

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Nauk o Zwierzętach

mgr inż. Aleksandra Garbacz

Analiza polimorfizmu w genach potencjalnie
odpowiedzialnych za padaczkę idiopatyczną
w populacji gończego polskiego
Analysis of polymorphism in genes potentially responsible for
idiopathic epilepsy in the Polish Hunting dog population

Praca doktorska
Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Wanda Olech-Piasecka


Instytut Nauk o Zwierzętach/Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt

Promotor pomocniczy
Dr inż. Zuzanna Nowak-Życzyńska
Instytut Nauk o Zwierzętach, SGGW w Warszawie

Warszawa, rok 2023

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 14.09.2023..... Podpis promotora pracy .....

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data 14.09.2023..... Podpis autora pracy Aleksandra Garbaw.....

Streszczenie

Tytuł pracy: Analiza polimorfizmu w genach potencjalnie odpowiedzialnych za padaczkę idiopatyczną w populacji gończego polskiego

Gończy polski to stara, rodzima rasa psów myśliwskich, hodowana i użytkowana od stuleci, początkowo na terenie Polski południowej i południowo wschodniej, a obecnie licznie występująca na terenie całego kraju.

Celem pracy była identyfikacja genów potencjalnie skorelowanych z wystąpieniem epilepsji idiopatycznej u gończego polskiego lub genów o kluczowym znaczeniu dla wystąpienia choroby.

W przeprowadzonych badaniach nad genetycznym podłożem padaczki idiopatycznej u gończego polskiego grupę badawczą stanowiło 48 osobników w wieku 3 do 12 lat (średnia 7,42 oraz mediana 7,50). Do grupy zwierząt chorych zakwalifikowano 12 osobników, do grupy zdrowych 36 osobników. Podziału dokonano na podstawie formularza wykluczającego inne potencjalne źródła drgawek u osobników chorych. Próbkę DNA zostały wyizolowane przy użyciu zestawu NucleoSpinRDX.Blood, a następnie zgenotypowane przy użyciu mikromacierzy Illumina CanineHD BeadChip.

Po przeprowadzeniu analizy GWAS wybrano trzy geny kandydujące - DOK5 leżący na chromosomie 22, ARFGEF2 leżący na chromosomie 24 oraz PCDH9 leżący na chromosomie 22. Do analizy dołączono gen, najczęściej wymieniany w literaturze w kontekście padaczki idiopatycznej u psów, ADAM23 leżący na chromosomie 37. Wieloczynnikowa redukcja wymiarów (MDR - Multifactor dimensionality reduction) oraz analiza SNP w obrębie wyżej wymienionych genów pozwoliła określić, że DOK5 oraz PCDH9 są głównymi genami kandydującymi do powiązania z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego. Gen ADAM23 warto przeanalizować w kontekście możliwości interakcji z innymi regionami, za to na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono dla genu ARFGEF2 brak satysfakcjonujących rezultatów.

Słowa kluczowe : gończy polski, padaczka, mikromacierz, DOK5, PCDH9

Summary

Title: Analysis of polymorphism in genes potentially responsible for idiopathic epilepsy in the Polish Hunting dog population

The Polish Hunting Dog is an old, indigenous breed, that has been bred and used for centuries, first in southern and southeastern Poland but now found in large numbers throughout the country.

The aim of this study was to identify genes that may correlate with idiopathic epilepsy in the Polish Hunting Dog or may be critical to for the onset of the disease.

Accordingly, a study was conducted on the genetic basis of idiopathic epilepsy in the Polish Hunting Dog was conducted. The study included 48 individuals aged 3 to 12 years (mean of 7.42 and a median of 7.50). 12 individuals were classified into the group of diseased animals, and 36 individuals into the group of healthy animals. The classification was based on a form that excluded other possible causes of seizures in diseased individuals. DNA samples were isolated using the NucleoSpinRDX.Blood kit and then genotyped using Illumina CanineHD BeadChip microarray.

After GWAS analysis, three candidate genes were selected - DOK5 on chromosome 22, ARFGEF2 on chromosome 24, and PCDH9 on chromosome 22. The gene most commonly found in the literature in association with canine idiopathic epilepsy ADAM23 lying on chromosome 37 was included in the analysis. Using multifactorial dimensionality reduction (MDR) and SNP analysis within the above genes, DOK5 and PCDH9 were found to be the main candidate genes for association with idiopathic epilepsy in the Polish Hunting Dog. The ADAM23 gene is worth analyzing in the context of the possibility of interaction with other regions, the ARFGEF2 gene did not provide satisfactory results at this stage.

Keywords: Polish Hunting Dog, epilepsy, microarray, DOK5, PCDCH9.

Spis treści

Wstęp	8
Przegląd literatury	9
Historia rasy gończy polski.....	9
Struktura genetyczna rasy gończy polski na podstawie dotychczasowych doniesień	20
Dane rodowodowe	20
Linie mateczne określone na podstawie badania mtDNA	20
Analiza zmienności na podstawie loci mikrosatelitarnych w obrębie rasy	24
Genetyczne podłoże padaczki u psów.....	26
Wyniki w obrębie genu ADAM23 u psów	32
Funkcje genów DOK5, PCDH9, ARFGEF2, ADAM23	35
Gen DOK 5	35
Gen PCDH9	36
Gen ARFGEF2.....	37
Gen ADAM23.....	37
Cel pracy	39
Material	40
Grupa badawcza i klasyfikacja osobników	40
Metody	41
Metody analizy rodowodowej.....	41
Metody analizy genetycznej.....	41
Metody analizy statystycznej	42
Analiza asocjacyjna GWAS.....	42
Analiza pojedynczych polimorfizmów	42
Analiza w obrębie genu ADAM23	43
Wyniki	45
Badania rodowodowe.....	45
Wyniki GWAS	48
Wyniki w obrębie pojedynczych polimorfizmów	50
Wyniki w obrębie genu ADAM23	62
Dyskusja	73
Wnioski	81
Spis dendrogramów, fotografii, formularzy, schematów, tabel, wykresów	82
Spis literatury	85
Aneks	94

Wstęp

Gończy polski to stara, rodzima rasa psów myśliwskich, hodowana i użytkowana od stuleci, początkowo na terenie Polski południowej i południowo wschodniej, a obecnie licznie występująca na terenie całego kraju. Pierwsze udokumentowane wzmianki o psach odpowiadające opisowi gończego polskiego sięgają początków XVII wieku, a najprawdopodobniej psy w podobnym typie musiały istnieć wcześniej. Mimo iż nie udało się ustalić jaki procent populacji obciążony jest padaczką idiopatyczną, to obserwuje się, że jest ona częstsza w niektórych liniach oraz u potomstwa określonych osobników. Stwierdzenie w większości przypadków więcej niż jednego chorego zwierzęcia w miocie, sugeruje genetyczne podłoże choroby u tej rasy i uzasadnia poszukiwanie mutacji odpowiedzialnej za jej wystąpienie. Do tej pory nie prowadzono badań podłoża genetycznego padaczki idiopatycznej u gończego polskiego. Obserwuje się nowe przypadki, a liczba zwierząt chorych się nie zmniejsza. Nie jest prowadzona ewidencja zwierząt chorych, a zgłaszanie kolejnych osobników z padaczką idiopatyczną do Rodowodowej Bazy Gończego Polskiego jest dobrowolna, więc spora część przypadków zostaje nieznana, a wiedza na ich temat niedostępna dla hodowców. Występuje wystarczająca różnorodność sposobu dziedziczenia oraz objawów klinicznych u psów, aby założyć, że podstawa genetyczna jest różna dla różnych ras. Wiedza na temat podłoża genetycznego tej choroby przyspiesza i ułatwia diagnozę oraz pozwala wykryć nosicieli.

Przegląd literatury

Historia rasy gończy polski

Gończy polski, rasa o numerze 354 FCI (Fédération Cynologique Internationale) jest rodzimą polską rasą psów, występującą dawniej na terenie Polski południowej (Bieszczady, Beskidy, Pieniny i Podhale) (Fotografia 1). Jest to pies lekki, zwarty, o sprężystej budowie ciała, która wskazuje na jego dużą ruchliwość, a także odporność na trudne warunki, które stawiało przed nim polowanie w terenach górskich. Gończy jest psem średniego wzrostu, o wysokości w kłębie do 60cm, jego sylwetka wpisuje się w prostokąt o proporcji 9:10. U tej rasy może występować umaszczenie czarne podpalane, czekoladowe podpalane i rude. Gończy ma zrównoważony, łagodny charakter ale przy tym jest psem brawurowo odważnym, a zarazem roztropnym. Jest psem inteligentnym, podatnym na tresurę, co w połączeniu z jego ogromną pasją łowiecką sprawia, że jest niezastąpionym towarzyszem współczesnego myśliwego. Gończy polski nie może być agresywny, ale ma pozostać nieufny wobec obcych, co sprawia, że jako jedyny z VI grupy FCI psów gończych i ras pokrewnych jest dobrym psem stróżującym. Obecnie jest wykorzystywany do polowania na zwierzynę płową i czarną, w szczególności na dziki, ale również na zające i lisy na terenach górskich południowej Polski i w Rosji. Jego cechą charakterystyczną jest melodyjny gon o zmieniającej się tonacji, znacznie wyższy u suk (ZKwP). Gończe są hodowane i użytkowane w Polsce, Niemczech, Francji, Szwecji i Czechach, ale są jako psy wystawowe prezentowane w niemal całej Europie, a jeden osobnik był pokazywany na wystawach w Stanach Zjednoczonych Ameryki.



Fotografia 1 Pies rasy gończy polski (autor Garbacz, 2021)

Największą trudnością, z którą muszą się zmierzyć myśliwi w trakcie polowania, zarówno w dawnych czasach jak i dziś, jest wytropienie zwierzyny, dojście do niej na odległość umożliwiającą oddanie skutecznego strzału (dawniej również np.: rzutu oszczepem, bumerangiem, arkanem czy innym) oraz odnalezienie postrzałka, jeśli nie padł w ogniu (Brabletz, 2007). W dawnej Polsce pies gończy, zwany ogarem, był pospolitym psem myśliwskim, używanym przeważnie do polowań na terenach bagiennych, w borach na mokradłach niemożliwych do przebycia przez człowieka. W polowaniu należało z danego terenu wypłoszyć zwierzynę, do czego potrzebne były psy silne i wytrzymałe, z dobrym wiatrem i donośnym głosem (Kryspin, 1957). Dlatego tak wysoko cenione były dobre psy gończe obdarzone wybitnym węchem. Dobrze podejmowały trop i podążały nim, czasem nawet całymi godzinami, a gdy odnalazły zwierzę, osaczały i trzymały je do momentu przybycia myśliwych.

Kilkaset lat temu tereny Polski były pokryte rozległymi puszczami, w których w przeciwieństwie do Europy Zachodniej, jeszcze żyły tury, żubry, niedźwiedzie, łosie, wilki i rysie. Mimo licznego pogłowia zwierzyny znalezienie jej i osaczenie bez zła psów było niebywale trudne, wręcz niemożliwe (Brabletz, 2007).

Myśliwy oczekiwał na przesmyku, a po głosach psów orientował się czy gonią za tropem zwierzyny, czy też mają ją przed sobą i jaką, bowiem inaczej głośzą lisa, a inaczej dzika lub jelenia (Kryspin, 1957).

Najstarszą wzmiankę o łowach z ogarami można odnaleźć w kronikach Galla Anonima.

Za panowania dynastii Piastów i Jagiellonów nastąpił znaczący rozwój łowiectwa, a co za tym idzie wykorzystania psa gończego. W zapiskach kronikarskich XIV wieku znajdują się wzmianki o ogarach hodowanych specjalnie na królewskie łowy, a także o darach dla panujących w postaci psów myśliwskich (Palak, 2012). W rejestrach rozchodów dworu Władysława Jagiełły i królowej Jadwigi wiele zapisów dotyczyło utrzymania psiarni królewskiej. W dniu 3 stycznia 1390 roku w rachunkach prokuratorii niepołomickiej zanotowano, że: „Timus Litwin łowczy królewski przybył z Proszowicz 12 końmi i 44 psami łowczymi”. Gdy w trakcie polowania psy zostały pokaleczone, leczono je, zapisując w rachunkach wydatki: „Za siarkę i sadło do smarowania dla psów królewskich 1 grosz”. W średniowiecznej Polsce, wielkie łowy na grubego zwierza – tura, żubra, łosia, niedźwiedzia, dzika czy jelenia – były wyłącznym przywilejem królów i książąt (Forelle, 1972). Zamiłowanie do polowania i psów gończych Władysława Jagiełły można dostrzec między innymi na jego nagrobku, który król wybrał dla siebie najprawdopodobniej sam. U podstawy widnieją marmurowe wizerunki psów i sokołów, które są interpretowane jako alegoria walki dobra ze złem lub symbol polowania (Palak, 2012).

Największa popularność ogara w Polsce przypada na okres od XIV do XVII wieku. Był to w Europie złoty okres myślistwa konnego par force, szczególnie popularnego we Francji, Anglii i Niemczech. W Polsce łowy par force nie były popularne. Tego typu polowania były możliwe tylko na polach i w lasach starannie utrzymanych, poprzecinanych alejami, po których polujący w grupie mogli na koniach podążać za gonem psów i sygnałami trąbek myśliwskich. W tych polowaniach chodziło nie tyle o upolowaną zwierzynę, ile o wykazanie dzielności konia. W Polsce polowania na grubą zwierzynę oparte były głównie na psach gończych, których głos był najważniejszym atutem. Znaczący tych psów dobierali osobniki do swojej sfory tak, aby ich głosy w trakcie polowania tworzyły harmonijny, przyjemny dla ucha akord (Kryspin, 1957). Typ jak i sposób użytkowania psów w łowiectwie zależały w największym stopniu od gatunków zwierzyny obecnej w łowisku oraz warunków terenowych. Na południu hodowano psy lekkie, odporne na ostry klimat gór. Te psy dały początek hodowli gończego o umaszczeniu czarnym podpalanym, od których wywodzi się obecny gończy polski oraz kilka pokrewnych ras psów gończych np. słowacki kopov, węgierski erdelyi kopo czy austriacki brandlbracke, a nawet gończy litewski (Marcinkowski, 2015a). Na nizinach polowano z psami mocniejszymi, lepiej sprawdzającymi się w rozległych puszczech. W Polsce spotykane były różnego typu ogary: na Wileńszczyźnie ogary

litewskie, na Podlasiu rosyjskie i kostromskie, a w centralnej Polsce ogary polskie, różniące się wzrostem i umaszczeniem. U ogarów zachodnich podpalanie było ciemno pomarańczowe, a u wschodnich ras jasno żółte (Kryspin, 1957). Na początku XVII wieku, gdy zaczęto w trakcie polowania używać broni palnej, zmienił się charakter pracy psów gończych. Psy duże, silne, szybkie i zajadłe, które potrafiły szybko dopaść i zdusić zwierzynę, przestały odgrywać ważną rolę w tego typu polowaniach. Zaczęto używać psów lżejszych, wolniejszych, pracujących z większym dystansem do zwierzęcia. Pies musiał z dużą uporczywością trzymać się w bliskości zwierzyny nieustannie głośząc. Jego zadaniem było ruszyć z legowiska zwierzynę i napędzić ją na strzał, nie doganiając jej, ale zachowując bezpieczny dystans. Jest to typ pracy ceniony także przez współczesnych myśliwych, charakterystyczny dla ogara i gończego polskiego. (Marcinkowski, 2015b).

Ogar i gończy polski wywodzą się prawdopodobnie, jak większość psów gończych w Europie, od psów Świętego Huberta i są wynikiem krzyżowania z miejscowymi typami psów myśliwskich oraz psami Turków i ogarami kostromskimi pochodzenia tatarskiego. W XVI wieku sprowadzono do Polski psy mediolańskie, gaskońskie, normandzkie, kurlandzkie, francuskie, sentońskie, włoskie i angielskie, które najprawdopodobniej miały wpływ na kształtowanie polskich ras. Na przykład osławiona psiarnia w Pieskowej Skale w ordynacji Wielkopolskich, składała się w czasach świetności z około 500 psów gończych trójkolorowych (Łakomik-Kaszuba, 2021). Inna informacja na temat Władysława Jagiełły to: „Łowcy ze służbą i liczną psiarnią wędrując konno z łowiska do łowiska, prowadzili na sforach z żelaznego łańcucha wielkie psy mediolańskie, psy na niedźwiedzie zwane „kurczami”, psy na jelenie, śledniki, ogary, charty i wyżły.” (Forelle, 1972). U współczesnych gończych polskich można również dopatrywać się cech, wynikających z dolewu krwi tych psów, jak na przykład kształt ucha zbliżony do angielskiego foxhunda (gończy trójkolorowy), czy umaszczenie czekoladowe podpalane i rude, które może być wynikiem dolewu krwi gończych mediolańskich (Marcinkowski, 2015a; Palak, 2012).

Nazwa „ogar” pojawia się po raz pierwszy w 1549 r. w „Księgach o gospodarstwie” Piotra Krescentyna. O ogarach wspomina też Mikołaj Rej w 1568 r. w „Żywocie człowieka poczciwego”. Etymologia tej nazwy nie jest jasna. Może pochodzić od grania, ogarniania, albo od umaszczenia ogorzałego (Kaźmierski, 2014). Co do nomenklatury polskiej, należy przypuszczać, że pierwotną nazwą jest właśnie „ogar”. Tylko tej nazwy używa Ostroróg w 1618 roku i to jedynie w tytule, w tekście pisze

„psi”, ogara wymienia również Haur w 1757 roku pisząc : „owe ucieszne wyźłów i ogarów głośy”. Późniejsi autorzy używają nazwy gończy, ale często jako synonim ogara. I tak Ładowski w Dykcyjoniariuszu w 1783 roku pisze - „Le Limier – ogar czyli pies gończy”, podobnie Gerald Wyżycki w 1838 roku – „Ogar czyli pies gończy” oraz Kumelski i S.B. Gorski „Ogar albo pies gończy”. Inni używają jednej z dwóch nazw: „ogara” – Kluk w 1779, podając łacińską nazwę *Canis sagax* oraz Czyżowski w 1838 roku. O „gończym” zaś piszą : Jundziłł w 1827 roku, Łyszkowski w 1839, Pisulewski w 1850. Belke zaś w 1849 roku uważa gończego za pododmianę ogara, nie podając żadnej różnicy. Różnicę między ogarem i gończym dostrzegają tylko Kozłowski w 1821 roku, Bobiatyński w 1823 roku oraz Szytler w 1839 roku (Dyakowska, 1980).

Pierwsze pełniejsze próby opisów psów gończych w Polsce przypadają na początek XVII w. W roku 1608 hrabia Jan Ostroróg napisał traktat naukowy: „O psiech gończych i myślistwie z nimi”. Dziesięć lat później wydaje go w pełnej formie pod tytułem „Myślistwo z ogary”. Był to pierwszy polski podręcznik kynologiczny. Opis ogara wg. Ostroroga: „Siła psia znaczy się grzbietem, który ma być kształtny, kościsty, pieczeniasty i długi. Pod takim grzbietem noga żyłowata (...). Stopa ma być podługowata (...). Nos ma być wielki, nozdrza przestronna, wilgotna (...)” (Kaźmierski, 2014). Różne są opisy ogarów u różnych autorów, na przykład w 1779 roku Kluk pisze :”...są miernej wielkości, brunatno-czerwonawe, czasem czarne z głową i nogami żółtawymi (...) Dobry ogar powinien mieć głowę miernie grubą, nozdrza wielkie i otwarte, uszy długie, mocne i wiszące, grzbiet mocny i wygięty, lędźwie grube, uda szerokie, nogi proste, suche z twardymi stopami (...)”. Kozłowski w swoich opisach rozróżnia ogara od gończego i w 1821 roku pisze : „ (...) ogar bywa pospolicie długi na trzy stopy i kilka cali, wysoki przeszło na półtorej stopy, przy tym ściągły, lekki i pieczeniasty. Głowa jego niezbyt gruba, opatrzona jest długimi obwisłymi uszami; nos ma szeroki, przednią część głowy długą, czoło wysokie i wypukłe (...) Szerści jest krótkiej i gładkiej, koloru jasnobrunatnego, uszy zaś i grzbiet są ciemniejsze; ma białe znaki na głowie, piersiach, brzuchu i nogach. (...) gończy niewiele różni się od ogara co do powierzchowności, jest o kilka cali niższy. Włosa czarnego i pięknie zbudowany; uszy ma długie i znaki podżare. Głos jego mocny ze szczególnym zacięciem (...)”. W 1823 uzupełnia opis gończego: „(...) gończe jakośmy widzieli odznaczają się także długimi obwisłymi uszami, tudzież muskularnymi nogami. Odziane są powszechnie włosiem bardzo krótkim i ogon trzymają podniesiony. Pospolity ich kolor jest czarny z plamami ognistymi; większa część ma znaczki tego

koloru nad oczyma: pod piersiami i brzuchem prawie zawsze są podpalane.” W roku 1823 opisu gończego podjął się również Bobiatyński, w „Nauce Łowiectwa” wydanej w Wilnie pisze: ”pies gończy powinien mieć głos czysty, donośny, węż czujny, głowy miernej wielkości, nozdrza rozwarte, uszy długie wiszące, grzbiet mocny (...) koloru pospolicie bywają brunatno czerwonego, czyli podżarego, niekiedy czarnego z białym podbrzuszem albo podgardlem.” Gerald Wyżycki w 1838 roku w ten sposób opisuje ogary :”Ogar czyli pies gończy. Tych jest kilka gatunków. Ogary wielkie są zwykle koloru czarnego: pysk, końce łap, pachwy i zadnia część uda żółte, niby ogorzałe, od czego mają nazwisko.” (Dyakowska, 1980).

Na wygląd, wytrzymałość i charakter polskich psów ras myśliwskich największy wpływ miała przemyślana hodowla, ukierunkowana głównie na poprawę cech związanych z użytkowością.

Selekcja ukierunkowana była przede wszystkim na:

- wytrzymałość, proporcje kończyn i linię grzbietu, umięśnienie oraz głębokość klatki piersiowej,
- głos, który dzielono na bas, tenor, alt i dyszkan,
- barwę głosu (głos rzewny, jadowity, niedbały, klarowny),
- umaszczenie.

Istotne było utrzymanie odpowiedniej budowy fizycznej zapewniającej lepsze efekty polowania. Jednocześnie selekcja naturalna eliminowała osobniki słabe, nienadające się do łowiectwa i życia w trudnych warunkach. (Marcinkowski, 2015a) Konsekwencją takiej hodowli było doprowadzenie do znakomitego przystosowania gończych do warunków klimatycznych i geograficznych terenu Polski (Marcinkowski, 2015b).

Rozwój hodowli psów gończych trwał nieprzerwanie do okresu rozbiorów Rzeczypospolitej Obojga Narodów. Pod koniec XVIII w. w miarę kurczenia się powierzchni lasów i osuszania mokradeł na pola uprawne, malało znaczenie ogara w gospodarce łowieckiej. Zaczęto hodować coraz więcej trzody chlewnej oraz bydła, co przy zmniejszającej się powierzchni lasów sprawiło, że łowiectwo przestało odgrywać tak ważną rolę, a polowanie w dużej mierze stawało się rozrywką. Mimo to wielkie łowy z gończymi organizowano aż do czasów upadku powstania styczniowego, kiedy przeważająca część szlachty i dworów magnackich utraciła swoje majątki, a wraz z nimi psiarnie gończaków. Do tego swoje piętno dołożyły dwie wojny światowe, które niemal doprowadziły do całkowitej zagłady rasy. (Marcinkowski, 2015b)

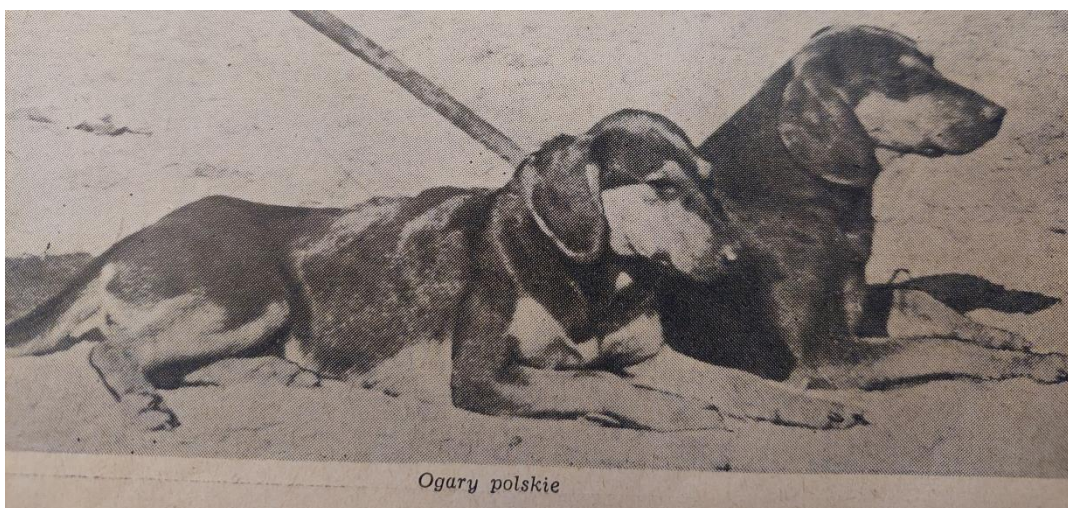
Żyjący w latach 1903 – 1979 na Podkarpaciu Józef Pawłusiewicz już od najmłodszych

lat polował z psami w typie gończego polskiego. Jak sam mówił hodował ogary polskie, które były w jego rodzinie od 150 lat. Ten ceniony polski kynolog, sędzia pracy psów myśliwskich, wieloletni kierownik Zakładu Tresury Psa Służbowego w Sułkowicach i honorowy członek Związku Kynologicznego w Polsce, dążył do odtworzenia oraz upowszechniania rasy gończy polski. W latach pięćdziesiątych założył hodowlę o nazwie „z Karpat”. Gończe polskie jako tzw. psy Pawłusiewicza zostały zarejestrowane w Związku Kynologicznym w Polsce jako hodowla eksperymentalna w rasie „ogary polski”. Wpisane do Polskiej Księgi Rodowodowej jako ogary posiadały pełne rodowody już w roku 1956. (Brabletz, 2006)

Za pierwszą próbę stworzenia wzorca popartą zdjęciami pełnorodowodowych egzemplarzy ogarów Pawłusiewicza uważa się artykuł w czasopiśmie „Pies” opublikowany w listopadzie 1957 roku przez Rudolfa Kryspina (Fotografia 2 i 3).



