bílá	-/-
59	pes	černo-bílá	-/-
60	fena	tricolor	-/-
61	pes	černo-bílá	-/-
62	pes	černo-bílá	-/-
64	fena	černo-bílá	-/-
65	fena	černo-bílá	-/-
66	fena	černo-bílá	-/-
67	fena	tricolor	-/-
68	pes	černo-bílá	-/-
69	pes	red merle s pálením	-/-
70	fena	černo-bílá	-/-
71	pes	černo-bílá	-/-
72	fena	černo-bílá	-/-
73	pes	blue merle s pálením	-/-
74	fena	černo-bílá	-/-
75	fena	černo-bílá	-/-
76	pes	černo-bílá	-/-
77	fena	černo-bílá	-/-
78	fena	australská červená	-/-
80	fena	tricolor	-/-
81	fena	tricolor	-/-
82	pes	černo-bílá	-/-
83	fena	blue merle	-/-
84	fena	černo-bílá	-/-
85	pes	černo-bílá	-/-
86	pes	černo-bílá	-/-
87	fena	blue merle	-/-
88	fena	černo-bílá	-/-
89	fena	černo-bílá	-/-
90	pes	černo-bílá	-/-
91	fena	tricolor	-/-
92	fena	černo-bílá	-/-
93	fena	černo-bílá	-/-
94	fena	blue merle	-/-
95	fena	blue merle	-/-

Tabulka 19 Border kolie a výsledky detekce mutace genu *MDR1* – 3. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Barva	Mutace
96	fena	hnědo-bílá s pálením	-/-
97	fena	hnědo-bílá	-/-
98	pes	modro-bílá	-/-
99	pes	černo-bílá	-/-
100	fena	černo-bílá	-/-

Tabulka 20 Bearded kolie a výsledky detekce mutace genu *MDR1* – 1. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Barva	Mutace
2	pes	černo-bílá	-/-
3	pes	černo-bílá	-/-
4	pes	černo-bílá	-/-
5	pes	hnědo-bílá	-/-
6	fena	černo-bílá	-/-
8	pes	černo-bílá	-/-
10	fena	černo-bílá	-/-
13	fena	hnědo-bílá	-/-
15	pes	černo-bílá	-/-
16	fena	černo-bílá	-/-
17	pes	černo-bílá	-/-
19	fena	černo-bílá	-/-
21	fena	černo-bílá	-/-
42	fena	modro-bílá	-/-
44	fena	tricolor	-/-
46	fena	černo-bílá	-/-
47	pes	černo-bílá	-/-
49	pes	černo-bílá	-/-
53	pes	černo-bílá	-/-
54	pes	černo-bílá	-/-
55	fena	černo-bílá	-/-
57	fena	černo-bílá	-/-
58	pes	hnědo-bílá	-/-
59	pes	modro-bílá	-/-
66	fena	hnědo-bílá	-/-
68	fena	černo-bílá	-/-
70	pes	černo-bílá	-/-
71	pes	černo-bílá	-/-
72	pes	černo-bílá	-/-

Tabulka 21 Bearded kolie a výsledky detekce mutace genu *MDR1* – 2. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Barva	Mutace
74	pes	černo-bílá	-/-
82	fena	modro-bílá	-/-
83	fena	černo-bílá	-/-
85	fena	hnědo-bílá	-/-
87	fena	černo-bílá	-/-
88	pes	hnědo-bílá	-/-
89	pes	hnědo-bílá	-/-
92	fena	černo-bílá	-/-
93	fena	hnědo-bílá	-/-
94	fena	hnědo-bílá	-/-
95	fena	hnědo-bílá	-/-
96	pes	černo-bílá	-/-
97	fena	černo-bílá	-/-
99	fena	plavo-bílá	-/-
100	pes	plavo-bílá	-/-
101	fena	hnědo-bílá	-/-
102	pes	hnědo-bílá	-/-
103	pes	hnědo-bílá	-/-
105	pes	černo-bílá	-/-
110	pes	hnědo-bílá	-/-
111	fena	hnědo-bílá	-/-
112	pes	hnědo-bílá	-/-
113	pes	černo-bílá	-/-

Tabulka 22 Českoslovenští vlčáci a výsledky detekce mutace genu *MDR1* – 1. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Barva srsti	Mutace
901	fena	vlkošedá	-/-
902	pes	vlkošedá	-/-
903	fena	vlkošedá	-/-
904	pes	vlkošedá	-/-
905	fena	vlkošedá	-/-
906	fena	vlkošedá	-/-
907	pes	vlkošedá	-/-
908	pes	vlkošedá	-/-
909	fena	vlkošedá	-/-
910	fena	vlkošedá	-/-
911	pes	vlkošedá	-/-
912	fena	vlkošedá	-/-

Tabulka 23 Českoslovenští vlčáci a výsledky detekce mutace genu *MDR1* – 1. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Barva srsti	Mutace
913	pes	vlkošedá	-/-
914	fena	vlkošedá	-/-
915	pes	vlkošedá	-/-
916	fena	vlkošedá	-/-
917	fena	vlkošedá	-/-
918	pes	vlkošedá	-/-
919	fena	vlkošedá	-/-
920	fena	vlkošedá	-/-
921	fena	vlkošedá	-/-
922	pes	vlkošedá	-/-
923	fena	vlkošedá	-/-
924	fena	vlkošedá	-/-
925	fena	vlkošedá	-/-
926	pes	vlkošedá	-/-
927	pes	vlkošedá	-/-
928	fena	vlkošedá	-/-
929	fena	vlkošedá	-/-
930	pes	vlkošedá	-/-
931	pes	vlkošedá	-/-
932	pes	vlkošedá	-/-
933	fena	vlkošedá	-/-
934	pes	vlkošedá	-/-
935	fena	vlkošedá	-/-
936	pes	vlkošedá	-/-
937	pes	vlkošedá	-/-
938	fena	vlkošedá	-/-
939	pes	vlkošedá	-/-
940	fena	vlkošedá	-/-

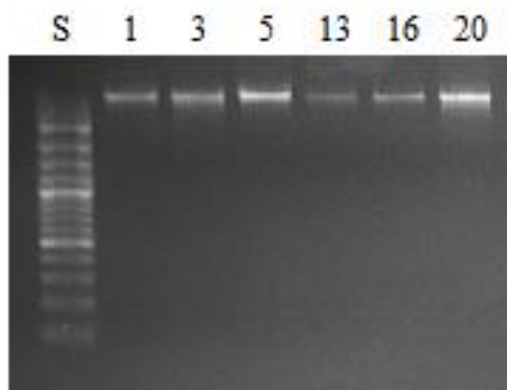
5.2 Kvalita a kvantita izolované DNA

K izolaci genomické DNA byl použit NucleoSpin® Tissue Kit od firmy Macherey-Nagel, který se ukázal jako vhodný pro izolaci DNA psa. Přesto, že cílem nebylo zjistit kvalitu a kvantitu DNA, byl každý vzorek kvantifikován z důvodu nezbytnosti používání shodného množství templátové DNA v každé PCR reakci. Použitý metodický postup umožnil získání dostatečného množství genomické DNA s kvalitou vhodnou pro následné PCR analýzy

Pomocí testovací elektroforézy byla hodnocena vysokomolekularita a přítomnost RNA v izolovaných vzorcích. Byl získán elektroforeogram (obrázek číslo 17), který zobrazuje

fragment DNA. Je patrné, že zde nejsou přítomny molekuly RNA, ani fragmenty degradované DNA.

