

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Speciální zemědělství

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra zootechnických věd

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Genetická analýza vybrané dědičné choroby u psů**

**Genetic analysis of selected inherited diseases of dogs**

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.

Autor: Bc. Jitka Volná

České Budějovice, duben 2016



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 22. 4. 2016

.....  
Bc. Jitka Volná

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Lence Hanusové, Ph. D. za cenné rady, připomínky, odborné vedení a trpělivost.

## **Abstrakt**

V rámci diplomové práce byla provedena analýza 60 biologických vzorků psů, u nichž se projevila epilepsie. Byl zjišťován vztah mezi genotypem ve vybraném lokusu a výskytem epilepsie. Na základě zjištěných výsledků analýz bylo provedeno zhodnocení, zda existuje prokazatelný vztah mezi výskytem epilepsie a genotypem v daném lokusu. Dle dosažených výsledků nebyl prokázán vliv tohoto genotypu na věk prvního epileptického záchvatu.

Klíčová slova: epilepsie, genetika, gen, psi, PCR/RFLP, záchvat

## **Abstract**

In my thesis I concentrated on an analysis of biological samples of 60 dogs, which manifested epilepsy. The aim was to find out the relation between genotype of the selected locus and the occurrence of epilepsy. Based on the results of the analysis, I assessed, whether there is a demonstrable relation between the occurrence of epilepsy and genotype in a particular locus. According to the results, no influence of genotype on the age of first epileptic seizure was proved.

Keywords: epilepsy, genetics, gene, dogs, PCR/RFLP, seizure

## Obsah

1. ÚVOD.....	9
2. CÍL PRÁCE .....	10
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1 DĚDIČNÁ ONEMOCNĚNÍ .....	11
3.1.1 Dědičnost .....	11
3.1.1.1 Typy dědičnosti, vyskytující se u dědičných chorob .....	12
3.1.2 Rozdělení genů .....	13
3.2 EPILEPSIE PSA .....	14
3.2.1 Popis průběhu choroby.....	14
3.2.2 Léčba.....	17
3.2.3 Alternativní léčba.....	18
3.2.4 Diagnostika epilepsie .....	19
3.2.5 Faktory související s výskytem epilepsie.....	20
3.2.5.1 Výživa.....	20
3.2.5.2 Prostředí.....	23
3.2.6 Genetické založení .....	26
3.3 TECHNIKY MOLEKULÁRNÍ GENETIKY VYUŽÍVANÉ PŘI ZPRACOVÁVÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	28
3.3.1 Izolace DNA .....	28
3.3.2 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction - PCR).....	30
3.3.2.1 Historie PCR.....	31
3.3.2.3 Průběh PCR.....	33
3.3.3 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP- restriction fragment length polymorphism).....	34
3.3.4 Elektroforéza.....	35
4. MATERIÁL A METODIKA.....	38
4.1 MATERIÁL .....	38
4.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	40
4.2.1 Složení reakční směsi.....	40
4.3 POLYMORFIZMUS DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ (RFLP).....	41

4.4 ELEKTROFORÉZA NA AGARÓZOVÉM GELU .....	42
4.5 VÝPOČTY.....	43
4.6 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ .....	43
5. VÝSLEDKY .....	44
5.1 GENOTYPIZACE .....	44
5.2 FREKVENCE ALEL A GENOTYPŮ .....	45
5.3 VLIV GENOTYPU NA VĚK PŘI PRVNÍM ZÁCHVATU .....	46
5.4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ .....	49
6. DISKUZE.....	50
7. ZÁVĚR .....	52
8. SEZNAM ZKRATEK.....	53
9. SEZNAM LITERATURY .....	54



## 1. Úvod

Analýzu vybrané dědičné choroby u psů jsem si jako téma diplomové práce zvolila z důvodu aktuálnosti problému. Konkrétně jsem se zaměřila na idiopatickou epilepsii. Celosvětově se počet psů odhaduje až na půl miliardy, v České republice se toto číslo pohybuje okolo dvou miliónů. Počet chovaných psů se má po celém světě tendenci zvyšovat, ale mnohdy jejich majitelé nejsou informováni o základních principech dědičnosti, o dědičných chorobách, ke kterému by jimi vybrané plemeno mohlo mít predispozici a ani celkově o základních podmínkách chovu psa. Každý chovatel má pro výběr psa jiná kritéria. Pokud se budou stále nabízet psi, jejichž rodokmen ani anamnéza nejsou známy, lidé, kteří se dostatečně neorientují v dané problematice, na první pohled nic nepoznají. Záleží tedy především na chovatelích chovných psů, aby budoucího majitele dostatečně informovali a nebo nejlépe psy, trpící idiopatickou epilepsií, vůbec do chovu nezařazovali. Bohužel stále existuje značné množství lidí, kteří si připouštějí pouze zisk z co největšího počtu prodaných peněz, ale ne už zdravotní dopady pro samotného psa potažmo celé plemeno.

Donedávna nebyla dědičným chorobám psů věnována téměř žádná pozornost. V současné situaci se dědičné choroby psů dostávají do popředí zájmu genetiků, šlechtitelů a chovatelů. U celé řady chorob však doposud není známo genetické pozadí či je pouze odhadován princip dědičnosti. Je tedy nezbytné provádět analýzy výskytu jednotlivých chorob u populací psů pro lepší pochopení genetických vztahů a pro zlepšení genetického zdraví jednotlivých plemen psů.

I přesto, že idiopatická epilepsie je velmi vážné onemocnění, postihující v poslední době stále větší počet plemen a psů, její genetické pozadí není odhaleno. V současné době vzniká řada výzkumů na objasnění dědičnosti epilepsie. Tyto ale zatím nepřinesly žádné konkrétní výsledky, pouze hypotézy.

## 2. Cíl práce

Cílem diplomové práce je provést analýzu možného genetického založení vybrané dědičné choroby u psů. Bude vypracován literární přehled o příznacích, diagnostice, léčbě a předpokládaném genetickém založení vybrané dědičné choroby. Budou stručně vysvětleny principy molekulárně-genetických metod, použitých v praktické části diplomové práce. Dále bude izolována DNA ze vzorků krve či jiných tělesných tekutin u vybrané populace psů. Pomocí molekulárně-genetických metod budou stanoveny genotypy ve sledovaném lokusu s potenciálním vztahem k výskytu dědičné choroby. Následně budou výsledky analýz vyhodnoceny statisticky. V závěru práce budou shrnuty výsledky a doporučena praktická chovatelská opatření u jedinců s prokázanými genetickými předpoklady pro výskyt či přenos studované dědičné choroby.

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Dědičná onemocnění

*„Dědičná onemocnění jsou taková onemocnění, u kterých je přenos zajištěn v rámci rodiny z rodičů na potomky [1].“*

V jádře uloženou genetickou informaci, zděděnou od rodičů, obsahuje každá buňka v těle, až na určité výjimky. Dědičná onemocnění, která se dále mohou přenášet na další generaci pomocí gamet, vznikají změnou DNA (mutací) v buňkách zárodečné linie.

Vrozené neboli kongenitální onemocnění, se kterým se jedinec narodí a trvale ho poškozuje či způsobí jedinci smrt, může vzniknout ještě v prenatálním stádiu narušením DNA buněk zárodečné linie. Všechny dědičné choroby nejsou vrozené, například epilepsie u psů, ale nejen ta. Dědičná onemocnění se mohou projevovat, až když se jedinec narodí. Mutace se dále přenáší pohlavními i nepohlavními chromozomy podle pravidel dědičnosti [2].

##### 3.1.1 Dědičnost

Celkem jsou známy dva typy chromozomů. První z nich jsou gonozomy, tzv. pohlavní chromozomy, pro které platí, že dědičnost genů, na nich uložených, není pro obě pohlaví stejná. Tento typ dědičnosti se nazývá gonozomální.

Druhým typem chromozomů jsou autozomy, tzv. nepohlavní (tělní) chromozomy. Pro ty platí, že dědičnost genů z těchto nepohlavních chromozomů je pro obě pohlaví stejná. Tento typ dědičnosti označujeme jako autozomální dědičnost [3].

U diploidních organismů se v buňce vyskytují vždy 2 alely příslušného genu. V případě stejného typu alel je jedinec označován jako homozygot. Pokud jsou tyto alely různé, takový jedinec se nazývá heterozygot [6].

Geny existují ve více formách. Tyto formy označujeme jako alely. Alely pak mezi sebou mohou být v různých mezialelických vztazích. Dominantní alely se běžně označují velkým písmenem (A) a recesivní malým (a). Nejčastějším typem mezialelických vztahů je úplná dominance či recesivita. Při úplné dominanci

dominantní alela zcela potlačí vliv recesivní. Stejně pravidlo pak platí u recesivity, kdy recesivní alela zcela potlačí vliv dominantní alely. Dominantní alela se vždy projeví i v heterozygotní kombinaci [8]. Dominantní dědičnost nastane v případě, že k projevu daného znaku je zapotřebí pouze jedna alela, nesoucí vlohu pro danou dědičnou chorobu. Obě alely jsou nutné v případě recesivní dědičnosti [4]. Mezi další typy dědičnosti se řadí neúplná dominance a kodominance. U neúplné dominance je fenotyp kombinací účinku dominantní a recesivní alely. U kodominance se obě alely projevují současně, ale vzájemně se neovlivňují [68].

### *3.1.1.1 Typy dědičnosti, vyskytující se u dědičných chorob*

Dědičností je hned několik typů. V první řadě se jedná o dědičnost autozomální, se kterou se setkáváme nejen u dědičných chorob. Hovoříme o dědičnosti, kdy jsou geny uloženy na nepohlavních chromozomech, tedy autozomech. Autozomální dědičnost se dále dělí na autozomálně dominantní a autozomálně recesivní.

V případě autozomálně dominantní dědičnosti rozhoduje o vzniku choroby vliv dominantní alely. Pravděpodobnost, že tato choroba postihne další generace, je 50%.

Dominantní dědičnost rozdělujeme na úplnou a neúplnou. Při úplné dominantní dědičnosti stačí k rozvoji plného fenotypu jedna mutovaná alela. Fenotypový rozdíl mezi heterozygotem s 1 mutovanou alelou a mezi dominantním homozygotem se 2 mutovanými alelami se neprojevuje. Fenotypový projev homozygota a heterozygota lze rozlišit u neúplné dominantní dědičnosti, která se vyskytuje častěji. Klinický stav dominantního homozygota je mnohem závažnější [3].

Jako další typ autozomální dědičnosti řadíme dědičnost autozomálně recesivní. Jedna alela danou chorobu nezpůsobí. Choroba se fenotypově projeví, pokud jsou mutovány obě alely. Jedinci s oběma mutovanými alelami se nazývají recesivní homozygoti. Tito zdědili mutovanou alelu jak od matky, tak od otce, a i svým potomkům mohou předat pouze mutovanou alelu. Tito potomci se tak mohou stát přenašeči nemoci [10].

*„Důležitým faktem je, že autozomálně recesivní i dominantní typ dědičnosti (podmíněné geny uloženými na nepohlavních chromosomech) mají stejné zákonitosti pro obě pohlaví [3].“*

V případě genů, které jsou uloženy na pohlavních chromozomech, hovoříme o gonozomálně dominantním a recesivním typu dědičnosti, kdy převážná část klinicky významných genů je uložena na chromozomu X. Jde tedy o X-vázanou dědičnost, zatímco Y-vázaná dědičnost, uložená na pohlavním chromozomu Y, se v klinické praxi uplatňuje pouze vzácně [3].

Za předpokladu, že konečný fenotyp není ovlivňován pouze jedním genem, tento typ dědičnosti označujeme jako polygenní dědičnost. To znamená, že na projevu znaku se podílí více genů, které jsou ve vzájemné interakci. Tyto interakce však nejsou ovlivňovány zevním prostředím nebo jsou jím ovlivněny pouze minimálně.

Jako poslední typ dědičnosti se označuje multifaktoriální dědičnost, kdy se na vzniku choroby nepodílí pouze geny, ale zároveň také více faktorů, jakými jsou například vliv prostředí [3].

### **3.1.2 Rozdělení genů**

Geny můžeme dělit podle jejich účinnosti při realizaci znaku nebo podle jejich funkce.

Podle účinnosti při realizaci znaku rozeznáváme geny:

- monogenní: *„Geny velkého účinku, na tvorbě znaku se podílí málo genů (často jen jeden), většinou jde o znak kvalitativní. Jsou rozhodující pro monogenní typ dědičnosti [5].“*

- polygenní: *„Geny malého účinku, na tvorbě znaku se podílí více genů, nezanedbatelný je i vliv vnějšího prostředí, většinou ovlivňuje kvantitativní znaky. Jsou rozhodující pro polygenní typ dědičnosti [5].“*

Podle funkce rozeznáváme geny:

- strukturní: kódují strukturu bílkoviny,

- regulační: podle nich vytvořené bílkoviny regulují expresi strukturních genů, ovlivňují diferenciaci buněk,
- RNA geny: dle nich se syntetizuje tRNA a rRNA [9].

## 3.2 Epilepsie psa

Označení epilepsie se používá pouze v případě, že se jedná o idiopatickou epilepsii [33]. „*Idiopatická epilepsie je diagnostikována vyloučením všech nám známých příčin záchvatů primárně vycházejících z mozku [7].*“ Záchvaty mohou být způsobeny také traumatem, toxinem, mozkovým nádorem, infekcí a celou řadou dalších vnějších vlivů. Proto ne všechny záchvatovité stavy lze označit jako epileptické. Ty totiž nemají žádnou zjistitelnou příčinu [33].

Epilepsie je obecným termínem pro neurologickou poruchu, provázenou záchvaty [33]. Uvádí se, že ze všech jakkoli nemocných psů je u 0,55 % - 2,3 % příčinou nemoci právě epilepsie [61]. Je to nejčastěji se vyskytující, chronické, onemocnění neurologického původu [34].

Opakující se záchvaty, způsobené idiopatickou epilepsií, spojují nejrůznější plemena na celém světě a mají částečně podobnou charakteristiku jako lidské. Tonicko-klonické záchvaty se převážně objevují do 5. roku věku a jsou spojeny s doživotní léčbou pomocí antiepileptik.

Výzkumy, provedené v poslední době, se zaměřují především na genetické založení epilepsie, ale čím dál více se klade důraz také na charakterizaci klinického průběhu a resistenci vůči lékům. Tato se může vyskytovat až u 30 % psů postižených epilepsií [35].

### 3.2.1 Popis průběhu choroby

Záchvaty jsou spojeny s paroxysmálním, synchronním výbojem neuronů v jedné nebo více oblastí mozku. Žádná prokazatelná mozková abnormalita se přitom s IE (idiopatická epilepsie) neslučuje [22].

Abnormální elektrickou aktivitu určitých neuronů může podněcovat několik možností.