Fotografia 2 Pies rasy gończy polski (źródło: „Pies” nr 5, 1957 rok)



Fotografia 3 Pies rasy gończy polski (źródło: „Pies” nr 5, 1957 rok)

Autor ten pisze: „Tak więc, korzystając z opisów zostawionych nam przez różnych autorów, którzy mieli do czynienia z ogarami, możemy odtworzyć następujący wzorzec ogara polskiego:

Ogar polski jest psem średniego wzrostu, silnej budowy, o głowie średniej wielkości i mocnych, proporcjonalnie długich nogach; wąż posiada raczej górny, głos czysty i donośny.

Głowa: nieco spłaszczona, pysk wydłużony i tępy, fafle grube i obwisłe – szczęki silne.

Uszy: osadzone na środkowej wysokości, szerokie, dość długie, wiszące, u dołu zaokrąglone i przylegające do głowy.

Nos: wielki i szeroki między oczami, nozdrza szerokie, otwarte, ciemnego koloru.

Szyja: gruba z obfitą skórą zwisającą na podgardlu.

Grzbiet: silny, długi, raczej wygięty niż zgarbiony, klatka piersiowa szeroka i głęboka.

Nogi: mocne, suche, proste, proporcjonalnie długie, zdatne do wytrwałego biegu, stopy podłużne, twarde i owłosione, wilcze pazury nie pożądane.

Sierść: krótka, gruba i przylegająca, nieco dłuższa pod brzuchem i na dolnej stronie ogona.

Ogon: wiszący, lekko zagięty lecz nie zakręcony.

Maść: czarna, brązowo podpalana. Biały kolor dopuszczalny na piersi, podbrzuszu i i na końcach łap.

Wady: zbyt duży wzrost (powyżej 60 cm), krótkie lub krzywe nogi, zbyt długie lub małe i odstające uszy, cienka szyja, długi kark, krótki tułów, długa sierść, łaciata maść, zakręcony ogon.

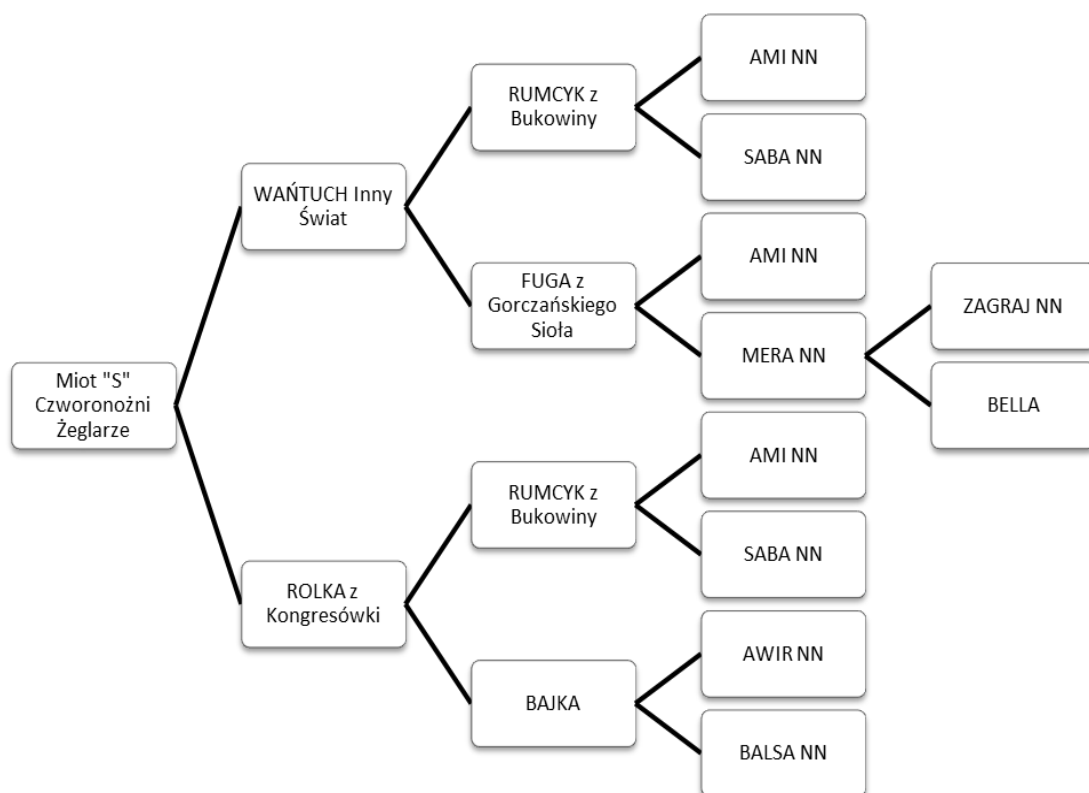
Wady względne : dolny wiatr, chrapliwy głos.” (Kryspin, 1957).

W 1959 roku płk. Kartawik sprowadził dwie pary ogarów o umaszczeniu czaprakowym z Wileńszczyzny. Były to psy większe i mocniejszej budowy, niż te hodowane na terenach górskich przez płk. Pawłusiewicza. Płk. Kartawik założył hodowlę o nazwie „z Kresów” i na podstawie jego psów Jerzy Dylewski opracował wzorzec ogara polskiego zatwierdzony przez FCI w 1967 roku pod numerem 52, który obowiązuje w nieznacznie zmienionej w 2014 roku formie do dziś. Ogary w typie hodowanym przez Józefa Pawłusiewicza były niższe, lżejsze i inaczej umaszczone, w związku z tym nie były zgodne z przyjętym wzorcem, czego konsekwencją było dyskwalifikowanie ich na wystawach psów rasowych. (Musiał, 2012)

Wysokie walory użytkowe gończych zapewniły zaangażowanie myśliwych, przedkładających cechy charakteru ponad braki w dokumentacji. Dzięki temu, mimo zaniechania oficjalnej hodowli, rasa przetrwała. W 1981 roku ponowne prace nad odtworzeniem rasy podjął klub ogara polskiego, którego przewodniczącą była Magdalena Musiał. W 1982 roku, dzięki zaangażowaniu między innymi Profesora Kazimierza Ściesińskiego oraz Małgorzaty Szmurło, na XXXIII Warszawskiej Wystawie Psów Rasowych zaprezentowano kilkanaście ogarów w typie hodowanym przez Józefa Pawłusiewicza. W marcu 1983 roku dzięki decyzji plenum Zarządu Głównego otwarto dla nich osobną Księgę Wstępną pod nazwą „gończy polski”. Jednocześnie przekształcono klub ogara polskiego, w klub ogara i gończego polskiego (Musiał, 2012). Dopiero w roku 2014 oba kluby zostały rozdzielone.

W trakcie przeglądów hodowlanych zaczęto wpisywać psy do Księgi Wstępnej, a w hodowlę zaczęła się angażować Rada Naukowa przy Związku Kynologicznym. Z numerem pierwszym do Księgi Wstępnej została wpisana suka o imieniu GAMA (o: AMI, m: SABA) urodzona w lutym 1982 roku w Bukowinie Tatrzańskiej, jej właścicielem był Henryk Żywicki. Pierwszy miot dała pod przydomkiem „Od Krakowskich Muzykantów” w roku 1985, ojcem szczeniąt został pies wpisany do Księgi Wstępnej pod numerem 11 ANTEK z Bukowiny Tatrzańskiej (o: AWIZ, m: ALMA). Pod numerem drugim w Księdze Wstępnej została wpisana suka pochodząca ze Studzionki w Gorcach o imieniu MERA urodzona 15.05.1978 roku po BELLI i ZAGRAJU. MERA dała początek hodowli „z Gorczańskiego Sioła” Pani Ewy Danielskiej z Katowic. Jako trzeci został wpisany pies o imieniu TROP, który nie zostawił po sobie potomstwa. Był miotowym bratem GAMY. Pod numerem cztery wpisano psa pochodzącego z Bukowiny Tatrzańskiej o imieniu AMI, który zostawił po

sobie liczne potomstwo i do tej pory widnieje w rodowodach znaczącej części populacji. Jako piątą do Księgi Wstępnej wpisano sukę Pana Michała Nekanda-Trepki z Warszawy AGEĘ (o: BARTEK, m: SZURA). Była ona założycielką hodowli o nazwie „Leśna Zgraja”, a zarazem matką pierwszego miotu który dostał metryki Związku Kynologicznego w Polsce jako rasa gończy polski, ojcem szczeniąt był pies o imieniu ATOM wyhodowany przez Jerzego Zwierzyńskiego. Pan Zwierzyński posiadał znaną psiarnię w Bukowinie Tatrzańskiej, hodowlę z przydomkiem „z Bukowiny Tatrzańskiej” oraz organizował polowania z udziałem psów gończych w ośrodkach wojskowych. Ponoć jego psy pochodziły od generała Berlinga, który miał swoje psy od samego płk. Pawłusiewicza. Pierwszy miot gończych polskich wpisany do Polskiej Księgi Rodowodowej przyszedł na świat w hodowli „Czworonożni Żeglarze” w Warszawie (Schemat 1). Rodzicami miotu zostali WAŃTUCH Inny Świat i ROLKA z Kongresówki. Pierwszym Championem Polski został PROMYK z Cisówki będący własnością Witolda Czarnockiego i Krystyny Baranowskiej - Czarnockiej (hodowla „Tuhanów”) (Musiał, 2012). W latach 1982 - 1984 odbywały się posiedzenia Rady Naukowej oraz członków klubu ogara i gończego polskiego i sędziów specjalizującymi się w ocenie ras myśliwskich. Ich celem było stworzenie wzorca rasy gończy polski.



Schemat 1 Rodowód pierwszego miotu gończych polskich wpisano do Polskiej Księgi Rodowodowej

Posiedzeniom towarzyszył pokaz psów, a za wzór typowego eksterieru posłużył RUMCYK z Bukowiny. W 1983 roku powstała praca magisterska dotycząca rasy gończy polski, której promotorem był profesor Kazimierz Ściesiński, a autorem Dariusz Kołodzki. W pracy dokonał powtórzenia oraz porównania pomiarów zoometrycznych populacji gończego z pomiarami wykonanymi przez Dorotę Abramowską w 1969 roku. Trzeci raz powtórzono procedurę pomiarów w roku 2009 w ramach pracy magisterskiej Aleksandra Krawczaka, której promotorem był również profesor Kazimierz Ściesiński (Musiał, 2012).

Podczas Światowej Wystawy Psów Rasowych w Poznaniu w dniu 10.11.2006 r zostało ogłoszone wstępne uznanie rasy przez FCI. Wzorzec został wpisany pod numerem 354. Zgodnie z procedurą pierwszym możliwym terminem na złożenie wniosku o ostateczne uznanie rasy był 10.11.2016 roku. Do tego czasu gończe polskie mogły występować na wystawach psów rasowych, jednak nie miały prawa do tytułu CACIB - , a co za tym idzie do tytułu Inter Championa (Larska, 2010). W trakcie trwania Światowej Wystawy

Psów Rasowych w Lipsku (Niemcy) 7.11.2017 roku, międzynarodowe forum kynologów ogłosiło oficjalnie ostateczne uznanie rasy.

Struktura genetyczna rasy gończy polski na podstawie dotychczasowych doniesień

Dane rodowodowe

Według danych rodowodowych odtwarzanie rasy gończy polski w latach 1970 – 2006 rozpoczęto od 20 psów: AMI, ATOM, ATOS, AWIR, AWIZ, BARTEK, BAS, BEMOL, DROPS, FILIP, GROT z TATR, HEBAN, MORUS, MURZYN, NERO, NERO, TROP, TROP Z RAJSKIEGO, ZAGRAJ, ZAGRAJ oraz 21 suk: ALMA, BALSZA, BELLA, DIANA, DORA, GAŁA, HAPPY, JOKI, KŁUSANKA, KORA Z ROPEK, KUNDZIA, LEDA, LORA, MELA, NORA, NORA, NUKA, NUTKA, SABA, ŚMIGA, SZURA o nieznanym pochodzeniu. Część z nich widnieje w Księdze Wstępnej utworzonej dla rasy gończy polski w 1983 roku.

W rodowodach dzisiejszych psów znajduje się 14 reproduktorów oraz 14 suk spośród wyżej wymienionych, pozostałe osobniki zniknęły z rodowodów po 1 – 3 pokoleniach (Tabela 1, Tabela 2).

Spośród suk założycielek, potomstwo piętnastu z nich nie utworzyło linii matecznych. Po ŚMIDZE NN, DORZE NN, SABIE NN, ALMIE NN, KŁUSANCE NN w hodowli zostały jedynie samce. Po SZURZE i JOKI linia mateczna zakończyła się po trzech pokoleniach, LEDZIE NN po dwóch pokoleniach, a po DIANIE, GALE, KORZE Z ROPEK, KUNDZI, LORZE, NORZE NN i NORZE po jednym pokoleniu. Ostatecznie linie mateczne przetrwały po: BALSZA NN, BELLA NN, HAPPY NN, MELA NN, NUTKA NN, NUKA NN.

Linie mateczne określone na podstawie badania mtDNA

Na podstawie 138 próbek pobranych od gończych polskich, w tym 89 suk oraz 49 psów w wieku od 7 tygodni do 12 lat określono linie mateczne na podstawie badania mtDNA. Amplifikacja fragmentów długości 410 par zasad została wykonana metodą PCR przy zastosowaniu uniwersalnych starterów Thr-L 15926 5'-CAATTCCCCGGTCTTGTAACC-3' i DL-H 16340 5'-

CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Vila, i.in., 1999). W analizowanych liniach matecznych wyznaczono 9 miejsc polimorficznych SNP, na podstawie których wyodrębniono 6 haplotypów. Pięć z nich pochodzi od suk, które mają określone na podstawie rodowodu linie mateczne, a jeden haplotyp pochodzi od suk o nieznanym pochodzeniu, która została wprowadzona do hodowli w 2013 roku i dała dwa mioty.

Tabela 1 Lista suk założycielek wraz z rokiem urodzenia

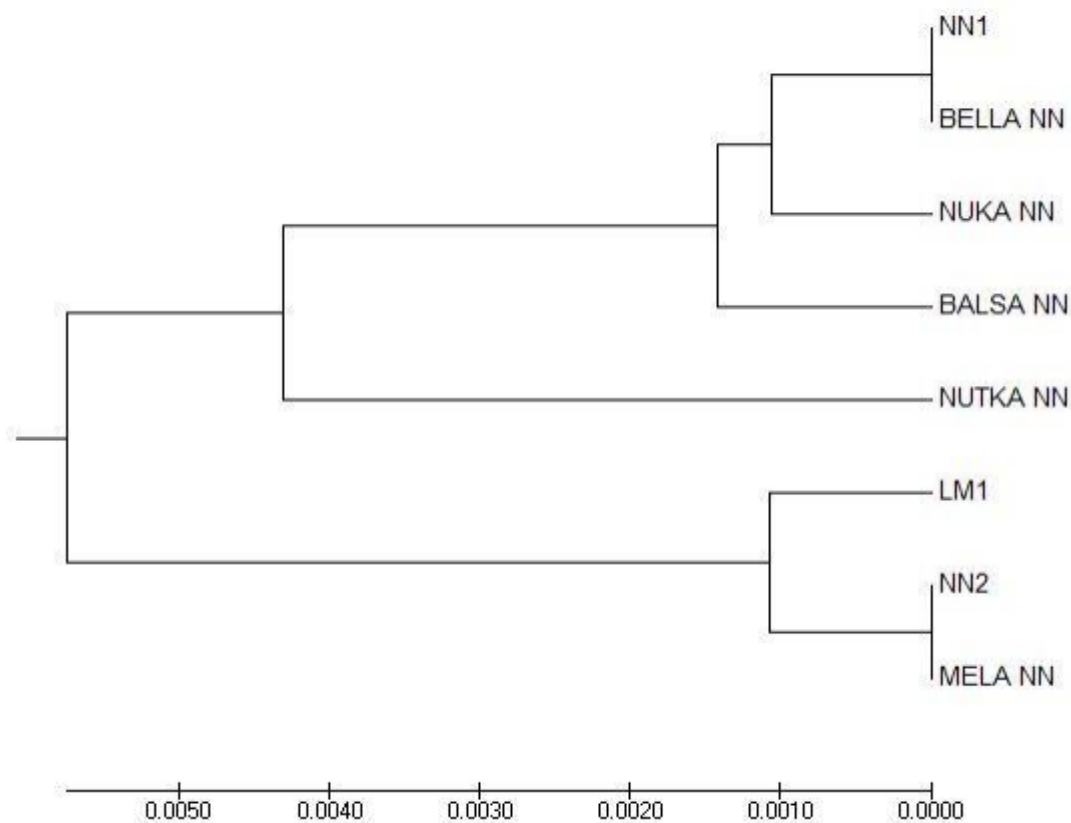
IMIĘ	rok urodzenia	czy jest w rodowodach współczesnych psów	Czy utworzyła linię mateczną
ALMA	<1980	tak	nie
BALSA	<1983	tak	tak
BELLA	1971	tak	tak
DIANA	2004	nie	nie
DORA	<1983	tak	nie
GAŁA	1982	nie	nie
HAPPY	1987	tak	tak
JOKI	1993	nie	nie
KŁUSANKA	2005	tak	nie
KORA Z ROPEK	<1986	tak	nie
KUNDZIA	1882	nie	nie
LEDA	<1984	tak	nie
LORA	1982	nie	nie
MELA	1997	tak	tak
NORA	1982	nie	nie
NORA	1994	nie	nie
NUKA	1999	tak	tak
NUTKA	1985	tak	tak
SABA	<1983	tak	nie
ŚMIGA	<1988	tak	nie
SZURA	<1978	tak	nie

Tabela 2 Lista psów założycieli wraz z rokiem urodzenia

IMIE	rok urodzenia	czy widnieje we współczesnych rodowodach
ATOM	1982	nie
ATOS	1983	nie
AMI	1979	tak
AWIR	<1983	tak
AWIZ	<1980	tak
BAS	1982	nie
BARTEK	<1978	tak
BEMOL	2005	tak
DROPS	<1983	nie
FILIP	1979	tak
GROT z TATR	<1987	nie
HEBAN	<1987	tak
MORUS	<1988	tak
MURZYN	<1990	tak
NERO	1999	tak
NERO	2006	nie
TROP	2006	tak
TROP Z RAJSKIEGO	<1986	tak
ZAGRAJ	<1971	tak
ZAGRAJ	2006	tak

Genotyp linii matecznej suki HAPPY NN nie został wyznaczony z powodu niewielkiej liczby potomków i prawdopodobnie linia ta nie będzie kontynuowana. Dodatkowo zbadano trzy suki o nieznanym pochodzeniu wpisane do Księgi Wstępnej, dwie z nich zostały użyte w hodowli. Wyznaczono linie mateczne uzyskane na podstawie potomstwa suk: BALSZA NN, BELLA NN, MELA NN, NUTKA NN, NUKA NN oraz linia LM1 jednej suki NN, dwie pozostałe powieliły istniejące w rasie genotypy, pierwsza pochodziła z linii matecznej MELI NN, a druga z linii matecznej BELLI NN. Najliczniej reprezentowaną w badaniu była linia NUTKI NN (n = 77). Druga pod względem liczebności była linia MELI NN (n = 32). Linia BELLI NN (n = 10, z czego jeden osobnik to była suka NN) jest w populacji reprezentowana przez niewielką liczbę

osobników, ale ma perspektywy dalszego trwania. Linia BALSZY NN ($n = 5$), jest to linia, która z dużym prawdopodobieństwem nie będzie kontynuowana. Linia NUKI NN ($n = 5$) jest stabilna, a ostatnia linia LM1 ($n = 2$), ma szansę być utrzymana się w populacji. Linia BELLI NN od BALSZY NN, BELLI NN od NUKI NN różni się jednym miejscem polimorficznym, NUKI NN od BALSZY NN dwoma. Najmniej podobne okazały się haplotypy linii BELLI NN i MELI NN, stwierdzono różnice w pięciu miejscach polimorficznych. Linia MELI NN ma największe podobieństwo do linii LM1 suki NN, różnica jest w jednym miejscu polimorficznym (Dendrogram 1) (Garbacz, 2018). Zadaniem hodowli zachowawczej jest utrzymanie jak największego zróżnicowania w populacji. Istotą jest również zachowanie haplotypów o niewielkiej frekwencji, silniej narażonych na skutki dryfu genetycznego (Prusak, Głazewska, 2014). Niepokojącym zjawiskiem w ostatnich latach jest brak kontynuacji linii matecznych. Ze względu na niewielki udział linie HAPPY NN oraz BALSZY NN prawdopodobnie nie będą kontynuowane. Biorąc pod uwagę niewielką ogólną liczbę linii i dominację reprezentacji linii NUTKI NN oraz w nieco mniejszym stopniu MELI NN i NUKI NN utrata linii matecznej jest zmniejszeniem różnorodności genetycznej rasy. W niewielkich populacjach zachowanie zmienności stanowi jeden z priorytetów. Liczba założycieli gończych polskich ro 24 osobniki, po połowie suki i reproductory. Jest to bardzo mała liczba założycieli, powodująca wysokie spokrewnienie osobników w populacji, a w konsekwencji zróżnicowanie genetyczne niewielkie. Do sierpnia 2022 roku była otwarta Księga Wstępna gończego polskiego, do której na podstawie oceny eksterieru były wpisywane osobniki o nieznanym pochodzeniu. Z badań trzech suk NN wynika, że tylko jedna z nich miała odmienny haplotyp mtDNA i wzbogaciła pulę linii matecznych, pozostałe dwie miały haplotypy powszechnie istniejące w rasie, po MELI NN i BELLI NN. Suki te powinny być genetycznie zbadane, aby określić ich pokrewieństwo z resztą populacji. Jako pozytyw należy traktować fakt, że założycielki kontynuowanych linii matecznych miały inne haplotypy. Niezwykle ważne jest uzyskanie zgodności przynależności do linii na podstawie badania mtDNA oraz analiz rodowodowych



Dendrogram 1 Dendrogram filogenetyczny linii matecznych gończego polskiego (Garbacz, 2018)

Analiza zmienności na podstawie loci mikrosatelitarnych w obrębie rasy

Przeprowadzono badanie zmienności loci STR u gończych polskich. Materiałem do analizy genetycznej były cebulki włosowe pobrane od 75 psów rasy gończy polski oraz wymazy komórek nabłonka jamy ustnej pobrane na wymazówki celulozowe Intensive sterile EUROTUBO® Collection swab (Deltalab). Do analizy wybrano 15 markerów: FH 2054, RNE 169 D 01, REN 105 L 03, AHTk 253, INU 055, AHTk 260, REN 54 P 11, REN 169 O 18, AHT 121, FH 2848, INRA 21, REN 162 C 04, INU 005, CXX 279, INU 030. Markery podzielone zostały na dwa panele (I - FH 2054, REN 169 D 01, REN 105 L 03, AHTk 253, INU 055, AHTk 260, REN 54 P 11, REN 169 O 18 i II - AHT121, FH 2848, INRA 21, REN 162 C 04, INU005, CXX279, INU 030)

Wszystkie 15 loci były wysoce polimorficzne. W analizie poszczególnych markerów zidentyfikowano od 7 do 14 wariantów allelicznych. Średnia liczba alleli w locus dla gończych polskich wynosiła 10, przy czym efektywna liczba alleli wynosiła 4 (Tabela 3). Zakres długości amplifikowanych fragmentów dla poszczególnych loci również został przedstawiony w tabeli 3.

Tabela 3 Zakres długości uzyskanych amplikonów [pz], zidentyfikowana liczba alleli (Na), liczba alleli efektywnych (Ne) (Głowacka, 2020)

Locus	zakres [pz]	GP	
		Na	Ne
AHT121	91-105	8	3,0
FH2848	227-241	10	3,6
INRA21	84-98	11	4,4
INU005	105-131	9	5,2
REN162C04	192-207	13	4,9
CXX279	117-130	6	1,7
INU030	143-154	11	3,4
FH2054	83-178	9	3,0
REN169D01	148-216	10	3,0
REN169O18	144-214	9	4,1
AHTk253	158-291	11	6,1
AHTTh260	284-237	14	9,0
INU055	208-242	8	3,0
REN105L03	208-242	10	2,5
REN54P11	221-238	10	4,8
średnia	-	9,9	4,1

Allele, których frekwencja jest równa bądź wyższa niż 10% można nazwać allelami prywatnymi (Szpiech i wsp., 2011). Liczba alleli prywatnych u gończych polskich wynosi 11, frekwencja 5 spośród nich ma wartość graniczną (10%), pozostałe zostały stwierdzone z frekwencją wyższą niż 10%. Allelem prywatnym o najwyższej frekwencji równej 0,36 jest allel 202 z locus REN162C04. Wykaz alleli prywatnych przedstawiono w tabeli 4 (Tabela 4). Wartość heterozygotyczności obserwowanej, uzyskanej u gończych polskich równa 0,67 była niższa niż wartość oczekiwana wynosząca 0,72. Inbred oszacowany na podstawie frekwencji alleli wyniósł: 0,0624 (Głowacka, 2020). Zespół badawczy Goleman wykorzystał dane rodowodowe gończych polskich udostępnione przez Związek Kynologiczny w Polsce. W sumie uzyskano dane dotyczące 2783 osobników.

Tabela 4 Allele prywatne dla rasy gończy polski (Głowacka 2020)

Locus	Allele	Frekwencja
REN162C04	202	0,36
REN169D01	210	0,24
INRA21	88	0,22
AHTk253	283	0,21
AHT121	97	0,17
INU005	109	0,14
AHTh260	251	0,11
REN54P11	233	0,10
REN169O18	160	0,10
INU030	143	0,10
INU030	152	0,10

DNA uzyskano z wymazów policzkowych pobranych od 177 psów badanej rasy. Zastosowano panel 21 markerów (Short Tandem Repeat - STR) AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTh260, AHTk253, INU005, INU030, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTh171, REN247M23, REN105L03, AHTh130, and REN64E19. Efektywna wielkość populacji została oszacowana na 28,51. Otrzymana na podstawie danych rodowodowych różnorodność genowa wyniosła 0,8802, średnie pokrewieństwo w populacji 0,1198, a średni inbred 0,1151. Badania markerów STR wykazały zawartość informacji polimorficznej - PIC = 0,56, a oszacowane wartości oczekiwanej heterozygotyczności były na ogół zbliżone do wartości heterozygotyczności obserwowanej i wynosiły średnio odpowiednio 0,6050 i 0,6142. Obliczona średnia wartość współczynnika inbredu F_{IS} wyniosła ujemną wartość -0,012, co sugeruje niski poziom inbredu w badanej rasie, jak również unikanie w kojarzeniach zwierząt spokrewnionych. (Goleman i wsp., 2019)

Genetyczne podłoże padaczki u psów

Padaczka to złożona choroba mózgu będąca przejawem nieprawidłowej czynności przodomózgowia charakteryzująca się nawracającymi napadami drgawek. Z klinicznego punktu widzenia, padaczkę stwierdza się w przypadku wystąpienia co

najmniej dwóch niesprovokowanych ataków w odstępie dłuższym niż 24 godziny. Na poziomie komórkowym padaczka jest wynikiem braku równowagi między mechanizmami pobudzającymi i hamującymi, co prowadzi do napadowego pobudzenia neuronów korowych (Ekenstedt i wsp., 2013).