Obrázek 17 Testovací elektroforéza izolované genomické DNA u vybraných zástupců plemene border kolie



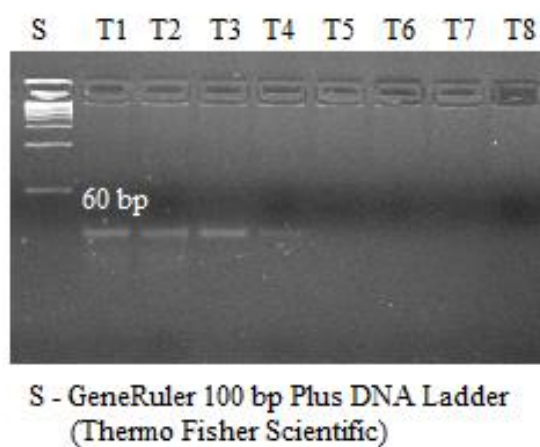
S - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder
(Thermo Fisher Scientific)

5.3 Optimalizace anelačních teplot PCR markerů genu *MDR1*

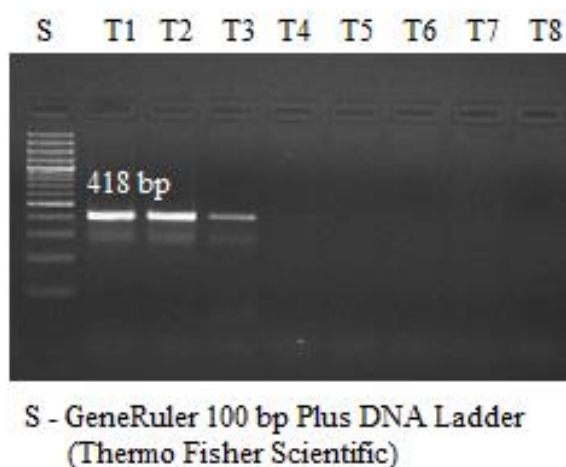
Optimalizace PCR markerů byla provedena s cílem zjistit optimální anelační teploty. Anealingová teplota byla zjištěna u dvou párů primerů *MDR1*-orig-F, *MDR1*-orig-R a *MDR1*-czu-F, *MDR1*-czu-R. Teplota musí být vhodná pro použitý pár primerů. Při nesprávné teplotě se mohou tvořit nescifické produkty, a nebo se nevytváří dostatečné množství produktu. Proto byl pro každý pár sestaven teplotní gradient pro výběr nejvhodnější teploty.

Pro primery *MDR1*-orig-F a *MDR1*-orig-R byla zvolena teplota 56 °C, pro primery *MDR1*-czu-F a *MDR1*-czu-R teplota 60 °C. Na obrázcích 18 a 19 jsou zobrazeny elektroforeogramy teplotních gradientů.

Obrázek 18 Optimalizace anelační teploty při použití primerů *MDR1*-orig-F a *MDR1*-orig-R



Obrázek 19 Optimalizace anelační teploty při použití primerů *MDR1*-czu-F a *MDR1*-czu-R

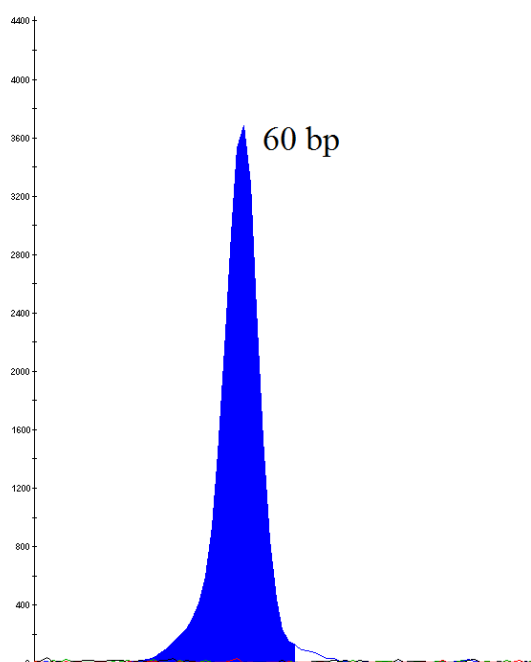


5.4 Detekce kauzální mutace genu *MDR1* kapilární elektroforézou

Pro detekci genotypů u všech jedinců byly použity PCR markery *MDR1*-orig-F a *MDR1*-orig-R.

Všichni zástupci psů uvedených v tabulkách 17 - 23 byli nemutovaní homozygoti. Chromatogram na obrázku číslo zobrazuje nemutovaného homozygota s jedním píkem. Vzniká zde pouze jeden fragment o velikosti 60 bp. Na obrázku číslo 20 je tento chromatogram uveden.

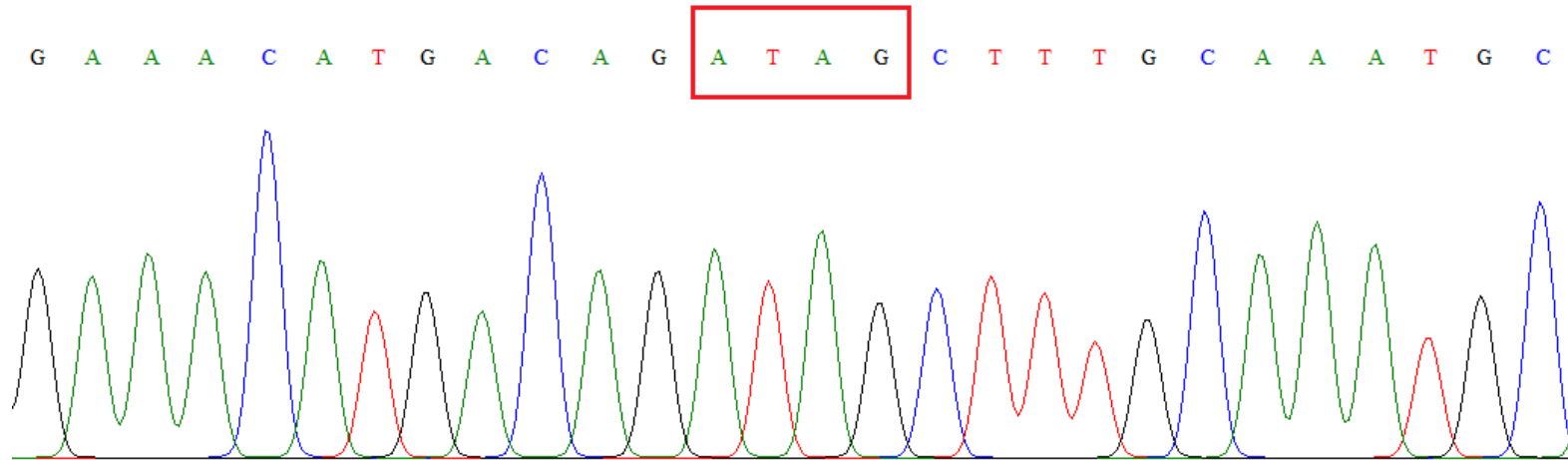
Obrázek 20 Výsledný chromatogram zobrazující nemutovaného homozygota s jedním píkem



5.5 Sekvence ampliconů markeru genu *MDR1*

K ověření správného nasedání primerů a specifičnosti amplifikace byla použita sekvenační analýza PCR produktu. Pro analýzy byli vybráni vždy dva zástupci plemen border kolie, bearded kolie a československý vlčák. Ve všech případech se jednalo o jedince, u kterých byla fragmentační analýzou potvrzena přítomnost pouze nemutované alely genu *MDR1*. Na obrázku 21 je uveden výřez chromatogramu se získanou sekvencí. Na obrázku 22 je uvedeno porovnání získaných sekvencí pomocí programu BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999). V červeném rámečku je u obou obrázků vyznačena sekvence čtyř nukleotidů, které jsou u mutované alely deletovány.

Obrázek 21 Sekvence genu *MDRI* u zástupce plemene border kolie



Obrázek 22 Porovnání sekvencí genu *MDRI* u různých plemen psů

border kolie 1	GCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTTTCCAGTTATAAT
border kolie 56	GCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTTTCCAGTTATAAT
bearded kolie 6	GCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTTTCCAGTTATAAT
border kolie 92	GCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTTTCCAGTTATAAT
československý vlčák 906	GCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTTTCCAGTTATAAT
československý vlčák 927	GCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTTTCCAGTTATAAT

5.6 *In silico* bioinformatické analýzy

In silico analýza označuje výpočetní metodu, která je poměrně často používána v molekulární genetice. Slouží k porovnávání výsledků experimentů s *In silico* modely, které můžeme najít v různých nukleotidových databázích. Pro vyhodnocení sekvenační analýzy byla použita mezinárodní nukleotidová databáze Ensembl (Hubbard et al., 2002).

