

## **DM – degeneratívna myelopatia**

Mgr. Zuzana Firdová, RNDr. Andrej Dudáš, PhD. Mgr. Evelína Turňová, Ing. Marcela Bieliková, PhD.

Degeneratívna myelopatia patrí medzi neurodegeneratívne ochorenia a postihuje prevažne starších psov (od 6. do 15. roku psa). Primárnym obrazom je paralýza panvových končatín s progresívnym zhoršovaním. Súčasne dochádza k poruchám koordinácie – ataxia zadnej časti tela, narušenie citlivosti a reflexov. S postupom ochorenia sú postihnuté aj predné končatiny. Ochorenie sa manifestuje najskôr ako paréza, neskôr celková paralýza. Je sprevádzaná močovou a fekálnou inkontinenciou z dôvodu straty kontroly nad močovým mechúrom a črevami. Pri tomto ochorení jedinec netrpí bolesťami, pretože dochádza k strate funkcie miechy ako následok deštrukcie myelínu a degradácii axónov spôsobujúcej progresiu ochorenia.

Príčinou ochorenia je rozklad myelínového plášťa nervových vlákien, ich expozícia a následná disrupcia komunikačnej dráhy medzi mozgom a miechou (neuroanatomická lokalizácia Th2 až L4). Pravdepodobné príčiny (etiológia ochorenia nie je známa): podozrivé toxíny, oxidatívny stres, vitamínová deficiencia, imunitný systém. Ochorenie je ireverzibilné, progresívne a neliečiteľné.

Nedá sa zastaviť ani spomaliť. Doporučené je cvičenie na udržanie schopnosti chodiť, fyzioterapia a canis hydroterapia. Tento defekt bol zistený u 43 plemien, napr.: nemecký ovčiak, boxer, rodézsky ridgeback, hrubosrstý foxteriér, welsh corgi, šeltia, dlhosrstá kólia, krátkosrstá kólia a iné.

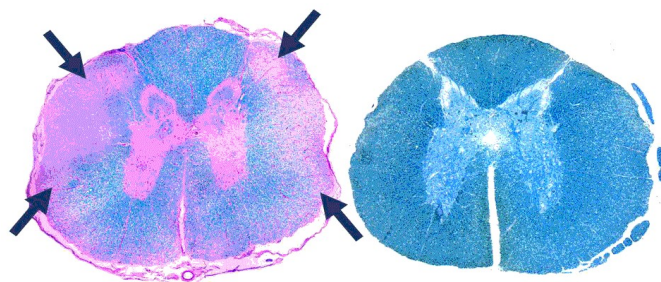
Vznik tohto defektu podmieňuje autozomálne recesívna mutácia v géne *SOD1* s neúplnou penetranciou (penetrancia – podiel jedincov, u ktorých sa určitý genotyp prejavil vo vonkajších znakoch. Ak je penetrancia menšia ako 100%, znak má neúplnú penetranciu, to znamená, že u niektorých jedincov, ktorí sú nositeľmi genetického defektu, sa daný znak neprejavil, napr. zomreli v skorom veku a ochorenie má neskorý vek nástupu.).

Gén *SOD1* kóduje superoxid-dismutázu 1, ktorá predstavuje významný cytosolický antioxidantný enzým v eukaryotickej bunke, ktorý katalyzuje konverziu superoxidových voľných radikálov na kyslík a peroxid vodíka a je kľúčový v antioxidantnej ochrane.

*SOD1* gén sa nachádza na chromozóme 31, je veľký 462 bázových párov a kóduje 153 aminokyselinových zvyškov. Jeho produktom je proteín, ktorého každá podjednotka obsahuje jeden  $Zn^{2+}$  a  $Cu^{2+}$  ión.