1. *„Abnormálně aktivní buňky mozku jsou přímo zasaženy nějakým onemocněním (nádor mozku, infekce) [41].“*
2. *„Buňky mozku jsou ovlivněny nedostatečnou funkcí jiných orgánů (hromadění odpadních látek v krvi, které jsou roznášeny až do mozku, kde mohou vyvolat záchvatovité, křečové stavy. Jedy přijaté do těla zvenčí mohou působit zcela shodně [41].“*
3. *„Abnormálně aktivní buňky jsou "zdravé", nejsou ani ovlivněny nedostatečnou funkcí jiných orgánů, nemůžeme tedy najít žádnou příčinu a jedná se pouze o funkční momentální nedostatek [41].“*

Mezi hlavní příznaky epilepsie řadíme záchvaty, vyvolané velkým počtem vnějších podnětů.

Dle intenzity se záchvaty rozlišují na:

**a) malý záchvat (petit mal)**

Křeče se vyskytují v určitých skupinách svalů, na hlavě a krku především. Díky tzv. žvýkacím pohybům čelistí dochází k nadprodukcii slin. Zvíře se normálně pohybuje a je při vědomí. Délka záchvatu je maximálně pár minut a je bez trvalých následků [42].

**b) velký záchvat (grand mal)**

Záchvat grand mal je nejčastěji se vyskytující formou epileptických záchvatů. Jeho začátek probíhá stejně jako u záchvatu petit mal, kdy pes sliní a žvýká. Příznaky se ale stupňují a přidávají se i změny v projevu chování jako jsou neklid, chození do kruhu a nervozita. Zvíře upadá na zem, kde provádí hrabivé pohyby, podobné běhu. V další fázi dochází k postupnému uvolňování křečí, přičemž toto uvolňování se týká i oblastí svalů u konečníku. Dochází tedy k samovolnému pokálení a pomočení. Jakmile odezní křeče, projevují se u psa tendence provádět manéžové pohyby. Pes je dezorientovaný, nekoordinovaný a v některých případech může docházet k neurologickým abnormalitám, jako jsou hluchota či slepota. Délka záchvatu je přibližně 95 sekund [42].

### c) status epilepticus

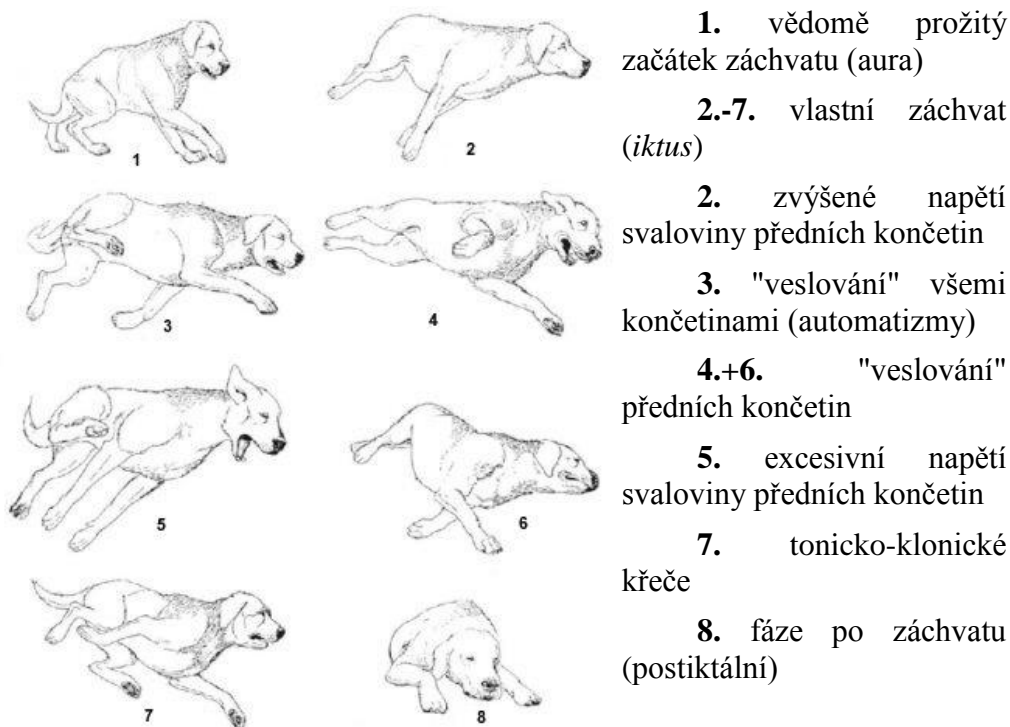
„Status epilepticus vzniká spojením několika za sebou následujících velkých záchvatů nebo jde přímo o velmi prodloužený velký záchvat. Neustálé křeče snižují energetické zásoby postiženého jedince natolik, že hyne na vyčerpání nebo z důvodů dlouhotrvající křeče dýchacího svalstva se zadusí [42].“

### d) komplexní parciální záchvat

Tento typ je spojen s bizarním chováním, opakujícím se při každém záchvatu. Pes může mít neobvyklé sluchové, chuťové a čichové vjemy. Často se objevuje neobvyklá žravost a žíznivost. Vyskytuje se i u idiopatické epilepsie, převážně však u sekundární [27].

### e) klastrový záchvat

U tohoto typu probíhá v krátkém časovém úseku několik záchvatů po sobě, mezi nimi jsou pouze krátké úseky, kdy je pes při vědomí. Tento typ může být zaměňován s typem *status epilepticus* [27].



Obrázek č. 1 Sekvence velkého záchvatu u labradora [71].



### 3.2.2 Léčba

Pokud má pes potvrzenou diagnózu idiopatické epilepsie, jeho léčba je doživotní a neznamená, že se záchvaty podaří odstranit úplně. Ve většině případů jsou pouze minimalizované a lépe kontrolovatelné [11].

Ve veterinární medicíně neexistují tak účinná antiepileptika jako v medicíně humánní. Převážná většina humánních preparátů je u psů a koček neúčinná a navíc s sebou jejich dlouhodobější podání přináší výrazné negativní vedlejší účinky. Na léčbu epilepsie má velký vliv stálost hladiny medikamentu v krvi, které lze dosáhnout pouze pravidelným užíváním léku. Současně je důležité preferovat monoterapii, tzn. použití jen jednoho medikamentu namísto více druhů. Jakékoli výkyvy (vynechání denní dávky), změny medikamentu a jeho dávky nejsou žádoucí a mohou vést k těžkým a těžce kontrolovatelným záchvatům. Při frekvenci záchvatů méně než 1 po dobu jednoho roku lze uvažovat o vysazení medikamentů, i toto však musí probíhat pozvolna, v rádech týdnů až měsíců. Za úspěšnou léčbu lze považovat takovou, která četnost záchvatových dnů v roce sníží pod 5 dní. U 20 % psů se podaří díky léčbě záchvaty eliminovat doživotně. Naopak u 5 – 8 % psů léčených antiepileptiky se nedaří záchvaty snižovat a kontrolovat vůbec. Další obecné pravidlo, které při léčbě epilepsie platí, souvisí s velikostí samotných psů, kdy platí, že u malých a středních plemen je zvládnutelnost záchvatů mnohem úspěšnější než u plemen velkého vzrůstu [20].

Na léčbu epilepsie má vliv mnoho faktorů, především by pro chovatele měla být důležitá snaha o odstranění veškerých stresových faktorů, které mají negativní vliv na probíhající léčbu. Dalším podstatným bodem je vyloučit poruchy zaživačích aparátů, aby se medikament mohl správně vstřebávat. V případě, že se tento problém vyskytne, medikamenty se mohou podávat i jinou formou, například čípky či injekčně [11].

Status psa, léčeného s epilepsií, by měl chovatel nechat zapsat do očkovacího průkazu a vždy na to i upozornit veterináře. Při nevědomosti této diagnózy mohou nastat problémy při chirurgických či diagnostických zákrocích, vyžadujících zklidnění nebo celkovou narkózu.

Je možné dle příznaků na psu zpozorovat, že záchvat přichází. V takovéto chvíli je potřeba jej co nejvíce zklidnit, mnohdy se daří tímto způsobem záchvat

zažehnat. Pokud se přece jen projeví, je důležité psa hlídat, aby se neporanil. Záchvaty většinou probíhají velice rychle po sobě, proto podání medikamentů, vzhledem k délce vstřebání a nástupu účinku, nemusí stačit, může však mít smysl alespoň v prevenci budoucích záchvatů. Tento typ, kdy se záchvaty rychle za sebou opakují (typ klastrový, *status epilepticus*), je potřeba velmi rychle zastavit a nejúčinnějším způsobem je aplikace medikamentu přímo do žíly. Toto zajistí veterinární lékař, který by měl být v případě záchvatů těchto typů zavolán. Jistou alternativou mohou být rektální tuby, které účinnou látku dopraví do konečníku, odkud se poměrně rychle vstřebá a efekt léku je patrný během několika minut [20].

Je třeba také zvážit závažnost a četnost záchvatů v porovnání s vedlejšími účinky léků [23]. Proto je hlavním cílem léčby vyvážit poměr záchvatů a vedlejších účinků léčby [22].

Mezi nejčastější medikamenty, které pomáhají utlumovat záchvaty, se řadí fenobarbital a bromid draselný. Fenobarbital patří do skupiny barbiturátů a je nejpoužívanějším antikonvulzivem (léčivo pro prevenci a léčbu epileptických záchvatů), má hypnotické a sedativní účinky [26]. Pomáhá snížit četnost záchvatů a obecně je dobře snášen [24]. Dalším antikonvulzivem je bromid draselný, což je iontová sůl, která má sedativní účinky, i v dnešních dobách je stále používán jako antiepileptikum pro psy a kočky [25].

### 3.2.3 Alternativní léčba

Stejně jako v humánní medicíně, se i v té veterinární začínají vyskytovat jiné způsoby léčby než pomocí medikamentů. Jednou z těchto metod je i akupunktura. Tradiční akupunkturální terapie psů s epilepsií zahrnuje umístění jehly nebo jehel až do 10 oblastí těla. Jehly mohou být ponechány na místě od 20 minut až měsíc. Akupunktura není obvykle hlavní léčbou, ale je používána ve spojení s medikamentózní léčbou. Pozitivní výsledky této metody na vliv výskytu záchvatů nejsou zatím prokázány.

Jako další alternativní možnost léčby je uváděna doplňková léčba pomocí lněného oleje. V Německu, Dánsku, Kanadě a USA je tato metoda, která byla stanovena a popsána Dr. Jolanou Budwig, známá a hojně využívaná. Metoda spočívá

v obsahu omega-3 tuků v krvi. Tento obsah by měl být u zdravých pacientů vyšší, než u nemocných. Nemocným je potřeba omega-3 dodat a za jeho nejlepší zdroj byl stanoven právě lněný olej.

Metoda Dr. Budwig je pomocníkem zejména v léčbě a prevenci rakovinných onemocnění, a to jak u lidí, tak u zvířat. Podle odborníků má tato metoda zásadní přínos pro psy postižené záchvaty. Její skutečná účinnost však není vědecky dokázána.

Lněná dieta spočívá v podávání malé dávky oleje, a to každý den. Lněný olej by měl pomáhat především v těchto oblastech

- regulace hladkých svalů a autonomních reflexů
- rozšiřování nebo zužování krevních cest
- doprava kyslíku do tělních tkání
- udržování mobility nasycených tuků
- primární zdroj energie pro svaly
- kontrola tlaku v cévních cestách, kloubech a očích
- zprostředkování produkce hormonů a steroidů a jejich následné řízení k cílovým buňkám
- poruchy emocí a pozornosti [28].

### 3.2.4 Diagnostika epilepsie

Diagnostika epilepsie je poměrně složitá, jelikož neexistuje přesné vyšetření, které by tuto nemoc stanovilo. Není tedy možné stanovovat diagnózu idiopatické epilepsie pouze na základě průběhu nemoci, ale je nutno provést další doplňková vyšetření jako jsou vyšetření krve, moči, EEG - elektroencefalograf, vyšetření mozkomíšního moku. Dále by měly být provedeny testy k vyhodnocení správné funkčnosti jater, ledvin, slinivky břišní, odpovídající hladiny cukru a elektrolytů [21]. Je také nutné vyloučit přítomnost parazita v těle [27]. Aby se mohlo začít s medikamentózní terapií, je nutno vyloučit možnost sekundární epilepsie. Obecně lze říci, že diagnostika epilepsie probíhá metodou vylučovací [20].

Pokud se u psa vyskytne více než jeden záchvat, měl by být sestaven jeho profil, který bude obsahovat data (plemeno, věk, pohlaví) o postiženém psu, jeho

historii, psychickou stránku, zda se neobjevily změny chování, prodělaná i současná onemocnění. Pokud jsou k dispozici, tak i data o psech v příbuzenském stavu. Důležitou věcí je také očkovací průkaz.

Kvůli podobnosti záchvatů při jiných onemocněních (narkolepsie, srdeční a plicní nemoci) je při diagnostice důležité, aby chovatel psa popsal co nejpřesněji průběh záchvatu [20].

### 3.2.5 Faktory související s výskytem epilepsie

Přesné genetické pozadí epilepsie ještě nebylo odhaleno, ale odhaduje se, že je epilepsie je onemocnění multifaktoriální, což znamená, že se na výskytu nemoci nepodílí pouze geny, ale také například vliv prostředí či výživy.

#### 3.2.5.1 Výživa

K získání energie, potřebné k zachování života a k zajištění reprodukce, je potřeba, aby psům bylo podáváno vhodné krmivo, které je zdrojem vyvážené krmné dávky [29].

Živiny jsou složky potravy, které poskytují organizmu potřebnou energii pro pohyb, vytváření tepla, růst, obnovu a reprodukci. Mezi hlavní druhy živin se řadí cukry, tuky, bílkoviny, minerální a stopové prvky a vitamíny. Nedílnou součástí potravy je také voda.

Cukry lze rozdělit na monosacharidy, disacharidy a polysacharidy. Monosacharidy, do nichž se řadí např. glukóza, jsou okamžitým zdrojem energie. Disacharidy se skládají ze dvou monosacharidů. Polysacharidy jsou složité cukry a nejznámějšími zástupci jsou vláknina a škrob.

Tuky představují hlavní zdroj energie. Obsah energie je v porovnání s uhlohydráty či bílkovinami až dvojnásobný [29]. Jsou také zdrojem esenciálních mastných kyselin, které podmiňují rozpustnost a využitelnost vitamínů rozpustných v tucích A,D,E,K a jsou důležité pro správnou činnost ledvin, stav kůže a srsti a pro reprodukci [30].

Bílkoviny jsou základní stavební jednotkou organismu, poskytují aminokyseliny, které jsou důležité pro růst a obnovu tělních tkání [29]. Složky aminokyselin se mohou metabolizovat za účelem poskytnutí energie [30].

Minerální látky se rozdělují na makroelementy a mikroelementy. Mezi makroelementy se řadí vápník, fosfor, draslík, sodík, chlór a hořčík. Do skupiny mikroelementů patří železo, měď, mangan, zinek, jód a selen.