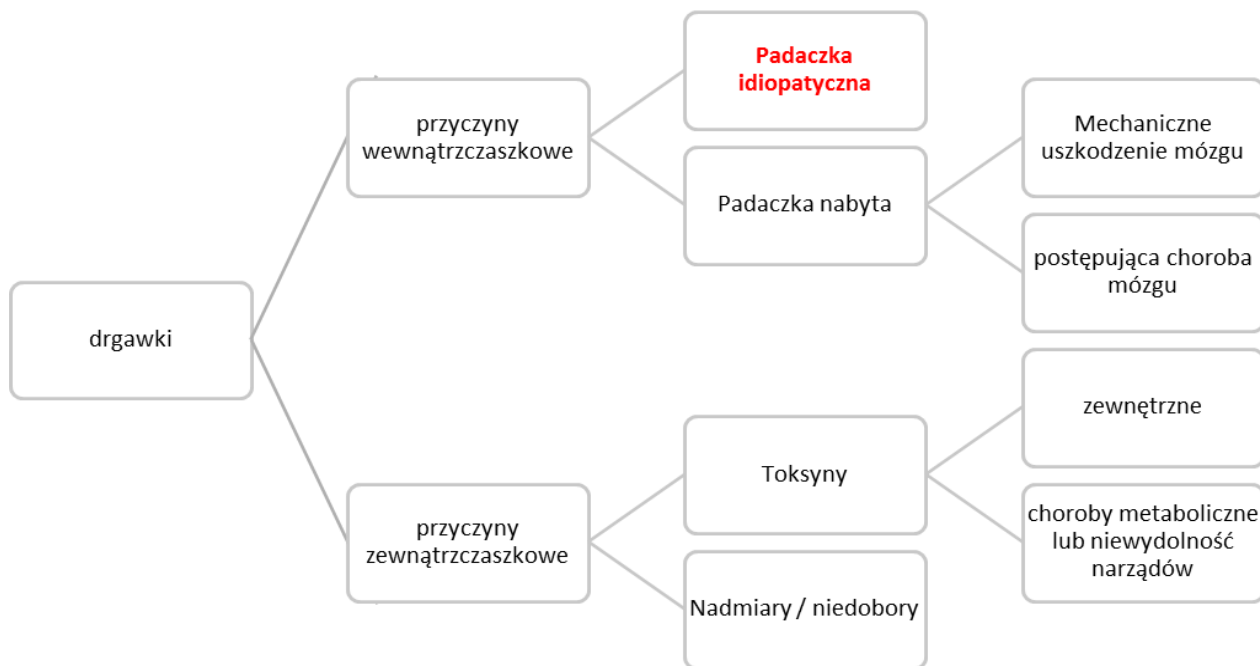
Padaczka u psów jest częstym zaburzeniem neurologicznym szacuje się, że dotyka od 0,5% do 5,7% populacji (Podell i wsp., 1995; Kearsley-Fleet i wsp., 2013; Heske i wsp., 2014). Psy w obrębie izolowanej często nielicznej populacji są na ogół wysoko spokrewnione a także występuje efekt założyciela (Wilbe i wsp., 2010). Dlatego też występowanie padaczki może być znacznie częstsze u niektórych ras lub linii, na przykład u owczarków belgijskich częstość występowania oszacowano na 9,5% (Berendt i wsp., 2008), a w jednej specyficznej linii nawet na 33% (Berendt i wsp., 2009).

Padaczka jest chorobą obejmującą szeroki zakres zaburzeń (Thomas 2010). International League Against Epilepsy (ILAE) wprowadziło podział padaczek o różnej etiologii wyróżniając trzy kategorie: (1) genetyczne, których głównym objawem klinicznym są napady drgawkowe bezpośrednio wynikające z defektu(-ów) genetycznego(-ych), (2) strukturalne/metaboliczne, spowodowane przez czynnik taki jak infekcja lub uraz i (3) o nieznannej etiologii, dla których podstawowy mechanizm wyzwalający jest nadal nieznan i może być genetyczny lub spowodowany przez inne, jak dotąd nierozpoznane zaburzenie (Berg i wsp., 2010).

Przewlekłe, nawracające zespoły napadowe bez wykrywalnych innych nieprawidłowości są określane jako „idiopatyczne”. Klasyfikacja „padaczka genetyczna” lub „padaczka o nieznanym podłożu” może obejmować padaczkę idiopatyczną (IE), natomiast „padaczka strukturalna” jest odrębną grupą chorób. Padaczki strukturalne/metaboliczne mogą wynikać z istnienia szerokiego wachlarza czynników, w tym między innymi anomalii metabolicznych, nagromadzenia toksyn, nowotworzenia, infekcji i urazów głowy (Ekenstedt i wsp., 2012).

U psów stwierdza się różne typy padaczek, poza IE o podłożu genetycznym oraz o podłożu nieznanym, definiuje się również progresywną padaczkę miokloniczną (ang. Progressive myoclonic epilepsies - PME) charakteryzującą się postępującymi zaburzeniami neurologicznymi. Ten typ padaczki nie jest technicznie definiowany jako IE, ponieważ psy często przejawiają nietypowe zachowania między napadami padaczkowymi, a proces chorobowy jest zarówno postępujący, jak i degeneracyjny. Ponadto u osobników dotkniętych chorobą mogą wystąpić nieprawidłowe metabolity

oraz zmiany histopatologiczne. Do tego typu chorób zaliczamy m.in. chorobę Lafora i uogólnioną młodzieńczą padaczkę miokloniczną (ang. Generalized Juvenile Myoclonic Epilepsy - GJME) (Ekenstedt i wsp., 2012). Dodatkowo wśród PME można wyróżnić Neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) będącą grupą chorób neurologicznych. Są to dziedziczne, postępujące choroby neurodegeneracyjne. NCL charakteryzują się postępującym upośledzeniem funkcji poznawczych i motorycznych, utratą wzroku, drgawkami, zaburzeniami oddychania i połykania, a ostatecznie śmiercią (Katz i wsp., 2017).



Schemat 2 Metody diagnostyki padaczki idiopatycznej na podstawie wykluczenia pozostałych możliwych źródeł drgawek

Sporą trudność w dotychczas przeprowadzanych badaniach stanowiło właściwe zdiagnozowanie psów, których materiał genetyczny był wykorzystywany do analiz. Drgawki mogą być efektem różnych zaburzeń nie związanych z padaczką idiopatyczną, a te należy wykluczyć (Schemat 2). W dotychczasowych badaniach najczęstszym sposobem przyporządkowania osobników do grupy chorych był kwestionariusz oparty w sporym uproszczeniu na wykluczeniu pozostałych możliwych przyczyn drgawek. Oprócz pytań dotyczących historii napadów, ważnym kryterium były badania kliniczne, które obejmowały pełne badanie neurologiczne, badania krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF), rezonans magnetyczny (MRI) i elektroencefalografie (EEG) ale ze

względu na wysoką cenę oraz konieczny wyspecjalizowany sprzęt do ich wykonania, jedynie niektóre osobniki były im poddane (Koskinen i wsp., 2015).

Wiele mutacji, z których większość związana jest z genami kodującymi funkcjonowanie kanałów jonowych, neuroprzeźniaki lub ich podjednostki regulatorowe, może powodować u ludzi rzadkie, specyficzne typy padaczki. W niektórych przypadkach podstawy pojawienia się padaczki u psów mają takie same podłoże jak u ludzi (Uriarte, Maestro, 2016).

W 2012 roku przeprowadzono badania na psach obejmujące analizę 52 genów kodujących kanały jonowe i neuroprzeźniaki, o których wiadomo, że są zaangażowane w padaczkę u ludzi. W badaniach uwzględniono cztery rasy psów: wyżła węgierskiego, angielskiego springer spaniela, dużego szwajcarskiego psa pasterskiego i beagla, ale nie stwierdzono żadnych znaczących powiązań z padaczką idiopatyczną u tych ras (Ekenstedt i wsp., 2012). Aktualnie prowadzone badania koncentrują się na identyfikacji nowych loci i genów specyficznych dla psów w obrębie całego genomu psa (Potscha i wsp., 2013).

Klasyczne i nowe techniki sekwencjonowania genomu pozwalają na identyfikację mutacji u różnych ras, u których obserwowana jest padaczka o nieokreślonej etiologii. Obiecującym odkryciem jest, między innymi, stwierdzenie podłoża genetycznego padaczki idiopatycznej u seter angielskiego. Chorobę warunkowała mutacja w genie CLN8 (p.L164P missense mutation) odpowiedzialnym za kodowanie błonowego białka siateczki śródplazmatycznej łączącej zewnętrzną błonę jądrową z błoną komórkową oraz błony organelli w komórce. Dziedziczenie określono jako autosomalne recesywne. Wszystkie chore osobniki miały genotyp C/C, nosiciele C/T, a osobniki zdrowe T/T (n case = 4, n carrier = 4, n control = 3 (angielski seter)) (Katz i wsp., 2005).

U border collie została stwierdzona mutacja w genie CLN5 (nonsense mutation (Q206X) w exonie 4) kodującym rozpuszczalne białka lizosomalne, które katalizują rozpad większości substancji bezużytecznych w komórce. Dziedziczenie określono jako autosomalne recesywne. Sześć z siedmiu chorych na padaczkę osobników miało genotyp T/T, jeden miał genotyp C/C, za to osobniki zakwalifikowane jako zdrowe miały genotypy C/C oraz C/T (n case = 7, n carrier = 16, n control = 86) (Melville i wsp., 2005).

U jamnika, jako przyczyna padaczki wskazana została mutacja w genie PPT1 (single nucleotide insertion in exon 8 (PPT1 c.736_737insC), kodującym jak CLN5 rozpuszczalne białka lizosomalne, a dziedziczenie również określono jako autosomalne

recesywne. Mutację 37insC wykryto u jednego psa chorego, a jego ojciec, matka i spokrewniony wysoko osobnik były nosicielami, przebadano również 127 niespokrewnionych osobników i żaden z nich nie posiadał tej mutacji (n case =1, n carrier = 3, n control = 127) (Sanders i wsp., 2010). U jamników wykryto również mutację w genie TPP1 (c.325delC). Badano dwa jamniki miniaturowe długowłose będących pełnym rodzeństwem z jednego miotu. Obecność mutacji stwierdzono u jednego osobnika chorego, heterozygotami byli zarówno ojciec jak i matka. W kolejnym etapie zbadano genotyp 177 psów, w tym 77 nie spokrewnionych jamników i wszystkie zwierzęta okazały się heterozygotami (n case = 1, n carrier = 2, n control = 100 (inne rasy) + 77 (jamniki)) (Awano i wsp., 2006a).

Awano i inni (2006a), przeprowadzili badania dotyczące podłoża NCL u buldoga amerykańskiego. Stwierdzono, że mutacja c.597G > A w eksonie 5 genu CTSD, odpowiedzialnym za produkcję enzymu katepsyny D, jest powiązana z wystąpieniem choroby u tej rasy. Zbadano 123 psy, z których 8 miało objawy choroby. Wszystkie osobniki chore miały genotyp A/A, oraz było 66 homozygot G/G, 45 heterozygot G/A oraz cztery homozygoty A/A. Cztery psy - homozygoty A/A bez objawów NCL, były w wieku poniżej czterech miesięcy, więc choroba mogła się u nich jeszcze nie ujawnić (n case = 8, n control = 115) (Awano i wsp., 2006b).

U owczarka australijskiego stwierdzono, że mutacja w genie CLN6 (T to C wariant (c.829T>C) exon 7), odpowiedzialnym również za kodowanie białka siateczki śródplazmatycznej, podlegająca dziedziczeniu autosomalnemu recesywnemu, wpływa na wystąpienie padaczki idiopatycznej. Przebadano jednego chorego osobnika, który miał genotyp C/C oraz 637 zdrowych owczarków australijskich, które miały genotyp T/T (n case = 1, n control = 637) (Katz i wsp., 2010).

Prowadzono również badania u teriera tybetańskiego nad genetycznym podłożem NCL (Neuronal Ceroid Lipofuscinosis), objawiającym się między innymi drgawkami. Odkryto, że delecja w eksonie 16, ATP13A2:c.1,623delG zwiększa prawdopodobieństwo choroby. W badaniu wykorzystano materiał genetyczny psów z potwierdzoną chorobą, z podejrzeniem i objawami klinicznymi NCL oraz od osobników z wykluczoną chorobą, powyżej dziesiątego roku życia bez występujących objawów choroby oraz psów poniżej dziesiątego roku życia bez objawów NCL. Wszystkie psy z potwierdzoną chorobą były homozygotami del/del. Wśród psów z objawami większość było homozygotami del/del, dwa były heterozygotami del/wt, a trzy były homozygotami wt/wt. W grupie kontrolnej wszystkie psy z wykluczoną chorobą były homozygotami

wt/wt, wszystkie psy powyżej dziesiątego roku życia bez objawów choroby były heterozygotami del/wt lub homozygotami z dzikim allelem wt/wt. Wśród osobników poniżej dziesiątego roku życia, u których nie stwierdzono objawów NCL były heterozygoty del/wt lub homozygoty wt/wt, a psy które miały genotyp del/del były w wieku do pięciu lat, więc prawdopodobnie symptomy choroby jeszcze się u nich nie ujawniły (średnia wieku pierwszych objawów u terierów tybetańskich to 6,4 roku) (n case = 54, n control = 385), (Farias F. h. G., i wsp., 2011).

Zidentyfikowano mutację w genie LGI2 (Lgi2 c.1552A>T) odpowiedzialną za padaczkę idiopatyczną u psów rasy lagotto romagnolo. Jest to gen kodujący białka, odgrywa ważną rolę w budowie synaps pomiędzy komórkami nerwowymi. Jest to jeden z typów padaczki występujących u tej rasy. Pierwsze ataki występują około 7 tygodnia życia i ustępują około 4 miesiąca. U dorosłych psów tej rasy występuje również padaczka idiopatyczna o nieznanym podłożu. Przeprowadzono analizę GWAS, do analiz wykorzystano mikromacierz Affymetrix's Canine SNP Array version 1 zawierającą 26,578 markerów, a następnie sekwencjonowano wybrane fragmenty DNA. U większości osobników chorych stwierdzono mutacje T/T, u dwóch stwierdzono genotyp A/T, natomiast w grupie kontrolnej 69 osobników posiadało genotyp A/A, 41 genotyp A/T oraz 2 posiadały genotyp T/T (n case = 28, n control = 112), (Seppala i wsp., 2011).

GJME (Generalized Juvenile Myoclonic Epilepsy) występująca u młodych rodhesian ridgebacków (RR) została zbadana przez Wielaender i in (2017). Przy pomocy analizy GWAS sprawdzono genotyp 40 psów, w tym 14 z objawami choroby. Do analiz wykorzystano mikromacierz Illumina CanineHD BeadChip 173,662 SNP, a następnie przeprowadzono sekwencjonowanie wybranego fragmentu DNA. Stwierdzono, że mutacja c.564_567delAGAC w genie DIRAS1 (Distinct Subgroup of the Ras Family, Member 1), leżącym na chromosomie 20, regulującym uwalnianie acetylocholino i odgrywającym rolę w rozwoju neurologicznym, jest ściśle powiązana z wystąpieniem choroby u tej rasy. Wszystkie osobniki ze stwierdzoną GJME posiadały genotyp del/del, a wśród pozostałych osobników stwierdzono heterozygoty oraz homozygoty z typem dzikim. Następnie zbadano 498 psów rasy RR oraz 965 psów innych ras pod kątem wystąpienia odkrytej mutacji. Stwierdzono, że genotyp del występuje jedynie u psów rasy RR i około 15% przebadanych psów jest jej nosicielami (n case = 12, n control = 26 + 498 (RR) + 965 (inne rasy)), (Wielaender , i wsp. 2017).

U pudła toy wskazano gen potencjalnie powiązany z padaczką, ale wciąż nie określono

konkretnej mutacji odpowiedzialnej za wystąpienie objawów. Przy pomocy analizy GWAS, do której użyto 10 psów chorych i 22 zdrowych gen *ELFN2* uznano za potencjalnie odpowiedzialny za padaczkę idiopatyczną w tej rasie, natomiast dalsze genotypowanie 33 osobników chorych oraz 38 zdrowych nie pozwoliło ustalić konkretnej mutacji powiązanej z chorobą (n case = 10, n control = 22 + n case = 33, n control = 38) (Togawa, 2019).

U psów rasy Petit Basset Griffon Vendeen stosunkowo często, bo u 8,9% psów występuje padaczka idiopatyczna (Gullov, i wsp., 2011), a u wielu ras psów częstość tej choroby wynosi około 1-2%. Zwiększenie udziału psów chorych w danej rasie może sugerować podłoże genetyczne (Schwartz-Porsche 1986, Gullov i wsp., 2011). W grupie 53 psów przeprowadzono badanie asocjacyjne w celu wskazania genu odpowiedzialnego za padaczkę. Wskazano trzy geny potencjalnie powiązane z chorobą, *NRN1* leżący w chromosomie 35, *DOK5* leżący w chromosomie 24 oraz *FAM135b* leżący w chromosomie 13. Analiza eksonów tych genów nie wykazała sekwencji o możliwym związku z padaczką idiopatyczną (n case =23 n control = 30) (Deschain i wsp., 2021).

Cały czas prowadzone są poszukiwania nowych mutacji oraz próby powiązania już odkrytych i potwierdzonych mutacji przyczyniających się do wystąpienia padaczki idiopatycznej u ras, u których podłoże wciąż jest nieznane. Jednak powolny postęp w identyfikacji genów powiązanych z padaczką idiopatyczną u psów sugeruje, że podobnie jak u ludzi, może ona stanowić złożoną chorobę genetyczną z interakcją wielu genów i czynników środowiskowych (Ekenstedt i wsp., 2012).

Wyniki w obrębie genu ADAM23 u psów

Oberbauer i wsp. (2010) przeprowadzili badanie DNA psów ras owczarek belgijski tervuren (BT) i owczarek belgijski (BS). Wykorzystano 410 markerów mikrosatelitarnych, rozłożonych równomiernie w obrębie genomu. Mimo iż poprzednie badania oparte na analizach rodowodowych sugerowały w tych rasach istnienie jednego genu o kluczowym znaczeniu, w badaniach DNA wykazano, że cecha ta jest poligeniczna. Na czterech chromosomach CHA 2, CHA 6, CHA 12, CHA 37 wykazano wstępnie powiązanie z chorobą (badania asocjacyjne – LOD score powyżej 1,0). Możliwe QTL w tych regionach były poparte również analizami multipoint linkage częstości alleli, TDT i analizą haplotypów. Najsilniejszy two-point LOD score dla

cechy binarnej został znaleziony na chromosomie CHA 12: 1.221 i 1.212 dla markerów FH3591 and FH2054, oraz na chromosomie CHA 37: 1.382 i 1.159, dla markerów AHT133 i REN67C18. Dla tych dwóch regionów potwierdzono powiązanie padaczki idiopatycznej z genotypem. Analiza haplotypów w blokach również wykazała istotne powiązania genów na chromosomach CHA2, CHA 6, CHA 12 i CHA37 z występowaniem padaczki (Oberbauer i wsp., 2010).

Seppala i wsp. (2012) prowadzili badania mające na celu zmapowanie genów epilepsji u owczarka belgijskiego. Wykonano analizę GWAS, na podstawie której stwierdzono istotne statystycznie powiązanie pomiędzy wystąpieniem choroby a markerem na chromosomie CHA37 SNP BICF2P890779 (18 123 961 bp). Wyniki potwierdzono genotypując 81 osobników chorych i 88 kontroli. Dodatkowo sprawdzono wpływ SNP BICF2P890779 na wystąpienie padaczki idiopatycznej u 303 osobników chorych i 316 bez objawów wśród ras lagotto romagnolo, pinczer miniaturowy, kromfohrlander, whippet, border terrier, schipperke, szpic fiński i fiński lapphund. Istotny statystycznie związek między wskazanym SNP i wystąpieniem padaczki wykazano w rasach kromfohrlander i whippet ($p = 0,003$ i $p = 0,02$). Prawie wszystkie szpice fińskie i schipperke były homozygotami AA, a u pozostałych ras nie wykazano istotnego wpływu (Seppala i wsp., 2012).

Badania nad genetycznym podłożem padaczki prowadzili również Koskinen i wsp. (2015). W pierwszym badaniu przy analizie GWAS oraz mapowaniu regionu CHA37 uwzględniono psy ras groenendael, tervueren, schipperke, szpic fiński oraz beagle. Jedyne istotne statystycznie wyniki uzyskano dla CHA37 SNP BICF2P1131874 w genie ADAM23. W badaniu bez uwzględniania wyników owczarków belgijskich inny SNP w obrębie genu ADAM23 (BICF2P1290526) miał najsilniejsze powiązanie z padaczką. W sekwencjonowaniu wyselekcjonowanych na podstawie GWAS regionów stwierdzono, że wariant kodujący (c.1159G > A, p.R387H) był powiązany z chorobą u owczarków belgijskich i beagle pochodzących z Finlandii, a drugi wariant kodujący (c.1158C > T, p. R387C) był powiązany z wystąpieniem padaczki u schipperke i fińskiego szpica. W analizie haplotypów wykazano, że w genie ADAM23 na CHA37 allele T-C-del-del-G-G w 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 bp w układzie homozygotycznym są istotnie powiązane z wystąpieniem padaczki. Sprawdzono również wpływ 26 pojedynczych SNP (15085438 (BICF2S23030950), 15106446 (BICF2P1021781), 15108593, 15108802, 15111724 (BICF2P1131874), 15113325, 18123961 (BICF2P890779), 15093174, 15113726,

15113939, 15113940, 15114127, 15114156, 15114233, 15114321, 15114336, 15115295, 15115366, 15116559, 15118894, 15119387, 15121756, 15121845, 15123005, 15123950, 15124474) dla ras owczarek belgijski, schipperkes, szpic fiński, beagle, beagles (finnish hunting). Stwierdzono istotny wpływ na padaczkę idiopatyczną dla ras owczarek belgijski, schipperkes, szpic fiński, i beagles (finnish hunting) w 13/26 SNP (15106446 (BICF2P1021781), 15108593, 15108802, 15111724 (BICF2P1131874), 15113325, 15121845, 15119387, 15114127, 15114156, 15114321, 15114336, 15115295, 15115366) oraz dla ras owczarek belgijski, szpic fiński i beagles (finnish hunting) w 1/26 SNP (15085438 (BICF2S23030950)). Dla owczarków belgijskich i beagle (finnish hunting) dodatkowo otrzymano istotne powiązania w 7/26 SNP (18123961 (BICF2P890779), 15113940, 15114233, 15121756, 15123005, 15123950, 15124474). W grupie psów rasy beagle nie pochodzących z fińskich linii polujących żaden wyżej wymieniony SNP nie był istotnie powiązany z wystąpieniem padaczki idiopatycznej (Koskinen i wsp., 2015).

Koskeinen i wsp. (2017) do analizy z roku 2015 dodali kolejnych osiem ras: kromfohländera, pinczera miniaturowego, fińskiego laphunda, pirenejskiego psa górskiego, setera irlandzkiego, labrador retrievera, whippetta oraz owczarka australijskiego. Cztery pierwsze rasy poddano analizie GWAS. Wykonano również genotypowanie genu ADAM23 w obrębie wszystkich ośmiu ras. W analizie GWAS nie wykazano żadnego powiązania, ale w analizie haplotypu w genie ADAM23 na CFA37 allele T-C-del-del-G-G w 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 bp w układzie homozygotycznym wykazano istotny statystycznie związek z padaczką idiopatyczną u ras owczarek australijski, kromfohländers, labrador retriever i whippet, a podobny trend, ale nie istotny stwierdzono u ras: owczarek pirenejski, pinczer miniaturowy i seter irlandzki. Fiński laphund był jedyną rasą w tej analizie, w której nie wykazano żadnego związku haplotypu z padaczką. Wykazano istotne statystycznie powiązanie dla wszystkich użytych SNP w rasach owczarek australijski, labrador retriever, owczarek pirenejski, whippet oraz kromfohländers (bez istotności w 15085438 (BICF2S23030950), (Koskinen i wsp., 2017).

Belagner i wsp. (2020) przeprowadzili badania podłoża genetycznego padaczki idiopatycznej u owczarków belgijskich ras: tervuren oraz groendael. Wykorzystano mikromacierze Illumina CanineHD BeadChip zawierającej 173,662 SNP. Potwierdzono poligeniczny charakter dziedziczenia padaczki. Największe ryzyko choroby bliskie 90% zaobserwowano u psów będących heterozygotami w bloku CTCG:ACTG dla CFA 14

(BICF2S23230472/BICF2P437468/BICF2S23211419/BICF2S23539344) oraz homozygotami w bloku GG:GG dla CFA 37 (BICF2P271491/TIGRP2P419463_rs8724220). Już brak allelu G w BICF2P271491 lub TIGRP2P419463_rs8724220 zmniejszało ryzyko wystąpienia choroby, a genotyp GG/GG dawał prawie sześciokrotnie większe ryzyko wystąpienia padaczki (Belagner i wsp., 2020).

Funkcje genów DOK5, PCDH9, ARFGEF2, ADAM23

Gen DOK 5

Białko kodowane przez ten gen należy do rodziny białek błonowych DOK, które są proteinami adaptacyjnymi zaangażowanymi w transdukcję sygnału. Każda komórka musi mieć zdolność odbierania i odpowiedzi na sygnały napływające ze środowiska zewnętrznego. Zachowanie się komórek regulowane jest przez zewnątrzkomórkowe ligandy, które łącząc się z receptorami aktywują kaskadę wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału. Poszczególne drogi sygnałowe kontrolują istotne dla komórek procesy i tym samym odpowiedzialne są za biologiczną odpowiedź komórki na bodziec zewnętrzny (Bryk i wsp., 2014). Kodowane białko oddziałuje z fosforylowanymi receptorowymi kinazami tyrozynowymi w celu pośredniczenia we wzroście neurytów i aktywacji szlaku kinazy MAP (mitogen-activated protein). Receptorowa kinaza tyrozynowa c-Ret i jego ligand GDNF (glial-derived neurotrophic factor) odgrywają istotną rolę w embriogenezie. Ablacja genów GDNF lub c-Ret sprawia, że rozwój komórek grzebienia nerwowego i ich pochodnych jest zaburzony, w konsekwencji czego nie powstają fragmenty jelitowego układu nerwowego, a liczba neuronów kilku zwojów obwodowych jest zmniejszona (Schuchardt i wsp., 1994; Moore i wsp., 1996; Pichel i wsp., 1996; Sanchez i wsp., 1996). Podobnie, inaktywujące mutacje c-Ret u ludzi mogą powodować chorobę Hirschsprunga, która charakteryzuje się hipoplazją jelitowego układu nerwowego (Edery i wsp., 1994; Romeo i wsp., 1994). Białka dok-4 i dok-5 mogą bezpośrednio wiązać się z Y1062 (resztą tyrozynową) receptora c-Ret. Dok-4 i dok-5 stanowią podgrupę członków rodziny dok, która ma wspólną ekspresję z c-Ret w różnych tkankach neuronalnych. Aktywowany c-Ret promuje wzrost neurytów w komórkach PC12 guza chromochłonnego, dla tej aktywności Y1062 w c-Ret jest

niezbędny. Białka fuzyjne c-Ret/dok, w których Y1062 z c-Ret jest usunięty i zastąpiony sekwencjami dok-4 lub dok-5, indukują zależny od liganda wzrost aksonów w komórkach PC12. Ponadto dok-4 i dok-5 zwiększają zależną od c-Ret aktywację kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (Grimm i wsp., 2008).