5.6.1 Ověření specifity použitých primerů *In silico* analýzou

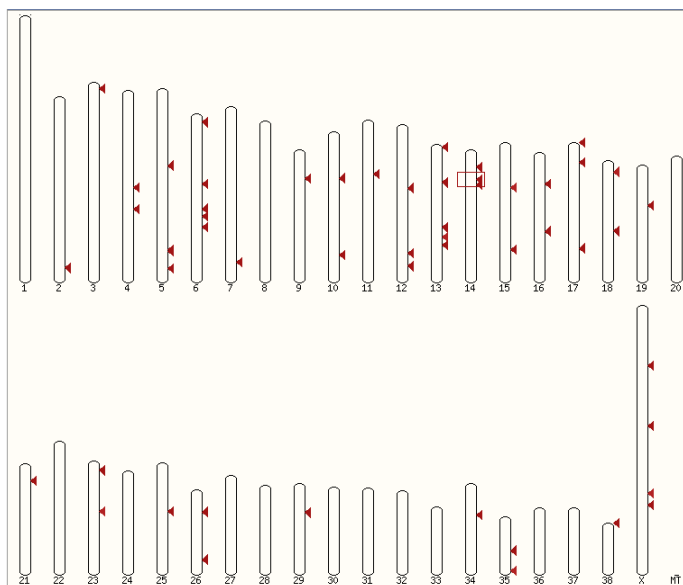
Cílem *In silico* analýzy bylo zjistit, zda dvojice primerů z experimentální části vymezují předpokládaný úsek. Vycházela jsem z primerů publikovaných v práci Firdové et al. (2016). K analýze byla použita nukleotidová databáze Ensembl (Hubbard et al., 2002) a zjištěná data zde byla ověřena.

Dvojice použitých primerů je komplementární s předpokládanou oblastí na chromozomu 14. Rámeček se šipkou označuje místo s nejvyšší podobností se sekvencí. Oba primery jsou homologní i k jiným částem psího genomu.

Obrázek 23 Komplementarita primeru *MDRI*-czu-F v genomu psa domácího (databáze Ensembl)

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
14:13726826-13726847 [Sequence]	MDR1	Reverse	1	22	22 [Sequence]	44.1	6e-04	100.00 [Alignment]
2:78756462-78756479 [Sequence]		Forward	4	21	18 [Sequence]	36.2	0.16	100.00 [Alignment]
17:48631842-48631858 [Sequence]		Forward	3	19	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
13:38024419-38024435 [Sequence]		Reverse	3	19	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
12:59138583-59138599 [Sequence]		Forward	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
14:8044615-8044630 [Sequence]	RBM28	Forward	6	21	16 [Sequence]	32.2	2.4	100.00 [Alignment]
14:16041326-16041341 [Sequence]		Reverse	1	16	16 [Sequence]	32.2	2.4	100.00 [Alignment]
13:42450543-42450562 [Sequence]	GABRA2	Reverse	2	21	20 [Sequence]	32.2	2.4	95.00 [Alignment]
9:13342796-13342811 [Sequence]	HELZ	Reverse	4	19	16 [Sequence]	32.2	2.4	100.00 [Alignment]
6:32427749-32427764 [Sequence]		Forward	1	16	16 [Sequence]	32.2	2.4	100.00 [Alignment]
6:43723936-43723951 [Sequence]		Reverse	3	18	16 [Sequence]	32.2	2.4	100.00 [Alignment]
5:74718529-74718544 [Sequence]	CNTNAP4	Reverse	5	20	16 [Sequence]	32.2	2.4	100.00 [Alignment]
35:15398819-15398834 [Sequence]	ENSCAFG00000034264	Reverse	6	21	16 [Sequence]	32.2	2.4	100.00 [Alignment]

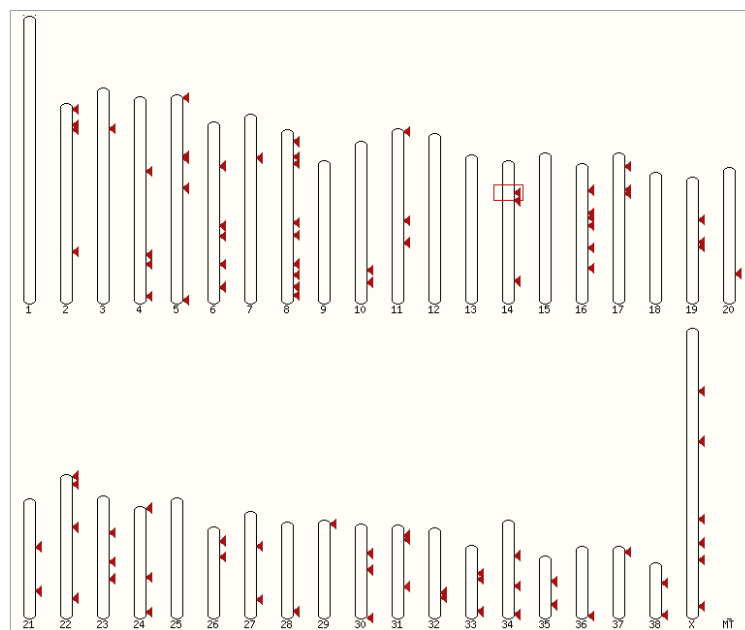
Obrázek 24 Komplementarita primeru *MDRI*-czu-F v genomu psa domácího (databáze Ensembl)



Obrázek 25 Komplementarita primeru *MDR1*-czu-R v genomu psa domácího (databáze Ensembl)

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E.val	%ID
14:13726430-13726451 [Sequence]	MDR1	Forward	1	22	22 [Sequence]	44.1	6e-04	100.00 [Alignment]
11:48394348-48394368 [Sequence]		Forward	1	21	21 [Sequence]	42.1	0.003	100.00 [Alignment]
37:2653229-2653247 [Sequence]		Reverse	3	21	19 [Sequence]	38.2	0.039	100.00 [Alignment]
22:52829967-52829984 [Sequence]		Reverse	5	22	18 [Sequence]	36.2	0.16	100.00 [Alignment]
19:29513144-29513161 [Sequence]		Reverse	5	22	18 [Sequence]	36.2	0.16	100.00 [Alignment]
14:51412320-51412336 [Sequence]		Reverse	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
11:1094349-1094365 [Sequence]	ENSCAFG00000030653	Forward	4	20	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
11:47665045-47665061 [Sequence]		Forward	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
11:49141744-49141760 [Sequence]		Reverse	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
19:18084052-18084068 [Sequence]		Forward	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
X:48330733-48330749 [Sequence]	ENSCAFG00000036828 , ENSCAFG00000016517	Reverse	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
X:81646013-81646029 [Sequence]		Forward	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
X:98868208-98868224 [Sequence]		Forward	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]

Obrázek 26 Komplementarita primeru *MDR1*-czu-R v genomu psa domácího (databáze Ensembl)



5.6.2 *In silico* identifikace místa kauzální mutace genu *MDR1*

V publikacích je uváděno, že umístění genu *MDR1* je na 14. chromozomu. Analýza tedy byla zaměřena na určení přesné pozice genu v genomu psa. Na obrázku číslo 28 jsou zobrazeny první exony a introny genu *MDR1*. Firdlová et al. (2016) uvádí, že mutace genu *MDR1* způsobuje vznik předčasného stop kodonu na pozici 75 aminokyseliny a také, že se tato mutace nachází ve 4. exonu. Pro identifikaci oblasti genu byla použita nukleotidová databáze Ensembl (Hubbard et al., 2002) a pozornost byla věnována 4. exonu.