- vápník (Ca) a fosfor (P) se podílejí na stavbě kostí, zubů a svalů. Vápník je důležitý při procesu srážení krve a při šíření nervových impulsů. Fosfor je součástí enzymových systému, metabolických procesů v organismu a je složkou organických fosfátových sloučenin, které přeměňují a ukládají energii v organismu [30].
- draslík (K) se nachází ve vysokých koncentracích hlavně uvnitř buněk. Je důležitý pro přenos nervových vzruchů, svalovém metabolismu a metabolismu vody [29].
- sodík (Na) a chlór (Cl) jsou zastoupeny v elektrolytech mimobuněčných tělních tekutin. Tyto prvky jsou důležité pro normální fyziologické funkce, vyskytují se v kuchyňské soli [29].
- hořčík (Mg) se vyskytuje v měkkých tkáních i kostech. Přispívá k normální funkci srdce, svaloviny, nervů a zvyšuje obranyschopnost organismu. V organismu musí být nastolena rovnováha mezi vápníkem a hořčíkem. Železo (Fe) hraje zásadní roli v přenosu kyslíku a je součástí hemoglobinu. Krmivo, které obsahuje velké množství sóji, znesnadňuje vstřebávání železa, zinku a manganu. Železo, obsažené v masu, se vstřebává lépe než železo, obsažené v rostlinách.
- Měď (Cu) je jednou ze složek pigmentu melaninu a vyskytuje se v řadě enzymů.
- Mangan (Mn) je, co se týče jeho potřeby ve výživě psů, stále málo známý.
- Zinek (Zn) zvyšuje obranyschopnost organismu proti infekcím a podporuje vstřebávání železa. Jeho nedostatek u štěňat se může projevit oslabením růstu.
- Jód (I), respektive jeho nadbytek či nedostatek způsobuje kretenismus, strumu, myxedém.
- Selen (Se) má detoxikační a protirakovinné účinky, taktéž chrání před otravou těžkými kovy [30].

Mezi nízkomolekulární látky, které zabezpečují normální fyziologický vývin a životní pochody organismu, se řadí vitamíny. Jsou rozděleny na dvě skupiny, rozpustné v tucích (A,D,E,K) a rozpustné ve vodě (B,H,C,P) [29].

Nutriční hodnoty stravy jsou málokdy vnímány v souvislosti s projevem nemoci. Nicméně do povědomí začíná přicházet myšlenka, že nejen u lidí, ale také u psů mohou nutriční nedostatky způsobit symptomy nejrůznějších chorob. Platí tak i u epilepsie u psů, kdy korekce nutričních hodnot může přispět ke snížení nebo dokonce k eliminování záchvatů [67].

Pro zachování zdraví psa je vhodné dodržovat základní pravidla. Nekvalitní krmiva plná chemických přidaných konzervačních látek, umělých barviv, nekvalitních zdrojů bílkovin a umělých příchutí by měla být nahrazená vhodnou stravou obohacenou o minerály, vitamíny a výživové doplňky. Vhodné je také krmení syrovou stravou. Je třeba se přesvědčit, že krmná dávka obsahuje dostatek vitamínů, minerálů a aminokyselin, jejichž nedostatek vede k vyvolání nebo zhoršení průběhu záchvatu. Pro zachování správné funkce nervového systému je důležitý příjem kvalitních živočišných bílkovin. Nedostatek aminokyseliny taurin je obecně uznáván jako možná příčina záchvatů u lidí, kočkovitých šelem a psů. Taurin má uklidňující účinek na nervový systém, ovlivňuje hladinu cukru v krvi, reguluje metabolismus sodíku, vápníku a hořčíku, jejíž nedostatky také souvisejí s výskytem záchvatů.

Důležitou součástí krmné dávky jsou také vitamíny. Veterinární lékař Roger DeHann uvádí, že některé formy epilepsie reagují na doplnění vitamínu B6, hořčíku a manganu [67]. *„Již dlouhou dobu je známo, že nedostatek vitamínu B6 nebo jakýkoli zásah do jeho funkce může vyvolat záchvaty u jakéhokoli druhu savců, včetně člověka a psa [65].“* Nedostatek vitamínu B je jednou z možných příčin záchvatů nejen u psů, ale také u člověka. V komerčních krmivech je vitamín B zničen při jejich tepelné úpravě. Proto je ho v této stravě nedostatek. Řešením je krmení syrovou stravou. Předpokládá se, že nedostatek vitamínu E může také zhoršit průběh záchvatu. Některé současné lidské studie došly k závěru, že přidáním vitamínu E do stravy epileptika, který je uživatelem antiepileptických léků, může snížit frekvenci záchvatů.

Hořčík vede žebříček nedostatku minerálních látek, které jsou spojeny se záchvaty. Úzce souvisí s metabolismem vitamínů C,D, B6, vápníku, fosforu a bílkovin. Pomáhá při vstřebávání vitamínu C a vápníku. To je důležité pro funkci nervů a pro transport sodíku a draslíku [67].

### 3.2.5.2 *Prostředí*

*„Psi jsou v dnešní době využíváni pro celou řadu pracovních a sportovních aktivit. Welfare psů využívaných pro různé účely se výrazně liší, je nutné hodnotit podmínky, v jakých psi žijí a pracují, způsob výcviku, použité pomůcky, rizika zranění a mnoho dalších faktorů [31].“*

Welfare neboli pohoda zvířat je stav, kdy se organismus zvířete vyrovnává s prostředím, ve kterém žije. Jde o naplnění všech materiálních a nemateriálních podmínek, které jsou základem pro zdraví organismu, kdy je zvíře v souladu s jeho životním prostředím [32].

Epileptické záchvaty mohou vznikat spontánně nebo za určitého podnětu vnějšího prostředí. Jako tzv. spouštěč záchvatů může u některých jedinců působit například pouhé vážení psa, jeho stříhání, odběr krve či jeho vypuštění do prázdné místnosti a ponechání jej samotného. Obecně se tedy usuzuje, že záchvaty mohou vyvolat situace, na něž pes není zvyklý, nebo u něj vyvolávají stres. K eliminaci záchvatů může dojít, když je u stresových situací přítomen chovatel a psa se snaží vlídným hlasem ukonejšit. Rovněž pozitivně působí přítomnost druhého psa [31].

Mezi plemena, postižená epilepsií, patří především kolie, bígl, zlatý retrívr, labradorský retrívr, pudl a německý ovčák. Jednotlivá plemena jsou popsána níže.

- Kolie: původní označení pro ovčácké psy v severní Anglii a Skotsku. Jsou aktivní, inteligentní a mající silný instinkt k pasení. Jsou to psi středního vzrůstu. Díky vysoké rychlosti učení a temperamentu jsou dnes používáni nejen jako psi pastevní, ale především některá plemena jako psi sportovní (agility). Současná plemena kolií jsou: Bearder kolie, dlouhosrstá kolie, krátkosrstá kolie, Bobtail, Border kolie, Sheltie [46].
- Bígl: plemeno vzniklo ve 14. století ve Velké Británii. Mezi jeho kladné vlastnosti se zařazuje čistotnost, neagresivnost a přátelská povaha. Je inteligentní a vytrvalý. Bígl je středního až malého vzrůstu. Z hlediska

anatomické stavby má silné kosti, silnou lebku, velké oči a uši. Při chůzi charakteristicky vyhazuje zadní končetiny. V současné době se již nevyužívá pouze jako pes lovecký, ale především jako společník [45].

- Zlatý retrívr: původ plemene se datuje do 19. století, vzniklo ve Velké Británii. Zlatí retrívři jsou povahou přátelští, neagresivní, nevyvolávají konflikty s cizími lidmi ani s cizími psi. Mají silnou fixaci na člověka. Tito psi jsou velkého vzrůstu. Je to statný pes, symetrické postavy. Dobře osrstěný, srst je hladká nebo mírně zvlněná a dlouhá. Zbarvení srsti je možné v odstínech od zlaté po krémovou. V dnešní době se využívají jako psi slepečtí, pro canis terapii, na nejrůznější záchranářské účely, ale především jako psi společenští [47].
- Labradorský retrívr: Původně se využíval jako lovecký pes, plemeno vzniklo v 19. století ve Velké Británii. Své rodině je velmi oddaný, k cizím lidem bývá nedůvěřivý. Je přátelský, se snahou se zavděčit, má vynikající čich a je pracovitý. Řadí se mezi psy středně velkého vzrůstu. Psi jsou široké konstituce, se silnou lebkou. Srst je krátká, lesklá, hustá a nesmí být kadeřavá. Barevně se vyskytují tyto varianty - černá, žlutá, čokoládově hnědá. Jeho využití najdeme především v policejních a záchraných složkách, není však vhodný do míst, kde je důležitá ostrost. Je vhodný jako slepecký pes, ale především je opět nejvíce využíván jako pes společenský [48].
- Pudl: Velký pudl se poprvé vyskytl již ve starověku, střední a trpasličí v 16. století. Pudlové jsou obecně dobře cvičitelní, oddaní, inteligentní a na oplátku vyžadují dostatek pozornosti. Menší pudlové mají sklony k častému štěkání, kvůli své nervozitě. Tito psi mají elegantní vzhled s ušlechtilou hlavou a výrazným čenichem. Tělo má harmonickou stavbu s vysoko nasazeným ocasem. Dle srsti se pudlové dělí na dva typy, prvním je pudl s kadeřavou srstí, druhým pudl s provázkovou srstí. Pudli nejsou vhodné na pracovní využití, neosvědčí se ani jako hlídači. Jsou vhodné především pro chov, následné výstavy a jako domácí mazlíčci [49].



- Německý ovčák: Vznik tohoto plemene se datuje do 19. století a je původem z Německa. Ovčák je oblíben pro svou inteligenci, talent k výcviku, vytrvalost a oddanost k chovateli. Je odvážný, temperamentní a přitom dobře ovladatelný. Řadí se mezi středně velké psy, tělesná konstituce je obdélníkového formátu, silná. Pes má velké osvalení. Původně byli ovčáci využíváni jako pastevečtí psi, v současné době se využívají především jako psi pracovní, hlídací, policejní. Hodí se pro nejrůznější sporty, např. agility a také samozřejmě jako společník člověka [66].

*„Plemena psů se měnila podle potřeby a přání člověka. Neexistuje žádný jiný druh zvířat, kde by bylo tolik odlišností ve velikosti, zbarvení, osrstění, vzhledu, využití, mentalitě, rychlosti a dalších rozdílností, jako je tomu právě u psů [43].“*

Obecně lze říci, že společným znakem plemen trpících zvýšeným výskytem epilepsie je jejich častý chov. Stále větší poptávka po vybraných plemenech vedla k jejich nekontrolovatelnému množení, což má za důsledek i častější výskyt dědičných chorob, protože oblíbená plemena nebyla tolik kontrolována. Ve velké míře se jedná právě o plemena společenská, která se v poslední době označují za přešlechtěná. To znamená, že vývoj šlechtění (řízené rozmnožování vybraných jedinců za účelem zkvalitnění dané vlastnosti či plemenného znaku [44]) se začal projevovat negativně jak na anatomické a morfologické stavbě, tak na výkonnosti, a též na nižším stupni odolnosti vůči nemocem všeho druhu i na vyšší míře heritability dědičných onemocnění [44].

*„Jedním z velkých rizik chovatelství obecně je výskyt různých dědičných defektů a dědičných chorob. Obecně se jedná o všechny odchylky od normálního fyziologického a anatomického stavu zvířete, které jsou větší nebo menší překážkou jeho života. U psů je jich známo a popsáno několik stovek a každým dnem jsou popisovány další dědičné defekty a choroby. Odhaduje se, že náklady na léčení dědičných chorob u psů představovaly celosvětově jen v roce 1995 částku okolo pět set miliard dolarů [43].“*

S větší poptávkou po psech začaly vznikat i tzv. množírny psů, kde jejich zdravotní stav a kontrola rodokmenu pro vyloučení dědičných chorob hraje až druhotnou roli. Pro tyto množírny je hlavní vyprodukovat psy, po kterých je poptávka, bez přihlídnutí k jejich zdravotnímu stavu nebo welfare [44].

### 3.2.6 Genetické založení

Přesné genetické založení této choroby není ještě potvrzeno, ale předpokládá se recesivní autozomální dědičnost [33]. Žádný lokus, zodpovědný za vznik epilepsie, nebyl ještě objeven. Určení způsobu dědičnosti je důležitým krokem hned z několika důvodů. Za prvé to nesporně pomůže chovatelům, kteří na základě genotypu mohou vyloučit z chovu psy, kteří mají lokus zodpovědný za vznik epilepsie. Za druhé důkaz přítomnosti jediného hlavního lokusu otevírá možnost vývoje molekulárního markeru, spojeného s epileptickým fenotypem. A za třetí objasnění dědičnosti epilepsie u psů může pomoci objasnit genetické mechanismy, zodpovědné za vznik epilepsie u člověka [62].

Velmi vysoká dědivost se na základě dlouhodobé analýzy psů (rodokmen, výskyt prvního záchvatu, pohlaví...) předpokládá u plemene Tervuren (dlouhosrstá varieta belgického ovčáka) a u německého ovčáka. Rozdíl ve výskytech záchvatů nebyl mezi pohlavími žádný. Odhad heritability nad 0,5 je indikativní pro přítomnost významného genu [64].

Odhad heritability u plemene Tervuren byl 0,77 a u ovčáka 0,83. To, že jsou si hodnoty heritability poměrně blízké, se přisuzuje společnému původu těchto dvou plemen [63].

U lidí a myší bylo dosud definováno kolem 15 genů, způsobujících epilepsii. Stejná či podobná sestava genů může být zodpovědná za vznik epilepsie i psů. Je možné, že většina plemen má genetickou mutaci stejnou či podobnou, existuje možnost, že každé plemeno má jinou [33].

Výzkumy DNA se snaží hledat geny zodpovědné za různé vlastnosti a to jak pozitivní, tak negativní. Důležité je, jak jsou geny v genomu na různých chromozomech uspořádány a za co jsou odpovědné. Donedávna byl psí genom odhalen jen z malé části, proto jsou výzkumy pomalé a náročné. Snahou výzkumných pracovníků, pracujících na DNA u psů, je navrhnout DNA markery- sekvence DNA, která může být jednoduše identifikována. Je způsobena mutací nebo pozměněním původní sekvence, které dokáží detekovat mutace, způsobující epilepsii [36].

Genetická dědičnost epilepsie byla také zkoumána u plemene vizsla (maďarský krátkosrstý ohař), kdy byl navržen autozomálně recesivní způsob dědičnosti, s tím, že polygenní dědičnost zatím nelze vyloučit [38].

Genetické faktory mohou do značné míry ovlivňovat práh citlivosti zvířete k záchvatům. Důležitý je také stresový faktor, kdy zvíře, které je více psychicky vyrovnané, bude mít menší pravděpodobnost výskytu záchvatu [39].

Jisté zjištěné dědičné predispozice jsou předpokládány u plemen těchto psů: pudl, kokršpaněl, knírač, špic a další. Dědičnost je prokázána u těchto plemen: kolie, labrador, zlatý retrívr a bígl. Zvířata trpící epilepsií by do chovu neměla být vůbec zařazována [40].

K epilepsii má vztah celá řada genů a polymorfismů, z nichž jako jeden z nejperspektivnějších se jevil gen *ABCBI*, u něhož se uvažuje, že mutace c.-6-180T> G by mohla mít potenciálně největší vztah k výskytu IE. Současně u ní byl studován vztah k rezistenci k fenobarbitalu u psů s epilepsií. Tato polymorfnní mutace je substitucí tyminu za guanin v intronu 1 blízko 5'- konci v genu *ABCBI* [70].