Kinazy aktywowane mitogenami są zakonserwowaną rodziną enzymów, które propagują sygnał zewnętrzny poprzez kaskadę fosforylacji w celu generowania skoordynowanej odpowiedzi komórki na środowisko (Raman M. i wsp., 2007). Są to kinazy białkowe o aktywności serynowo-treoninowej, które regulują wiele wewnątrzkomórkowych procesów, włączając w to transkrypcję genów, biosyntezę białek, podziały komórkowe, różnicowanie i przeżycie lub apoptozę komórki.

Aktywowany c-Ret rekrutuje białka sygnałowe takie jak Grb7/Grb10, PLC γ , Shc/Enigma i Grb2, które wiążą się z fosforylowanymi resztami tyrozyny w jego COOH-końcowej sekwencji (Asai i wsp., 1996; Borrello i wsp., 1996; Durick i wsp., 1996; Arighi i wsp., 1997; Lorenzo i wsp., 1997; Alberti i wsp., 1998, Bryk i wsp., 2014).

Gen PCDH9

Niezgrupowane δ -protokadheryny są homofilnymi cząsteczkami adhezyjnymi komórek, niezbędnymi dla rozwoju układu nerwowego kręgowców. Funkcja układu nerwowego jest silnie zależna od architektury neuronalnej, w tym wzorców połączeń neuronalnych. Rozpoznawanie komórek przez receptory powierzchniowe jest bardzo ważne przy prawidłowym budowaniu obwodów neuronalnych podczas rozwoju (Kiecker i Lumsden, 2005; Steinberg, 2007; Zipursky i Sanes, 2010). W szczególności, niezgrupowane δ -protocadheriny zostały powiązane z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, niepełnosprawnością intelektualną, wrodzoną mikrocefalią i padaczką (Cooper i wsp., 2016). Gen PCDH9 jest wiązany w literaturze z autyzmem oraz guzami mózgu ale nie ma bezpośredniego dowodu na wpływ na wystąpienie epilepsji (Izycka i wsp., 2019). Inny gen z tej rodziny Protokadheryna-19 (PCDH19) jest członkiem podrodziny δ 2-protokadheryn o strukturze niezgrupowanej (Wolverton i Lalande, 2001; Vanhalst i wsp., 2005; Gaitan i Bouchard, 2006; Emond i wsp., 2009; Liu i wsp., 2010), która znajduje się na chromosomie X. Mutacje w PCDH19 powodują sprzężoną z chromosomem X, ograniczoną do kobiet postać padaczki u niemowląt, która wiąże się z niepełnosprawnością intelektualną, a także z zachowaniami kompulsywnymi lub

agresywnymi i cechami autystycznymi (Dibbens i wsp., 2008; Scheffer i wsp., 2008; Depienne i LeGuern, 2012; van Harssel i wsp., 2013; Leonardi i wsp., 2014; Thiffault i wsp., 2016; Terracciano i wsp., 2016; Walters i wsp., 2014). Do tej pory zidentyfikowano znacznie ponad 100 odrębnych mutacji w PCDH19 u pacjentów z padaczką, co czyni go ważnym genem o znaczeniu klinicznym w padaczce u ludzi. Około połowa z tych mutacji to mutacje typu missense rozmieszczone w całej domenie zewnątrzkomórkowej białka PCDH19 (Cooper i wsp., 2016).

Gen ARFGEF2

Białka wiążące GTP czynnika rybosylacji ADP (Arf) są głównymi regulatorami transportu pęcherzyków, a czynniki wymiany nukleotydów guaninowych Arf (GEF) regulują cykl białek Arf między nieaktywnymi formami związanymi z difosforanem guaniny GDP i aktywnymi formami związanymi z trifosforanem guaniny GTP. Istnieją różne GEF, które oddziałują z ARF (ARFGEF), ale wszystkie mają wspólną domenę Sec7, uważaną za niezbędną do aktywności wymiany nukleotydów guaninowych (Togawa i wsp., 1999; Pacheco-Rodriguez i wsp., 2002). ARFGEF2 jest jednym z trzech GEF o dużej masie cząsteczkowej w mózgu i specyficznym dla aparatu Golgiego czynnikiem wymiany nukleotydów guaninowych 1 [GBF1] oporności na brefeldynę A. ARFGEF2 koduje białko GEF2 hamowane przez brefeldynę (BIG2) (Chavrier i Goud, 1999; Cox i wsp., 2004). BIG2 reguluje przemieszczanie się pęcherzyków niektórych kluczowych białek, prawdopodobnie cząsteczek adhezyjnych, takich jak β -katenina i E-kadheryna (Sheen i wsp., 2004), a hamowanie BIG2 powoduje również cofanie się aksonalnych i dendrytycznych stożków wzrostu *in vitro* (Jareb i Banker, 1997; Ruthel i Banker, 1999). Upośledzenie wydłużania neurytów lub adhezji międzykomórkowej może potencjalnie powodować cofanie się wiodącego procesu migrujących neuronów lub osłabienie wyściółki neuroependymalnej (Lu i wsp., 2005).

Gen ADAM23

Adamalizyny (ADAM) są glikoproteinami i tworzą zróżnicowaną pod względem budowy chemicznej grupę białek transbłonowych. Mają wspólną budowę strukturalną i pełnią dwie jasno określone role biologiczne: proteolizę i adhezję komórkową. Pod względem strukturalnym są podobne do metaloproteinaz stwierdzanych w jadach węży

(Duffy i wsp., 2009). Adamalizyny w komórkach powstają pierwotnie w postaci nieaktywnej, postacie aktywne są syntetyzowane z prekursorów z udziałem enzymu metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-7 (MMP-7) (Mochizuki S. i wsp., 2004, Mochizuki i Okada 2007, Mochizuki i Okada 2009 , Mitsui Y. i in, 2007). Białka rodziny ADAM spełniają w organizmie liczne funkcje, pełnią rolę w procesach oddziaływania międzykomórkowego, w mechanizmach migracji, adhezji za pośrednictwem domeny dezintegryny, fuzji i przekazywania sygnałów (Kuroda H., i in, 2010, Mitsuri Y., i wsp., 2006). Ich aktywność proteolityczna ma zastosowanie przy degradacji macierzy międzykomórkowej, a także podczas proteolizy kompleksów białkowych, przez co białka te regulują biodostępność różnych czynników wzrostowych. Każda z tych funkcji może mieć udział w promocji kancerogenezy, w wielu nowotworach potwierdzono zwiększoną ekspresję białek ADAM w tkankach guza. Rola białek z rodziny ADAM jako promotorów wzrostu i różnicowania komórek ujawnia się przede wszystkim w procesach embriogenezy. Na podstawie badań nad rozwojem tkanek na wczesnych etapach życia i formowania narządów potwierdzono, że białka z tej grupy regulują liczne etapy neurogenezy i spermatogenezy. Działanie to nie wygasa w życiu dorosłym, a ze względu na obecność dodatkowych czynników modyfikujących, może mieć znaczenie w procesach patologicznych (Liang i wsp., 2013).

Cel pracy

Celem pracy była identyfikacja genów potencjalnie skorelowanych z wystąpieniem epilepsji idiopatycznej u gończego polskiego lub genów o kluczowym znaczeniu dla wystąpienia choroby.

Celem było również zawężenie listy wyłonionych genów, przy pomocy uczenia maszynowego, do najbardziej prawdopodobnych

Materiał

Grupa badawcza i klasyfikacja osobników

Grupę badawczą stanowiło 48 osobników w wieku 3 do 12 lat. Do grupy zwierząt chorych zakwalifikowano 12 osobników, do grupy zdrowych 36 osobników. Stwierdzenie, że pies jest chory bazowało na wywiadzie z opiekunem/hodowcą zgodnie z zaprojektowanym formularzem, dzięki czemu wykluczono inne potencjalne źródła drgawek. Formularz obejmował między innymi pytania dotyczące przebytych lub przewlekłych chorób, przyjmowanych leków, przebytych urazów oraz wykonanych badań diagnostycznych (załącznik 1). Do grupy zwierząt zdrowych kwalifikowano psy, które nie miały objawów klinicznych padaczki, miały co najmniej dwa mioty z różnymi partnerami i w żadnym miocie nie stwierdzono osobników chorych.

Materiał do badań (krew obwodowa) pochodził od psów, których właściciele dobrowolnie wzięli udział w projekcie. Materiał był pobierany przez lekarza weterynarii w trakcie rutynowej wizyty psa w gabinecie i wysyłany do Laboratorium Genetyki Molekularnej Katedry Genetyki i Ochrony Zwierząt SGGW.

Tabela 5 Charakterystyka grupy badawczej, psów gończych polskich ze stwierdzoną padaczką idiopatyczną

id	wiek [l]	wiek wystąpienia pierwszych drgawek [l]	MRI	płeć	lekoodporność	napady
ch1	4	1	tak	F	nie	Generalized
ch2	4	1,5	tak	M	nie	Generalized
ch3	4	2	nie	M	nie	Generalized
ch4	12	2	tak	F	nie	Generalized
ch5	10	1,5	tak	M	nie	Generalized
ch6	11	1,5	nie	M	nie	Generalized
ch7	12	2	tak	M	nie	Generalized
ch8	8	2	tak	M	nie	Generalized
ch9	10	7	tak	F	nie	Generalized
ch10	3	2	nie	M	nie	Generalized
ch11	4	2	nie	F	tak	Generalized
ch12	7	1,5	tak	F	nie	Generalized

Id – numer id badanego zwierzęcia, MRI – czy wykonano badanie MRI (magnetic resonance imaging), płeć – F – samica, M – samiec, napady – rodzaj zaobserwowanych napadów padaczkowych, l - lata

Średni wiek psów w grupie chorych wyniósł 7,4 lata, wiek, w którym wystąpił pierwszy atak wahał się między 1 - 2 lata u jedenastu osobników, u jednej suki to było 7 lat. U jednego osobnika wdrożone leczenie nie przyniosło efektu w postaci wygaszenia napadów (Tabela 5).

Metody

Metody analizy rodowodowej

Do obliczenia średniego współczynnika inbredu oraz przeciętnego spokrewnienia w populacji wykorzystano pakiety ggroups i kinship2 programu R (version 4.0.3, R Foundation for Statistics Computing, <https://cran.r-project.org>).

Metody analizy genetycznej

Izolację DNA wykonano przy użyciu zestawu NucleoSpin^RDX.Blood. Stężenie i czystość produktów badano przy pomocy spektrofotometru NanoDrop (Tabela 1 - Aneks), a następnie zgenotypowano przy użyciu mikromacierzy Illumina CanineHD BeadChip (San Diego, CA) zawierającej sondy do 173 662 (SNP).

Technologia mikromacierzy wykorzystuje mikroperełki krzemionkowe umieszczone w starannie wytrawionych mikrostudzienkach na plastikowych płytkach. Są one pokryte wieloma kopiami sondy oligonukleotydowej kompatybilnej z określonym miejscem w genomie. Każda sonda wiąże się z komplementarną sekwencją jednoniciowego DNA, zatrzymując hybrydyzację jedną zasadę przed interesującym nas locus. Specyficzność alleli jest zapewniona poprzez przedłużenie sondy o jedną zasadę komplementarną do sekwencji przyłączonego fragmentu DNA, która zawiera jeden z czterech znakowanych nukleotydów. W trakcie skanowania, etykieta nukleotydu emituje sygnał fluorescencyjny. Intensywność tego sygnału dostarcza informacji o układzie alleli w danym locus (Illumina). Genotypowanie wykonano w Laboratorium Genetyki Bydła PFHBiPM w Parzniewie.

Metody analizy statystycznej

Analiza asocjacyjna GWAS

Wszystkie analizy statystyczne oraz wykresy zostały wykonane przy użyciu programu R (version 4.0.3, R Foundation for Statistics Computing, <https://cran.r-project.org>). Do filtrowania danych wykorzystano program PLINK v1.07 (Purcell i wsp., 2007). W ramach wstępnej analizy usunięto SNP o współczynnikach call frequency niższym niż 85%, minor allele frequency niższe niż 5% oraz SNP odbiegające od równowagi Hardy'ego-Weinberga wśród kontroli ($p < 0,0001$). Ostatecznie do analizy pozostało 115206 SNP. Analizę GWAS przeprowadzono przy użyciu pakietu - StatgenGWAS, a następnie zobrazowano przy pomocy Manhattan plot przy użyciu pakietu qqman. Wykres Q – Q utworzono również z użyciem pakietu qqman. Linkage disequilibrium D' oraz r^2 obliczono przy pomocy pakietu pegas.

Analiza pojedynczych polimorfizmów

Programowanie genetyczne jest narzędziem uczenia maszynowego służącym do wyboru zmiennych i cech w analizie danych pochodzących z mikromacierzy (Moore J., 2003). Wieloczynnikowa redukcja wymiarów (MDR - Multifactor dimensionality reduction) została wykorzystana do wykrycia wpływu wspólnego efektu kombinacji wielu SNP leżących na różnych chromosomach, na wystąpienie choroby (Gui J. i wsp., 2010). Wynikiem jest zbiór modeli, po dziesięć dla każdej rozważanej wielkości (ilości użytych SNP). Z tego zestawu wybierany jest model z kombinacją loci i czynników środowiskowych (podział na osobniki chore i kontrolę), który maksymalizuje spójność krosvalidacji i minimalizuje błąd predykcji. Ocena spójności 10-krotnej krosvalidacji jest określeniem ile razy ten sam model MDR jest identyfikowany w każdym z możliwych 9/10 badanych. Proces polega na tym, że prawdziwy sygnał (tj. asocjacja) w uczeniu maszynowym powinien być obecny w danych, niezależnie od sposobu ich podziału. Gdy spójność walidacji krzyżowej jest maksymalna dla jednego modelu, a błąd predykcji jest minimalny dla innego modelu, do wyboru najlepszego modelu jest używane kryterium parsymonii (Motsinger i Ritchie, 2005, Gui i wsp., 2013, Gui i wsp. 2010, Ritchie i wsp., 2001).

Dokładność równowagi (balance accuracy) została użyta jako miara oceny, do

uszeregowania potencjalnych modeli, a sprawdzenie krzyżowe (cross-validation) wykorzystano do wyboru najlepszych modeli (Moore J., 2003). Obliczenia wykonano przy użyciu programu MDR 3.0.2 (<http://sourceforge.net/projects/mdr/>). Do sprawdzenia istotności modelu wykorzystano test chi-kwadrat.

Analizę pojedynczego locus przeprowadzono uwzględniając cztery modele genetyczne (kodominujący, dominujący, recesywny i naddominujący). Modele zostały skonstruowane w odniesieniu do allelu rzadkiego. Wpływ częstości genotypów oraz pojedynczych alleli analizowano za pomocą dokładnego testu Fishera. Współczynnik szans (OR) został wykorzystany jako miara związku między padaczką, a genotypem oraz w celu określenia, czy dany genotyp może być traktowany jako czynnik ryzyka. Kryterium informacyjne Akaike (AIC) zostało użyte do oceny dopasowania modelu do danych. Przy analizie haplotypów uwzględniono trzy różne modele dziedziczenia (addytywny, dominujący i recesywny), wykorzystano metodę największej wiarygodności dla częstości występowania haplotypów i prawdopodobieństwa a posteriori, przy użyciu algorytmu maksymalizacji oczekiwań (EM). Przeprowadzono również analizę interakcji międzygenowych SNP x SNP, przy użyciu testu ilorazu wiarygodności, dla genów leżących na jednym chromosomie, rozpatrzono te same modele genetyczne jak dla analizy pojedynczego locus. Wymienione analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu R (version 1.9–2, R Foundation for Statistics Computing, <https://cran.r-project.org>). Wszystkie analizy statystyczne uznano za istotne gdy poziom istotności (p – value) $< 0,05$.

Analiza w obrębie genu ADAM23

Ponieważ wyniki w obrębie genu *ADAM 23* zostały opublikowane przez różne zespoły badawcze dla do różnych ras, a zestaw SNP był powtarzalny i obejmował również miejsca polimorficzne, możliwe było porównanie wyników opublikowanych i uzyskanych dla gończego polskiego. Do oceny wpływu poszczególnych SNP oraz bloku na wystąpienie padaczki idiopatycznej u wielu ras jednocześnie wybrano metaanalizę zobrazowaną przy pomocy wykresu leśnego. Metaanaliza jest narzędziem statystycznym do szacowania podstawowych efektów populacyjnych na podstawie zbioru badań empirycznych dotyczących tego samego problemu (Field & Gillett 2010). Przy jej pomocy syntetyzowane są wyniki pochodzące z niezależnych badań oraz możliwa jest ocena wpływu analizowanego czynnika w populacji, szczególnie, gdy

próby w pojedynczych eksperymentach były nieduże. Dzięki metaanalizie można podsumować i integrować dotychczasowe wyniki badań oraz sugerować kierunki przyszłych eksperymentów (Chan Arvey 2012).

Wszystkie analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu programu R (version 4.0.3, R Foundation for Statistics Computing, <https://cran.r-project.org>). Do obliczenia ogólnych odds ratio dla każdego SNP oraz bloku z uwzględnieniem wielu ras oraz artykułów w jednej analizie użyto metody Mantela-Haenszela. Do zbadania heterogenności grup, wymaganej aby przeprowadzić metaanalizę wykorzystano parametr I-kwadrat opisujący procent obserwowanej wariancji wynikający z różnicy w wielkości badanych efektów oraz test Chi-kwadrat. Obliczenia wykonano przy pomocy funkcji z pakietu meta (R version 4.0.3, R Foundation for Statistics Computing, <https://cran.r-project.org>). Analizę wrażliwości, wykrywającą wyniki odmienne wpływające na brak homogeniczności grup przeprowadzono przy pomocy wykresu Baujat, przedstawiającego udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności na osi poziomej w porównaniu do wpływu każdego badania (zdefiniowanego jako standaryzowana różnica kwadratów między ogólnymi oszacowaniami opartymi na modelu z efektem stałym z i bez i-tego badania zawartego w modelu) na osi pionowej, oraz przy pomocy wykresu lejkowego określającego relację między błędem standardowym oszacowań, a wielkością efektu uzyskanego przy pomocy funkcji funnel.plot (R version 4.0.3, R Foundation for Statistics Computing, <https://cran.r-project.org>). Badania odmienne od pozostałych usuwano, aby można było kontynuować metaanalizę rozpatrując model z efektem stałym. Wykresy leśne wykonano przy pomocy funkcji forest.plot z pakietu meta (R version 4.0.3, R Foundation for Statistics Computing, <https://cran.r-project.org>). Każdy SNP oraz blok były analizowane osobno.

Metaanalizę wykonano w celu sprawdzenia czy istnieją ogólne, uniwersalne dla wielu ras zależności między genotypem genu ADAM23, a wystąpieniem choroby. Ze względu na homogeniczność statystyczną grup wybrano model z efektem stałym, a jako miarę rozpatrywanego efektu wybrano Odds Ratio (OR). Liczbę obserwacji w grupie case – psy chore oraz control – psy zdrowe, pomnożono przez dwa aby uwzględnić, że na chromosomie autosomalnym osobnik ma dwa allele w danym SNP.

Efekt metaanalizy był ogólny wpływ pojedynczych SNP oraz bloku na wystąpienie padaczki idiopatycznej w grupie ras łącznie.

Wyniki

Badania rodowodowe

Według Rodowodowej Bazy Gończego Polskiego zarejestrowanych jest ogółem 10906 psów (5644 samców oraz 5258 suk) z czego żyjących 8146 (4140 samców oraz 4006 suk) (Baza Rodowodowa)(Wykres 1). Najczęściej użyty w hodowli reproduktor był ojcem 25 miotów, łącznie 197 szczeniąt, najczęściej używana suka hodowlana miała 7 miotów, łącznie 71 szczeniąt. Wśród wszystkich zarejestrowanych psów 1111 posiada uprawnienia hodowlane (493 samce oraz 618 suk) (Baza Rodowodowa). Wśród siedmiu z 10 najczęściej pojawiających się w hodowli reproduktorów, mających łącznie 1400 szczeniąt, stwierdzono potomstwo potencjalnie obciążone padaczką idiopatyczną, oraz wśród czterech z 10 suk o najliczniejszym potomstwie, mających łącznie 534 szczeniata. (Baza Rodowodowa) (Tabela 6, Tabela 7).

Wykres 1 Liczba żyjących osobników zarejestrowanych w bazie rodowodowej z podziałem na płeć, psy hodowlane oraz zarejestrowane w Związku Kynologicznym w Polsce

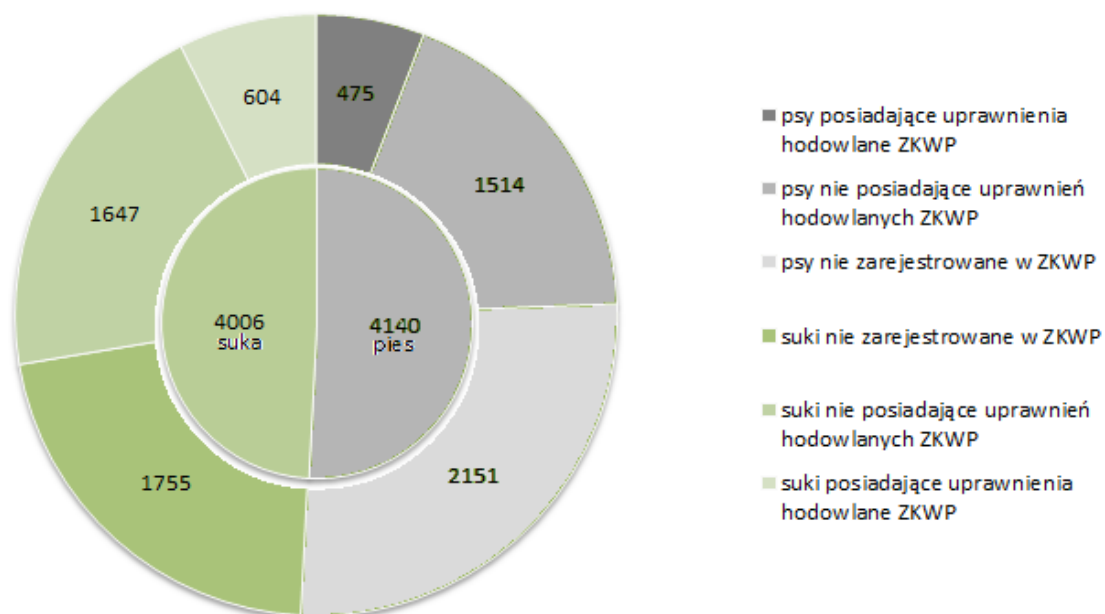


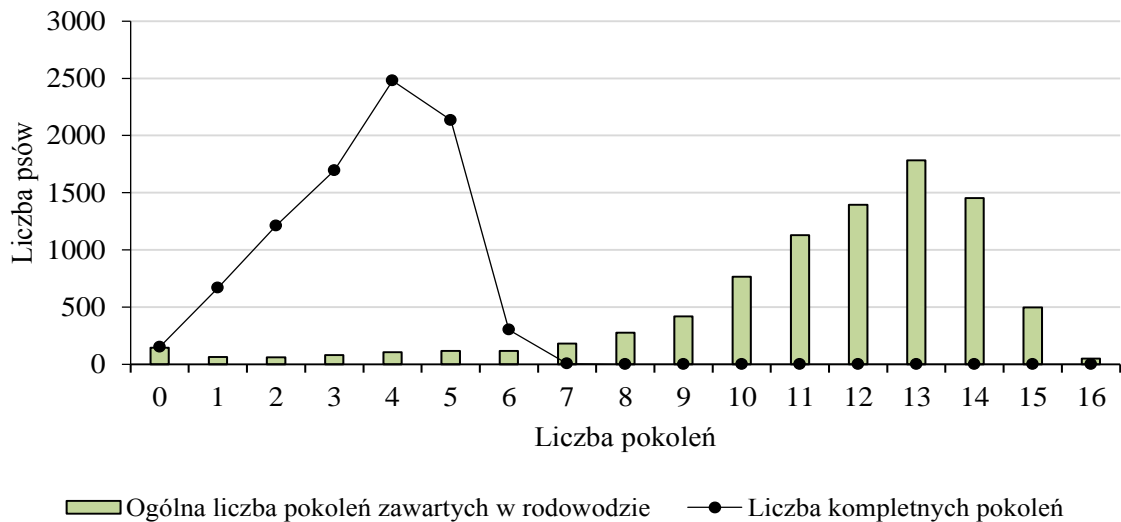
Tabela 6 Liczba potomstwa oraz występowanie padaczki idiopatycznej wśród 10 reproduktorów rasy gończy polski mających najliczniejsze potomstwo

	liczba potomstwa	padaczka
I	186	nosiciel
II	174	nosiciel
III	161	brak danych
IV	160	nosiciel
V	135	nosiciel
VI	123	nosiciel
VII	117	brak danych
VIII	108	chory
IX	101	brak danych
X	101	nosiciel

Wśród psów żyjących, znajdujących się w bazie, maksymalna liczba pokoleń w rodowodzie wynosi 16, a kompletnych (czyli ze znajomością obustronnie rodowodu) jedynie 6. Średnio psy mają informację o 12 pokoleniach przodków, natomiast pełną o 4 pokoleniach (Wykres 2).