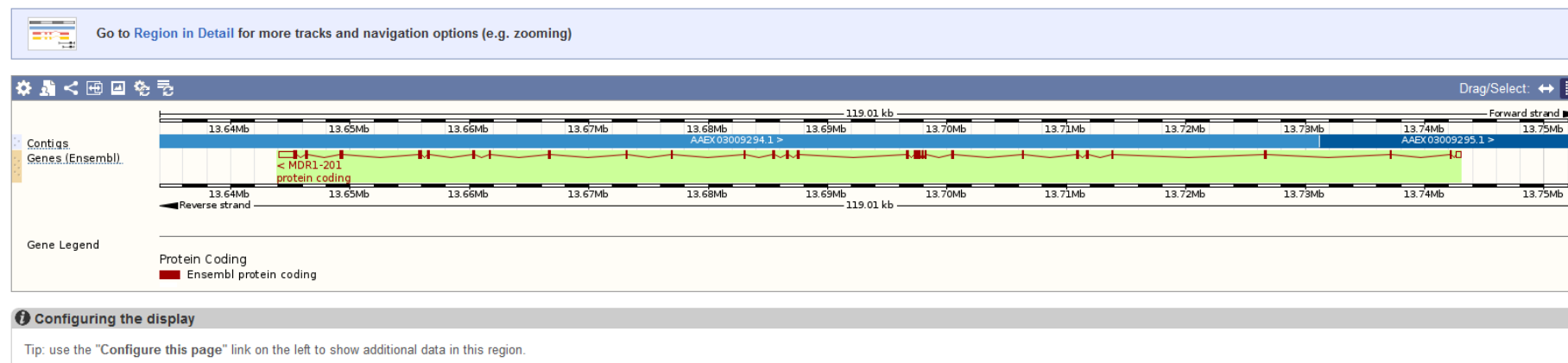
Obrázek 27 Pozice genu *MDR1* na autozomu 14 (databáze Ensembl)

Gene: MDR1 ENSCAFG0000001835

Description ATP binding cassette subfamily B member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:40]
Synonyms p-gp, MDR1
Location [Chromosome 14: 13,644,042-13,743,053](#) reverse strand.
CanFam3.1:CM000014.3
About this gene This gene has 1 transcript ([splice variant](#)), [83 orthologues](#), [3 paralogues](#), is a member of [1 Ensembl protein family](#) and is associated with [1 phenotype](#).
Transcripts [Show transcript table](#)

Summary

Name MDR1 (UniProtKB Gene Name)
Ensembl version ENSCAFG0000001835.3
Gene type Known protein coding
Annotation method Annotation produced by the Ensembl [genebuild](#).



Obrázek 28 Prvních 5 exonů genu *MDR1* (databáze Ensembl)

[Exons/ Introns](#)
[Translated sequence](#)
[Flanking sequence](#)
[Intron sequence](#)
[UTR](#)

[Variants](#)
Frameshift
Missense
Synonymous

[Markup](#) loaded

No.	Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
	5' upstream sequence					atatacacatctgtatattttccacggatgatggagctttatgtggacatgc
1	ENSCAFE00000292124	13,743,053	13,742,667	-	-	387	AGAGACATGACTCTATGAAATGTTAAGAGTCCCAGTTCAGCCGTTATGCGTTTCTC TCTGGCTCTTCTAAGGAGCAACAGCAAGGAGGACATTCCTCCTGGAACCCAACTGTT TCGTAACCTCGCCTTGAATCAGCATTGCGGCGAGCGGGCCGACAGGGGAACCCGAGG CCGATTGGCTGGCCAGGAGCACCAGGTTGAGGACGCGCCGCCCTCACTCCCGG GACGCGAARACCCGGCGCTGCGAGCAGCGCTCCTCTGCTCCAAGGAGCCAGGC CGTTGTTGCTGCCCTCCGGTCTTTAAAGTCTGACTCTCATCTTCCCAAATCCCTTCTC GGTGGAGGTTGCGAAGGAAGCCCGAG
	Intron 1-2	13,742,666	13,742,223			444	gtaggcgcgcgatgctgagggtc.....tcgatggcctctgttttatcctcag
2	ENSCAFE00000019844	13,742,222	13,742,152	-	2	71	GTACGATGGATCCTGAAGGAGCCGTAAGGGGATGCAGAGAAGAACTTCGGAAAATG GGCAAAAAAAG
	Intron 2-3	13,742,151	13,737,182			4,970	gtagccagtttcttctcactttcata.....gtgtaatcctgttctgtctttcag
3	ENSCAFE00000019847	13,737,181	13,737,130	2	0	52	TAAAAAATGAGAAGAAAGAAACCAACTGTCAGCACGTTTGCAATG
	Intron 3-4	13,737,129	13,726,710			10,420	gtgagctgaattattcagtggtc.....ttctttcttttttttttttttttag
4	ENSCAFE00000019850	13,726,709	13,726,538	0	1	172	TTTCGCTATTCAAATGGCTTGATAGTTGTATATGTTGGTGGGACAATGGCTGCCATC ATCCATGGAGCTGCATCCCTCTCATGATGCTGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTT GCAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAATTTCCAGTTATAATTAATGAAA
	Intron 4-5	13,726,537	13,713,855			12,683	gtaagtattatttggcactgatc.....atatgtttgtttgtggtgatctag
5	ENSCAFE00000019853	13,713,854	13,713,800	1	2	55	GTATTACGAACAATACACAACATTTTCATCAACCATCTGGAGGAGGAAATGACCAC
	Intron 5-6	13,713,799	13,711,819			1,981	gtaattaaacattttcttactatt.....gtgtagtgttcttctgttctttgcag

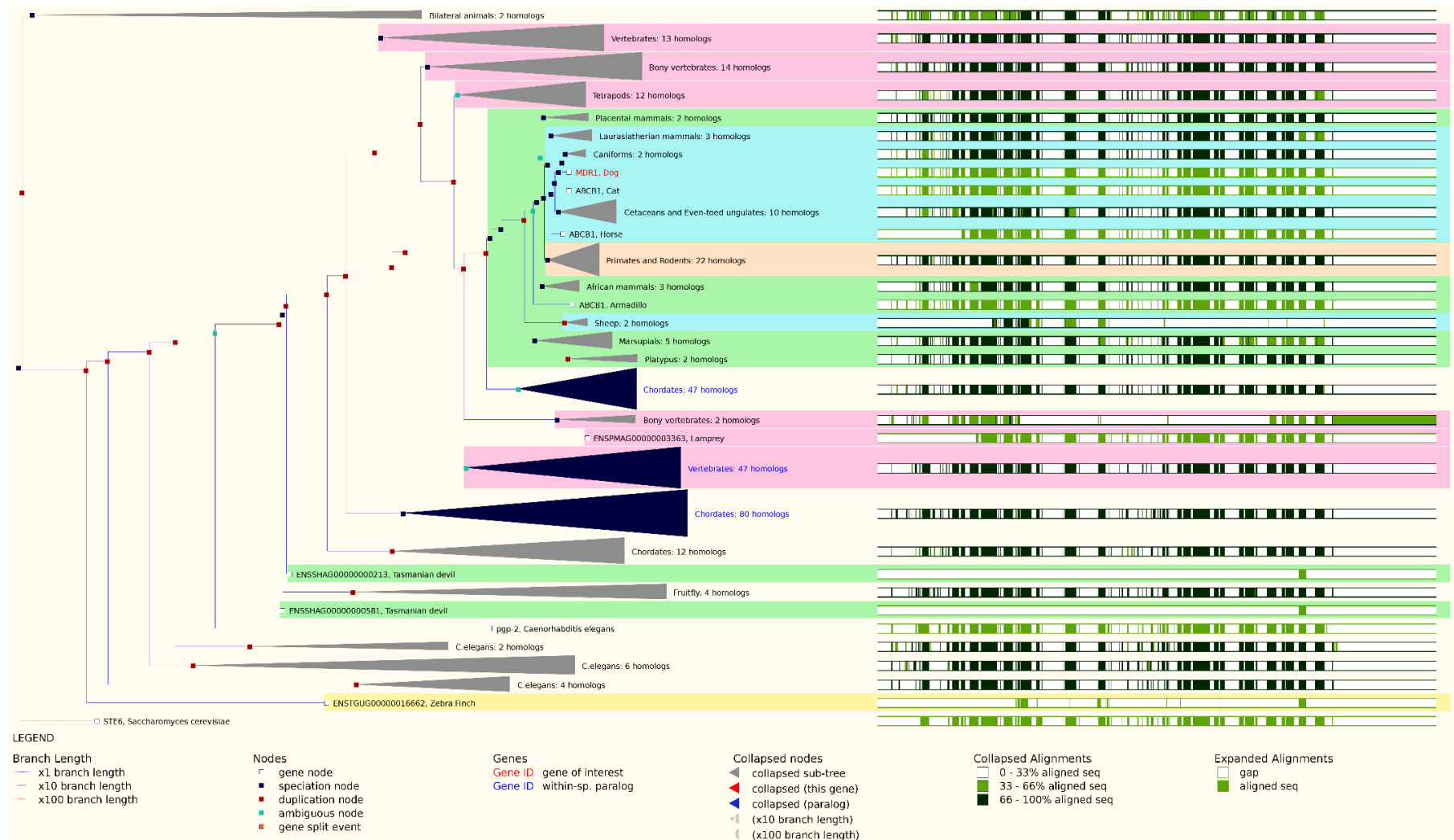
Obrázek 29 Vyznačená sekvence kódovaného polypeptidu v sekvenci cDNA genu *MDR1* u psa domácího