Byly provedeny genotypizační studie u border kolií, australských ovčáků a belgických ovčáků, kde byl zjišťován vliv uvedeného polymorfizmu k ranějšímu nástupu epilepsie a současně již zmiňované rezistenci k fenobarbitalu. Gen *ABCBI* kóduje transmembránový protein ATP binding cassette, subfamily B, member 1. V rámci tohoto proteinu bylo zjištěno několik jednonukleotidových polymorfizmů z nichž nejdůležitější je výše zmiňovaný c.-6-180T> G. Gen *ABCBI* je lokalizován na chromozomu 14. Obsahuje 28 exonů. Protein ATP, který funguje jako efluxní pumpa hematoencefalické bariéry, podporuje mechanismus odstraňování široké škály sloučenin, které jsou pro centrální nervový systém (CNS) potenciálně škodlivé. Mezi tyto sloučeniny se řadí například antiepileptika či fenobarbital. Dysfunkce tohoto neuroprotektivního proteinu může vést buď k intoxikaci CNS nebo k rezistenci k antiepileptikům. Známým příkladem je delece 4 párů bází (c.296\_299del) v exonu 4 genu *ABCBI* u kolií. Psi nesoucí deleci v homozygotním stavu mají nefunkční permeabilitu glykoproteinu a koncentrace cizorodých látek dosahují vyšší koncentrace, včetně těžkých neurobiologických příznaků [69].

### 3.3 Techniky molekulární genetiky využívané při zpracování diplomové práce

Mezi nejčastěji používané techniky molekulární genetiky, využití i při zpracování diplomové práce, patří izolace deoxyribonukleové kyseliny- DNA, PCR (polymerase chain reaction), RFLP (restriction fragment length polymorphism) a gelová elektroforéza.

#### 3.3.1 Izolace DNA

K tomu, aby mohla být získána informace o DNA, je třeba první krok s názvem separace.

Kvůli podobnosti DNA s ostatními biopolymery je nutné při izolaci DNA vybírat metody s vysokou selektivitou. Vzhledem k relativně malému množství DNA ve vzorcích je třeba přihlížet i k citlivosti zvolené metody. Aby nedocházelo k degradaci molekul, hlavně co se týče pH, teploty a použitých rozpouštědel, musí se vzhledem k nestabilitě DNA udržovat mírné podmínky, aby se co nejvíce přiblížily fyziologickým hodnotám. *„Při izolaci nukleové kyseliny je třeba volit metodu v závislosti na požadované čistotě a množství finální nukleové kyseliny a na typu buněk, z nichž má být nukleová kyselina izolována [50].“*

Jako další kritérium pro výběr metody je třeba brát v úvahu také časovou náročnost izolačního procesu a také jeho celkovou ekonomii. Pro selekci metody je důležité vycházet z požadovaných charakteristik získávané DNA a pro každý typ vzorku zvolit individuální přístup.

Opětovnými aplikacemi separačních procesů nebo jejich kombinací je možno získanou DNA dále přečišťovat [51].

DNA se nachází v nitrobuněčném obsahu. Ve vzorku se může vyskytnout více druhů buněk (jiných rostlinných či živočišných druhů), proto se tyto druhy potřebují od sebe oddělit, nejčastěji se to děje pomocí centrifugace. Dále se může izolovat už jen DNA vybraného druhu. V případě, že předmětem zkoumání je DNA obsažená v některé z organel, je zapotřebí před samotnou izolací dané organely z buněčného obsahu separovat [51].

Jako první musí proběhnout lýze buněk, ze kterých je DNA získávána. Je zapotřebí rozpuštění biomembrán a denaturace proteinů detergentem. Detergenty jsou látky, po kterých se rozruší membrána a dojde k uvolnění buněčného obsahu. Tyto mohou být iontové povahy, často SDS (dodecylsulfát sodný) nebo také soli žlučových kyselin. Další možností jsou neionogenní (nenabité) detergenty, např. Triton X100. Dále se mohou použít i různé fyzikální nebo fyzikálně-chemické postupy, zejména rozrušení membrán ultrazvukem. Při lýzi pevných tkání nebo houbových a rostlinných buněk se používá mechanická síla, např. protřepání na vortexu se skleněnými kuličkami, drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce apod. K lyzačnímu roztoku se může přidat enzym proteináza K, který štěpí bílkoviny, včetně histonů vázaných na strukturu DNA, a tak zvyšuje čistotu izolované DNA [12].

Jako další krok je třeba izolovanou látku oddělit z roztoku buněčného obsahu. Toho lze dosáhnout dočasnou denaturací, kdy se používá teplotní denaturace, technika vysolování nebo srážení organickými rozpouštědly [51]. Buněčný obsah včetně nukleových kyselin se z lyzovaných buněk uvolní do pufovaného roztoku, obsahujícího kromě detergentů také etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA). EDTA chelatuje ionty vápníku, které jsou zapotřebí jako kofaktor nukleáz. Ty bez vápníku nemohou pracovat, proto se vychytáním vápníku zabrání rozštěpání čerstvě uvolněné DNA nukleázami, které se také uvolňují z lyzovaných buněk. Některé detergenty, používané při lýze buněk, také fungují jako inhibitory nukleáz. Mezi ně se řadí zejména laurylsíran sodný a N-laurylsarkosin [12].

Existuje řada způsobů izolace DNA, nejčastěji používanou je izolace fenol-chloroformovou extrakcí nukleových kyselin. Fenol-chloroformová extrakce je pracnější a je obvykle používána pro práci s větším množstvím DNA. Tato metoda extrakce odstraňuje ostatní složky lyzátu, především proteiny K a ponechává nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí (pufru). K lyzátu se pak přidává směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu [12]. Chloroform je organické rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem buněčného lyzátu. Směs se tak rozdělí na dvě fáze, a to horní vodnou a dolní chloroformovou [13]. K promíchání fází dochází při protřepávání, při kterém fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Zvýšení rozpustnosti fenolu v chloroformu zajišťuje izoamylalkohol, po skočení protřepávání tak fenol přejde do chloroformové báze. Pro dokonalé oddělení fází je

nutné roztok odstředit. Mezi fázemi se vytvoří bílý prstenec sražených proteinů. Horní fázi s nukleovými kyselinami je třeba přenést do nové čisté zkumavky. Pro odstranění stop fenolu, který by mohl interferovat s použitím enzymů při dalším opracování izolovaných nukleových kyselin, je nutné ještě jednou extrahovat, ale pouze směsí chloroformu a izoamylalkoholu. Ze vzniklého přečištěného vodného roztoku se přidáním etanolu vysráží nukleové kyseliny a usazují se na dně zkumavky ve formě mléčného zkaleného sedimentu. Srážejí se také soli, které zvyšují účinnost srážení nukleových kyselin. Soli se odmyjí 70% etanolem a čisté nukleové kyseliny je po odsátí supernatantu možné rozpustit ve vodě nebo vhodném pufru [12].

Vzhledem k faktu, že více než 95% nukleových kyselin v buňce tvoří ribonukleová kyselina (RNA), je třeba pro vyizolování čisté DNA RNA odstranit působením RNázy [13].

Druhým nejčastějším způsobem izolace je adsorpce na silikát. Metoda je založena na zjištění, že DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch. Výhodou této metody je její pohodlnost a rychlost a to, že jsou pro ni vytvořeny komerční soupravy (kity) pro rutinní extrakce DNA.

Existují také automatické přístroje pro izolaci DNA, které jsou založeny na principu izolace nukleových kyselin pomocí magnetických částic [52].

V současné době jsou používány kity. Ty jsou optimalizovány na konkrétní typ a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Pohodlnost práce s kity zvyšuje i fakt, že obvykle používají nástavce do mikrozkuvek, který obsahuje jemný filtr a ten zadrží silikátové částice. Při zpracování jsou roztoky promývány přes kolonku (filtr se zachycenými částicemi). Kity místo tradičního silikátu také využívají speciální pryskyřice a mají různě nastavené složení pufrů, tak, že mohou preferovat při adsorpci molekulu DNA určité velikosti [12].

### **3.3.2 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction - PCR)**

Polymerázová řetězová reakce je metoda molekulární biologie používaná k množení (amplifikaci) specifického úseku DNA *in vitro*. Uplatnění této metody najdeme zejména v sekvenování DNA, analýze genů, při diagnostice infekčních nemocí, při zjišťování genetických nemocí a při identifikaci osob [14]. Cílová DNA

bývá v analyzovaných vzorcích většinou přítomna v nízkých koncentracích, proto je potřeba její namnožení [16].

### *3.3.2.1 Historie PCR*

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) je jedním z nejvýznamnějších vědeckých objevů 20. století. Je to snadný a rychlý způsob k vytvoření neomezených kopií DNA pomocí primerů z jediného původního vlákna, a to během několika hodin. Užití této metody je široké, především se ale používá k diagnostice či monitoringu onemocnění či v molekulární biologii [53].

Roku 1971 v časopise *Journal of Molecular Biology* vyšla první publikace, popisující na dvaceti stránkách hlavní principy PCR. Napsána byla vědcem Kjellem Kleppeem a laureátem Nobelovy ceny za lékařství pro rok 1968 Harem Gobudem Khoranaou. Vzhledem k problémům se syntézou primerů a čištěním DNA polymerázy byl rozvoj metody na několik let pozastaven.

Jako samotný objevitel metody je označován Dr. Kary Banks Mullis, který myšlenku PCR vyslovil roku 1983. V roce 1985 vyšel článek, který se zabýval použitím PCR metody pro stanovení mutace genomické DNA, která způsobuje srpkovitou anémií. V následujících dvou letech byly publikovány další detaily a použití PCR, kdy se na konec metoda pro analýzu mutací DNA začala používat k namnožení jakékoli části DNA.

Původní metodika dle Dr. Mullise byla založena na malém množství DNA, které obsahovalo požadovaný gen, velké skupině oligonukleotidů a primerů. Tyto všechny komponenty se vložily do zkumavky. Ta se zahřála na teplotu blízkou 100°C a poté zchladila. Dále se přidala DNA polymeráza, čímž došlo k syntéze DNA. Tento proces zahřátí a zchlazení se několikrát zopakoval. Tím došlo k syntéze DNA.

DNA polymeráza se musela přidat před každým cyklem, vzhledem k její tepelné denaturaci. To znamenalo, že tento proces sice obstaral několikanásobné zmnožení požadovaného úseku DNA, byl však časově náročný, neefektivní a vyžadoval velkou spotřebu DNA polymerázy. Tyto časově náročné metody byly záminkou pro zautomatizování procesu, kdy vznikl první termocykler [54].

Pořád zde ale vyvstával problém s termolabilní DNA polymerázou. Ve středu zájmů vědců bylo hledat látku, která by měla vlastnosti DNA polymerázy, ale její termolabilita by byla minimální. Po mnohaletém výzkumu byla objevena termostabilní DNA polymeráza, získaná izolací z bakterie *Thermus aquaticus* [15].

Po spojení termocyklerů a termostabilní DNA polymerázy se metoda PCR stala plně automatickou a veškerá její obsluha spočívá ve vložení reakční směsi, zapnutí a vypnutí přístroje. Metoda je díky těmto zdokonalením citlivá a přesná [54].

### 3.3.2.2 Princip PCR

Tato metoda je hlavním mechanismem, sloužícím k amplifikaci kratších úseků genomu do délky několika kilobází- kb [55].

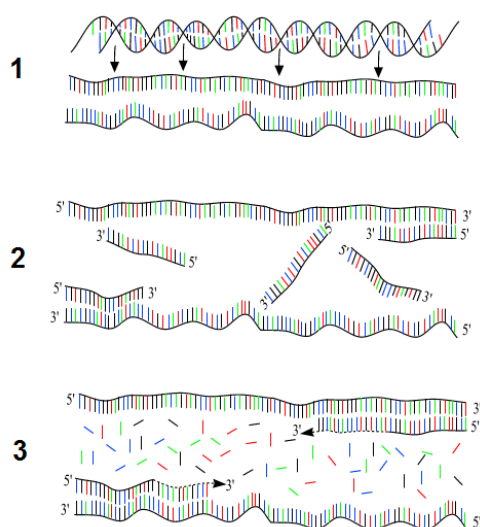
DNA- polymeráza syntetizuje komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru  $5' > 3'$ . Krátký existující úsek druhého vlákna potřebuje kromě templátového vlákna a nukleotidtrifosfátu tzv. primer, který se může syntetizovat uměle jako oligonukleotid. Za předpokladu, že je známá sekvence templátového vlákna, je možné připravit primer, který za vhodných teplotních podmínek tvoří vodíkové můstky s komplementární sekvencí v templátovém vlákně, tzv. fáze nasedání primeru. Takto je možné určit DNA- polymeráze, od kterého místa a kterým směrem má začít syntetizovat komplementární vlákno. Tímto způsobem podle templátového vlákna vznikne jen jedna kopie, nedochází tedy k řetězovému hromadění produktu. To je v PCR zajištěno použitím dvou primerů, které nasedají na komplementární sekvence dvou templátových vláken, vzniklých denurací původně dvouvláknové DNA. Po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenzi primeru DNA polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus, protože primery na templátová vlákna nasedají v protisměrné orientaci. Produkt se hromadí geometrickou řadou. Ze 2 vláken lze po 30 cyklech získat 107 miliónu kopií [15].

K amplifikaci daného úseku postačí pouze malé množství DNA, což se řadí mezi výhody PCR. V jednom cyklu, jehož je základní jednotkou PCR, se stále opakují po sobě jdoucí 3 fáze (denaturační, anelační, syntetická). Nejobvyklejší počet opakování je 25 - 35x [54].



### 3.3.2.3 Průběh PCR

Reakční směs pro PCR se napipetuje do zkumavky, která je k PCR určená, a ta se vloží do termocykleru, ve kterém probíhají teplotní cykly. Dosyntetizování řetězců probíhá ve fázi závěrečné polymerační reakce po dobu 5 minut při 72 °C. PCR směs se skládá z těchto komponentů: templátová DNA, pufr, DNA polymeráze, primery, PCR voda, dvojmocné kationty a dNTP- nukleosid trifosfát. (54). Popis jednotlivých cyklů je znázorněn na obr. č. 2 [14].



**Obrázek č. 2** Průběh PCR: 1 - denaturace, 2 - nasednutí primerů, 3 - syntéza DNA

1. Denaturace: „*dvouřetězcová (dvouvláknová) molekula DNA se po dobu 20 až 30 sekund zahřívá na teplotu 94 - 98°C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v dvouřetězcové molekule DNA a k rozvolnění této dvoušroubovice. Vznikají tak dvě jednořetězcové (jednovláknové) molekuly DNA, na které mohou v dalším kroku nasednout primery [17]“.*
2. sednutí primerů: „*teplota se sníží na 50 - 65°C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA/primer se váže DNA polymeráza [17]“.*
3. Syntéza DNA: „*teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity při 72 - 80°C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od*

*5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA [17].“*

### **3.3.3 Polymorfizmus délky restričních fragmentů (RFLP- restriction fragment length polymorphism)**

Tato metoda byla objevena v 80. letech jakožto první genetický test založený na bázi DNA. Její využití se uplatňuje v nejrůznějších odvětvích, používá se například k identifikaci genů zodpovědných za určitá onemocnění [18].