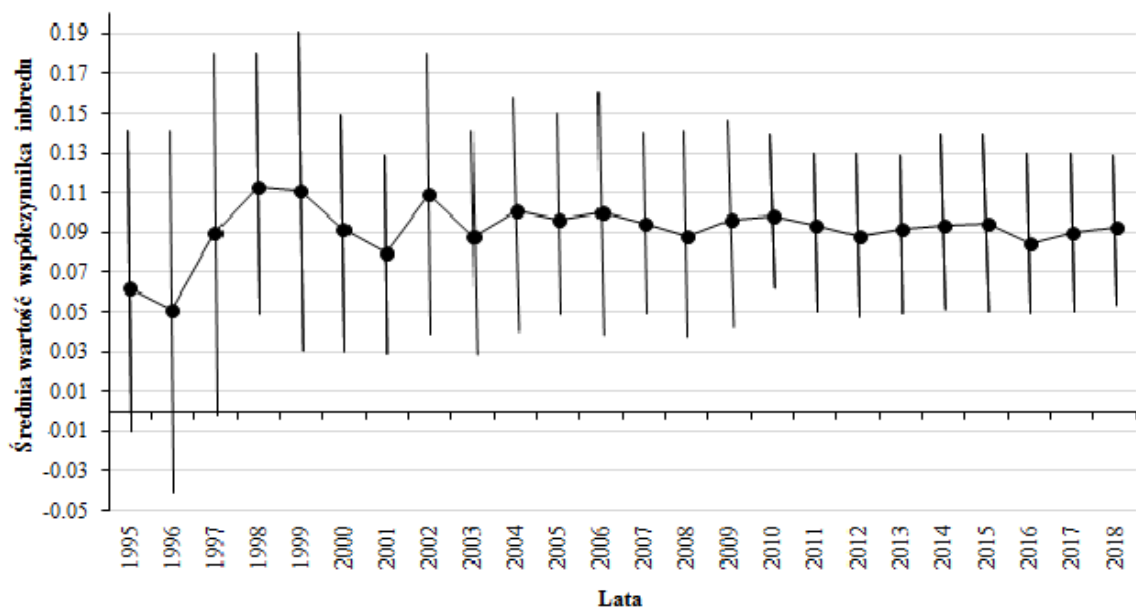
Tabela 7 Liczba potomstwa oraz występowanie padaczki idiopatycznej wśród 10 suk hodowlanych rasy gończy polski mających najliczniejsze potomstwo

	liczba potomstwa	padaczka
I	71	nosiciel
II	63	córka nosiciela
III	54	córka nosiciela
IV	53	córka 2 nosicieli
V	52	nosiciel
VI	51	córka 2 nosicieli
VII	50	brak danych
VIII	47	nosiciel
IX	47	brak danych
X	46	nosiciel



Wykres 2 Struktura populacji zależnie od liczby pokoleń przodków w rodowodzie

Średnia wartość współczynnika inbredu osobników urodzonych w poszczególnych latach do 2003 roku wahała się, przy czym odchylenie standardowe początkowo miało większe wartości, a potem ustabilizowała i od 2004 roku nie przekracza 0,1 (Wykres 3). Wśród osobników aktualnie żyjących średnia współczynnika inbredu wynosi $0,1 \pm 0,033$ a przeciętne spokrewnienie w populacji $0,21 \pm 0,024$. Do tego podsumowania wykorzystane zostały jedynie osobniki które mają kompletną informację o trzech lub więcej pokoleniach przodków.



Wykres 3 Zmiany średniego współczynnika inbredu dla osobników rodzących się w kolejnych latach

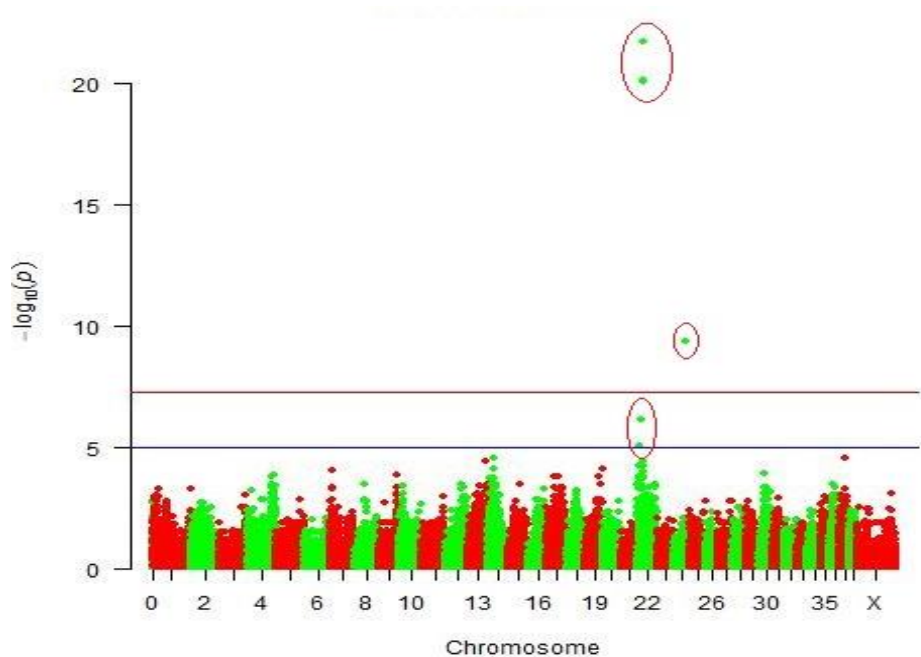
Wyniki GWAS

Po przeprowadzeniu analizy GWAS wyłoniono 6 istotnych SNP - BICF2P1268671 (chr.24 pos.34869455), BICF2G630322683 (chr.22 pos.20042412), BICF2G630322671 (chr.22, pos.20008605), BICF2G630318787 (chr.22 pos.12804034), BICF2S2327136 (chr.22 pos.14371069), BICF2G630322764 (chr.22 pos.20102489) (Tabela 8, Wykres 4). Na wykresie Q-Q można zauważyć rozbieżność między zakładanymi, a obserwowanymi wartościami odwrotnego logarytmu dziesiętnego prawdopodobieństwa. Biorąc pod uwagę niedużą liczebność próby, spokrewnienie wewnątrz rasy oraz fakt, że wartości te oscylują blisko zakładanych, nie stwierdzono bazując na p-value potencjalnie fałszywie pozytywnych asocjacji (Wykres 5).

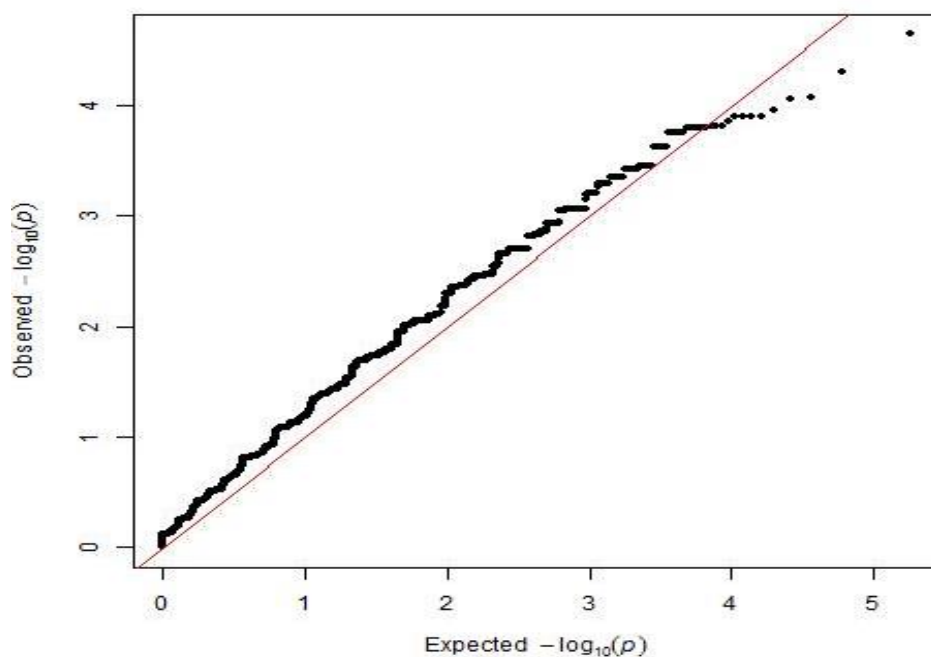
Tabela 8 Lista istotnych statystycznie SNP na podstawie wyników analizy GWAS

SNP	chromosom	pozycja	MAF	p-value
BICF2P1268671	24	34869455	0.33	4.41E-10
BICF2G630322683	22	20042412	0.29	2.00E-22
BICF2G630322671	22	20008605	0.27	6.87E-21
BICF2G630318787	22	12804034	0.26	7.59E-07
BICF2S2327136	22	14371069	0.14	7.59E-07
BICF2G630322764	22	20102489	0.20	8.82E-21

SNP – Single Nucleoid Polymorphism, MAF –Minor allele frequency



Wykres 4 Wskazane SNP dla markerów powiązanych z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego



Wykres 5 Porównanie uporządkowanych danych empirycznych z kwantylami teoretycznego rozkładu $-\log_{10}(p)$ dla analizy GWAS markerów powiązanych z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego

Na podstawie odległości oraz obliczonych wartości korelacji między regionami oraz wybranymi genami w pobliżu wyłonionych SNP (linkage disequilibrium $D' > 0.9$ oraz $r^2 > 0.9$), wybrano trzy geny kandydujące:

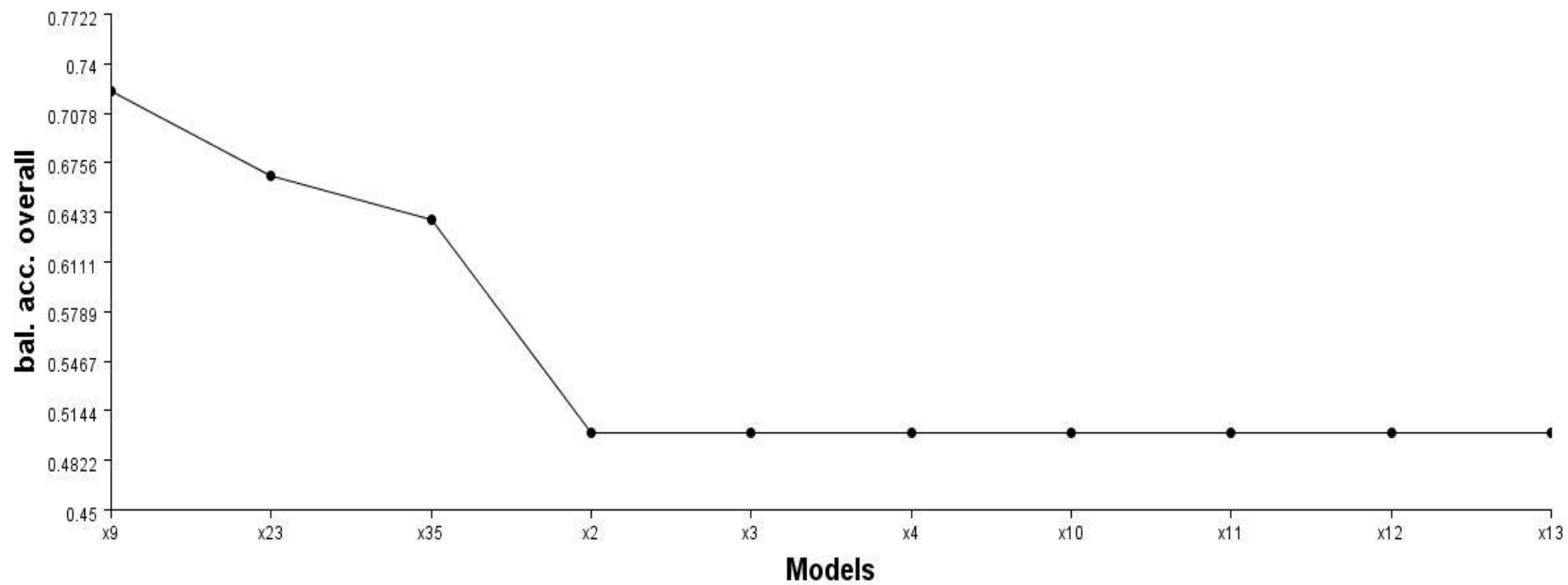
DOK5 (chr 24: 40,842,594-40,995,459) - Docking Protein 5, *PCDH9* (chr 22: 21,178,718-22,063,427) – Protokadheryna 9 (PCDH), *ARFGEF2* (chr 24: 34,891,422-34,987,404) - ADP-ribosylation factors (ARFs). Do dalszych analiz dołączono gen najczęściej występujący w literaturze *ADAM23* (chr 37: 14,933,217-15,098,305) - ADAM metallopeptidase domain 23.

Wyniki w obrębie pojedynczych polimorfizmów

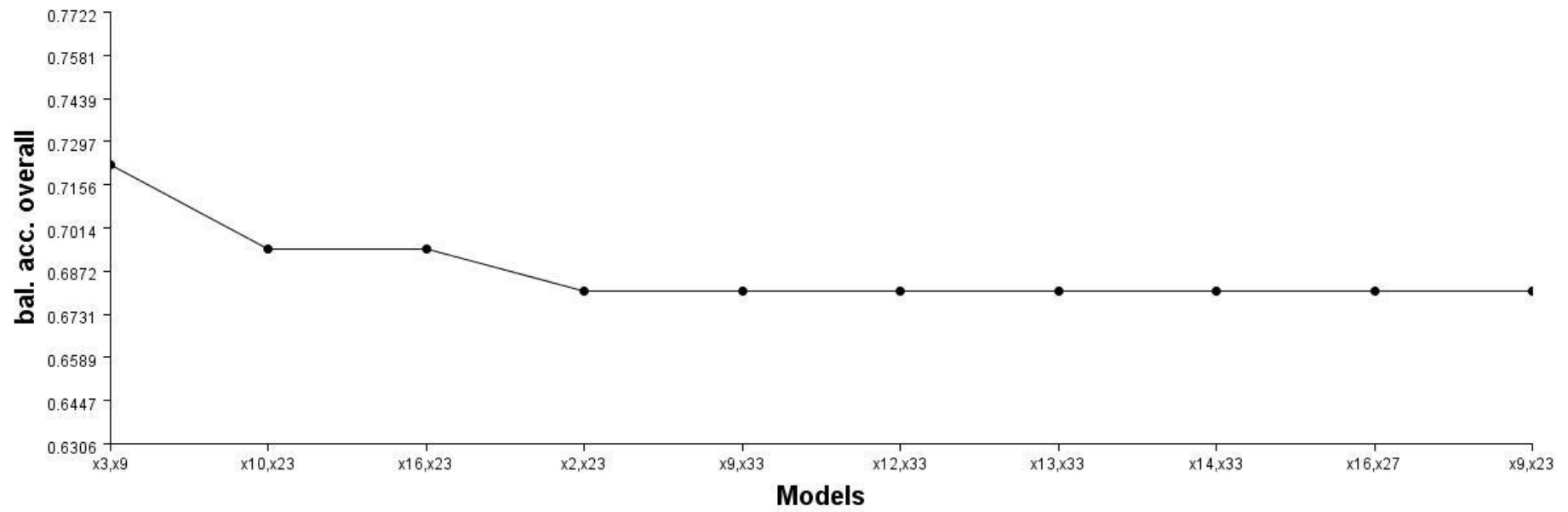
Przeanalizowano 40 SNP w obrębie czterech genów – *ADAM23*, *DOK5*, *ARFGEF2*, *PCDH9*. W 12 przypadkach nie było równowagi Hardygo-Weinberga (p -value < 0.05), więc wyłączono te SNP z dalszej analizy (Tabela 9). W wyniku analizy MDR otrzymano modele i układy genotypów o największym prawdopodobieństwie korelacji z wystąpieniem padaczki, uszeregowano je na podstawie dokładności równowagi oraz sprawdzenia krzyżowego (Wykres 6 - 10). Wybrano SNP, które w odpowiednich zestawieniach mogą zwiększać szansę wystąpienia choroby. Analizowano modele od 1 do 5 loci (Tabela 10-11, Schemat 3). Jako najlepszy model 1 locus wyłoniono SNP x9 (BICF2P1032728) w obrębie genu *DOK5*. Do grupy chorych z największym prawdopodobieństwem przyporządkowano układ heterozygotyczny (OR = 7.86), wystąpienie pozostałych genotypów sprawiało, że osobnik był przypisany do grupy zwierząt zdrowych. W modelu dwuczynnikowym najlepsze dopasowanie uzyskano dla SNP x3 (BICF2P152556) w obrębie genu *ADAM23* i x9 (BICF2P1032728) w genie *DOK5*. Wystąpienie układu homozygotycznego dominującego x3 w połączeniu z heterozygotycznym układem w x9 skutkowało przypisaniem do klasy osobników chorych (OR = 16). Model trzech, czterech i pięciu loci zawierał SNP leżące w obrębie genów *ADAM23*, *DOK5* oraz *PCDH9*. SNP x3 (BICF2P152556) występował we wszystkich konfiguracjach w postaci homozygoty, x4 (BICF2P434501) w postaci homozygoty dominującej lub heterozygoty, x9 (BICF2P1032728) jako układ heterozygotyczny, x29 (BICF2G630323614) jako homozygota dominująca, a x30 (BICF2P618948) jako homozygota recesywna lub heterozygota.

Tabela 9 Lista analizowanych SNP wraz ze sprawdzeniem istotności (p – value) zgodności z równowagą Hardyego-Weinberga

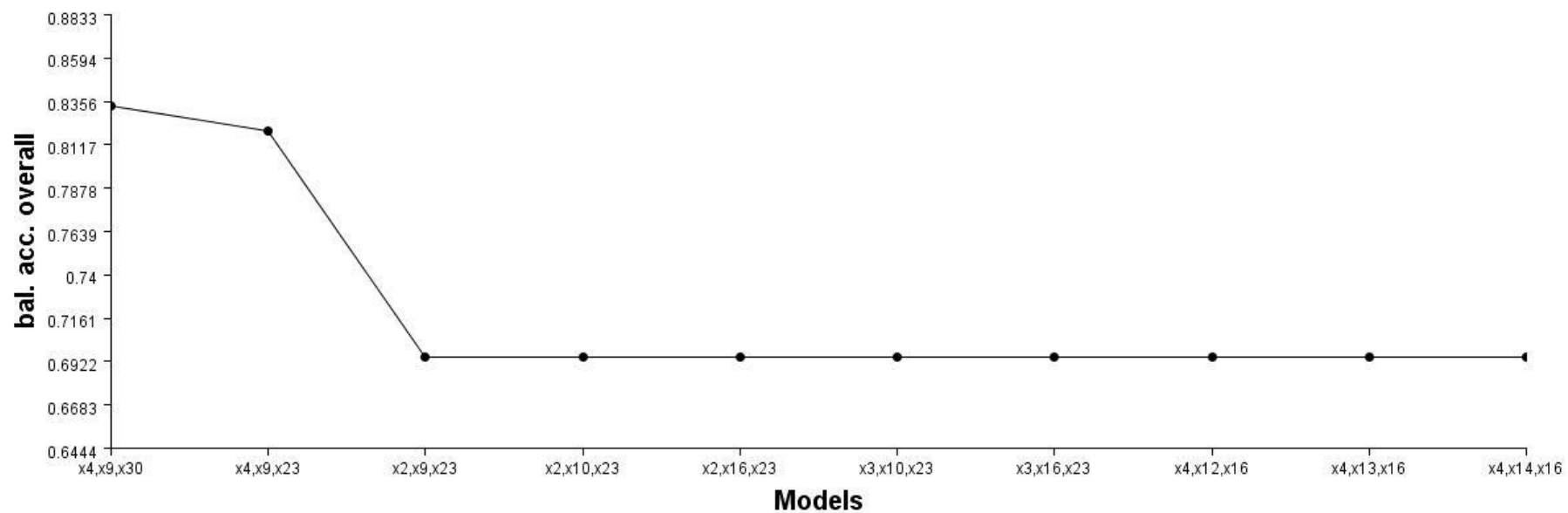
SNP	GEN	KONTROLA	CHORE	WSYZSTKIE	numer MDR
BICF2P1240823	<i>ADAM23</i>	0.0002	0.0005	1	x1
BICF2P693492	<i>ADAM23</i>	1	1	1	x2
BICF2P152556	<i>ADAM23</i>	0.1628	0.2198	1	x3
BICF2P434501	<i>ADAM23</i>	0.6633	1	0.5293	x4
BICF2P1290526	<i>ADAM23</i>	-	-	-	x5
BICF2P126358	<i>ADAM23</i>	-	-	-	x6
BICF2S2395334	<i>ADAM23</i>	-	-	-	x7
BICF2P1131874	<i>ADAM23</i>	-	-	-	x8
BICF2P1032728	<i>DOK5</i>	0.3533	1	0.0631	x9
BICF2S2296921	<i>DOK5</i>	0.7103	0.2329	0.5293	x10
BICF2S22943715	<i>DOK5</i>	0.1683	0.0771	1	x11
BICF2S2323046	<i>DOK5</i>	1	1	1	x12
BICF2S2322479	<i>DOK5</i>	0.6583	0.6324	1	x13
BICF2S23640303	<i>DOK5</i>	0.6203	0.5886	1	x14
BICF2P1021165	<i>DOK5</i>	0.492	0.2606	1	x15
BICF2S23511433	<i>DOK5</i>	1	0.6324	0.4874	x16
BICF2S2291355	<i>DOK5</i>	0.0515	0.0301	1	x17
BICF2S23513531	<i>DOK5</i>	1	1	1	x18
BICF2P91240	<i>PCDH9</i>	0.0821	0.3167	0.1031	x19
BICF2P8314	<i>PCDH9</i>	-	-	-	x20
BICF2G630323504	<i>PCDH9</i>	0.7511	1	1	x21
BICF2G630323533	<i>PCDH9</i>	0.0002	0.0005	1	x22
BICF2G630323538	<i>PCDH9</i>	1	1	1	x23
TIGRP2P290930_rs8706370	<i>PCDH9</i>	0.4567	1	0.1945	x24
BICF2P1014833	<i>PCDH9</i>	0.0806	0.0593	1	x25
TIGRP2P290949_rs8766113	<i>PCDH9</i>	0	0	1	x26
BICF2G630323600	<i>PCDH9</i>	0.3127	0.4587	0.5293	x27
BICF2G630323605	<i>PCDH9</i>	1	1	1	x28
BICF2G630323614	<i>PCDH9</i>	0.0471	0.051	1	x29
BICF2P618948	<i>PCDH9</i>	0.4155	0.164	1	x30
BICF2G630323645	<i>PCDH9</i>	1	0.7005	0.4874	x31
BICF2P452858	<i>PCDH9</i>	0.3516	1	0.2053	x32
BICF2G630323662	<i>PCDH9</i>	0.2142	0.0683	0.4874	x33
BICF2G630323683	<i>PCDH9</i>	1	0.3071	0.5176	x34
BICF2S23440437	<i>PCDH9</i>	0.7456	0.693	0.2815	x35
BICF2G630323722	<i>PCDH9</i>	0.0959	0.0308	1	x36
BICF2P116116	<i>PCDH9</i>	-	-	-	x37
BICF2P912253	<i>ARFGEF2</i>	0.0169	0.0152	1	x38
TIGRP2P317678_rs8946978	<i>ARFGEF2</i>	-	-	-	x39
TIGRP2P317757_rs9088872	<i>ARFGEF2</i>	0	0	1	x40



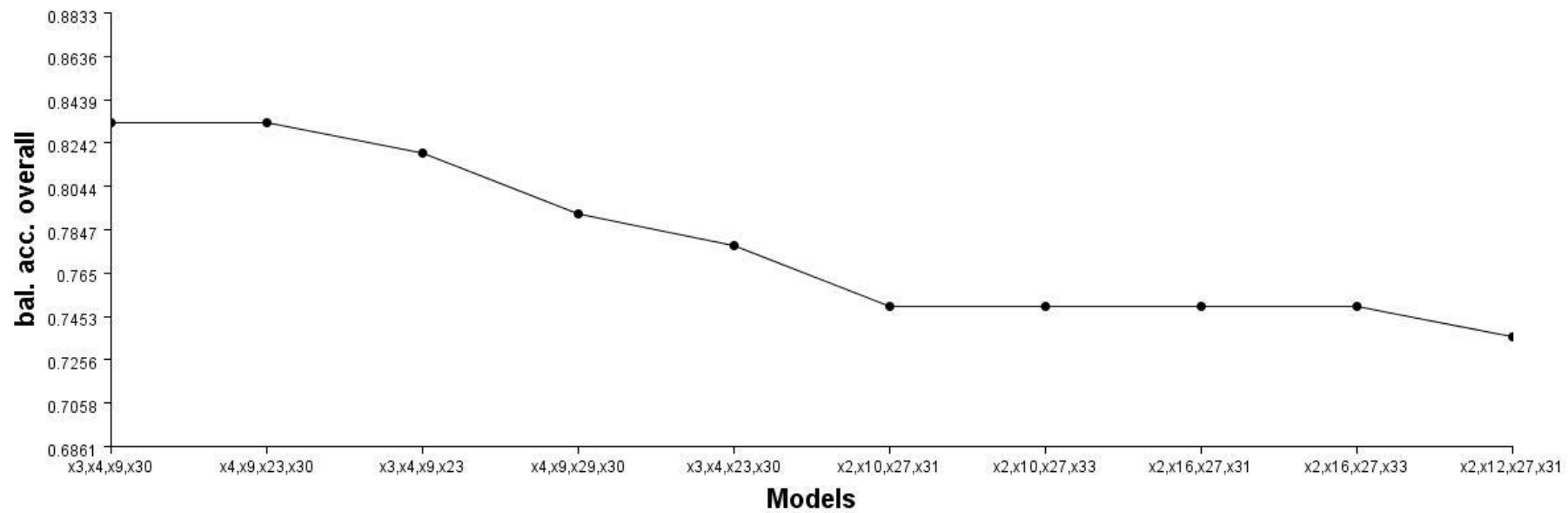
Wykres 6 Oszacowana dokładność równowagi (balance accuracy) dla modeli jednego locus w MDR (Multifactor dimensionality reduction)