5.6.3 Sekvenční charakteristika genu *MDR1* u různých savců a ortology psiho genu *MDR1*

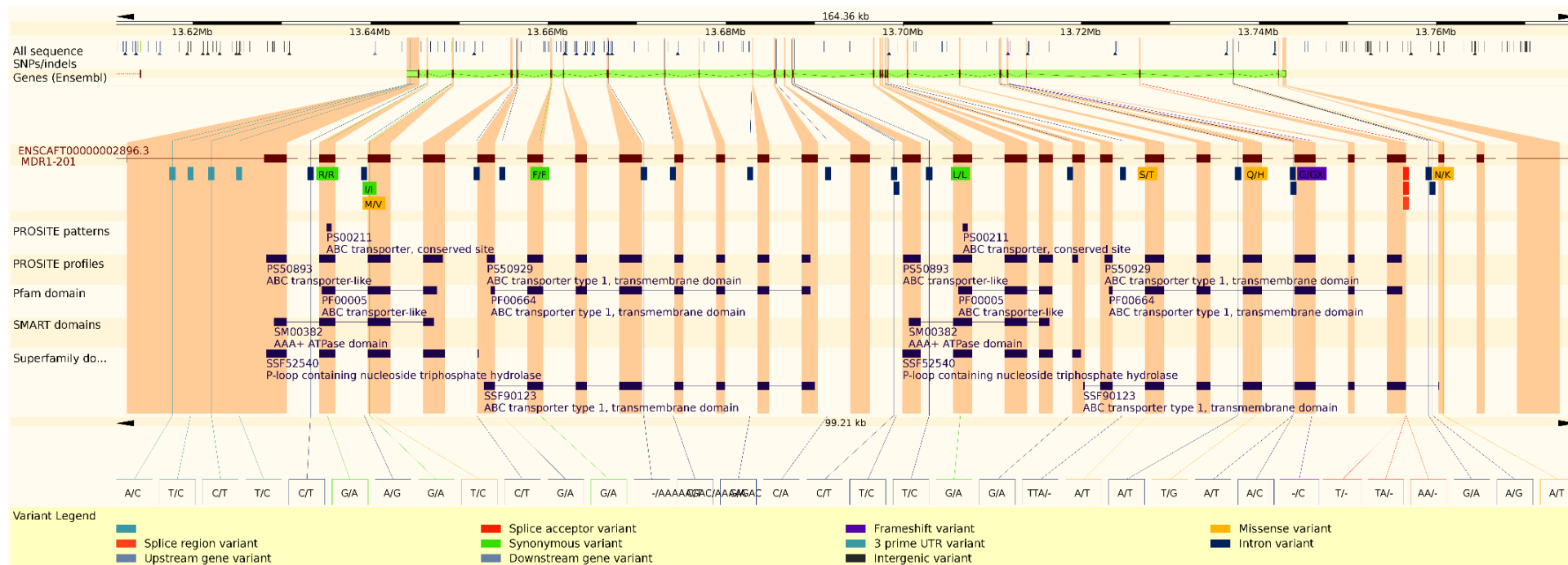
Autoři různých studií uvádějí, že obdobný typ mutace v genu *MDR1* se nachází i u jiných savců. Psí gen *MDR1* byl tedy *in silico* porovnán s genomy ostatních savců. Pomocí databáze Ensembl bylo provedeno porovnání ortologů psiho genu *MDR1*. Geny podobné genu *MDR1* se označují jako ortology. Největší podobnost se nacházela u kočky, dále u primátů, koně a pásovců. V databázi Ensembl (Hubbard et al., 2002) byl sestaven kladogram (obrázek 30) zobrazující nejbližší ortology.

Obrázek 30 Porovnání ortologů psiho genu *MDR1* s ostatními savci (databáze Ensembl)



V mezinárodní databázi nebyla *MDR1* mutace zavedena, varianta *MDR1* nt230(del4) zde není zmiňována. Ostatní mutace jsou zobrazeny na obrázku číslo 31.

Obrázek 31 Přehled publikovaných mutací genu *MDR1* (databáze Ensembl)



6 Diskuze

6.1 Volba modelových plemen při řešení bakalářské práce

Volba modelových plemen do mé bakalářské práce vycházela z publikovaných výsledků různých autorů (Geyer et al., 2005a, Gramer et al., 2010, Neff et al., 2004, Monobe et al., 2015). Byla vybrána taková plemena, u kterých byl největší předpoklad výskytu mutované alely. Všichni autoři ve svých pracích zkoumají výskyt mutace u kolií a australských ovčáků. Geyer et al. (2005a) použil pouze 2 zástupce kolií a 1 zástupce australského ovčáka. U kolií nebyly příznaky neurotoxicity pozorovány, ale australský ovčák vykazoval známky neurotoxicity po podání jedné dávky moxidectinu (400 μ g/kg). Neff et al. (2004) použil 263 kolií a 178 australských ovčáků, Monobe et al. (2015) 103 kolií a 16 australských ovčáků, Gramer et al. (2010) 2227 kolií a 1908 australských ovčáků. Dále byla nejčastěji studována následující plemena: šeltie, staroanglický ovčák, německý ovčák, dlouhosrstý vipet a bílý švýcarský ovčák. Tito psi nevykazovali známky neurotoxicity.

Byli tedy vybráni jedinci ze skupiny border kolií, u kterých se mutace vyskytovala nejčastěji, a dále bearded kolií a československých vlčáků, díky jejich blízké příbuznosti s ovčáckými plemeny.

Vybraní jedinci nevykazovali žádné známky neurotoxicity a dalo se tak předpokládat, že jedinci budou zdraví nebo přenašeči, bez výskytu nemocného recesivního homozygota.

Bylo prokázáno, že 100% vyšetřovaných jedinců jsou zdraví homozygoti, bez výskytu mutované alely. Je možné, že zkoumaná populace byla málo početná anebo se mutace v linii nevyskytuje.

6.2 Metody izolace DNA

Autoři použili k izolaci DNA krev a méně často stěry z bukálních sliznic psů. Monobe et al. (2015) použil k izolaci Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare). Geyer et al. (2005a) izoloval DNA z krve pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Izolace DNA je považována za rutinní laboratorní techniku a ostatní autoři způsob izolace DNA nepopisují.

Izolace DNA z krve v mé práci nebyla použita hlavně z důvodu nutnosti veterinárního lékaře při odběru. Bylo také vhodnější využít neinvazivní metodu odběru, kterým byl odběr z bukalních sliznic.

Při řešení bakalářské práce jsem použila k izolaci DNA komerčně vyráběný NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel). Tento kit se ukázal jako vhodný pro izolaci DNA.

UV-spektrofotometrem byla zjištěna kvalita a kvantita DNA. Díky rychlému a jednoduchému postupu je snižená šance na kontaminaci DNA. Průměrná hodnota A260/A280 byla 1,79. Z toho vyplývá, že izolovaná DNA je vysoce čistá a tento výsledek koresponduje i s Glaselem (1995), který považuje DNA za čistou při hodnotě A260/A280 ~2.