RFLP je metoda, kdy se pomocí tzn. restričních endonukleáz (RE) enzymaticky štěpí molekuly DNA ve specifickém restričním místě. RE jsou produkovány zejména z produkci různých druhů bakterií. Působí jako ochrana před cizorodou DNA. V současné chvíli je známo cca 1500 restričních endonukleáz [57].

Různé typy RE štěpí cílovou DNA v různých místech. Polymorfizmy (rozdíly ve studovaných sekvencích) lze sledovat po rozdělení vzniklých fragmentů, které se vytvářejí díky gelové elektroforéze. Rozhodující je velikost a počet fragmentů. Tyto jsou pro každého jedince specifické [56].

Polymorfizmy délky restričních fragmentů jsou způsobeny přestavbou, jakou je například delece, substituce, inzerce bází. Změna počtu restričních míst je tak způsobena změnou v pořadí bází nukleotidů [57].

Určité restriční endonukleázy mohou být citlivé na metylaci DNA. Někdy methylace adeninu a methylace cytosinu štěpení inhibuje, jindy je methylace pro štěpení nezbytná. Odlišení různých DNA se provádí na základě polymorfizmu délky štěpných úseků. Vznik tohoto polymorfizmu je zapříčiněn přítomností nebo nepřítomností rozpoznávacích a štěpných míst. Obecně lze říci, že RE rozpoznávající kratší sekvenci štěpí DNA častěji na menší úseky a RE, které rozpoznávají delší sekvenci, štěpí na delší sekvenci a méně často. Delší úseky vznikají při neúplném štěpení DNA vlivem nevhodných reakčních podmínek (velký obsah bílkovin, nevhodná teplota, nedostatečná doba). V případě nespecifického štěpení mimo poznávací místa je takové štěpení označeno jako hvězdičkové. Vznikne mnoho krátkých úseků. Tento analyticky nepříznivý stav může být zapříčiněn například nadbytkem glycerolu v reakci [19].

### 3.3.3.1 Průběh RFLP

Vytvoří se reakční směs, která se skládá z produktu PCR a specifické restriční endonukleázy. Tato směs se inkubuje při 37 °C po dobu jedné hodiny i přes noc. Posledním krokem je analýza štěpných fragmentů DNA. Ta probíhá na agarózovém gelu vhodné koncentrace [20].

### 3.3.4 Elektroforéza

Elektroforéza využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly. To znamená, že různě velké a nabitě molekuly se budou pohybovat různou rychlostí. Elektroforéza se nejčastěji využívá pro separaci látek pro analytické a taky preparativní účely [58].

Elektroforéza může být uskutečněna pomocí různých typů. Prvním je tzv. volná elektroforéza. Tato elektroforéza se provádí ve vodných roztocích tlumivých roztoků a částice putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou rychlostí, která je přímo úměrná velikosti jejich náboje. Gradient napětí udává rychlosti migrace. Nevýhodou této jinak jednoduché metody je, že se separace snadno poruší konvenčními proudy v kapalině. Tyto proudy vnikají vlivem tepla, způsobeného průchodem elektrického proudu. Tato technika je velmi málo používaná [59].

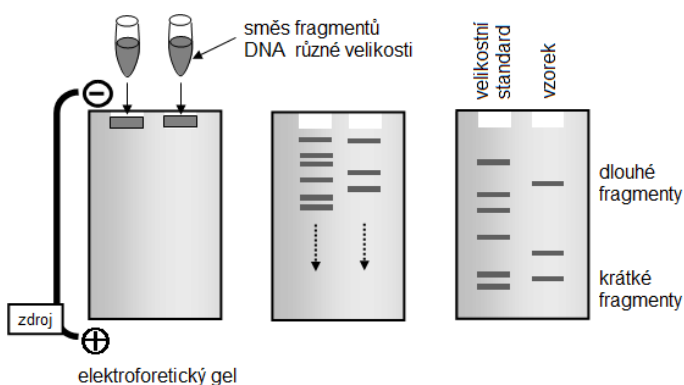
Dalším typem elektroforézy je elektroforéza na nosičích, označovaná také jako zonální elektroforéza. Byla vyvinuta za účelem odstranění nedostatků volné elektroforézy. Nosiče používané při této metodě musí být hydrofilní, nerozpustné ve vodě a měly by mít co nejmenší adsorpční schopnosti. Mezi prvními nosiči, které byly pro tuto metodu využity, se objevoval neklížený papír, acetát celulózy, škrob a celulóza. Dnes se nejčastěji používají gely, a to především agarózový, škrobový a polyakrylamidový [59].

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu se v současnosti řadí k nejvyužívanější elektroforetické technice. Úspěšnost separace závisí na zvolení vhodných podmínek pro provedení procesu. Na stupeň disociace látek a na jejich velikost náboje má rozhodující vliv pH prostředí. Látky, které nenesou žádný vnější náboj a nacházejí se v izoelektrickém stavu, se nebudou v elektrickém poli

pohybovat. Látky, které náboj nesou, se budou pohybovat ve směru elektrody s opačným nábojem, tedy kationty ke katodě a anionty k anodě. Důležitý faktor při elektroforéze na jakémkoli gelu je koncentrace gelu, resp. stupeň zesítnění gelu. Gel s menšími póry je neprůchodný pro větší molekuly.

Experimentální uspořádání elektroforézy na gelu je dvojího typu. Pro oba platí, že se elektroforéza provádí ve speciálním aparátu, kde je nosič se vzorkem k separaci umístěn mezi dvě elektrody, mezi kterými prochází stejnosměrný proud. První, starší metoda, se od novější odlišuje v umístění vzorku. Tato umísťuje nosič vertikálně v trubičkách, kdežto u novější metody je gel rozprostřen v tenké vrstvě horizontálně na destičkách - plošná elektroforéza. Takto uspořádaný nosič má oproti vertikální variantě mnoho výhod. Je citlivější, lze jej snadněji kvantifikovat pomocí tzv. denzitometrů a na plošně uloženou destičku lze umístit více vzorků. Proces se stává efektivnějším a vzorky jsou snáze porovnatelné. Výhody metody, při které jsou nosiče uspořádány v trubičkách, spočívají ve snadnější přípravě gelu a v tom, že uspořádání v trubičkách je jednodušší. Nelze opomenout ani fakt, že metoda uložení v trubičkách je jednodušší na provedení a také podstatně levnější než plošná elektroforéza [59].

Mezi elektroforézy prováděné na gelu patří i elektroforéza na agarovém gelu (viz. obrázek 3), který je tvořen složitou sítí molekul s póry. Molekuly DNA se v gelu pohybují na základě velikosti, kdy menší fragmenty se pohybují v gelu rychleji. V gelu jsou připraveny jamky, do kterých se DNA nanáší, klesnutí DNA fragmentu a jeho migraci v gelu zajišťuje přidání vkládacího pufru.



**Obrázek č. 3** Elektroforéza na agarovém gelu [58].

Třetím typem elektroforézy je elektroforéza kapilární. Ta využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry. Vysokoučinná kapilární elektroforéza se provádí jako volná elektroforéza, gelová elektroforéza ale také jako izoelektrická fokusace.

Posledním typem je afinitní elektroforéza. Jedná se o zvláštní případ elektroforézy na nosičích, kdy se separované látky pohybují vlivem elektroforetické pohyblivosti v gelu, ve kterém je imobilizován afinitní ligand, který je specifický minimálně pro jednu složku směsi. Složka, která má k ligandu specifickou afinitu, se při průchodu gelem opožďuje, zatímco neaktivní látky putují normální rychlostí [59]. Separované fragmenty se po proběhnutí elektroforézy musí zviditelnit, a to zajišťuje barvivo ethidiumbromid a jiná barviva, která se váží na DNA a v UV záření v přístroji UV transluminátor se fragmenty DNA zviditelní [60].

## 4. Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

Ke studiu byli vybráni psi, u nichž se objevil epileptický záchvat. Celkem se jednalo o 60 jedinců různých plemen. Věkové rozmezí se zde pohybovalo od 2 let (9 jedinců) po 10 let (1 jedinec). Od těchto jedinců byly odebrány biologické vzorky v podobě krve nebo chlupu s chlupovou cibulkou. Tabulka č. 1 znázorňuje číslo vzorku, stáří psa a jeho věk při prvním záchvatu.

Číslo vzorku	Stáří (roky)	Věk při prvním projevu (měsíce)	Číslo vzorku	Stáří (roky)	Věk při prvním projevu (měsíce)
1	5	11	31	6	10
2	7	10	32	9	16
3	3	10	33	9	18
4	9	21	34	9	20
5	7	12	35	10	21
6	2	10	36	2	23
7	2	9	37	6	10
8	4	9	38	6	11
9	6	10	39	8	12
10	4	12	40	5	16
11	5	15	41	4	14
12	8	12	42	5	16
13	9	13	43	6	12
14	6	10	44	9	12
15	6	14	45	5	11
16	7	10	46	3	9
17	8	10	47	2	8
18	9	29	48	3	4
19	3	20	49	2	15
20	5	23	50	3	3
21	9	19	51	3	14
22	8	10	52	3	10
23	7	15	53	3	10
24	2	18	54	5	12
25	3	18	55	5	10
26	3	12	56	6	19
27	2	15	57	9	21
28	2	14	58	8	21
29	3	10	59	7	18
30	2	9	60	5	12

Tabulka č. 1 Číslo vzorku, stáří, věk při prvním záchvatu

Ze získaných biologických vzorků, které byly uskladněny v mrazáku, byla následně vyizolována DNA. K izolaci DNA bylo použito komerčně dostupných kitů od firmy Macherey-Nagel. Přítomnost vyizolované DNA byla následně ověřena elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu. Kvalita byla následně potvrzena spektrofotometricky.

Pro izolaci z krve bylo potřeba nejprve vzorek krve rozmrazit. Poté se do mikrozkušavky napipetovalo 200  $\mu$ l krve a přidalo 25  $\mu$ l proteinázy K. Dále se přidalo 200  $\mu$ l pufru B3 a promíchalo na vortexu. Následně probíhala inkubace při 70°C po dobu 10 - 15 minut. Po inkubaci se do mikrozkušavky přidalo 210  $\mu$ l 96-100% etanolu a vzorek se znovu promíchal na vortexu. Vzorek se přendal do kolonky na nové mikrozkušavce a odstředil se po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách. Poté se opět přendal do nové mikrozkušavky a přidalo se 500  $\mu$ l pufru BW a odstředil se po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách. Celý proces s přendáním do nové mikrozkušavky a odstředěním se ještě jednou zopakoval, ovšem tentokrát za přidání 500  $\mu$ l pufru B5. Po odstředění se proteklý roztok z mikrozkušavky odstranil, kolonka se vrátila do stejné mikrozkušavky a za stejných podmínek se vzorek opět odstředil. Po odstředění se kolonka přendala do nové mikrozkušavky a přidalo se 100  $\mu$ l předehřátého elučního pufru BE. Původní mikrozkušavka se i s obsahem vždy vyhodila. Vzorek se inkuboval 1 minutu při pokojové teplotě a poté odstředil po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách. Kolonka byla odstraněna a vzorek uložen do chladu.

Pro izolaci z tkání, konkrétně z chlupové cibulky, byl vzorek nejdříve rozmražen. Poté se chlupové cibulky vložily do mikrozkušavky. K cibulkám se přidalo 180  $\mu$ l pufru T1 a 25  $\mu$ l roztoku proteinázy K a promíchalo ve vortexu. Vzorek se inkuboval při 56°C nejméně 1 - 3 minuty a po dobu inkubace se občas promíchal na vortexu. Po inkubaci se vzorek znovu promíchal na vortexu a bylo k němu přidáno 200  $\mu$ l pufru B3, důkladně se vortexovalo a 10 minut inkubovalo při 70°C. Dále se k vzorku přidalo 210  $\mu$ l 96-100% etanolu a důkladně se promíchal. Všechna precipitát se přenesl do kolonky, centrifugoval 2 minuty při 14 000 otáčkách, odstranil se proteklý roztok a kolonka se umístila zpátky do mikrozkušavky. Do kolonky se přidalo 500  $\mu$ l pufru BW a centrifugovalo se po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách, odstranil se proteklý roztok a kolonka se umístila zpátky do mikrozkušavky. Proces centrifugace se za stejných podmínek opakoval

ještě jednou, přidávalo se ale 600 µl pufru BW. Poté se vzorek znovu centrifugoval po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách. Kolonka se umístila do 1,5 ml mikrozkušavky a přidalo se 100 µl temperovaného pufru BE (70 °C). Vzorek se inkuboval 1 minutu při pokojové teplotě a poté centrifugoval 2 minuty při 14 000 otáčkách. Po centrifugaci byla mikrozkušavka uložena do chladu.

## 4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

V práci se vycházelo ze studie Mizukami et al. (2013). Na základě této studie a jejího zjištění, že na genu *ABCB1* se nachází mutace c.-6180T>G, byly připraveny primery o následujících sekvencích znázorněné v tabulce č. 2.

Gen	Primer	Sekvence primeru (5' - 3')
<i>ABCB1</i>	forward	5'-GCA GTG GGG TGA GAA CTA GA- 3'
	reverse	5'-CGC AAG CCA TGT AAG GTA TG- 3'

**Tabulka č. 2** Sekvence primerů použitých pro PCR

### 4.2.1 Složení reakční směsi

Složení reakční směsi potom bylo následující: 3 µl mastermixového pufru, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 3 µl dNTP's, po 1,5 µl primeru (10 ng), 3 µl *Taq* polymerázy (1U), 2 µl DNA a 14 µl H<sub>2</sub>O. Na chladícím stojánku byl připraven mastermix, který se skládá z pufru, MgCl<sub>2</sub>, dNTP's, primerů a H<sub>2</sub>O. Tento mix byl rozpipetován do označených mikrozkušavek. Následně byla do každé z nich přidána DNA a vzorky byly vloženy do termocyklu (Biometra T3000 thermocykler). Po 2 minutách úvodní denaturace byl přidán roztok *Taq* polymerázy, který vznikl namícháním *Taq* polymerázy a ke každému vzorku byly přidány 2 µl DNA. Poté bylo spuštěno pokračování programu. Složení reakční směsi znázorňuje tabulka č. 3.



<b>ABCB1</b>	
<b>Komponenta</b>	<b>Objem [μl]</b>
Taq pufr	3
MgCl <sub>2</sub>	2
dNTP's	3
Primer 1	1,5
DNA	2
Taq DNA polymeráza (1U)	3
H <sub>2</sub> O	14
Celkový objem	28,5

**Tabulka č. 3** Složení reakční směsi PCR pro jeden vzorek

Cykly pro PCR genu *ABCB1* se skládají z denaturace při 95°C po dobu 2 minut, dále proběhlo 35 cyklů, skládajících se z denaturace při 95°C po dobu 30 sekund, annealingu při 60°C po dobu 30 sekund a elongace, která proběhla při 72°C po dobu 30 sekund. Na závěr byla provedena extenze při 72°C po dobu 10 minut pro dokončení všech řetězců. PCR trvala přibližně 2,5 hodiny. Délka PCR produktu byla 416 bp. Výtěžek amplifikované DNA byl detekován na 2,5% agarózovém gelu pomocí elektroforézy a vizualizován pod UV světlem.