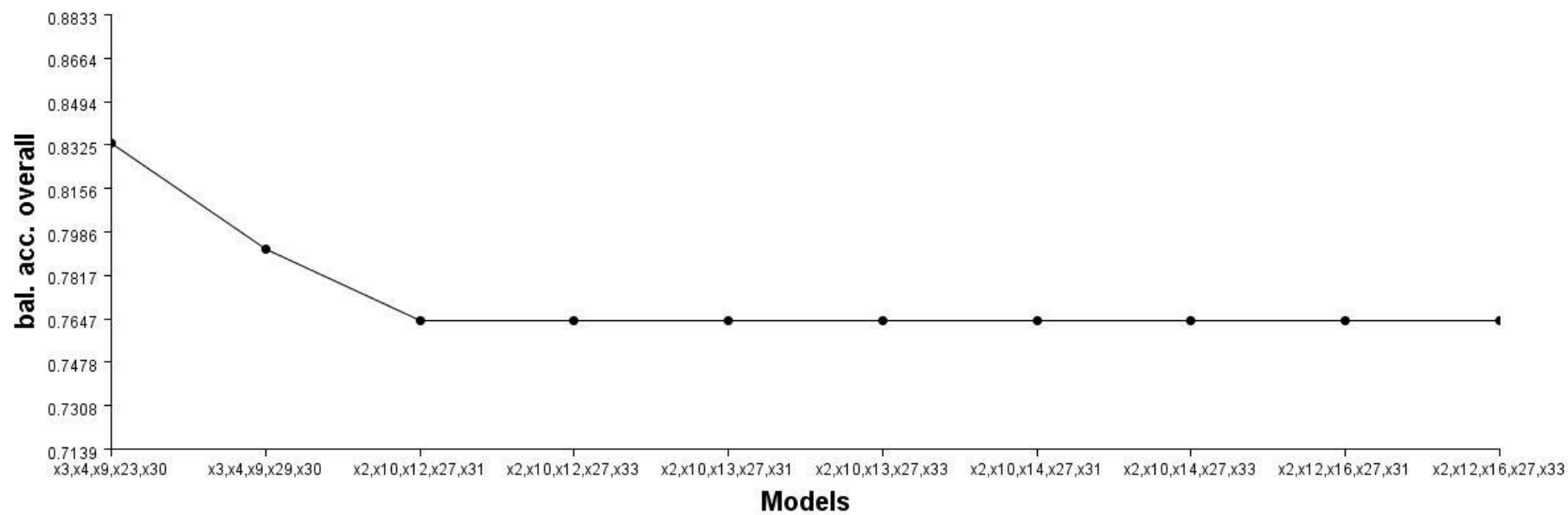
Wykres 7 Oszacowana dokładność równowagi (balance accuracy) dla modeli dwóch loci w MDR (Multifactor dimensionality reduction)



Wykres 8 Oszacowana dokładność równowagi (balance accuracy) dla modeli trzech loci w MDR (Multifactor dimensionality reduction)



Wykres 9 Oszacowana dokładność równowagi (balance accuracy) dla modeli czterech loci w MDR (Multifactor dimensionality reduction)



Wykres 10 Oszacowana dokładność równowagi dla modeli pięciu loci w MDR

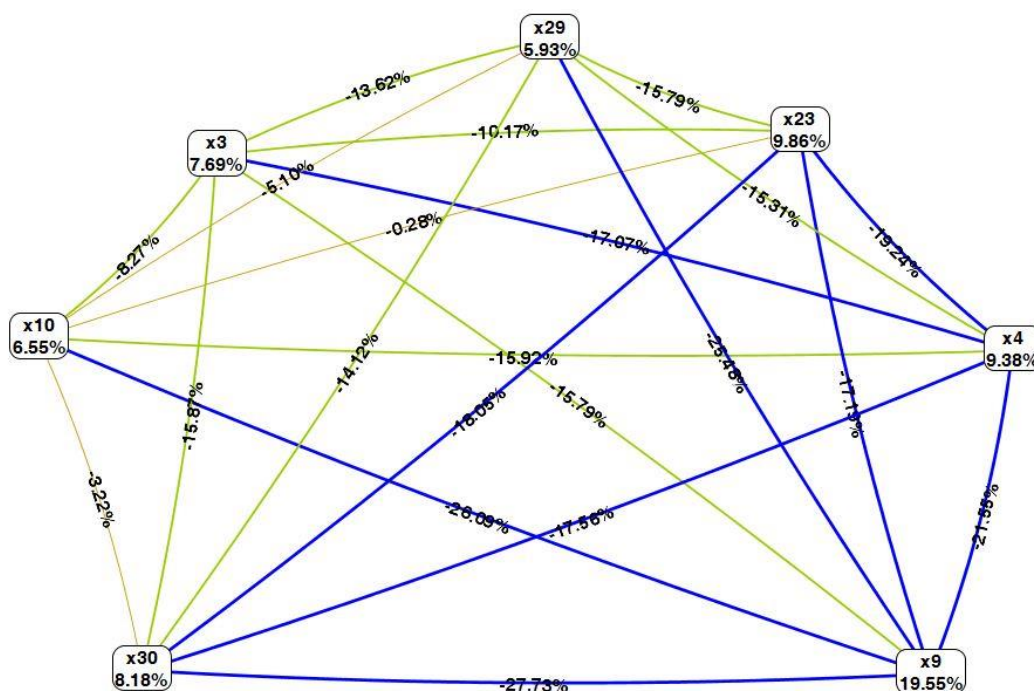
Tabela 10 SNP wskazane jako najlepsze modele, przy użyciu algorytmu wykorzystywanego przez MDR z dopasowaniem modelu oraz ilorazem szans przyporządkowania osobnika do klasy chorych

Najlepszy model	p-value	Balanced accuracy	OR	95% CI	
x9	0.0077	0.72	7.86	1.49	41.30
x3, x9	0.0020	0.77	16.00	1.89	146.95
x4,x9,x30	0.0001	0.83	33.00	5.67	192.18
x3, x4, x9, x30	0.0001	0.83	33.00	5.67	192.18
x3,x4,x9,x29,x30	0.0001	0.79	22.00	4.08	118.57

Tabela 11 Układy alleli sprawiające, że na podstawie algorytmu MDR przypisano osobnika do klasy chorych z większym prawdopodobieństwem

model	x3	x4	x9	x29	x30	przewidywana klasa
1 locus	-	-	Aa	-	-	CHORE
2 loci	AA	-	Aa	-	-	CHORE
3 loci	-	AA	Aa	-	Aa	CHORE
3 loci	-	Aa	Aa	-	aa	CHORE
4 loci	AA	AA	Aa	-	Aa	CHORE
4 loci	AA	Aa	Aa	-	aa	CHORE
5 loci	AA	AA	Aa	AA	Aa	CHORE
5 loci	AA	Aa	Aa	AA	aa	CHORE

Po przeprowadzeniu bardziej precyzyjnej analizy pojedynczych locus wybrano trzy SNP mające istotny związek z wystąpieniem padaczki, są to te same SNP, które zostały wyłonione przy pomocy algorytmu wykorzystywanego przez MDR jako najlepsze dla modelu 1 locus (x9, x23, x35) (Wykres 6). Pierwszy z nich x9 (BICF2P1032728) leży w obrębie genu *DOK5*, istotna korelacja genotypu z wystąpieniem padaczki stwierdzono przy założeniu modelu kodominującego ($p = 0.04$). Żaden z chorych osobników nie był homozygotą dominującą AA. Wśród osobników zdrowych występowały wszystkie genotypy. W modelu dominującym ($p = 0.02$) oraz naddominującym ($p = 0.03$) wykazano również istotny statystycznie związek z wystąpieniem padaczki, przy czym genotyp Aa miał ponad 5 krotnie większą szansę wystąpienia choroby niż genotyp AA-aa (OR = 5.36) (Tabela 12).



Schemat 3 Mapa interakcji w odniesieniu do padaczki idiopatycznej. Węzły reprezentują wpływ konkretnego genotypu na klasę fenotypową, a linie je łączące reprezentują wpływ interakcji.

Kolejnym SNP związanym z chorobą był x23 (BICF2G630323538) leżący w obrębie genu *PCDH9*. W modelu dominującym genotyp AA zwiększał prawie 5 krotnie szansę wystąpienia choroby ($p = 0.03$, $OR = 0.21$) (Tabela 13). W trzecim rozpatrywanym SNP x35 (BICF2S23440437), leżącym również w obrębie genu *PCDH9* model recesywny AA-Aa vs. aa ($p = 0.02$) wykazał, że wystąpienie genotypu aa ponad 8 krotnie zwiększało szansę wystąpienia choroby ($OR = 8.5$), a samo wystąpienie allelu rzadkiego a zwiększało ją ponad 2 krotnie ($p = 0.01$, $OR = 0.39$) (Tabela 14). W analizie związku haplotypów BICF2G630323538 i BICF2S23440437 z padaczką idiopatyczną wykazano, że układ dwóch alleli dominujących w modelu addytywnym zmniejszał szansę wystąpienia choroby ($p = 0.01$). Taki układ haplotypów występował u 18 % osobników chorych oraz u 53 % osobników zdrowych (Tabela 15). Nie stwierdzono interakcji między wybranymi SNP.

Tabela 12 Analiza asocjacji SNP x9 (BICF2P1032728) w obrębie genu *DOK5* z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego

Model		KONTROLA	%	CHORE	%	OR	95% CI		p-value	AIC
Kodominujący	AA	10	34,5	0	0	1			0,04	47
	Aa	14	48,3	10	83,3		0			
	aa	5	17,2	2	16,7		0			
Dominujący	AA	10	34,5	0	0	1			0,02	45,4
	Aa-aa	19	65,5	12	100		0			
Recesywny	AA-Aa	24	82,8	10	83,3	1			0,96	53,6
	aa	5	17,2	2	16,7	0,96	0,16	5,8		
Naddominujący	AA-aa	15	51,7	2	16,7	1			0,03	48,9
	Aa	14	48,3	10	83,3	5,36	0,99	28,85		
Allel	A	34	58,62	10	41,67	1				
	a	24	41,38	14	58,33	1,97	0,68	5,87	0,22	

A – Allel dominujący, a – allel recesywny

Tabela 13 Analiza asocjacji SNP x23 (BICF2G630323538) w obrębie genu *PCDH9* z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego

Model		KONTROLA	%	CHORE	%	OR	95% CI		p-value	AIC
Kodominujący	AA	6	17,6	6	50	1			0,07	53,4
	Aa	18	52,9	5	41,7	0,28	0,06	1,25		
	aa	10	29,4	1	8,3	0,1	0,01	1,04		
Dominujący	AA	6	17,6	6	50	1			0,03	52,3
	Aa-aa	28	82,4	6	50	0,21	0,05	0,9		
Recesywny	AA-Aa	24	70,6	11	91,7	1			0,11	54,3
	aa	10	29,4	1	8,3	0,22	0,02	1,92		
Naddominujący	AA-aa	16	47,1	7	58,3	1			0,50	56,4
	Aa	18	52,9	5	41,7	0,63	0,17	2,4		
Allel	A	30	44,12	17	70,83	1				
	a	38	55,88	7	29,17	5,43	0,64	256,89	0,13	

A – Allel dominujący, a – allel recesywny

Tabela 14 Analiza asocjacji x35 (BICF2S23440437) w obrębie genu *PCDH9* z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego

Model		KONTROLA	%	CHORE	%	OR	95% CI		p-value	AIC
Kodominujący	AA	18	50	4	33,3	1			0,06	54,5
	Aa	16	44,4	4	33,3	1,13	0,24	5,25		
	aa	2	5,6	4	33,3	9	1,2	67,42		
Dominujący	AA	18	50	4	33,3	1			0,31	57
	Aa-aa	18	50	8	66,7	2	0,51	7,84		
Recesywny	AA-Aa	34	94,4	8	66,7	1			0,02	52,5
	aa	2	5,6	4	33,3	8,5	1,32	54,82		
Naddominujący	AA-aa	20	55,6	8	66,7	1			0,50	57,5
	Aa	16	44,4	4	33,3	0,62	0,16	2,46		
Allel	A	20	27,78	12	50	1				
	a	52	72,22	12	50	0,39	0,19	0,77	0,01	

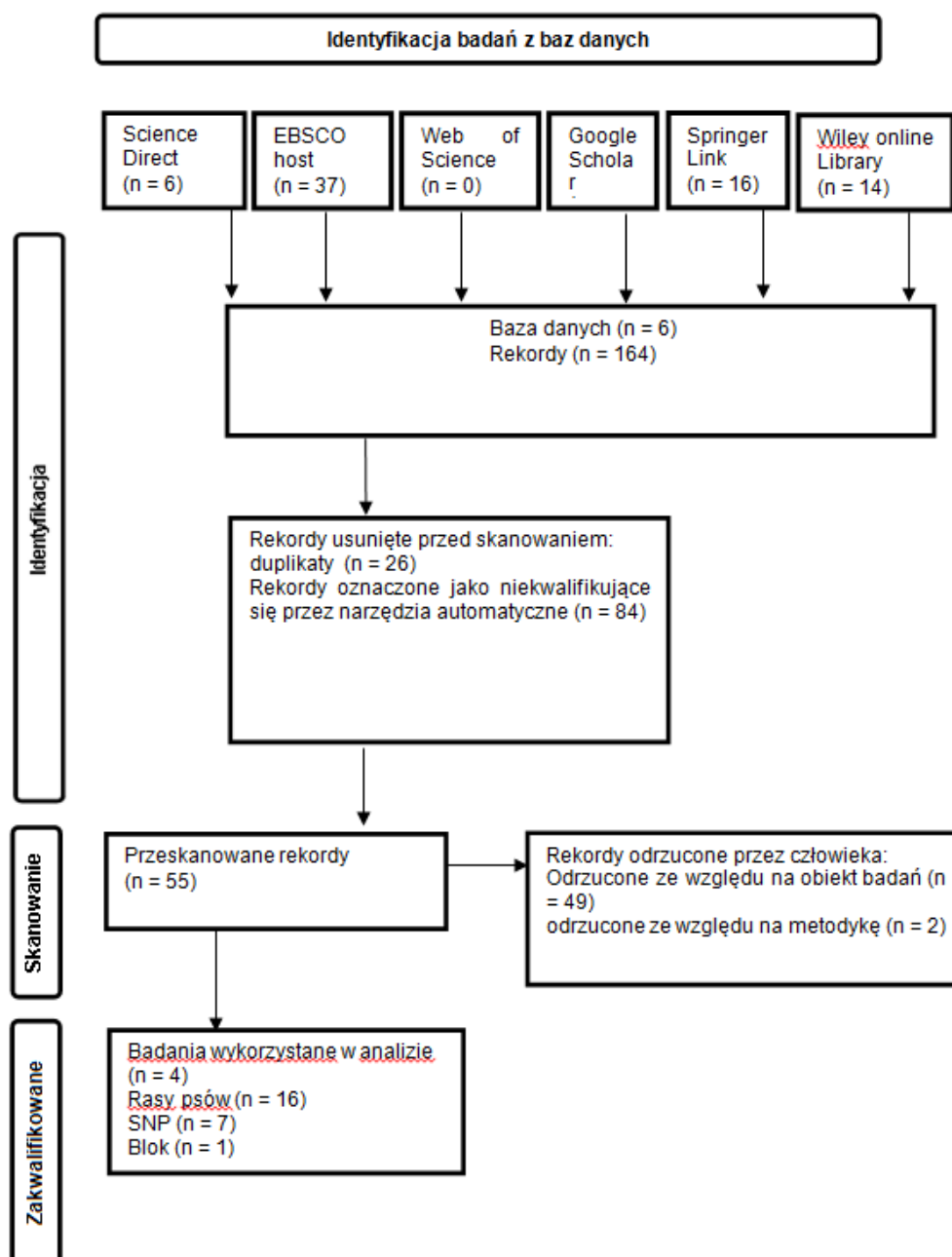
A – Allel dominujący, a – allel recesywny

Tabela 15 Analiza związku haplotypów BICF2G630323538 i BICF2S23440437 w obrębie genu *PCDH9* z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego

Haplotyp (BICF2G630323538, BICF2S23440437)		częstotliwość występowania haplotypu (%)			addytywny (score = 7.93, p-val = 0.04)		dominujący (score = 10.95, p- val = 0.03)		recesywny (score = 1.50, p-val = 0.22)	
		WSZYSTKIE	CHORE	KONTROLA	score	p-value	score	p-value	score	p-value
A	A	0,44	0,18	0,53	-2,76	0,01	-3,23	0,00	-1,23	0,22
a	A	0,22	0,11	0,04	1,00	0,32	0,44	0,66	NA	NA
A	a	0,05	0,32	0,19	1,05	0,29	1,05	0,29	NA	NA
a	a	0,28	0,39	0,24	1,65	0,10	1,46	0,15	NA	NA

NA - not applicable, A – Allel dominujący, a – allel recesywny

Wyniki w obrębie genu *ADAM23*



Schemat 4 Selekcja badań z baz danych

Proces wyboru artykułów do metaanalizy wpływu genu *ADAM23* na padaczkę idiopatyczną u psów był kilkustopniowy. Wyboru artykułów dokonano ze względu na fakt, że kilku autorów podejmuje badania dotyczące tych samych SNP oraz bloku dla różnych ras, a tylko w przypadku kilku różnych artykułów dotyczących tej samej tematyki metaanaliza jest możliwa do przeprowadzenia.

Początkowo przy użyciu programu Systematic Review Accelerator Polyglot wybrano 164 prace z 6 baz naukowych. Następnie artykuły selekcyjonowano automatycznie przy pomocy programu Screenator usuwając te dotyczące ludzi, myszy, kotów. Odrzucono artykuły w języku innym niż angielski oraz zastosowano program Deduplicator do usunięcia duplikatów. W efekcie liczba zmniejszyła się do 54, a po przeskanowaniu ręcznie zostawiono 5 artykułów. Z tej grupy odrzucono kolejne dwa artykuły ze względu na odmienną metodykę badawczą i brak możliwości włączenia wyników do metaanalizy. Dokładny proces selekcji przedstawiono na schemacie 3 (Schemat 4).

W wybranych pracach badania nad występowaniem padaczki idiopatycznej prowadzono u następujących rasy psów: owczarek belgijski, kromfohrlander, whippet, szpic fiński, lagotto romagnolo, pinczer miniaturowy, border terrier, schipperke, fiński lapphund, beagle (polująca linia z Finlandii), beagle, owczarek australijski, seter irlandzki, labrador retriever, owczarek pirenejski, gończy polski. Po przeanalizowaniu modelu odrzucono wyniki fińskich lapphundów, jako najbardziej oddziałujące na brak homogeniczności grup, użyto modelu z efektem stałym. Na wykresie MDS według Kroskinen i wsp. (2015) Fińskie polujące Beagles stanowiły osobną populację od pozostałych, w związku z czym w analizie zostały potraktowane jako osobna rasa. Być może fakt utrzymywania ich w czystości linii aby wzmocnić ich cechy użytkowe wpłynął na zmianę frekwencji rozpatrywanych alleli.

Do analizy wybrano artykuły : (Seppala i wsp., 2012), (Koskeinen i wsp., 2015), (Koskeinen i wsp., 2017), (Garbacz i wsp., ...) z opublikowanych danych wybrano 7 SNP oraz 1 blok.

Wybrane SNP (7) : 15085438 (BICF2S23030950), 15106446 (BICF2P1021781), 15108593, 15108802, 15111724 (BICF2P1131874), 15113325, 18123961 (BICF2P890779)

Blok (1) : 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 (allele T-C-del-del-G-G)

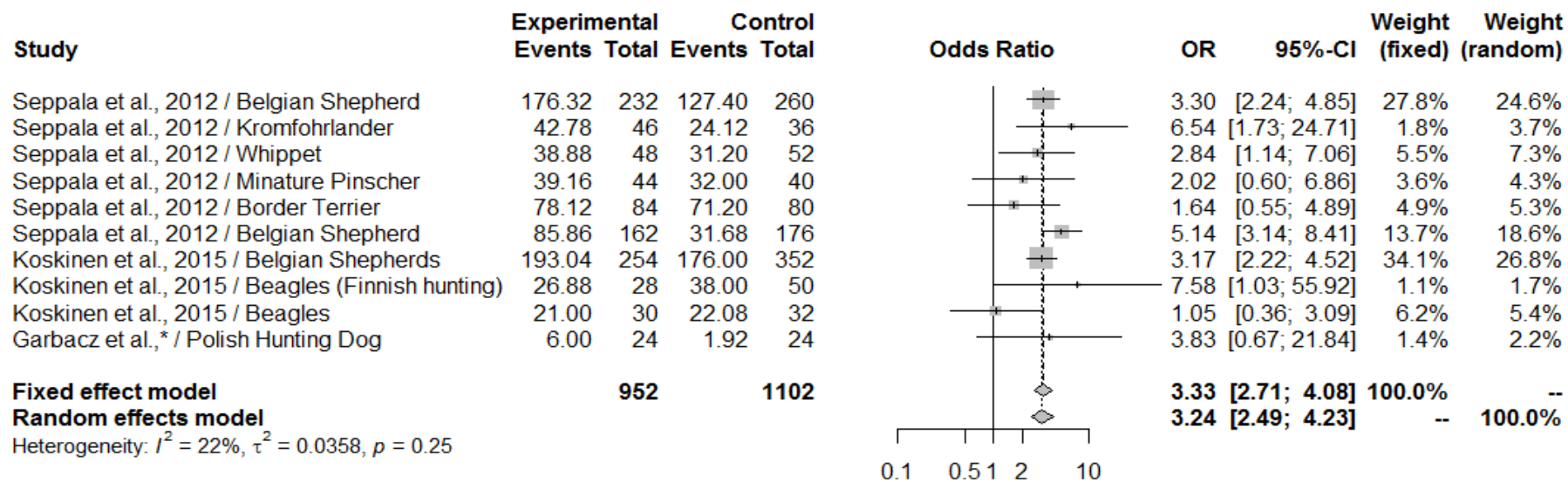
Wyniki metaanalizy przedstawione na wykresach 11 – 22 pokazują oszacowanie heterozygotyczności oraz OR, zarówno dla poszczególnych badań, jak i potraktowane jako efekt łączny (Wykres 11 – 22). Wielkość zacienionych kwadratów obrazuje wpływ danego badania na ogólny wynik, a poziome linie pokazują wielkość przedziału ufności. Największe ryzyko pojawienia się choroby było powiązane z obecnością allelu A w 18123961 (BICF2P890779) dla ras owczarek belgijski, kromfohrlander, whippet, pinczer miniaturowy, border terrier, beagle (polująca linia z Finlandii), beagle, gończy

polski z ilorazem szans $OR = 3.33$. Oprócz fińskich lapphundów, lagotto romagnolo zostały również odrzucone ze względu na dużą odmiennność wyników i wpływ na homogeniczność grup, za to rasy szpic fiński i schipperke zostały odrzucone ze względu na brak zmienności w danym SNP. Ostatecznie heterogeniczność wyniosła $I2 = 22\%$, a $p = 0.27$ (Wykres 11 - 13).

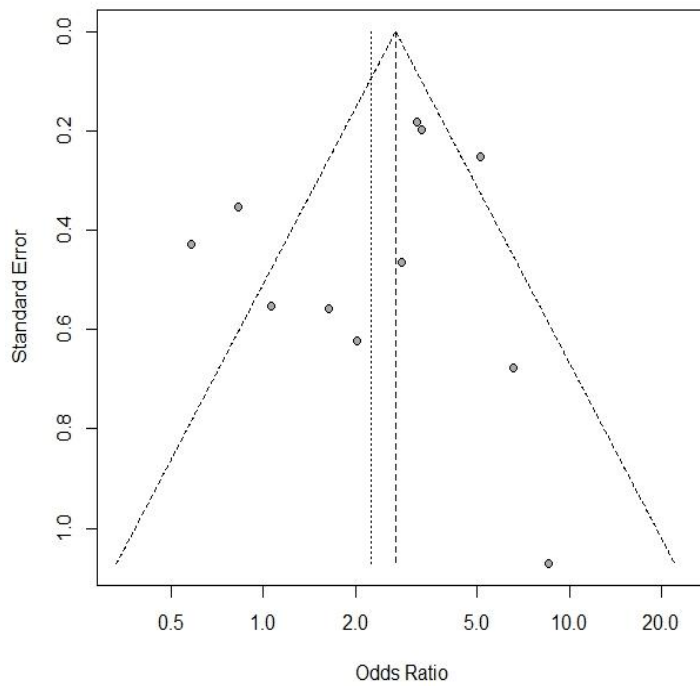
Dla 15111724 (BICF2P1131874) łączny wynik ilorazu szans w rasach : owczarek australijski, seter irlandzki, kromfohländer, labrador retriever, pinczer miniaturowy, owczarek pirenejski, whippet, owczarek belgijski, schipperkes, szpic fiński, beagle (polująca linia z Finlandii), beagle, gończy polski wynosił $OR = 2.76$ dla $I2 = 17\%$ i $p = 0.27$. Allelem ryzyka był allel G (Wykres 14 - 16).

Grupa SNP, które miały jednakowy wpływ na wystąpienie padaczki z $OR = 2.74$ to 15106446 (BICF2P1021781) ($I2 = 28\%$, $p = 0.17$, allel ryzyka C), 15108593 ($I2 = 26\%$, $p = 0.19$, allel ryzyka del) oraz 15113325 ($I2 = 33\%$, $p = 0.12$, allel ryzyka G) w rasach owczarek australijski, seter irlandzki, kromfohländer, labrador retriever, pinczer miniaturowy, owczarek pirenejski, whippet, owczarek belgijski, schipperkes, szpic fiński, beagle (polująca linia z Finlandii), beagle. Dla tych samych ras najmniejszy wpływ SNP na wystąpienie padaczki z $OR = 2.72$ wykazano dla zbiorczego efektu w dwóch SNP 15085438 (allel ryzyka T) oraz 15108802 (allel ryzyka del). Heterogeniczność grup wyniosła odpowiednio 44% , $p = 0.05$ oraz 27% , $p = 0.18$ (Wykres 17 - 19).

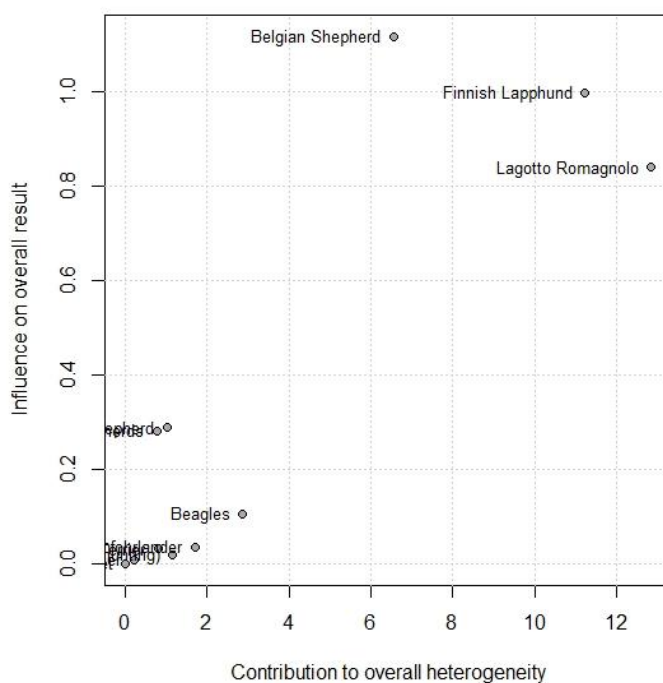
W bloku 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 (allele T-C-del-del-G-G) w metaanalizie otrzymano $OR = 2.81$. Wystąpienie wyżej wymienionego układu alleli podwyższało ryzyko wystąpienia padaczki idiopatycznej ponad 2.5 krotnie dla rasy owczarek australijski, seter irlandzki, kromfohländer, labrador retriever, pinczer miniaturowy, owczarek pirenejski, whippet, owczarek belgijski, schipperke, szpic fiński, beagle (polująca linia z Finlandii), beagle. Ostatecznie grupy miały wynik heterogeniczności $I2 = 25\%$, $p = 0.20$ (Wykres 20 - 22).