Mutáciou v géne *SOD1* je tranzícia (zámena) G-guanínu za A-adenín, ktorá sa nachádza v exóne 2 (chromozóm 31) a je asociovaná s jeho toxickou funkciou (“*toxic gain of function*”). Vytvorí sa proteín, ktorý má na rozdiel od pôvodného proteínu zmenené vlastnosti, získava novú, resp. zmenenú funkciu. Zvyčajne je pre bunku škodlivý. Táto “*missense*” mutácia je označovaná E40K. Mutácia spôsobuje buď konformačné zmeny v *SOD1* proteíne, čo zmení jeho biologickú aktivitu a/alebo napomáha formovaniu intracelulárnych *SOD1* agregátov. Presný mechanizmus nie je známy, ale jeho vonkajším prejavom (obr. 1) je vakuolizácia myelínu a jeho degradácia, myelofagocytóza, reaktívna astrocytóza a formovanie elipsoidov a proteínových inklúzných teliesok v tele buniek neurónov a axónov. Telieska zvyčajne obsahujú ubiquitín.

Pre detekciu mutácie boli navrhnuté dva primery, ktoré ohraničujú miesto mutácie. Polymerázovou reťazovou reakciou je z genómu analyzovaného jedinca nasyntetizovaný úsek, v ktorom sa nachádza miesto mutácie. Získaný produkt sa následne restriktívne štiepi pomocou enzýmu *Eco57I(AluI)*. Tento enzým má špecifické rozpoznávacie miesto s presným poradím báz. V prípade, že jedinec je nositeľom mutácie, je toto rozpoznávacie miesto narušené a enzým neštiepi nasyntetizovaný fragment. Konkrétne u štandardnej alely (bez mutácie) dochádza k poštiepeniu na 61 bp a 14 bp fragmenty a u mutovanej alely sa produkt nepoštiepi. Na separáciu fragmentov bola použitá polyakrylamidová gélová elektroforéza (obr. 2).



Obr. 1: Histológia tkaniva hrudnej časti miechy u jedinca postihnutého degeneratívnou myelopatiou (vľavo) vs. zdravý jedinec (vpravo). Bledé zóny degenerovanej bielej hmoty u postihnutého jedinca znázorňujú oblasti, kde došlo k strate nervových vlákien.



Obr. 2: Záznam polyakrylamidovej gélovej elektroforézy. 1. dráha: 10 bp DNA veľkostný štandard, 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14., 16., 18., 20. a 22. dráha: 75 bp produkt PCR, 7., 23. dráha: zdravý jedinec (len poštirpená alela – 61 bp + 14 bp), 3., 9., 15., 17. dráha: prenášač (nepoštirpená a poštirpená alela – 75 bp, 61 bp+ 14 bp), 5., 11., 13., 21. dráha: postihnutý jedinec (len nepoštirpená alela – 75 bp).

Cieľom našej práce bola detekcia mutácie v populácii predisponovaných plemien psov (dlhosrstá kólia, krátkosrstá kólia a šeltia). Získané údaje boli štatisticky spracované pre jednotlivé plemená a poskytujú informáciu pre chovateľov o aktuálnom výskyte defektnej alely (tab. 1, tab. 2). Tieto údaje môžu byť nápomocné pri rozhodovaní o ďalšom smerovaní chovu.

Tab. 1: Zastúpenie zdravej a postihutej alely u jednotlivých predisponovaných plemien.

Plemeno	Počet analyzovaných vzoriek	Genotyp: DM(+/+) zdravý DM(+/-) prenášač DM(-/-) postihnutý	Percentuálne zastúpenie	Frekvencia defektnej alely v %
Krátkosrstá kólia	174	107	61,5	20,4
		63	36,2	
		4	2,3	
Dlhosrstá kólia	489	191	39,1	36,9
		235	48,0	
		63	12,9	
Šeltia	25	25	89,3	6
		3	10,7	
		0	0	

Tab. 2: Zastúpenie zdravej a postihnutej alely u jednotlivých predisponovaných plemien zo vzoriek získaných od chovateľov z Českej republiky.

<b>Plemeno</b>	<b>Počet analyzovaných vzoriek</b>	<b>Genotyp: DM(+/+) zdravý DM(+/-) prenášač DM(-/-) postihnutý</b>	<b>Percentuálne zastúpenie</b>	<b>Frekvencia defektnej alely v %</b>
<b>Krátkosrstá kólia</b>	21	16	76,2	11,9
		5	23,8	
		0	0	
<b>Dlhosrstá kólia</b>	50	15	30	41
		29	58	
		6	12	
<b>Šeltia</b>	0	0	0	0
		0	0	
		0	0	