### 4.3 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Získané PCR produkty byly štěpeny restrikční endonukleázou *MboI*. Restrikční endonukleáza v množství 1 μl byla spolu s 1,7 μl pufru přidána k 15 μl PCR produktu. Následně byla reakční směs inkubována přes noc při 37°C. Výsledný genotyp byl stanoven díky elektroforéze na 3% agarózovém gelu. Složení reakční směsi RFLP pro jeden vzorek je popsáno v tabulce č. 4.

<b>ABCB1</b>	
<b>Komponenta</b>	<b>Objem [μl]</b>
Restrikční endonukleáza <i>MboI</i> (10 U/ μl)	1
Pufr (Buffer Tango)	1,7
PCR produkt	15
Celkový objem	17,5

**Tabulka č. 4** Složení reakční směsi RFLP pro jeden vzorek

#### 4.4 Elektroforéza na agarózovém gelu

Koncentrace agarózového gelu byla připravena v závislosti na metodě, pro kterou byl použit (viz tabulka č 5).

Agarózový gel [%]	Agaróza [g]	1x TBE pufr [ml]	Ethidium bromid [μl]
1	1,0	100	17
2,5	2,5	100	17
3	3,0	100	17

**Tabulka č. 5** Složení agarózových gelů o různé koncentraci

Elektroforéza byla prováděna v horizontální elektroforézní aparatuře, kde jako elektrolyt byl použit 1x TBE pufr (180g TRIS, 55 g kyseliny borité, 800ml destilované vody, 40ml EDTA, do objemu o 1l doplněno destilovanou vodou). K ověření genomové DNA se na 1 % agarózový gel do každé jamky napipetovalo 5 μl resuspendované DNA, která byla obarvená 5 μl bromfenolové modři. Elektroforéza na 1% gelu trvala 75 minut při 80 V. Elektroforéza na 2,5% agarózovém gelu byla použita k separaci molekul DNA, které byly získány metodou PCR. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 5 μl PCR produktu a 5μl bromfenolové modři. Tato elektroforéza trvala 45 minut při 120 V. Jako poslední byla použita elektroforéza na 3% gelu, sloužící k ověření naštipaných fragmentů metodou RFLP. Do všech jamek bylo vloženo 10 μl vzorku, který byl předtím obarven 5 μl bromfenolové modři. Délka trvání elektroforézy činila 90 minut při 80 V. Pro ověření přítomnosti a délky fragmentů produktů PCR a RFLP bylo do první či poslední jamky napipetováno 1μl markeru *pUC19 DNA/MspI (HpaII)*, smíchaného s 5μl bromfenolové modři. Výsledky byly vizualizovány pod UV světlem.

## 4.5 Výpočty

Metodou PCR-RFLP byla provedena genotypizace, ze které byly spočteny absolutní frekvence genotypů  $AA, AB, BB$  v genu  $ABCBI$ . Z výpočtů byly poté určeny relativní frekvence genotypů a absolutní a relativní frekvence alel.

Vzorce pro výpočet relativní frekvence genotypů genu  $ABCBI$ :

$$AA^R = AA^A / N,$$

$$AB^R = AB^A / N,$$

$$BB^R = BB^A / N,$$

Vzorce pro výpočet absolutní frekvence alel:

$$AA = 2 \times AA^A + AB^A,$$

$$BB = 2 \times BB^A + AB^A,$$

Vzorce pro výpočet relativní frekvence alel:

$$A^R = 2 \times AA^A + AB^A / 2 \times N,$$

$$B^R = 2 \times BB^A + AB^A / 2 \times N,$$

kde horní index  $A$  značil absolutní frekvenci, horní index  $R$  označoval relativní frekvenci.  $N$  vyjadřovalo počet jedinců ve sledované populaci.

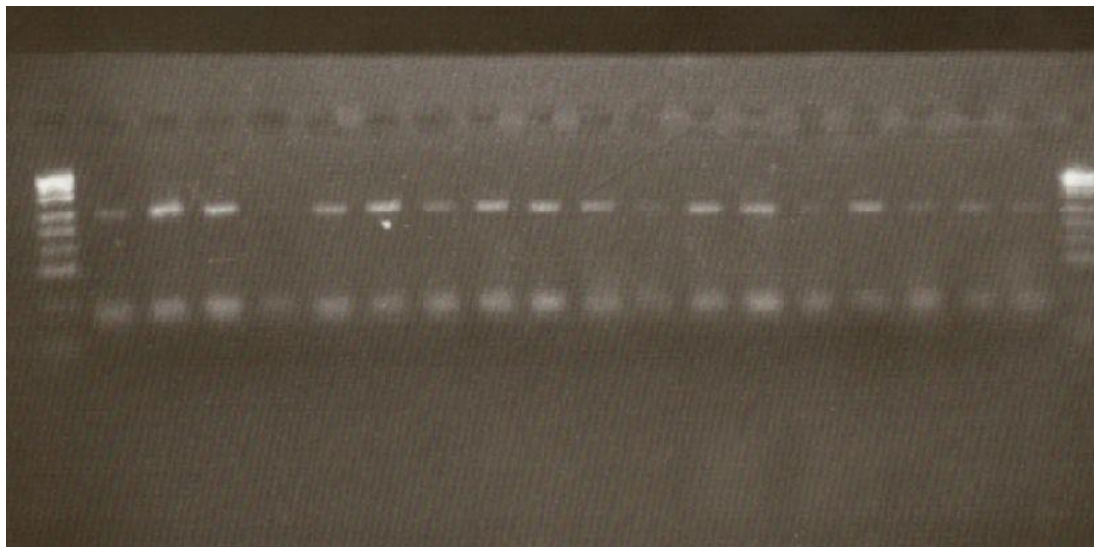
## 4.6 Statistické vyhodnocení

Na závěr byl statisticky vyhodnocen vztah mezi genotypem a věkem, ve kterém byl zjištěn první epileptický záchvat. Ke statistickému zpracování byla použita metoda ANOVA programu Statistica 9.0.

## 5. Výsledky

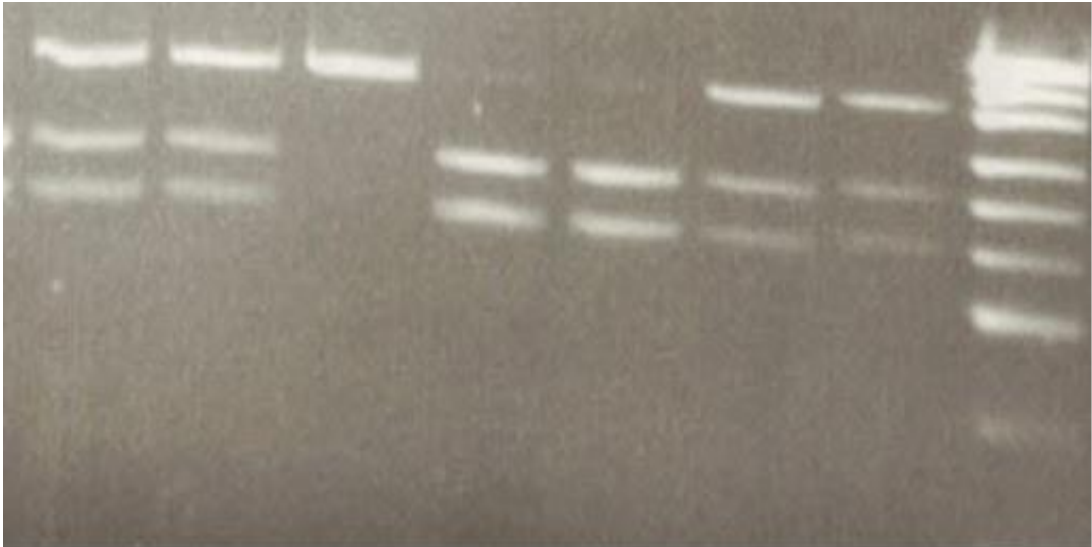
### 5.1 Genotypizace

Z 60 vzorků krve nebo tkáně od různých plemen psů byla úspěšně vyizolována DNA. Metodou PCR-RFLP/ *MboI* byla provedena genotypizace genů *ABCB1*. PCR fragment genu *ABCB1* byl dlouhý 416 bp - viz. obrázek č. 4.



**Obrázek č. 4** PCR produkt genu *ABCB1*

Alela *A* byla určena přítomností 2 fragmentů o délkách 313 a 103 bp, neboť sekvence této alely obsahovala 1 štěpné místo pro zmiňovanou restrikční endonukleázu. Alela *B* byla určena přítomností 2 restrikčních míst a následkem toho se na gelu objevovaly 3 fragmenty o délkách 191, 122 a 103 bp. Heterozygotní sestava alel *AB* byla určena přítomností 4 fragmentů o délkách 313, 191, 122 a 103 bp. Vzhledem ke snížené možnosti odlišení fragmentů o délkách 122 a 103 bp občas docházelo ke splynutí těchto 2 fragmentů. Genotyp *AA* potom vykazoval na gelu 2 fragmenty o délkách 313 a 103 bp, genotyp *BB* byl rovněž určován přítomností 2 fragmentů o délkách 191 a 122 bp a genotyp *AB* se potom prezentoval přítomností 3 fragmentů o délkách 313, 191 a 122 bp (viz. obrázek č. 5).



**Obrázek č. 5** Gen *ABCB1*: vizualizace RFLP

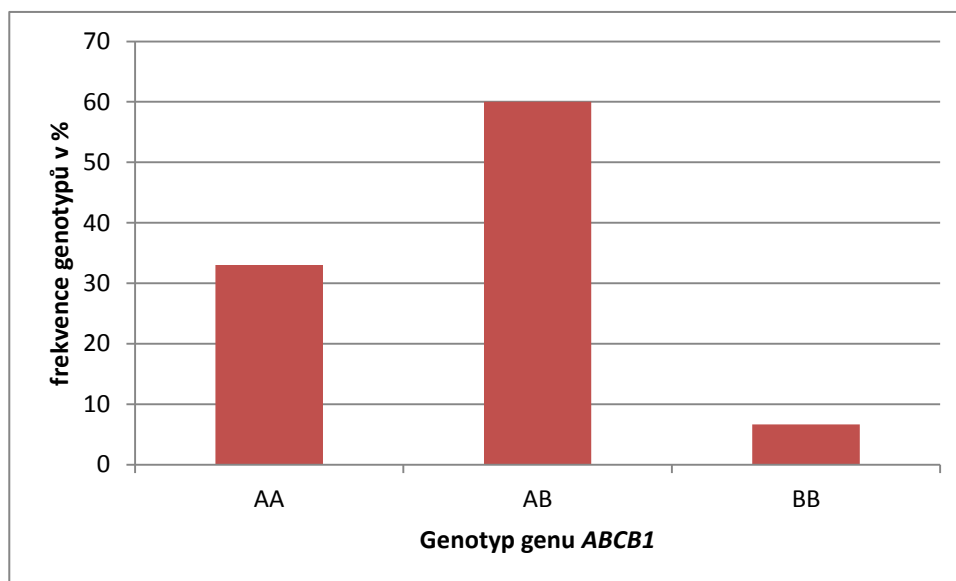
## 5.2 Frekvence alel a genotypů

Výše zvolenou metodikou bylo v našem souboru, který čítal 60 jedinců, zjištěno 20 homozygotů *AA*, 36 heterozygotů *AB* a pouze 4 homozygoti *BB*. Z toho vyplývá, že genotyp *BB* byl nejméně četný s relativní frekvencí 0,0667, nejpočetnější byl genotyp *AB* s relativní frekvencí 0,60. Co se týče zastoupení alel v populaci, tak nejčetnější byla alela *A*, která s relativní frekvencí 0,633 převažovala nad alelou *B*, která měla relativní frekvenci 0,367. Absolutní a relativní frekvence genotypů a alel genu *ABCB1* jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Frekvence	Genotyp			Alela	
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
absolutní	20	36	4	76	44
relativní	0,3333	0,60	0,0667	0,633	0,367

**Tabulka č. 6** Absolutní a relativní frekvence genotypů a alel

Z grafu č. 1 lze vyčíst procentické zastoupení genotypů *AA*, *AB*, *BB* v genu *ABCB1* ve sledované populaci.



**Graf č. 1** Zastoupení genotypů v genu *ABCB1*

### 5.3 Vliv genotypu na věk při prvním záchvatu

Z tabulky č. 7 lze vyčíst číslo vzorku, genotyp, stáří psa při odebrání vzorku a věk psa při prvním projevu záchvatu. Stáří sledované populace se v době odebrání vzorku pohybovalo v rozmezí 2 let (9 jedinců) až 10 let (1 jedinec) přičemž průměr činil 5,3 let. Nejdříve se záchvat u psa ve sledované populaci objevil ve 3 měsících (1 jedinec), nejpozději ve 29 měsících (1 jedinec). Průměrný věk výskytu záchvatů u všech genotypů dohromady je 13,6 měsíců.