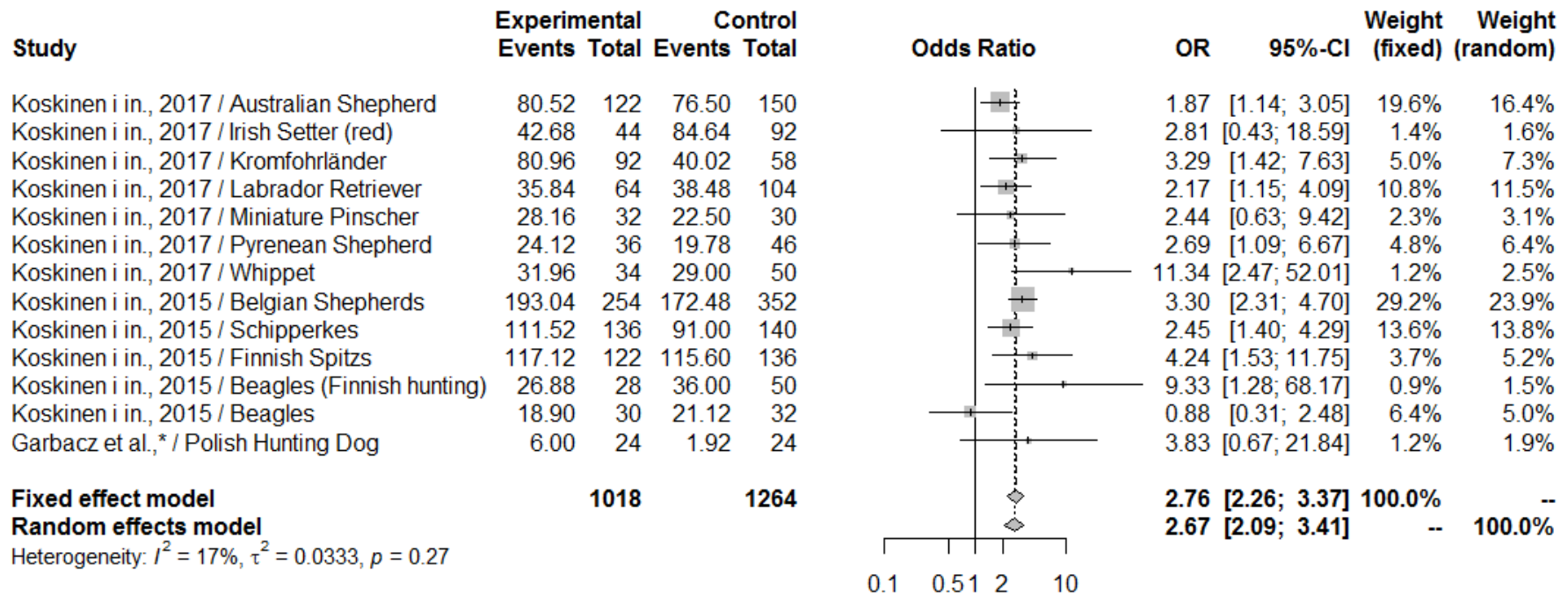
Wykres 11 Zbiorcze wyniki OR dla zależności między SNP 18123961, a padaczką idiopatyczną



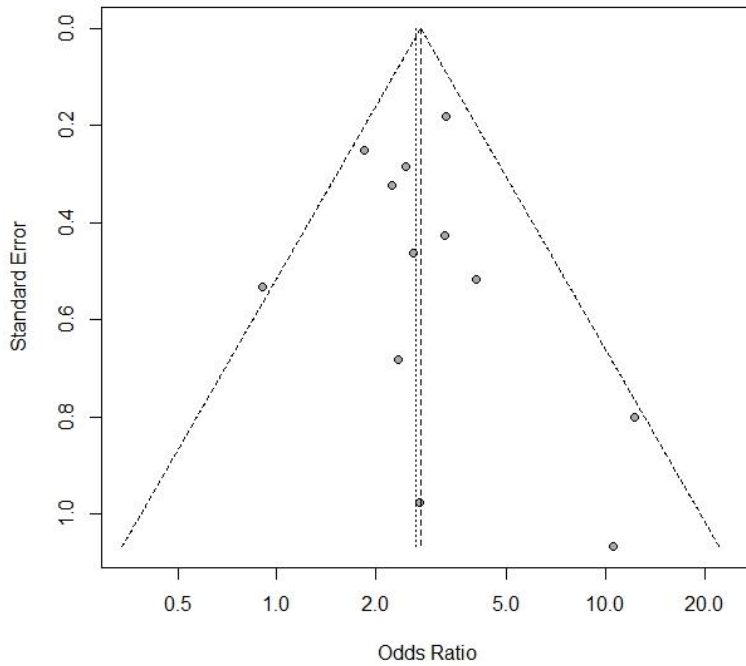
Wykres 12 Wykres lejkowy obrazujący relację między błędem standardowym oszacowań, a wielkością Odds Ratio dla SNP 18123961



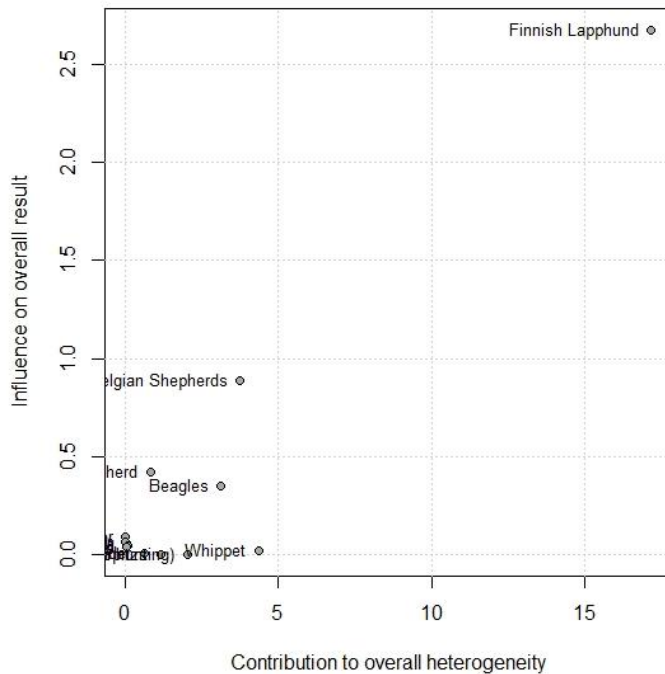
Wykres 13 Wykres Baujat obrazujący udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności w odniesieniu do wpływu każdego badania na brak homogeniczności grup dla SNP 18123961



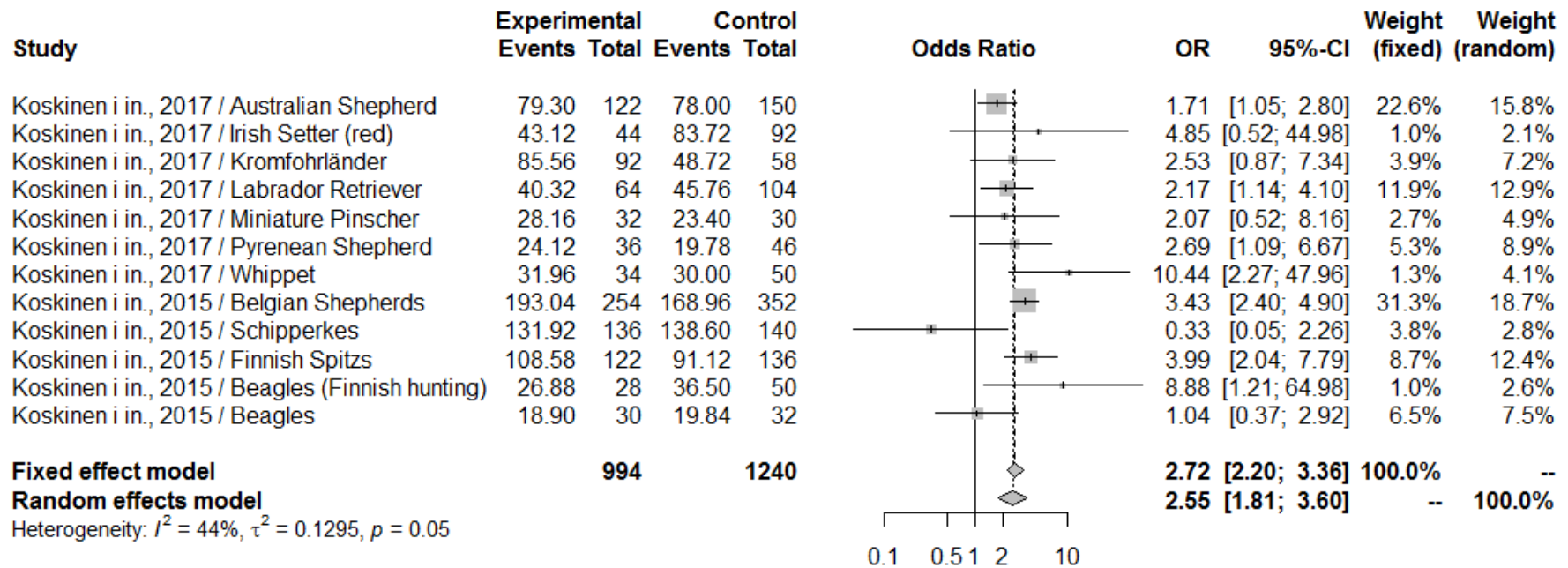
Wykres 14 Zbiorcze wyniki OR dla zależności między SNP 15111724, a padaczką idiopatyczną



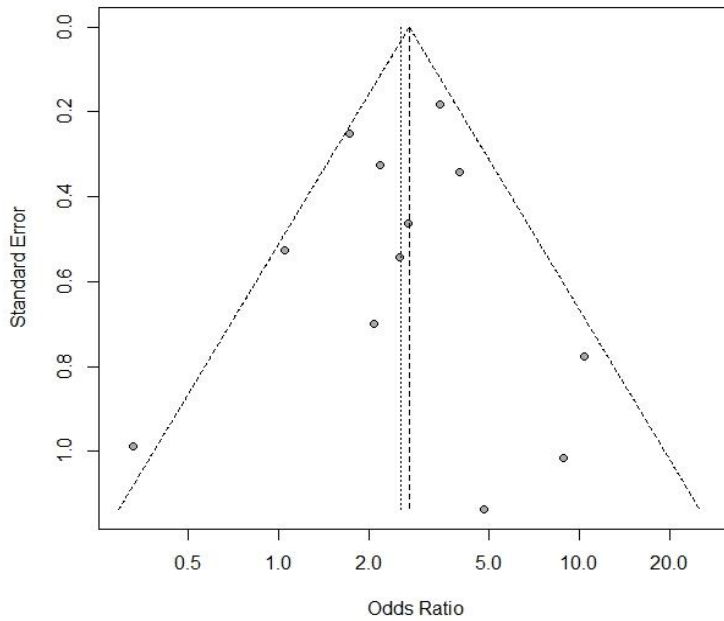
Wykres 15 Wykres lejkowy obrazujący relację między błędem standardowym oszacowań, a wielkością Odds Ratio dla SNP 1511724



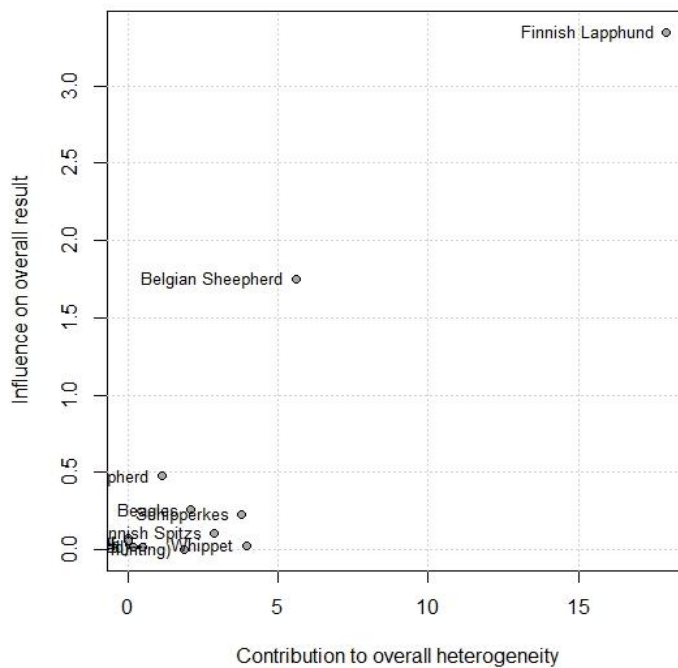
Wykres 16 Wykres Baujat obrazujący udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności w odniesieniu do wpływu każdego badania na brak homogeniczności grup dla SNP 1511724



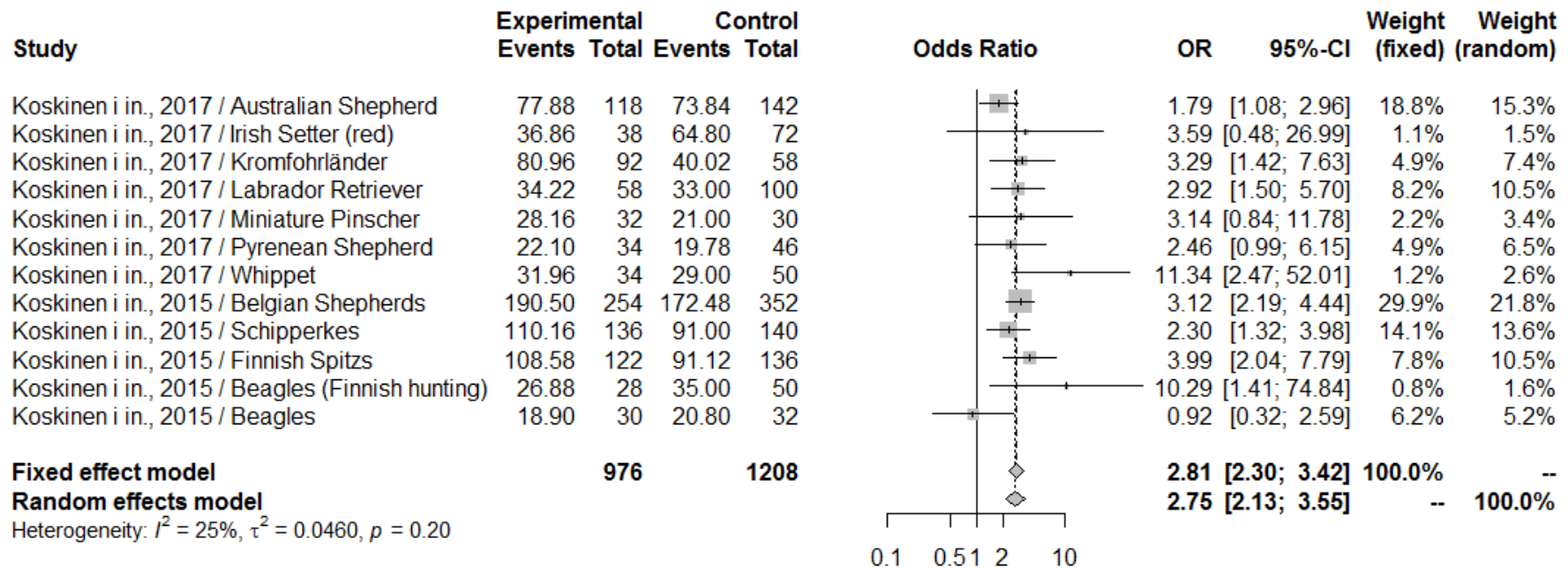
Wykres 17 Zbiorcze wyniki OR dla zależności między SNP 15085438 (BICF2S23030950), a padaczką idiopatyczną



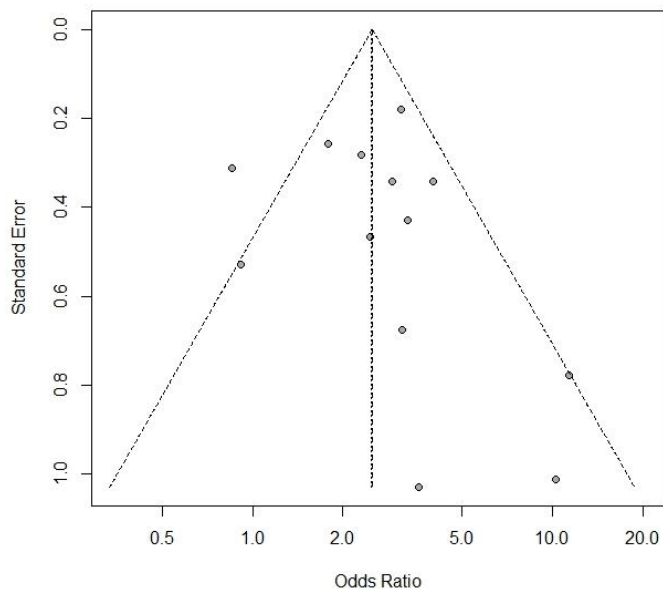
Wykres 18 Wykres lejkowy obrazujący relację między błędem standardowym oszacowań, a wielkością Odds Ratio dla SNP 15085438 (BICF2S23030950)



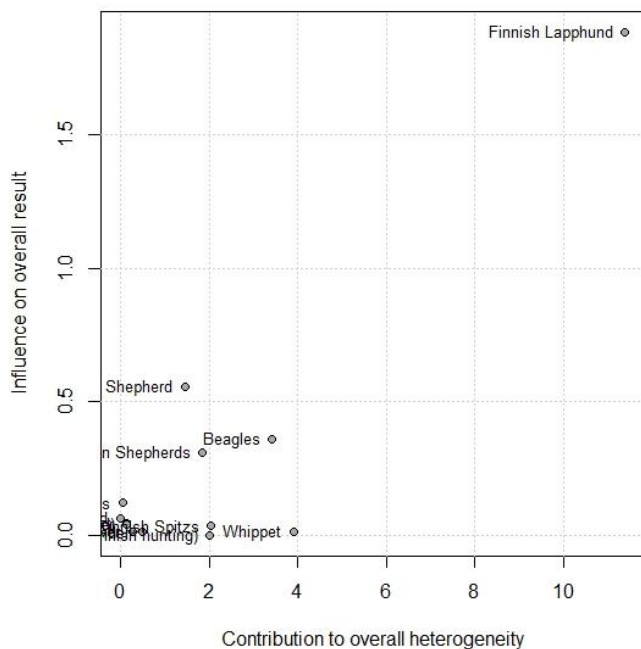
Wykres 19 Wykres Baujat obrazujący udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności w odniesieniu do wpływu każdego badania na brak homogeniczności grup dla SNP 15085438 (BICF2S23030950)



Wykres 20 Zbiorne wyniki OR dla zależności między blokiem SNP 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 (allele T-C-del-del-G-G), a padaczką idiopatyczną



Wykres 21 Wykres lejkowy obrazujący relację między błędem standardowym oszacowań, a wielkością Odds Ratio dla bloku SNP 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 (allele T-C-del-del-G-G)



Wykres 22 Wykres Baujat obrazujący udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności w odniesieniu do wpływu każdego badania na brak homogeniczności grup dla bloku SNP 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 (allele T-C-del-del-G-G)

Dyskusja

Według badań wielu autorów dziedziczne podstawy padaczki idiopatycznej u wielu ras są często wskazywane, ale wciąż nie ma zgodności co do modelu dziedziczenia (Thomas 2010). W badaniach powiązanych z analizą rodowodów część badaczy sugeruje istnienie allelu, często recesywnego, o kluczowym znaczeniu, jednak wiele opracowań wskazuje na dziedziczenie poligeniczne o charakterze addytywnym. Na przykład w badaniu padaczki idiopatycznej u angielskich springer spanieli sposób dziedziczenia wydawał się częściowo autosomalny recesywny, ale nie wykluczono również podłoża poligenicznego (Patterson i wsp., 2005). Podobnie w badaniach prowadzonych na populacji wyżłów węgierskich analiza rodowodów wykazała, że padaczka w tej rasie jest prawdopodobnie dziedziczona w sposób autosomalny recesywny, ale nie udało się wykluczyć dziedziczenia poligenicznego (Patterson i wsp., 2003). Występująca u psów duża różnorodność sposobu dziedziczenia oraz objawów klinicznych pozwala założyć, że przyczyna jest różna dla różnych ras (Ekenstedt i wsp., 2011). Cały czas prowadzone są poszukiwania mutacji oraz próby powiązania tych już odkrytych z rasami, u których podłoże choroby jest wciąż nieznane. Jednak powolny postęp sugeruje, że u psów podobnie jak u ludzi, padaczka może stanowić złożoną chorobę genetyczną z interakcją wielu genów i czynników środowiskowych (Ekenstedt i wsp., 2012).

W latach 2016 - 2020, przeprowadzono analizę rodowodów chorych oraz zdrowych gończych polskich w celu ustalenia potencjalnego źródła padaczki idiopatycznej oraz oszacowania udziału osobników z tym schorzeniem w rasie. Wśród 10 najczęściej wykorzystywanych reproduktorów w tej rasie aż siedem było potencjalnymi nosicielami padaczki idiopatycznej. Taki udział wykorzystania w hodowli zwierząt obciążonych padaczką sugeruje brak selekcji na tą cechę.

Na podstawie wcześniejszych badań własnych, wykonano analizę ogólnej zmienności genetycznej z uwzględnieniem identyfikacji linii macecznych przy pomocy sekwencjonowania regionu kontrolnego mtDNA i markerów mikrosatelitarnych. W wyniku analizy mtDNA w populacji gończych polskich wyróżniono 6 haplotypów, jest to wynik analogiczny do uzyskanego w populacji gończych słowackich, z czego dwa haplotypy były wspólne dla obydwu ras (Garbacz, 2018). W analogicznych badaniach ogara polskiego wykazano istnienie trzech haplotypów mtDNA (Głazewska, Prusak,

2012). Podobne wyniki uzyskały Zielińska i Głazewska (2015) analizując populację hovavartów w Niemczech, stwierdzając trzy haplotypy, z czego jeden występował u prawie 74% badanych osobników. Zatem zmienność mtDNA u gończego polskiego jest na porównywalnym poziomie do innych wyżej wymienionych ras.

Poziom zmienności genetycznej oszacowany na podstawie markerów mikrosatelitarnych w badanej rasie był zbliżony lub wyższy niż u innych europejskich populacji psów rasowych. Współczynnik inbredu dla badanej grupy gończych polskich wynosił średnio 0,0624, poziom heterozygotyczności obserwowanej był równy 0,72. Dla porównania inbred w grupie gończych słowackich wyniósł 0,2456 (Głowacka, 2020), pointera angielskiego 0,33 (Parra i wsp., 2007), owczarka niemieckiego 0,25 czy labrador retrievera 0,15 (Cole i wsp., 2004), natomiast dla posokowców hanowerskich wynosił 0,092 i był podobny do uzyskanej dla polskich gończych wartości (Lupke i wsp., 2004). U wielu ras psów stwierdzono podobny, jak u polskiego gończego, poziom heterozygotyczności obserwowanej. Dla gończego słowackiego 0,64 (Głowacka, 2020), golden retrievera 0,62, owczarka niemieckiego 0,64, jamnika szorstkowłosego 0,72 (Koskinen i wsp., 2003) czy wyżła włoskiego 0,64 (Ciapolini i wsp., 2011).

Analizując populację gończego polskiego nie stwierdzono niższej niż u innych ras zmienności genetycznej.

Mimo iż nie udało się ustalić jaki procent populacji jest obciążony chorobą to fakt, że padaczka występuje częściej w niektórych liniach lub u potomstwa określonych osobników zwykle u więcej niż jednego zwierzęcia w miocie, sugeruje genetyczne podłoże choroby u tej rasy i uzasadnia poszukiwanie mutacji odpowiedzialnej za jej wystąpienie.

Na podstawie analizy GWAS, biorąc pod uwagę korelację (linkage disequilibrium D' oraz r^2) między regionami oraz między genami w pobliżu badanych istotnych 6 SNP, wybrano trzy geny kandydujące:

DOK5 (chr 24: 40,842,594-40,995,459) - Docking Protein 5, *ARFGEF2* (chr 24: 34,891,422-34,987,404) - ADP-ribosylation factors (ARFs), *PCDH9* (chr 22: 21,178,718-22,063,427) – Protokadheryna 9 (PCDH). Do tej pory jedynie gen *DOK5* z tych trzech został powiązany w literaturze z epilepsją u psów i jest jednym z genów potencjalnie powiązanych z padaczką idiopatyczną w rasie petit basset griffon vendeen (Deschain i wsp., 2021). Do analiz dołączono gen najczęściej występujący w literaturze jako potencjalnie powiązany z padaczką idiopatyczną u psów *ADAM23* (chr 37: 14,933,217-15,098,305) - ADAM metallopeptidase domain 23. Łącznie wyłoniono 40

SNP w obrębie wyżej wymienionych 4 genów, ale z powodu braku równowagi Hardyego-Weinberga 12 odrzucono z dalszych analiz. Na podstawie wieloczynnikowej redukcji wymiarów MDR wskazano SNP x9 (BICF2P1032728) w obrębie genu *DOK5* jako najlepszy model jednego locus. Przy wystąpieniu układu heterozygotycznego przyporządkowywano osobnika do grupy chorych z ilorazem szans równym 7,86, wystąpienie pozostałych genotypów skutkowało przypisaniem osobnika do grupy zwierząt zdrowych. W modelach dwu, trzy, cztero- i pięcioczynnikowych również SNP x9 (BICF2P1032728) występował w formie heterozygotycznej i był obecny w każdym wyłonionym schemacie. Dla modelu dwuczynnikowego drugim istotnym SNP był x3 (BICF2P152556) w obrębie genu *ADAM23* w układzie homozygotycznym dominującym w połączeniu z heterozygotycznym układem w x9 skutkowało przypisaniem do klasy osobników chorych z ilorazem szans równym 16. Model uwzględniający Trzy, cztery i pięć *loci* zawierał dodatkowo SNP leżące w obrębie genów *ADAM23* oraz *PCDH9*. SNP x3 (BICF2P152556) występował we wszystkich konfiguracjach w postaci homozygoty, x4 (BICF2P434501) w postaci homozygoty dominującej lub heterozygoty, x29 (BICF2G630323614) jako homozygota dominująca, a x30 (BICF2P618948) jako homozygota recesywna lub heterozygota aby przypisano osobnika z określonym genotypem do grupy zwierząt chorych.