6.3 Optimalizace PCR markeru genu *MDR1*

Optimalizovány byly v experimentální části primery, navržené v práci Firdlové a kol. (2016). Bylo nutné tuto optimalizaci provést, protože každá laboratoř poskytuje různé podmínky, může být používán jiný termocykler, různé kity a polymerázy. Neff et al. (2004) používal AmpliTaq polymerázu (PerkinElmer), Firdová a kol. (2016) využila polymerázu Taq Dream Taq (Fermentas a iCycler™ Thermal Cycler, BioRad), Geyer et al. (2005a) Taq DNA polymerázu od firmy BioTherm. Podmínky amplifikace jsou pak odlišné. Pomocí teplotního gradientu byla zvolena anealingová teplota 56 °C pro primery *MDR1*-orig-F a *MDR1*-orig-R a 60 °C pro primery *MDR1*-czu-F a *MDR1*-czu-R. Obrázek číslo ukazuje vznik specifického fragmentu a tím potvrzuje vhodnou anealingovou teplotu. Firdlová a kol. (2016) použila anealingovou teplotu 49,9 °C a Geyer et al. (2005a) používal anealingovou teplotu 55 °C při použití odlišných primerů (*MDR1*-F- 5`ATTGGCTTGATAGGTTGTATATG 3`, *MDR1*-R- 5`CAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTT3`). Neff et al. (2004) zvolil anealingovou teplotu 55 °C u zvolených primerů z GenBank databáze (*CfMDR1*-F- 5`GGCTTGATAGGTTGTATATGTTGGTG3`, *CfMDR1*-R- 5`ATTATAACTGGAAAAGTTTTGTTTC 3`).

Na základě *in silico* analýzy bylo potvrzeno, že anealingová teplota byla zvolena správně a metoda PCR produkovala amplikony s vhodnou sekvencí.

6.4 Detekce mutace genu *MDR1* pomocí kapilární elektroforézy

V experimentální části byla použita metoda kapilární elektroforézy, která detekovala genotypy psů. Nebyla zde prokázána žádná delece v genu *MDR1* a všichni jedinci byli

označeni jako dominantní homozygoti bez mutace. Autoři různých studií kapilární elektroforézu nepoužívali i přesto, že je to snadný a velice přesný způsob laboratorní metody.

Firdová a kol. (2016), Geyer et al. (2005a) a Monobe et al. (2015) používali ke zjištění genotypů horizontální gelovou elektroforézu. Tu jsme použili při optimalizaci anelačních teplot primerů a ke zjištění kvality a kvantity DNA. Gramer et al. (2010) použil metodu nazývanou Automated fluorogenic 5' nuklease TaqMan allelic discrimination method.

Přesto, že ostatní autoři využili různé metody, rozhodla jsem se použít metodu kapilární elektroforézy díky její přesnosti a možnosti stanovit genotyp u více vzorků najednou a automatickému přenosu dat do počítačového programu.

6.5 Sekvenační vyhodnocení PCR markeru genu *MDR1*

Pomocí sekvenační analýzy byly fragmenty DNA od osekvenovány a výsledky byly zpracovány v počítačovém programu DNA Sequencing Analysis Software verze 5.1 (Applied Biosystems). Byl tak zjištěn genotyp testovaných jedinců.

Chromatogramový záznam sekvence vybraných jedinců odpovídal zdravému jedinci a sekvenační analýza se plně shodovala s výsledky ostatních autorů v případech dominantních homozygotů. Z toho vyplývá, že použité primery byly vhodně navrhnuty.

Firdlová a kol. (2016) sekvenační analýzu neprováděla. Výsledky vyčetla pouze z horizontální gelové elektroforézy pomocí fotodokumentačního zařízení Whatman Biometra. Geyer et al. (2005a) používal pro sekvenování ABI Prism 373A (Applied Biosystems).

7 Závěr

Literární přehled byl zaměřen na charakteristiku genomu psa a molekulární charakteristiku genu *MDR1* a jeho deleční mutace, která způsobuje neurotoxicitu u psů. Dále jsou zde popsány problémové léky, které mohou neurotoxicitu vyvolat a plemena psů, která jsou mutací genu *MDR1* postižena nejvíce.

V experimentální části bylo použito plemeno border kolie, které je podle výzkumů ostatních autorů nejčastěji postižené touto mutací. Plemena bearded kolie a československý vlčák byla vybrána z důvodu jejich blízké příbuznosti s jinými ovčáckými psy, u kterých se delece nejčastěji vyskytuje.

Border kolie jsou v České republice velice oblíbené a genetický materiál nebylo problém získat.

Pes domácí je vhodným genetickým modelem pro ovlivňování a léčbu rakoviny u člověka. P-glykoprotein je velice významný pro výzkum léčebných postupů při rakovinném onemocnění.

Výsledky z této práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Byly sepsány základní informace o genu *MDR1*, jehož mutace způsobuje deleci 4 bází ve 4. exonu na 14. chromozomu. Kvůli této deleci vzniká neúplná verze důležitého proteinu nazývaného P-glykoprotein.
- Byla popsána funkce a stavba P-glykoproteinu.
- Byly sepsány substráty P-gp a problémová léčiva pro psy s defektní alelou genu. Dále byly tyto léky charakterizovány.
- Podle výzkumů z celého světa bylo zjištěno, že mutace se nachází u mnoha plemen. Nejvíce však u border kolií.
- Kvalita a kvantita izolované DNA byla vhodná pro následné PCR analýzy.
- Metoda PCR je základní technikou zjišťování mutací. Metoda byla popsána a využita v experimentální části.
- Primery *MDR1*-orig-F, *MDR1*-orig-R a *MDR1*-czu-F, *MDR1*-czu-R byly vhodně navrženy.
- Optimalizace PCR markeru spočívala ve zjištění vhodné anelační teploty. Ta byla potvrzena následnou horizontální gelovou elektroforézou.

- Bylo vyšetřeno celkem 253 jedinců s průkazem původu, kteří představovali zástupce tří plemen psů. Plemena byla zvolena podle předpokladu výskytu mutace s vyšší četností podle jiných autorů.
- Kapilární elektroforéza se ukázala jako vhodná metoda pro detekci deleční mutace.
- Mutace se u vyšetřovaných psů nevyskytovala. Všichni jedinci jsou dominantní homozygoti, tedy zdraví jedinci.
- Mezinárodní databáze Ensembl byla použita pro porovnávání sekvence markeru genu *MDR1* a byla zjištěna vysoká sekvenční homologie u jednotlivých ortologů genu *MDR1*.

Genetické testy na zjištění mutace *MDR1* nejsou povinné pro chovatele ani majitele psů. Genetické testy jsou tedy dobrovolné. Vzhledem k tomu, že u vyšetřovaných plemen a jejich zástupců mutovaná alela nebyla zjištěna, lze předpokládat, že mutovaných jedinců je v chovech velmi málo anebo se vůbec nevyskytují. Je tedy důležité, aby mutace nebyla přenesena ze zahraničních chovů, kde se studovaná mutace genu *MDR1* u border kolií vyskytuje kolem 33%.

Existují jednoduché molekulární metody pro identifikaci mutace u psích jedinců a proto se domnívám, že záleží pouze na zodpovědnosti samotných chovatelů, zda se rozhodnou pro genetické testy či nikoliv.

8 Seznam použité literatury

- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M. 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 39. 361-398.
- Baars, C., Leeb, T., Klopman, T., Tipold, A., Potschka, H. 2008. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional *MDR1* polymorphism in dogs. *The Veterinary Journal*. 177. 394-397.
- Barbet, J. L., Snook, T., Gay, J. M., Mealey, K. L. 2009. ABCB1-1 Delta (*MDR1*-1 Delta) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. *Veterinary Dermatology*. 20(2). 111–114.
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwinska, K., Malecki, A. 2008 Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacological Reports*. 60(5). 600–622.
- Bloomquist, J. R. 2003. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of insect Biochemistry and Physiology*. 54 (4). 145–156.
- Burchenal, J. H., Robinson, E. 1950. The induction of resistance to 4-amino-N10-methylpteroylglutamic acid in a strain of transmitted mouse leukemia. *Science*. 111 (2875). 116.
- Bustin, S. A. 2004. A-Z of quantitative PCR. International University Line. 5. 4-29, 141 – 432.
- Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Alberts-Schonberg, G., Jacob, T. A. 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*. 221. 823-828.
- Chin, J. E., Soffir, R., Nonan, K. E., Choi, K., Roninson, I. B. 1989. Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Molecular and Cellular Biology*. 9(9). 3808-3820.
- Císařovský, M. 2008. Pes: nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí. Altercan s.r.o. Praha. 902 s. ISBN: 978-80-900820-1-4.
- Dano, K. 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 323(3). 466-483.
- Dean, M., Hamon, Y., Chininu, G. 2001. The human ATP- binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome research*.42(7). 1007-1017.
- Derrien, T., Thézé, J., Vaysse, A., André, C., Ostrander, E. A., Galibert, F., Hitte, Ch. 2009. Revisiting the missing protein-coding gene catalog of the domestic dog. *BMC Genomics*. 10(1). 62.