Číslo vzorku	Genotyp	Stáří (roky)	Věk při prvním projevu (měsíce)	Číslo vzorku	Genotyp	Stáří (roky)	Věk při prvním projevu (měsíce)
1	AA	5	11	31	AB	6	10
2	AB	7	10	32	BB	9	16
3	AB	3	10	33	BB	9	18
4	AB	9	21	34	AB	9	20
5	AB	7	12	35	AA	10	21
6	AB	2	10	36	AB	2	23
7	AB	2	9	37	AB	6	10
8	BB	4	9	38	AB	6	11
9	AA	6	10	39	AB	8	12
10	AA	4	12	40	AB	5	16
11	AA	5	15	41	AB	4	14
12	AA	8	12	42	BB	5	16
13	AB	9	13	43	AA	6	12
14	AB	6	10	44	AA	9	12
15	AB	6	14	45	AA	5	11
16	AB	7	10	46	AA	3	9
17	AB	8	10	47	AA	2	8
18	AB	9	29	48	AA	3	4
19	AB	3	20	49	AA	2	15
20	AB	5	23	50	AA	3	3
21	AA	9	19	51	AA	3	14
22	AA	8	10	52	AA	3	10
23	AA	7	15	53	AA	3	10
24	AB	2	18	54	AB	5	12
25	AB	3	18	55	AB	5	10
26	AB	3	12	56	AB	6	19
27	AB	2	15	57	AB	9	21
28	AB	2	14	58	AB	8	21
29	AB	3	10	59	AB	7	18
30	AB	2	9	60	AB	5	12

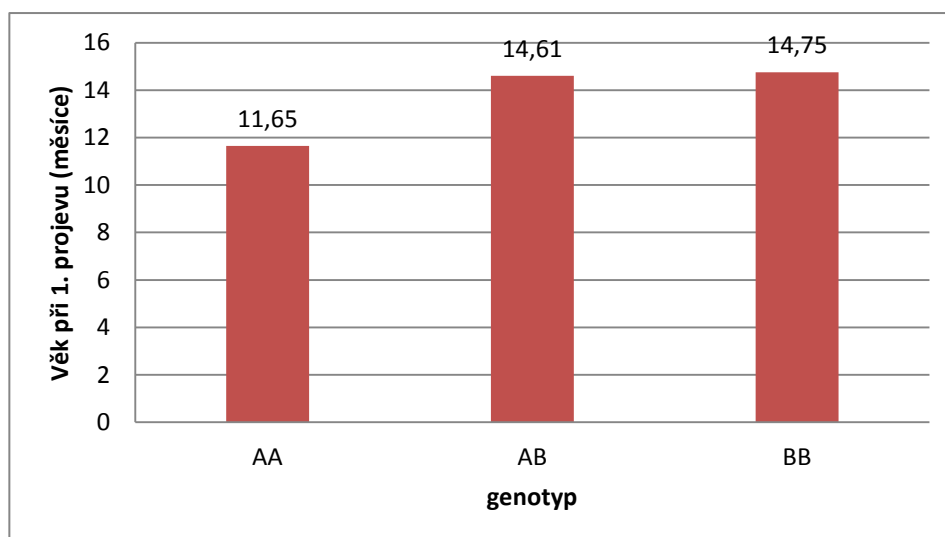
**Tabulka č. 7** Vliv genotypu na věk při prvním záchvatu

U genotypu *AA* se první výskyt záchvatu objevil nejdříve ve 3 měsících (1 jedinec), u genotypu *AB* v 9 měsících (2 jedinci) a u genotypu *BB* se první záchvat vyskytl také v 9 měsících (1 jedinec). Rozdíl ve výskytu prvního záchvatu mezi genotypy *AA*, *AB*, *BB* činil půl roku. Průměrný věk záchvatu v genotypu *AA* byl 11,65 měsíců, u *AB* 14,71 měsíců a u *BB* 14,75. Rozdíl mezi začátkem projevu záchvatu u genotypu *AA* a *BB* činí více než tři měsíce, zato rozdíl mezi *AB* a *BB* je pouze několik dní. Zdá se, že genotyp *AA* by mohl být díky nejnižšímu průměrnému věku při prvním záchvatu na výskyt epilepsie nejnáchylnější, ale záchvaty se projevily u všech genotypů. Rozdíl je tak pouze ve věku při prvním výskytu záchvatu. Průměrný věk při výskytu prvního záchvatu u jednotlivých genotypů popisuje tabulka č. 8.

Genotyp	Průměrné stáří (v měsících)
<i>AA</i>	11,65
<i>AB</i>	14,71
<i>BB</i>	14,75

**Tabulka č. 8** Průměrné stáří při výskytu prvního záchvatu

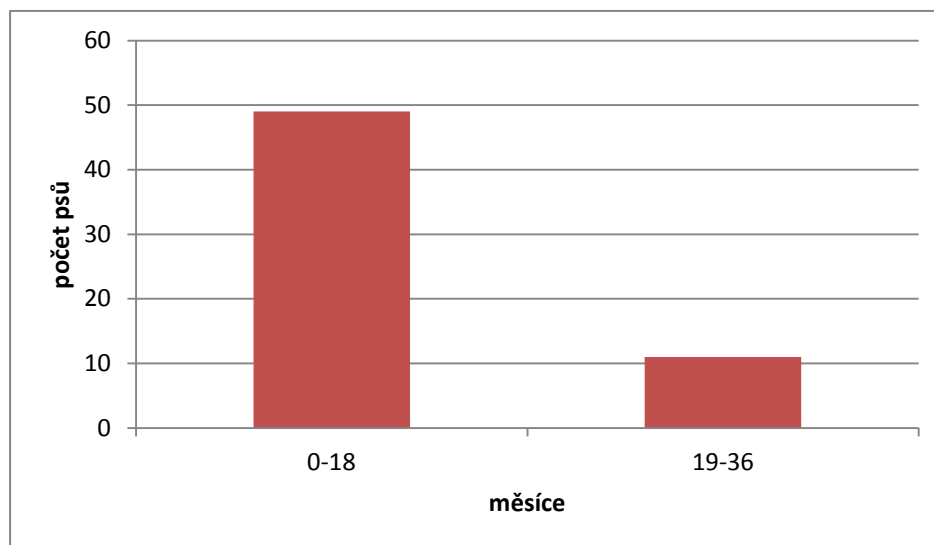
Graf č. 2 ukazuje průměrné stáří psů při prvním záchvatu u jednotlivých genotypů.



**Graf č. 2** Průměrné stáří psů u jednotlivých genotypů



Z grafu č. 3 lze vyčíst, že 49 jedinců (82 %) mělo první záchvat do 18 měsíců věku. Od 19 do 36 měsíců věku mělo ve sledované populaci první záchvat 11 jedinců (18 %). Je zde tedy výrazná převaha jedinců s výskytem do 18 měsíců.



**Graf č. 3** Počet psů s výskytem záchvatu do 18. měsíce a od 19. měsíce

#### 5.4 Statistické vyhodnocení

Ačkoli zvířata s genotypem AA měla nižší věk při nástupu prvního záchvatu, práce statisticky nepotvrdila vliv genotypu v mnou studovaném lokusu na věk při prvním záchvatu a to na statisticky významné hladině ( $P < 0,05$ ).

## 6. Diskuze

Z celkového počtu 60 sledovaných psů různých plemen tvořili homozygoti v genu *ABCB1* se zastoupením alel AA 33 % (20 jedinců), heterozygoti AB byli zastoupeni 60ti % (36 jedinců) a homozygoti BB měli nejmenší zastoupení, a to pouze 6,6 % (4 jedinci).

Alves *et al.* (2011) zkoumali výše zmiňovanou mutaci v genu *ABCB1* u kolií. Z celkového počtu 236 studovaných jedinců zjistili pouze u 1 jedince výskyt heterozygotního genotypu. To představuje frekvenci výskytu heterozygotů 0,4 %. Výskyt homozygotů s oběma alelami mutovanými nebyl ve výše uvedené studii zaznamenán. Výsledky této studie jsou v rozporu s mými zjištěními. V mnou provedené studii tvořili heterozygoté převažující skupinu. Jejich výskyt byl 60 %, což představuje několikanásobnou převahu oproti výskytu heterozygotů ve studii Alves *et al.* (2011). Rovněž výskyt homozygotů a jejich frekvence se liší. Oproti nulové frekvenci homozygotů s mutovanými alelami u border kolií byla frekvence tohoto genotypu v mnou studované populaci 6,6 %. Z hlediska zastoupení genotypu s původními alelami lze u mnou studované populace zaznamenat výrazný pokles. Tento genotyp byl zastoupen s 20% frekvencí, což je pouhá pětina frekvence ze studie Alves *et al.* (2011) K jiným výsledkům ve své práci, zkoumající zmíněnou mutaci genu *ABCB1* a její souvislost s rezistencí na léčbu fenobarbitalem u border kolií došli Mizukami *et al.* (2013). Sledovali 472 border kolií. Zjistili, že výskyt mutované alely byl velmi vysoký a to 24,9 %. V mnou provedené studii byl výskyt této alely mnohonásobně vyšší, konkrétně 63,3 %. Rozdíl mezi výskytem homozygotů s původními alelami je také výrazný. Oproti 60 % v dané studii byl v mnou sledované populaci výskyt těchto homozygotů pouze 6,7 %, což představuje skoro desetinásobný rozdíl. Stejně tak se liší i procentuální zastoupení heterozygotů. Ze studie Mizukami *et al.*(2013) vyplývá, že heterozygoti tvořili 30,3 % populace, kdežto v mnou sledované populaci se vyskytovalo 60 % heterozygotů, což je o polovinu více. Výrazně jiná je i frekvence homozygotů s mutovanou alelou, kdy oproti 9,8% frekvenci u border kolií, byla v mé studované populaci tato frekvence 33 %. Rozdíly ve výsledcích frekvencí alel a genotypů mohou být dány tím, že v mé populaci se vyskytovalo více plemen, kdežto Mizukami *et al.* (2013) prováděli studii pouze na border koliích. Z výsledků Mizukami *et al.* (2013) předpokládají, že vysoký výskyt mutované alely může mít za následek zvýšenou rezistenci na léčbu

fenobarbitalem u idiopatické epilepsie. Ačkoli v mnou provedené studii byla frekvence mutované alely mnohonásobně vyšší, nemám k dispozici o rezistenci k léčbě k dispozici. Weissl *et al.* (2011) zaznamenali ve své studii u australských ovčáků relativně podobné výsledky jako Mizukami *et al.* (2013). Tyto výsledky se však zcela lišily od výsledků zjištěných z mé práce. Weissl *et al.* (2011) zkoumali dvě skupiny: případovou a kontrolní. Obě čítaly 50 jedinců. Dospěli k výsledkům, že výskyt frekvence heterozygotního genotypu byl v případové skupině 22 % a v kontrolní skupině 18 %, což je o dvě třetiny méně, než frekvence v mé provedené práci. V provedené práci u australských ovčáků byl výskyt frekvence homozygotního genotypu s mutovanou alelou 2 % u případové i kontrolní skupiny. Tato frekvence v mé práci byla několikanásobně vyšší (33 %). Frekvence pro homozygoty s původní alelou byla u případové skupiny 70 % a u kontrolní skupiny 80 %. Tyto frekvence jsou v porovnání s mými výsledky (6,7 %) o několik desítek procent nižší. Rozdílnost mezi mými výsledky a výsledky Weissl *et al.* (2011) může být dána opět jednoplemennou studií a také tím, že australský ovčák není tolik prošlechtěným plemenem, proto je u něj výskyt mutované alely výrazně nižší než v mé práci. K podobným výsledkům, co se týče frekvence homozygotního genotypu s původní alelou jako v mé práci, dospěli i Muñana *et al.* (2012). Ti ve své práci zkoumali asociaci mezi *ABCB1* genotypem a výskytem záchvatů u kolíí s epilepsií. Frekvence homozygotů s původní alelou byla u kolíí 14 %, v mé práci 6,7 %. Společným znakem pro tyto dva výsledky je procentuálně nejmenší zastoupení výskytu tohoto genotypu. Při porovnání s mou prací byl rozdíl v zastoupení homozygotů s mutovanou alelou, který činil 28 %. Rozdíl mezi heterozygoty byl pouhá 2 %. V mé práci byl výskyt heterozygotů nižší. Relativní podobnost výsledků může být dána faktem, že stejně jako v mé práci Muñana *et al.* (2012) sledovali ve své práci skupinu psů, kteří měli všichni diagnostikovanou idiopatickou epilepsii.

Homozygoti s mutovanou alelou měli statisticky prokázán dřívější nástup záchvatů než heterozygoti a homozygoti s původní alelou. V mé práci nebyl statisticky vliv genotypu na věk zvířete při prvním záchvatu na statisticky významné hladině  $P < 0,05$  prokázán.

## 7. Závěr

Cílem mé práce bylo zhodnotit, zda má genotyp v daném lokusu vliv na výskyt epilepsie. Konkrétně bylo pro testování vybráno 60 psů, trpících idiopatickou epilepsií. Od nich byly odebrány vzorky krve nebo chlup s chlupovou cibulkou a následně provedena analýza genetického založení.

Testován byl gen *ABCB1* a výskyt mutace c.-6-180T> G v tomto genu. Ve sledované populaci byl výskyt genotypu 20 homozygotů s mutovanou alelou, 36 heterozygotů a 4 homozygoti s původní alelou. Frekvence výskytu alely A byla 63,3 % a alely B 36,7 %. V porovnání s výsledky jiných studií se frekvence výskytu alel a genotypů podstatně lišily. Genotyp dle statistického zjištění na hladině významnosti P 0,05 nemá vliv na věk při prvním záchvatu.

Velké procento chovatelů stále upřednostňuje jiná kritéria při výběru psa než jeho genetické založení. Faktory jako odkud pes pochází, zdravotní stav příbuzenské populace a obecně nemoci, které postihují chovatelem vybrané plemeno, by měly být v chovatelství řazeny velmi vysoko. Při přihlédnutí k těmto faktorům je možné do budoucnosti snížit či eliminovat následky dědičných chorob. Mnoho chovatelů od provedení genotypizační studie odrazuje časová náročnost, velké množství potencionálních chorob k testování a první řadě především finanční náklady. Chovatelé si mnohdy neuvědomují, že i pouze pomocí stravy či správného welfare zvířete mohou snížit následky choroby. Jedině skutečný zájem chovatele o celkovou pohodu a zdraví a historii předků psa může přispět ke snížení šíření dědičných chorob.

Dalším důležitým aspektem je zjištění přesného genetického založení idiopatické epilepsie, které v tuto dobu není známo. Existuje řada hypotéz, ale žádná nebyla potvrzena. Proto je velmi důležité, aby výzkumná činnost pokračovala a pomohla tak odhalit mutace, které jsou za vznik IE zodpovědné.

## 8. Seznam zkratek

Bp- pár bází

CNS- centrální nervový systém

DNA- deoxyribonukleová kyselina

EDTA- etylenediamnetetraoctová kyselina

EEG-elektroencefalograf

IE- idiopatická epilepsie

Kb- kilobáze

PCR- polymerázová řetězová reakce

RE-restrikční endonukleáza

RFLP- polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RNA- ribonukleová kyselina

SDS- docecylsulfát sodný

rRNA- ribosomální ribonukleová kyselina

tRNA- transferová ribonukleová kyselina

UV- ultrafialové záření

## 9. Seznam literatury

- [1] Dědičná onemocnění. *Vitalion*. [online]. [cit. 2015-11-11]. Dostupné z WWW: <<http://nemoci.vitalion.cz/dedicna-onemocneni/>>
- [2] SVOBODA, M.; SENIOR, D.F.; DOUBEK, J.; KLIMEŠ, J. *Nemoci psa a kočky, I. díl*. Brno: Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat, 2000, 1014 s.
- [3] Základní typy dědičnosti. Vrozené vývojové vady. *Informační portál o vrozených vadách a jejich výskytu v ČR*. [online]. [cit. 2015-11-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.vrozene-vady.cz/genetika/index.php?co=dedicnost>>
- [4] Dědičná onemocnění. *Vitalion*. [online]. [cit. 2015-11-25]. Dostupné z WWW: <<http://nemoci.vitalion.cz/dedicna-onemocneni/>>
- [5] Geny a znaky. *Genetika – biologie. Váš zdroj informací o genetice a biologii*. [online]. [cit. 2015-12-01]. Dostupné z WWW: <<http://www.genetika-biologie.cz/geny-znaky>>
- [6] Alely a mezialelické vztahy. *Genetika – váš zdroj informací o genetice*. [online]. [cit. 2015-12-03]. <Dostupné z WWW: <<http://genetika.wz.cz/alely.htm>>
- [7] Epilepsie. *WELL-VET – veterinární klinika*. [online]. [cit. 2015-12-05]. Dostupné z WWW: <<http://www.well-vet.cz/clanky/epilepsie.html>>
- [8] Potřebná minimální teorie aneb genetický základ. *RURGenetika* [online]. [cit. 2015-12-05]. Dostupné z WWW: <<http://genetika.nikde.eu/teorie.php>>
- [9] Základní pojmy, molekulární genetika, genetika buňky. *Uč se online!* [online]. [cit. 2015-12-07]. Dostupné z WWW: <<http://www.ucseonline.cz/biologie/zakladni-pojmy-molekularni-genetika-genetika-bunky/>>
- [10] Vrozené vývojové vady. *Vrozené vady. Informační portál o vrozených vadách a jejich výskytu v ČR*. [online]. [cit. 2015-12-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.vrozene-vady.cz/genetika/index.php?co=dedicnost>>
- [11] Život s epileptickým psem. *Veterinární klinika Na hůrce*. [online]. [cit. 2015-12-10]. Dostupné z WWW: <[http://vets4pets.cz/uzitecne-tipy/1\\_psi/10\\_zivot-s-epileptickym-psem](http://vets4pets.cz/uzitecne-tipy/1_psi/10_zivot-s-epileptickym-psem)>

- [12] Izolace nukleových kyselin. *Laboratorní cvičení z molekulární biologie. Univerzita Palackého v Olomouci, 2014.* [online]. [cit. 2015-12-12]. Dostupné z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>>
- [13] Izolace DNA. *Molekulární biologie. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat.* [online]. [cit. 2015-12-19]. Dostupné z WWW: <[http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-izolace\\_dna&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-izolace_dna&lang=cz)>
- [14] PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat.* [online]. [cit. 2015-12-19]. Dostupné z WWW: <[http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)>
- [15] Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). *Laboratorní cvičení z molekulární biologie. Univerzita Palackého v Olomouci, 2014.* [online]. [cit. 2015-12-19]. Dostupné z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm>>
- [16] Polymerázová řetězová reakce. *Datový standard MZ ČR - verze 4. Webové služby pro distribuci číselníků datového standardu, DTD a schémat.* [online]. [cit. 2015-12-22]. Dostupné z WWW: <<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/ILACI.htm>>
- [17] Polymerázová řetězová reakce (PCR). *LABGuide. Průvodce laboratoří.* [online]. [cit. 2016-12-22]. Dostupné z WWW: <<http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Ke-sta%C5%BEen%C3%AD-PCR1.pdf>>
- [18] Bartoš, M. *Základy farmakogenomiky. Facultas pharmaceutica brunensis.* [online]. [cit. 2015-12-27]. Dostupné z WWW: <<http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9&podkapm=91>>
- [19] RFLP (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů). *Učebnice biochemie. Univerzita Karlova.* [online]. [cit. 2015-12-27]. Dostupné z WWW: <<http://stary.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-DNA/newlook/defa3.htm>>
- [20] ŠRENK, P. *Epilepsie psů. VETERINA-INFO. Katalog veterinárních ordinací, klinik a nemocnic v ČR. 1998.* [online]. [cit. 2015-12-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.veterina-info.cz/odborne-clanky/epilepsie-psu-18.html>>
- [21] Epilepsie psů a koček. *ANIMA veterinární klinika.* [online]. [cit. 2016-01-05]. Dostupné z WWW: <<http://www.klinikaanima.cz/clanky/epilepsie-psu-a-kocek>>

- [22] KNOWLES, Kim. *Idiopathic epilepsy*. Clinical Techniques in Small Animal Practice, 1998. Pages 144–151. [online]. [cit. 2016-01-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096286798800352>>
- [23] De RISIO, L.; Newton, R.; Freeman, J.; Shea, A. *Idiopathic Epilepsy in the Italian Spinone in the United Kingdom*. Journal of veterinary Internal Medicine, 2015. Prevalence, Clinical Characteristics, and Predictors of Survival and Seizure Remission. [online]. [cit. 2016-01-10]. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12599/epdf>>
- [24] FISCHER, A. et al. *Disease Progression and Treatment Response of Idiopathic Epilepsy in Australian Shepherd Dogs*. Journal of veterinary Internal Medicine, 2012. [online]. [cit. 2016-01-11]. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.00853.x/full>>
- [25] Bromid draselný. *Wikipedie. Otevřená encyklopedie*. [online]. [cit. 2016-01-15]. Dostupné z WWW: <[https://cs.wikipedia.org/wiki/Bromid\\_draseln%C3%BD](https://cs.wikipedia.org/wiki/Bromid_draseln%C3%BD)>
- [26] Fenobarbital. *Wikipedie. Otevřená encyklopedie*. [online]. [cit. 2016-01-15]. Dostupné z WWW: <<https://cs.wikipedia.org/wiki/Fenobarbital>>
- [27] WIERSMA-AYLWARD, A. *Canine Epilepsy FAQ. Diagnosing Epilepsy*. Canine epilepsy resources. [online]. [cit. 2016-01-17]. Dostupné z WWW: <<http://www.canine-epilepsy.com/FAQ.html#anchor6015685>>
- [28] Lněný olej jako nečekaná pomoc pro psí pacienty. *Epilepsie a záchvaty u psů*. [online]. [cit. 2016-01-17]. Dostupné z WWW: <<http://www.psi-epilepsie.cz/zazracny-lneny-olej>>
- [29] DUDEK, M. *Výživa psa*. Cz-pes. Stránky plné psů. [online]. [cit. 2016-01-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.cz-pes.cz/literatura-veterina-vyziva.php>>
- [30] Základní složky potravin. *Haf bez obav. Magazín o psech a lidech*. [online]. [cit. 2016-01-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.hafbezobav.cz/clanek-2005011402-zakladni-slozky-potravin.html>>
- [31] STAFFORD, K. *The welfare of dogs*. Springer: UK, 2007. 280 s.
- [32] DOLEŽAL, O.; BÍLEK, M.; DOLEJŠ, J. *Chov skotu. Ochrana a welfare zvířat*. ZOOTECHNIK.cz. [online]. [cit. 2016-01-25]. Dostupné z WWW: <[http://www.zootechnik.cz/zoo\\_oaw.php](http://www.zootechnik.cz/zoo_oaw.php)>
- [33] OBERBAUER, A. M. et al. *The Genetics of Epilepsy in the Belgian Tervuren and Sheepdog*. Oxford Journals, 2002. Pages 57-63. [online]. [cit. 2016-01-26]. Dostupné z WWW: <<http://jhered.oxfordjournals.org/content/94/1/57.full>>



- [34] De RISIO, L.; Newton, R.; Freeman, J.; Shea, A. *Idiopathic Epilepsy in the Italian Spinone in the United Kingdom*. Journal of veterinary Internal Medicine, 2015. Prevalence, Clinical Characteristics, and Predictors of Survival and Seizure Remission [online]. [cit. 2016-01-10]. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12599/epdf>>
- [35] FISCHER, A. et al. *Disease Progression and Treatment Response of Idiopathic Epilepsy in Australian Shepherd Dogs*. Journal of veterinary Internal Medicine, 2012. [online]. [cit. 2016-01-11]. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.00853.x/full>>
- [36] Canine Epilepsy Project. *American Chesapeake Club*. [online]. [cit. 2016-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.amchessieclub.org/health/epilepsy.html>>
- [37] Genetický marker. *Wikipedie. Otevřená encyklopedie*. [online]. [cit. 2016-01-28]. Dostupné z WWW: <[https://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%BD\\_marker](https://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%BD_marker)>
- [38] Vizsla Epilepsy Research Project. *Vizsla Club of America*. [online]. [cit. 2016-01-28]. Dostupné z WWW: <[http://vcaweb.org/welfare/vizsla\\_epilepsy\\_research\\_project.shtml](http://vcaweb.org/welfare/vizsla_epilepsy_research_project.shtml)>
- [39] Genomové mutace. *Vše co student potřebuje vědět*. [online]. [cit. 2016-01-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.studentske.cz/2007/08/genomov-mutace.html>>
- [40] BLAŤKOVÁ, J. Epilepsie – záchvatové stavy u psů. *Klinika malých zvířat Hanzlík&Křeček*. [online]. [cit. 2016-02-02]. Dostupné z WWW: <[http://www.petklinika.cz/informace-o-zvirecich-nemocech/epilepsie\\_%E2%80%93\\_zachvatovite\\_stavy\\_u\\_psu](http://www.petklinika.cz/informace-o-zvirecich-nemocech/epilepsie_%E2%80%93_zachvatovite_stavy_u_psu)>
- [41] ŠRENK, P. *Epilepsie psů*. VETERINA-INFO. Katalog veterinárních ordinací, klinik a nemocnic v ČR. 1998. [online]. [cit. 2015-12-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.veterina-info.cz/odborne-clanky/epilepsie-psu-18.html>>
- [42] Epilepsie. *Shiba-dog.de*. [online]. [cit. 2013-03-09]. Dostupné z WWW: <<http://www.shiba-dog.de/shiba-klub/Zecken/epilepsie.htm>>
- [43] DOSTÁL, J. *Genetika a šlechtění plemen psů*. 1. vyd.: DONA, 2007. 260 s. ISBN 80-7322-104-7-1
- [44] Šlechtění živočichů. *Wikipedie. Otevřená encyklopedie*. [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z WWW: <[https://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0lecht%C4%9Bn%C3%AD\\_%C5%BEivo%C4%8Dich%C5%AF](https://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0lecht%C4%9Bn%C3%AD_%C5%BEivo%C4%8Dich%C5%AF)>

- [45] Bígl. *Plemena psů. Psí plemena od A do Z*. [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.psi-plemena.cz/bigl-beagle/>>
- [46] Kolie. *Wikipedie. Otevřená encyklopedie*. [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z WWW: <<https://cs.wikipedia.org/wiki/Kolie>>
- [47] Zlatý retrívr. *Plemena psů. Psí plemena od A do Z*. [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.psi-plemena.cz/zlaty-retrivr-golden-retriever/>>
- [48] Labradorský retrívr. *Plemena psů. Psí plemena od A do Z*. [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.psi-plemena.cz/labradorsky-retrivr-labrador-retriever/>>
- [49] Pudl. *Plemena psů. Psí plemena od A do Z*. [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.psi-plemena.cz/pudl-poodle-caniche/>>
- [50] RAŠKA, M. *Základní postupy práce s nukleovými kyselinami, 2006*. [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z WWW: <[http://mat.skolabiotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop\\_Milan%20Raska.doc](http://mat.skolabiotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop_Milan%20Raska.doc)>
- [51] JANOCHOVÁ, Jana. *Izolace DN: Výťažnost a kvalita*. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, 2009. [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z WWW: <[http://is.muni.cz/th/211424/prif\\_b/](http://is.muni.cz/th/211424/prif_b/)>
- [52] Přístroje pro izolaci DNA/RNA. *ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.* [online]. [cit. 2016/03/11]. Dostupné z WWW: <<https://www.elisabeth.cz/nabidka-automaticka-izolace-dna-rna.html>>
- [53] PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat*. [online]. [cit. 2016-03-12]. Dostupné z WWW: <[http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)>
- [54] DVOŘÁKOVÁ, Magdaléna. *Základní principy a využití kvantitativní PCR s ohledem na onkologickou diagnostiku*. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, 2007. [online]. [cit. 2016-03-12]. Dostupné z WWW: <[http://is.muni.cz/th/150897/prif\\_b/](http://is.muni.cz/th/150897/prif_b/)>
- [55] ŘEHOUT, V. A KOL. *Genetika I: Úvod do studia genetiky*. České Budějovice, 2000. 256 s. ISBN 80-7040-405-1.

- [56] RFLP – restriční reakce. *Molekulární biologie. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat*. [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z WWW: <[http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-rflp&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-rflp&lang=cz)>
- [57] KOSOBUDOVÁ, Hana. *Kongenitální choroby skotu*. Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2012. [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z WWW: <[https://wstag.jcu.cz/portal/studium/prohlizeni.html?pc\\_pagenavigationalstate=H4sIAAAAAAAAAAGNgYGBkYDMYmJAzNhNmZADxOIpLEktSvVMrwTwRXUsjI2NjcyMDYzMLUxNzcyMjcwugDAMAGTXWJjoAAAA\\*#cpa\\_220636](https://wstag.jcu.cz/portal/studium/prohlizeni.html?pc_pagenavigationalstate=H4sIAAAAAAAAAAGNgYGBkYDMYmJAzNhNmZADxOIpLEktSvVMrwTwRXUsjI2NjcyMDYzMLUxNzcyMjcwugDAMAGTXWJjoAAAA*#cpa_220636)>
- [58] Gelová elektroforéza. *Molekulární biologie. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat*. [online]. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z WWW: <[http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza)>
- [59] Elektroforéza. *Biochemický web*. [online]. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z WWW: <<http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>>
- [60] Gelová elektroforéza. *Wikipedie. Otevřená encyklopedie*. [online]. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z WWW: <[https://cs.wikipedia.org/wiki/Gelov%C3%A1\\_elektrofor%C3%A9za](https://cs.wikipedia.org/wiki/Gelov%C3%A1_elektrofor%C3%A9za)>
- [61] PODELL, M. et al. *Seizure classification in dogs from a non referral-based population*. J Am Vet Med Assoc, 1995; 206: pp. 1721-1728.
- [62] PATTERSON, E. E. et al. *Clinical description and mode of inheritance of idiopathic epilepsy in English Springer Spaniels*. J Am Vet Med Assoc, 2005; 226: pp. 54-58.
- [63] SCHWARTZ-PORSCHKE, D. *Epidemiological, clinical and pharmacokinetic studies in spontaneously epileptic dogs and cats*. ACVIM, 1986; 4 (II): pp. 1161-1163.
- [64] MOHANRAJ, R; BRODIE, M. J. *Early predictors of outcome in newly diagnosed epilepsy*. Seizure, 2013; 22(5): pp. 333-344.
- [65] BEILFELT, S. W; REDMAN, H.C; McCLELLAN, R. O. *Sire-and Sex-Related Differences in Rates of Epileptiform Seizures in a Purebred Beagle Dog Colony*. American Journal Veterinary Research, 1971; 32 pp. 2039-2048
- [66] Německý ovčák. *Plemena psů. Psi plemena od A do Z*. [online]. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z WWW: <<http://www.psi-plemena.cz/nemecky-ovcak-german-shepherd-dog/>>

- [67] ALDERSON, Ch.; HERMAN, K.; MITCHELL, M. *The Role of a Natural Healthy Diet in the Management of Canine Epilepsy*. Canine Epilepsy Resources. [online]. [cit. 2016-03-18]. Dostupné z WWW: <<http://www.canine-epilepsy.com/healthydiet.html>>
- [68] Alelová analýza. *BIOMACH, výpisky z biologie*. [online]. [cit. 2016-03-18]. Dostupné z WWW: <<http://www.biomach.cz/genetika/alelova-analyza-mendelovy-zakony>>
- [69] ALVES, L. et al. *Polymorphisms in the ABCB1 gene in phenobarbital responsive and resistant idiopathic epileptic Border Collies*. J Vet Intern Med., 2011. [online]. [cit. 2016-03-18]. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21488961>>
- [70] MIZUKAMI, K. et al. *High Frequency of a Single Nucleotide Substitution (c.-6-180T>G) of the Canine MDR1/ABCB1 Gene Associated with Phenobarbital-Resistant Idiopathic Epilepsy in Border Collie Dogs*. [online]. [cit. 2013-03-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.hindawi.com/journals/dm/2013/695918/>>
- [71] PETRUSOVÁ, H. *Epilepsie*. Shiba-dog.de. [online]. [cit. 2013-03-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.shiba-dog.de/shiba-klub/Zecken/epilepsie.htm>>