- Dhooge, C., De Moerloose, B., Laureys, G. 1999. P-glycoprotein is an independent prognostic factor predicting relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of a 6-year prospective study. *British Journal of Haematology*. 105(3). 676-683.
- Doscher, M. E., Wood, I. B., Pankavich, J. A., Ricks, C. A. 1989. Efficacy of nemadectin, a new broad-spectrum endectocide, against natural infections of canine gastrointestinal helminths. *Veterinary Parasitology*. 34(3). 255–259.
- Dostálek, M., Janoštková, E., Juica, J., Zahradníková, J., 2006. *Farmakokinetika*. 1. vyd. Grada Publishing, 220 s. ISBN: 80-247-1464-7.
- Dowling, P. 2006. Pharmacogenetics: It's not just about ivermectin in collies. *The Canadian Veterinary Journal*. 47(12). 1165-1168.
- Drach, J., Gsur, A., Hamilton, G. 1996. Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood*. 88(5). 1747-1754.
- Filipits, M. 2004. Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 1 (2). 229-234.
- Freedman, A. H., Gronau, I., Schweizer, R. M., Vecchyo, D. O., Han, E., Silva, P. M., Galaverni, M., Fan, Z., Marx, P., Lorente-Galdos, B., Beale, H., Ramirez, O., Hormozdiari, F., Alkan, C., Vila, C., Squire, K., Geffen, E., Kusak, J., Boyko, A. R., Parker, H. G., Lee, C., Tadiogola, V., Siepel, A., Bustamante, C. D., Harkins, T. T., Nelson, S. F., Ostrander, E. A., Bonet, T. M., Wayne, R. K., Novembre, J. 2014. Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genetics*. 10(1). e1004631
- Fromm, M. F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences*. 25 (8). 423-9.
- Galibert, F., Andre, C., Hitte, C. 2004. Dog as a mammalian genetic model. *Medical Sciences*. 20. 761–766.
- Gaš, B. 2001. Kapilární elektroforéza. *Přírodovědecký časopis Vesmír*. 80 (7). 370-374. ISSN 1214-4029.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J. R., Leidolf, R., Moritz, A., Petzinger, E. 2005a. Frequency of the nt230(del4) *MDR1* mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 28(6). 545-51.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J. R., Moritz, A., Petzinger, E. 2005a. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 28(6). 95-99.
- Geyer, J., Janko, Ch. 2012. Treatment of *MDR1* Mutant Dogs with Macrocyclic Lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13(6). 969-986.

- Glasel, J. A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*. 18(1). 62-63.
- Gokbulut, C., Karademir, U., Boyacioglu, M., McKellar, Q. A. 2006. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. *Veterinary Parasitology*. 135(3-4).347-354.
- Gottesman, M. M., Pastan, I. 1988. The multidrug transporter, a double-edged sword. *Journal of Biological Chemistry*. 263(25). 12163-12166.
- Gramer, I., Leidolf, R., Döring, B., Klintzsch, S., Krämer, E. M., Yalcin, E., Petzinger, E., Geyer, J. 2010. Breed distribution of the nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs. *The Veterinary Journal*. 189. 67-71.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41. 95-98.
- Hennessy, M., Spiers, J. P. 2007. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological Research*. 55. 1-15.
- Higgins, C. F., Linton, K. J. 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*. 11(10).918-926.
- Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., Durbin, R., Eyras, E., Gilbert, J., Hammond, M., Huminiecki, L., Kasprzyk, A., Lehvaslaiho, H., Lijnzaad, P., Melsopp, C., Mongin, E., Pettett, R., Pocock, M., Potter, S., Rust, A., Schmidt, E., Searle, S., Slater, G., Smith, J., Spooner, W., Stabenau, A., Stalker, J., Stupka, E., Ureta-Vidal, A., Vastrik, I., Clamp, M. 2002. The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Research*. 30(1). 38-41.
- Hodges, L. M., Markova, S. M., Chinn, L. W., Gow, J. M., Kroetz, D. L., Klein, T. E., Altman, R. B., 2011. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (*MDR1*, P-glycoprotein). *Pharmacogenetics and Genomics*. [online]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/gene/PA267?tabType=tabVip>
- Hugnet, C., Bentjen, S. A., Mealey, K. L. 2004. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in sample of Collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27. 227-229.
- Kawabata, A., Momoi, Y., Inoue-Murayama, M., Iwasaki, T. 2005. Canine *MDR1* gene station in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 67. 1103-1107.
- Koler-Matznic, J. 2002. The origin of the dog revisited. *Anthrozoos*. 15 (2). 98-118.
- Laboklin. 2007. *MDR1* Gene Defect. [online]. [cit. 2017-02-05]. Dostupné z: <http://www.laboklin.co.uk/laboklin/showGeneticTest.jsp?testID=8032>
- Larson, G., Karlsson, E. K., Perri, A., Webster, M. T., Ho, S. Y. W. 2012. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 109. 8878-8883.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 20(62). 3791-3923.

Lehne, G. 2000. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Current Drug Targets*. 1(1). 1-18.

Levi, T., Wilmers, C. C. 2012. Wolves-coyotes-foxes: a cascade among carnivores. *Ecology*. 93. 921-929.

Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., DeJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C. W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K. P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Baldwin, J., Abebe, A., Abouelleil, A., Aftuck, L., Ait-Zahra, M., Aldredge, T., Allen, N., An, P., Anderson, S., Antoine, C., Arachchi, H., Aslam, A., Ayotte, L., Bachantsang, P., Barry, A., Bayul, T., Benamara, M., Berlin, A., Bessette, D., Blitshteyn, B., Bloom, T., Blye, J., Boguslavskiy, L., Bonnet, C., Boukhgalter, B., Brown, A., Cahill, P., Calixte, N., Camarata, J., Cheshatsang, Y., Chu, J., Citroen, M., Collymore, A., Cooke, P., Dawoe, T., Daza, R., Decktor, K., DeGray, S., Dhargay, N., Dooley, K., Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Egbiremolen, O., Elong, R., Falk, J., Farina, A., Faro, S., Ferguson, D., Ferreira, P., Fisher, S., FitzGerald, M., Foley, K., Foley, C., Franke, A., Friedrich, D., Gage, D., Garber, M., Gearin, G., Giannoukos, G., Goode, T., Goyette, A., Graham, J., Grandbois, E., Gyaltzen, K., Hafez, N., Hagopian, D., Hagos, B., Hall, J., Healy, C., Hegarty, R., Honan, T., Horn, A., Houde, N., Hughes, L., Hunnicutt, L., Husby, M., Jester, B., Jones, C., Kamat, A., Kanga, B., Kells, C., Khazanovich, D., Kieu, A. C., Kisner, P., Kumar, M., Lance, K., Landers, T., Lara, M., Lee, W., Leger, J. P., Lennon, N., Leuper, L., LeVine, S., Liu, J., Liu, X., Lokyitsang, Y., Lokyitsang, T., Lui, A., Macdonald, J., Major, J., Marabella, R., Maru, K., Matthews, C., McDonough, S., Mehta, T., Meldrim, J., Melnikov, A., Meneus, L., Mihalev, A., Mihova, T., Miller, K., Mittelman, R., Mlenga, V., Mulrain, L., Munson, G., Navidi, A., Naylor, J., Nguyen, T., Nguyen, N., Nguyen, C., Nguyen, T., Nicol, R., Norbu, N., Norbu, C., Novod, N., Nyima, T., Olandt, P., O'Neill, B., O'Neill, K., Osman, S., Oyono, L., Patti, C., Perrin, D., Phunkhang, P., Pierre, F., Priest, M., Rachupka, A., Raghuraman, S., Rameau, R., Ray, V., Raymond, C., Rege, F., Rise, C., Rogers, J., Rogov, P., Sahalie, J., Settipalli, S., Sharpe, T., Shea, T., Sheehan, M., Sherpa, N., Shi, J., Shih, D., Sloan, J., Smith, C., Sparrow, T., Stalker, J., Stange-Thomann, N., Stavropoulos, S., Stone, C., Stone, S., Sykes, S., Tchuinga, P., Tenzing, P., Tesfaye, S., Thoulutsang, D., Thoulutsang, Y., Topham, K., Topping, I., Tsamla, T., Vassiliev, H., Venkataraman, V., Vo, A., Wangchuk, T., Wangdi, T., Weiand, M., Wilkinson, J., Wilson, A., Yadav, S., Yang, S., Yang, X., Young, G., Yu, Q., Zainoun, J., Zembek, L., Zimmer, A., Lander, E. S. 2005. Genome sequence, komparative analysis and holotype structure of the domestic dog. *Nature* 438. 803-819.

Loo, T. W., Clarke, D. M. 1994. Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *Journal of Biological Chemistry*. 269(10). 7750-7755.

- Margulies, E. H. 2005. An initial strategy for the systematic identification of functional elements in the human genome by low-redundancy comparative sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 102. 4795–4800.
- McKellar, Q. A., Benchaoui, H. A. 1996. Avermectins and milbemycins. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 19(5).331–351.
- Mealey, K. L. 2008. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: heartworm prevention and pharmacogenetics. *Veterinary Parasitology*. 158(3). 215–222.
- 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. 479-481.
- Mealey, K. L., Bentjen, S. A., Gay, J. M. 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *MDR1* gene. *Pharmacogenetics*. 11(8). 727-733
- Mealey, K. L., Meurs, K. M. 2008. Breed distribution of the ABCB1-1 Δ (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *Journal of the American veterinary Medical Association*. 233. 921-924.
- Mealey, K. L., Munyard, K. A., Bentjen, S. A. 2005. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary Parasitology*. 10. 193-196.
- Merola, V. M., Eubig, P. A. 2014. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 42 (2). 313-333.
- Merola, V., Khan, S., Gwaltney-Brant, S. 2009. Ivermectin toxicosis in dogs: a retrospective study. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 45(3).106–111.
- Mizukami, K., Chang, H. S., Yabuki, A., Kawamichi, T., Hossain, M. A., Rahman, M. M., Uddin, M. M., Yamato, O. 2012. Rapid genotyping assay for the 4- base pair deletion of canine *MDR1/ABCB1* gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24(1). 127-34.
- Monobe, M. M., Araujo, J. P., Lunsford, K. V., Silva, R. C., Bulla, C. 2015. Frequency of the *MDR1* mutant allele associated with multidrug sensitivity in dogs from Brazil. *Dovepress*. 6. 111-117.
- Murphy, W. J. 2001. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature*. 409. 614–618.
- Najmanová D., Humpál Z. 1981. Atlas plemen psů. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 272 s. ISBN: 07-126-81.
- Neff, M. W., Robertson, K. R., Wong, A. K., Safra, N., Broman, K. W., Slatkin, M., Mealey, K. L., Pedersen, N. C. 2004. Breed distribution and history of canine *MDR1-1 Δ* , a pharmacogenetic marker that marks the emergence of the collie lineage,

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101. 11725-11730.
- Nosková, V., Hajdúch, M., Michál, V., Cwiertka, K. 2000. Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi, I. typická MDR. *Klinická onkologie*. 13 (speciál 2). 4-9.
- Novotny, M. J., Krautmann, M. J., Ehrhart, J. C., Godin, C. S., Evans, E. I., McCall, J. W., Sun, F., Rowan, T. G., Jernigan, A. D. 2000. Safety of selamectin in dogs. *Veterinary Parasitology*. 91. 377-391.
- Ostrander, E. A., Galibert, F., Patterson, D. F. 2000. Canine genetics comes of age. *Trends in Genetics*. 16. 117–123.
- Ovodov, N. D., Crockford, S. J., Kuzmin, Y. V., Higham, T. F. G., Hodgins, G. W. L. 2011. A 33,000-Year-Old Incipient Dog from the Altai Mountains of Siberia: Evidence of the Earliest Domestication Disrupted by the Last Glacial Maximum. *PLoS One*. 6(7). e22821.
- Parker, H. G., Kim, L. V., Sutter, N. B., Carlson, S., Lorentzen, T. D., Malek, T. B., Johnson, G. S., DeFrance, H. B., Ostrander, E. A., Kruglyak, L. 2004. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*. 304. 1160-1164.
- Pazourek, J. 2003. Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium. Brno. [online]. [cit. 2017-01-09] Dostupné z: <http://docplayer.cz/1428450-Jiri-pazourek-moderni-elektroforeticke-analyticke-metody-prednasky-pro-magisterske-studium-skripta-elektroforeticke-analyticke-metody-2-6.html>
- Pechandová, K., Buzková, H., Slanař, O., Perlík, F. 2006. Efluxní transmembránový transportér-P-glykoprotein. *Klinická biochemie a metabolismus*. 14(35). 196-201.
- Perez, R., Cabezas, I., Sutra, J. F., Galtier, P., Alvinerie, M. 2001. Faecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses. *Veterinary Journal*. 161(1). 85–92.
- Plumb, D. C. 2005. *Plumb's veterinary drug handbook*. 5. Stockholm (WI): PharmaVet; 2005.
- Randolph, G. J., Beaulieu, S., Pope, M. 1998. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proceedings of the National Academy of Science*. 272(16). 10685-10694.
- Ruetz, S., Gros, P. 1994. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*. 77(7). 1071-1081.
- Sadava, D. E., Hillis, D. M., Heller, H. C., Hacker, S. D. 2016. *Life: The science of biology*. Sinauer Associates. 1268 s. ISBN: 1-319-01016-4.365-385.
- Sargan, D. R. 2004. IDID: inherited diseases in dogs: web-based information for canine inherited disease genetics, *Mammalian Genome*. 15. 503-506.

- Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V. 2001. Charakterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically simile but affect different functional outcomes. *Journal of Biological Chemistry*. 276(15). 11653-11661.
- Savolainen, P., Zhang, Y. P., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*. 298. 1610–1613.
- Seelig, A. 1998. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *European Journal of Biochemistry*. 251(1-2). 252-261.
- Shafique, S. 2012. Polymerase chain reaction. LAP Lambert Academic Publishing. United Kingdom. 96 s. ISBN: 3659134791.
- Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A. A. M., Deemter, L. 1996. P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier of Mice Influences the Brain Penetration and Pharmacological Activity of Many Drugs. *The American Society for Clinical Investigation*. 97 (11). 2517-2524.
- Simmons, M. J., Snustad, D. P. 2009. Genetika. Masarykova univerzita. Brno. 871 s. ISBN: 978-80-210-4852-2.
- Sun, J., He, Z. G., Cheby, G., Wang, S. J., Hao, X. H., Zou, M. J. 2004. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Medical Science Monitor*. 10(1). 5-14.
- Tappin, S. W., Goodfellow, M. R., Peters, I. R., Day, M. J., Hall, E. J., Bentjen, S. A., Mealey, K. L. 2008. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in dogs in the United Kingdom. *Scientific Proceedings: Veterinary Programme*. 83/49.
- Thomas, J. W. 2003. Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature*. 424. 788–793.
- Tranquilli, W. J., Paul, A. J., Todd, K. S. 1991. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemyacin oxime in collies. *American Journal of Veterinary Research*. 52(7) .1170–1172.
- Trock, B. J., Leonessa, F., Clarke, R. 1997. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of *MDR1*/gp170 expression and its possible functional significance. *Journal of the National Cancer Institute*. 89(13). 917-931.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40(15). E115.
- Vercruysse, J., Rew, R. S. 2002. Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy. CABI.USA. 464 s. ISBN: 0851996175.
- Vlček, J., Topinková, E., Ficková, D. 2002. Role P-glykoproteinového transportu v klinicky významných lékových interakcích. *Remedia*. 3 (5). 207-213.

Woodward, K. N. 1993. Ivermectin. Veterinary Medicines Directorate.[online]. [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v31je03.htm>.

Yu, H., Xu, X., Sun, J., You, T. 2012. Recent progress for capillary electrophoresis with electrochemical detection. Central European Journal of Chemistry. 10(3). 639-651.