Podstawowym wnioskiem z wieloczynnikowej redukcji wymiarów był fakt, że jedynie SNP x9 (BICF2P1032728) w obrębie genu *DOK5* występował we wszystkich wyłoniowanych modelach i w postaci heterozygotycznej. Kolejną fazą była szczegółowa analiza korelacji z wystąpieniem padaczki idiopatycznej wszystkich 28 SNP z uwzględnieniem czterech modeli genetycznych - kodominującego, dominującego, recesywnego i naddominującego. Uwzględniono również potencjalny wpływ pojedynczych alleli na fenotyp. W efekcie otrzymano istotny wynik dla SNP x9 (BICF2P1032728) w genie *DOK5* w modelu kodominującym AA vs. Aa (p-value 0.04), dominującym AA vs. Aa-aa (p-value = 0.02) i naddominującym AA-aa vs. Aa (p-value = 0.03). Wśród osobników chorych nie zaobserwowano homozygot dominujących AA, za to wśród osobników zdrowych stanowiły 34.5%. 83.3 % osobników chorych było heterozygotami Aa, za to wśród osobników zdrowych heterozygoty stanowiły 48.3 %. Homozygoty recesywne były mało licznie reprezentowane w obydwu grupach. Dla genotypu heterozygotycznego Aa szansa znalezienia się w grupie osobników chorych była ponad 5 razy większa niż dla genotypów homozygotycznych łącznie (OR = 5.36). Wiek wystąpienia pierwszych objawów równy około 2 lat (mediana) jest podobny u

pettit basset griffon vendeen i u gończego polskiego. Obydwie rasy należą do VI grupy FCI, psów gończych i ras pokrewnych. Objawy kliniczne były nieco odmienne, u wszystkich gończych polskich objawy występowały centralnie, a u petit basset griffon vendeen większość psów miała objawy ogniskowe z ewentualnym rozszerzeniem na objawy centralne (Gullov i wsp., 2011). Niemniej gen *DOK5* jest obiecującym kandydatem, jako gen ryzyka wystąpienia padaczki idiopatycznej u psów, szczególnie ze względu na swoją funkcję. Jest to gen, który koduje białko błony komórkowej, oddziałujące z receptorem białkowym kinazy tyrozynowej pośredniczącym w tworzeniu neurytów (Shi i wsp., 2006).

Geny o podobnej funkcji były już wcześniej powiązane z występowaniem padaczki u różnych gatunków (Tabela 2 - Aneks), głównie *LGI1* oraz *LGI2* u ludzi, myszy i psów (Deschain i wsp., 2021).

Mutacja białka *LGI1* u ludzi jest przyczyną dziedzicznej autosomalnie dominująco padaczki z napadami częściowymi i zaburzeniami słuchu, znanej także jako autosomalna dominująca padaczka płata skroniowego (autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy, ADLTE) (Al.-Banji i wsp., 2015, Dazzo i wsp. 2016). U myszy transgenicznym posiadających zmutowany gen dla *LGII* wykazano hamowanie prawidłowego dojrzewania neuronów przez eliminację elementów drzewa dendrytycznego (dendritic pruning) i zwiększanie gęstości kolców dendrytycznych, czego skutkiem jest nasilona transmisja synaptyczna. Myszy pozbawione genu dla białka *LGI1* giną w przebiegu nasilonych drgawek mioklonicznych. Zaproponowano, że obecność przeciwciał przeciwko *LGI1* zakłóca funkcje tego białka, przyczyniając się do zwiększonej pobudliwości neuronów. Konsekwencją są napady drgawkowe i inne objawy limbicznej encefalopatii. (Yamagata i wsp., 2018). Wykazano, że *LGI2*, podobnie jak *LGII*, jest wydzielany neuronalnie i działa na receptory z rodziny ADAM, które funkcjonują w przebudowie synaps. Wynikająca z tego padaczka pojawia się u psów rasy lagotto romagnolo w wieku około siedmiu tygodni i ustępuje po czterech miesiącach, jej przyczyną jest mutacja *Lgi2* c.1552A.T (Jokinen i wsp., 2007).

Porównując objawy występujące u gończego polskiego do występujących u lagotto romagnolo (gen *LGI2*) oraz u petit basset griffon vendeen (gen *DOK5*) stwierdza się różnicę wieku wystąpienia symptomów. U gończego polskiego oraz u petit basset griffon vendeen średni wiek wynosił 2 lata, w przeciwieństwie do lagotto romagnolo, u których jest to typowe schorzenie wieku szczenięcego.

Istotne powiązanie z wystąpieniem padaczki uzyskano również dla SNP x23

(BICF2G630323538) oraz x35 (BICF2S23440437) w obrębie genu *PCDH9*. W pierwszym rozpatrywanym polimorfizmie w modelu dominującym AA vs. Aa-aa (p-value = 0.03) dla genotypu Aa-aa prawie 5-krotnie mniejsze szanse z ilorazem szans równym 0.21. Za to w x35 (BICF2S23440437) dla modelu recesywnego AA-Aa vs. aa (p = 0.02) wykazano, że wystąpienie genotypu aa ponad 8-krotnie zwiększało szansę wystąpienia choroby (OR=8.5), a samo wystąpienie allelu A (p-value = 0.01) zmniejszało ją ponad 2-krotnie (iloraz szans równy 0.39). Jako, że obydwa SNP znajdują się w jednym genie przeprowadzono również analizę haplotypów BICF2G630323538 i BICF2S23440437. Układ dwóch alleli dominujących w modelu addytywnym dawał mniejszą szansę wystąpienia choroby (p = 0.01). Taki układ haplotypów występował u 18 % osobników chorych oraz u 53 % osobników zdrowych. Protokadheryna 9 (*PCDH9*) jest to gen produkujący białko adhezyjno zależne od wapnia, które tworzy (wraz z innymi białkami z tej rodziny) główną podrodzinę nadrodziny kadheryn. Ulegają one obfitej ekspresji w ośrodkowym układzie nerwowym podczas rozwoju embrionalnego i w wieku dorosłym (Frank i wsp., 2002; Sano i wsp., 2003, Hirano i Takeichi, 2012; Suzuki, 1996; Frank i Kemler, 2002; Shapiro i wsp., 2007; Gumbiner, 2005; Chen i Maniatis, 2013).

Ostatnim genem wskazanym na podstawie analizy GWAS był *ARFGEF2* (chr 24: 34,891,422-34,987,404) - ADP-ribosylation factors (ARFs). Dalsze analizy w obrębie tego genu nie przyniosły żadnych istotnych statystycznie wyników. W wyniku analizy MDR gen *ARFGEF2* nie został wyłoniony w żadnym z modeli, dla analizy pojedynczych SNP w szczegółowych modelach genetycznych nie uzyskano istotności w żadnym z trzech analizowanych polimorfizmów, a w analizie interakcji międzygenowej SNP x SNP (*ARFGEF2* x *DOK5*) dla genów leżących na jednym chromosomie nie otrzymano istotnych statystycznie wyników w żadnym z modeli genetycznych. Mimo obiecującej roli genu w organizmie w kontekście powiązania z padaczką idiopatyczną na podstawie wykonanych analiz nie uzyskano oczekiwanego efektu. *ARFGEF2* odgrywa ważną rolę w wewnątrzkomórkowym transporcie pęcherzykowym. U człowieka mutacja w tym genie została powiązana z zespołem Westa (WS), który jest encefalopatią padaczkową wieku dziecięcego, charakteryzującą się obecnością skumulowanych spazmów występujących zwykle przed ukończeniem 1. roku życia oraz zatrzymaniem lub regresją rozwoju. Częstość występowania WS wynosi 1:3200 urodzeń, a rokowanie zależy od etiologii choroby. Blisko 80% dzieci z objawowym WS cierpi na upośledzenie umysłowe, a u około 50% rozwija się zespół Lennox-Gastauta

(LGS) (Kato 2006; Banne i wsp., 2015). Zespół ten jest ciężkim zespołem padaczkowym u dzieci, charakteryzującym się napadami mieszanymi, zaburzeniami funkcji poznawczych i uogólnionymi wolnymi (<3Hz) wyładowaniami fal spajkowych w elektroencefalografii. Napady atoniczne powodują niebezpieczne napady padaczkowe z ryzykiem urazu i pogorszenia jakości życia. Napady są często odporne na wiele leków przeciwpadaczkowych (AED) (Al-Banji i wsp., 2015).

Do tej pory jednym z najczęściej przewijających się w literaturze genów powiązanych z padaczką idiopatyczną u psów jest gen *ADAM23*, z tego względu został dołączony do analiz. Jest to gen leżący na chromosomie 37. W wyniku wieloczynnikowej redukcji wymiarów MDR dwa SNP leżące w obrębie tego genu zostały wskazane, jako potencjalnie powiązane z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego. SNP x3 (BICF2P152556) w modelu dwóch, czterech i pięciu *loci* i dodatkowo x4 (BICF2P434501) w modelu trzech, czterech i pięciu *loci*. W analizie pojedynczych SNP dla żaden polimorfizmu nie wykazywano istotnego związku z wystąpieniem padaczki idiopatycznej w rasie gończy polski.

Stwierdzono, że białko *ADAM23* jest związane z epilepsją u myszy. Jako jeden z dwóch głównych receptorów LGI1 w mózgu jest wiązany z specyficzną śmiertelną padaczką (Fukata i wsp., 2009). Uczestniczy w ważnym procesie regulacji przepływu jonów potasu z pobudzonego neuronu, a także w stabilizacji synapsy nerwowej. Kanał jonowy Kv1 zostaje otwarty w wyniku osiągnięcia wysokiego potencjału elektrycznego w neuronie presynaptycznym po przyłączeniu LGI1 do *ADAM23*. Następnie przepływ jonów K⁺ zmniejsza napięcie neuronu aż do wyciszenia sygnału. Atak padaczki występuje w momencie zaburzenia tego mechanizmu i wydłużenia przekazywania sygnału powodując zwiększoną aktywność elektryczną neuronów (Boudin i wsp., 2021). Brak białka LGI1 w mózgu potwierdzony przy użyciu przeciwciał anti-LGI1 skutkowało obserwowanym fenotypem padaczkowym lub letalnym u LGI1^{-/-} myszy podczas trzeciego tygodnia życia. Zmutowane zwierzęta miały spontaniczne uogólnione napady drgawkowe (Fukata i wsp., 2009). Dodatkowo myszy z wyciszonym genem *ADAM23* charakteryzowały się występowaniem fenotypu padaczkowego, a ich średnia długość życia była krótsza w niż osobników, u których gen ulegał ekspresji. Stwierdzono, że myszy które były heterozygotyczne pod względem działającego genu *ADAM23* były bardziej podatne na napady drgawkowe niż myszy z prawidłowym genotypem (Pakozdy i wsp., 2015). Sugeruje się, że każde zaburzenie kompleksu LGI-ADAM może prowadzić do wystąpienia padaczki, a obydwa geny traktuje się jako

potencjalnie powiązane z chorobą u ssaków (Fukata i wsp., 2009).

Jako, że gen *ADAM23* jest jedynym genem opisywanym w badaniach różnych ras przy użyciu tych samych metod i SNP, możliwe było zestawienie wyników gończych polskich z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Po przeprowadzeniu metaanalizy 4 artykułów opisujących wyniki dla 17 ras, z uwzględnieniem 7 SNP i jednego bloku, można zauważyć wyraźny wspólny trend dla ras owczarek belgijski, kromfohrlander, whippet, szpic fiński, lagotto romagnolo, pinczer miniaturowy, border terrier, schipperke, beagle (polująca linia z Finlandii), beagle, owczarek australijski, seter irlandzki, labrador retriever, owczarek pirenejski i gończy polski. Przeciwnie rezultaty były charakterystyczne dla fińskiego lapphunda, dla którego jako jedynej rasy uzyskano wszystkie wyniki OR poniżej 1, co sugeruje odwrotny skutek pojawienia się kluczowego allelu lub bloku SNP niż u pozostałych ras. Na przykład w 15113325 pojawienie się allelu G zmniejszało ryzyko wystąpienia padaczki 1.6 razy (OR = 0.59) w przeciwieństwie do pozostałych ras dla których zbiorczy wynik OR z metaanalizy wyniósł 2.74 co sugeruje ponad dwukrotnie większe ryzyko wystąpienia padaczki w przypadku pojawienia się kluczowego allelu. Ciekawym przypadkiem jest również lagotto romagnolo, u stwierdzono, że mutacja w genie *LGI2* powoduje Benign Familial Juvenile Epilepsy (BFJE), za to nie ma wpływu na wystąpienie padaczki w wieku dorosłym (Seppala i wsp., 2011). Na podstawie wyników można zauważyć, że u jednej rasy różne typy padaczki mogą mieć zupełnie inne podłoże genetyczne i że jest to na tyle złożona choroba, że pod jednym ogólnym pojęciem, nawet u jednej rasy, mogą występować zupełnie różne schorzenia. Bardzo interesujące okazało się, że dla SNP 18123961 (BICF2P890779) rasy lagotto romagnolo i fiński lapphund wyróżniały się wynikiem OR poniżej 1, sugerującym, że wystąpienie allelu A w tym SNP zmniejsza ryzyko wystąpienia padaczki w przeciwieństwie do pozostałych ras. W wyniku metaanalizy dla ras owczarek belgijski, kromfohrlander, whippet, pinczer miniaturowy, border terrier, owczarek belgijski, beagle (polująca linia z Finlandii), beagle oraz gończy polski w tym SNP otrzymano wynik OR = 3.33. Warto tu podkreślić, że linie w obrębie rasy mogą być odmiennymi genetycznie populacjami z powodu innego kierunku selekcji, niewielkiej efektywnej wielkości populacji czy efektu założyciela, (Ekensted, 2013). Dlatego uzyskanych wyników nie można traktować jako uniwersalnych dla gatunku.

U wszystkich rozpatrywanych ras poza beagle, podłoże padaczki idiopatycznej wydaje się multigeniczne z dużym znaczeniem SNP leżących na *CHA37*, tylko u beagle dla

wszystkich rozpatrywanych wariantów SNP, OR oscylowało wokół 1, co sugeruje brak wpływu wybranych genów na wystąpienie choroby. U wszystkich ras dalsze badania są konieczne, szczególnie dla tych, u których OR było wysokie a analiza przeprowadona na stosunkowo niewielkiej próbie, jak na przykład u whippetów (n case = 17, n control = 25) oraz dla ras, u których nie stwierdzono istotnych powiązań pomimo wyraźnej tendencji, jak na przykład pinczer miniaturowy i seter irlandzki. Analizując wykresy 11 – 14 dla wybranych SNP i bloku można zauważyć, że największy wpływ na łączne wyniki miały rezultaty naliczeń grup, czyli owczarków belgijskich. Wynika to z faktu, ukierunkowania badań zgodnie z metodyką zastosowaną dla tej rasy. Najmniejszy wpływ na ostateczny wynik stanowił udział beagle z polującymi liniami z Finlandii.

Biorąc pod uwagę wszystkie analizy, geny *DOK5* oraz *PCDH9* wydają się być głównymi kandydatami powiązania z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego. Geny *ADAM23* warto przeanalizować w kontekście możliwości interakcji z innymi regionami, choć nie uzyskano dla genu *ARFGEF2* satysfakcjonujących rezultatów. Dalsze bardziej szczegółowe analizy są konieczne w celu ustalenia podłoża genetycznego padaczki idiopatycznej u rasy gończy polski. Na tym etapie skupiono się na szerokich analizach asocjacyjnych i wybranych SNP, w celu wyłonienia genów kandydujących. Dalszym etapem badań będzie analiza otrzymanych genów, stanowiąca podstawę do stworzenia testów genetycznych lub wskazania multigenicznego podłoża choroby w rasie.

W hodowli psów rasowych eliminacja padaczki idiopatycznej bez wiedzy na temat jej dziedziczenia oraz testów genetycznych jest bardzo problematyczna. Z założenia rasy są izolowanymi populacjami i wyeliminowanie zbyt dużej liczby osobników może powodować zmniejszenie zmienności genetycznej. Wiedza na temat podłoża genetycznego tej choroby przyspiesza i ułatwia diagnozę oraz pozwala wykryć nosicieli. Rynek testów genetycznych dla psów rasowych jest bardzo dynamiczny i od lat rozwija się intensywnie.

Wnioski

- Na podstawie dotychczasowych badań uważa się, że u psów podobnie jak u ludzi, padaczka może stanowić złożoną chorobę genetyczną z interakcją wielu genów i czynników środowiskowych.
- Duża częstotliwość wykorzystania w hodowli rasy gończy polski psów obciążonych padaczką jest dowodem braku selekcji na tę cechę.
- Na podstawie analizy populacji gończego polskiego stwierdzono, że poziom zmienności genetycznej w rasie jest wyższy niż u innych ras.
- Padaczka idiopatyczna występuje częściej w niektórych liniach lub u potomstwa określonych osobników oraz często występuje więcej niż jedno chore zwierzę w miocie, co sugeruje genetyczne podłoże choroby u gończego polskiego i uzasadnia poszukiwanie mutacji odpowiedzialnej za jej wystąpienie.
- Gen *DOK5* wydaje się być głównym kandydatem do powiązania z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego. Równie obiecujący i wymagający dalszych analiz jest gen *PCDH9*.
- Gen *ADAM23* powinien być analizowany w kontekście możliwości interakcji z innymi regionami
- Stwierdzono, że gen *ARFGEF2* nie jest związany z występowaniem padaczki i powinien być usunięty z dalszych analiz.

Spis dendrogramów, fotografii, formularzy, schematów, tabel, wykresów

- Formularz 1 - Aneks Ankieta wysłana właścicielom psów rasy gończy polski uczestniczącym w badaniu – strona 95
- Dendrogram 1 Dendrogram filogenetyczny linii matecznych gończego polskiego – strona 25
- Fotografia 1 Pies rasy gończy polski (autor Garbacz, 2021) – strona 11
- Fotografia 2 Pies rasy gończy polski (archiwum własne: „Pies” nr 5, 1957 rok) – strona 16
- Fotografia 3 Pies rasy gończy polski (archiwum własne: „Pies” nr 5, 1957 rok) – strona 17
- Schemat 1 Rodowód pierwszego miotu gończych polskich wpisanego do Polskiej Księgi Rodowodowej – strona 20
- Schemat 2 Metody diagnostyki padaczki idiopatycznej na podstawie wykluczenia pozostałych możliwych źródeł drgawek – strona 298
- Schemat 3 Mapa interakcji w odniesieniu do padaczki idiopatycznej. Węzły reprezentują wpływ konkretnego genotypu na klasę fenotypową, a linie je łączące reprezentują wpływ interakcji – strona 59
- Schemat 4 - Selekcja badań z baz danych – strona 63
- Tabela 1 Lista suk założycielek wraz z rokiem urodzenia oraz liczbą pokoleń widniejącą w rodowodach potomstwa – strona 22
- Tabela 2 Lista psów założycieli wraz z rokiem urodzenia oraz liczbą pokoleń widniejącą w rodowodach potomstwa – strona 23
- Tabela 3 Zakres długości uzyskanych amplikonów [pz], zidentyfikowana liczba alleli (Na), liczba alleli efektywnych (Ne) – strona 26
- Tabela 4 Allele prywatne dla rasy gończy polski – strona 27
- Tabela 5 Charakterystyka grupy badawczej, psów gończych polskich ze stwierdzoną padaczką idiopatyczną – strona 41
- Tabela 6 Liczba potomstwa oraz występowanie padaczki idiopatycznej wśród 10 reproduktorów rasy gończy polski posiadających najliczniejsze potomstwo – strona 47
- Tabela 7 Liczba potomstwa oraz występowanie padaczki idiopatycznej wśród 10 suk hodowlanych rasy gończy polski posiadających najliczniejsze potomstwo – strona 47
- Tabela 8 Lista istotnych statystycznie SNP na podstawie wyników analizy GWAS – strona 49
- Tabela 9 Lista analizowanych SNP wraz ze sprawdzeniem istotności (p – value) zgodności z równowagą Hardyego-Weinberga – strona 52
- Tabela 10 SNP wskazane przez MDR z dopasowaniem modelu oraz ilorazem szans przyporządkowania osobnika do klasy chorych – strona 58
- Tabela 11 Modele wskazane przez MDR przyporządkowujące osobnika do klasy chorych z większym prawdopodobieństwem – strona 58
- Tabela 12 Analiza asocjacji SNP x9 (BICF2P1032728) w obrębie genu DOK 5 z

- padaczką idiopatyczną u gończego polskiego – strona 60
- Tabela 13 Analiza asocjacji SNP x23 (BICF2G630323538) w obrębie genu PCDH9 z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego – strona 61
- Tabela 14 Analiza asocjacji x35 (BICF2S23440437) w obrębie genu PCDH9 z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego – strona 62
- Tabela 15 Analiza związku haplotypów BICF2G630323538 i BICF2S23440437 z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego – strona 62
- Tabela 1 - Aneks Stężenie i czystość produktów izolacji DNA – strona 97
- Tabela 2 - Aneks Geny związane z padaczką o znanym wpływie na wzrost i tworzenie neurytów – strona 98
- Wykres 1 Liczba osobników zarejestrowanych w bazie rodowodowej z podziałem na psy hodowlane oraz zarejestrowane w Związku Kynologicznym w Polsce – strona 46
- Wykres 2 Liczba osobników posiadających informacje rodowodową o poszczególnej liczbie pokoleń – strona 48
- Wykres 3 Zmiany średniego współczynnika inbredu dla osobników rodzących się w kolejnych latach – strona 48
- Wykres 4 Wskazane SNP dla markerów powiązanych z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego – strona 50
- Wykres 5 Wykres obrazuje porównanie uporządkowanych danych empirycznych z kwantylami teoretycznego rozkładu $-\log_{10}(p)$ dla analizy GWAS markerów powiązanych z padaczką idiopatyczną u gończego polskiego – strona 50
- Wykres 6 Oszacowana dokładność równowagi dla modeli jednego locus w MDR – strona 53
- Wykres 7 Oszacowana dokładność równowagi dla modeli dwóch loci w MDR - strona 54
- Wykres 8 Oszacowana dokładność równowagi dla modeli trzech loci w MDR – strona 55
- Wykres 9 Oszacowana dokładność równowagi dla modeli czterech loci w MDR – strona 56
- Wykres 10 Oszacowana dokładność równowagi dla modeli pięciu loci w MDR – strona 57
- Wykres 11 Zbiorcze wyniki OR dla zależności między SNP 18123961, a padaczką idiopatyczną – strona 66
- Wykres 12 Wykres lejkowy obrazujący relację między błędem standardowym oszacowań, a wielkością Odds Ratio dla SNP 18123961 – strona 67
- Wykres 13 Wykres Baujat obrazujący udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności w odniesieniu do wpływu każdego badania na brak homogeniczności grup dla SNP 18123961 – strona 67
- Wykres 14 Zbiorcze wyniki OR dla zależności między SNP 15111724, a padaczką idiopatyczną – strona 68
- Wykres 15 Wykres lejkowy obrazujący relację między błędem standardowym oszacowań, a wielkością Odds Ratio dla SNP 15111724 – strona 69
- Wykres 16 Wykres Baujat obrazujący udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności w odniesieniu do wpływu każdego badania na brak homogeniczności grup dla SNP 15111724 – strona 69
- Wykres 17 Zbiorcze wyniki OR dla zależności między SNP 15085438 (BICF2S23030950), a padaczką idiopatyczną – strona 70
- Wykres 18 Wykres lejkowy obrazujący relację między błędem standardowym

oszacowań, a wielkością Odds Ratio dla SNP 15085438 (BICF2S23030950) – strona 71

Wykres 19 Wykres Baujat obrazujący udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności w odniesieniu do wpływu każdego badania na brak homogeniczności grup dla SNP 15085438 (BICF2S23030950) – strona 71

Wykres 20 Zbiorcze wyniki OR dla zależności między blokiem SNP 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 (allele T-C-del-del-G-G), a padaczką idiopatyczną – strona 72

Wykres 21 Wykres lejkowy obrazujący relację między błędem standardowym oszacowań, a wielkością Odds Ratio dla bloku SNP 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 (allele T-C-del-del-G-G) – strona 73

Wykres 22 Wykres Baujat obrazujący udział każdego badania w ogólnej statystyce niejednorodności w odniesieniu do wpływu każdego badania na brak homogeniczności grup dla bloku SNP 15085438, 15106446, 15108593, 15108802, 15111724 i 15113325 (allele T-C-del-del-G-G) – strona 73

Spis literatury

- 1 Al-Banji MH., Zahr DK., Jan MM. (2015): Lennox-Gastaut syndrome. Management update, *Neurosciences (Riyadh)*, 20, 3, 207-12
- 2 Alberti, L., M.G. Borrello, S. Ghizzoni, F. Torriti, M.G. Rizzetti, and M.A. Pierotti. (1998): Grb2 binding to the different isoforms of Ret tyrosine kinase, *Oncogene*, 17, 1079 - 1087
- 3 Arighi, E., L. Alberti, F. Torriti, S. Ghizzoni, M.G. Rizzetti, G. Pelicci, B. Pasini, I. Bongarzone, C. Piutti, M.A. Pierotti, and M.G. Borrello. 1997. Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase, *Oncogene*, 14, 773 - 782
- 4 Asai, N., H. Murakami, T. Iwashita, and M. Takahashi. (1996): A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with shc adaptor proteins, *J. Biol. Chem*, 271, 17644-17649
- 5 Awano T., Katz ML., O'Brien DP., Sohar I., Lobel P., (2006a): A frame shift mutation in canine TPP1 (the ortholog of human CLN2) in a juvenile Dachshund with neuronal ceroid lipofuscinosis, *Mol Genet Metab*, 89, 254–260
- 6 Awano T., Katz ML., O'Brien DP., Taylor JF., Evans J Khan S., Sohar I., Lobel P., Johnson GS., (2006b): A mutation in the cathepsin D gene (CTSD) in American Bulldogs with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Genet Metab* 87,341–348
- 7 Banne E., Elpeleg O., Atawneh O., Edvardson S., Henneke M., Brockmann K, Gärtner J., (2013): West syndrome, microcephaly, grey matter heterotopia and hypoplasia of corpus callosum due to a novel ARFGEF2 mutation, *J Med Genet* 2013,50,772–775
- 8 Baudin P., Cousyn L., Navarro V., (2021): The LGI1 protein: molecular structure, physiological functions and disruption-related seizures, *Cell Mol Life Sci*, 30, 79 (1), 16
- 9 Belagner J. M., Famula T. R., Gershony L. C., Palij M. K., Oberbauer A. M. (2020): Genome-wide association analysis of idiopathic epilepsy in the Belgian shepherd, *Canine Medicine and Genetics*, 7,12
- 10 Berendt M., Gullov CH., Christensen SLK., Gudmundsdottir H., Gredal H., (2008): Prevalence and characteristics of epilepsy in the Belgian shepherd variants Groenendael and Tervueren born in Denmark 1995–2004, *Acta Vet Scand*, 50-51
- 11 Berendt M., Gullov CH., Fredholm M., (2009): Focal epilepsy in the Belgian shepherd: evidence for simple Mendelian inheritance, *J Small Anim Pract*, 50, 655–661
- 12 Berg AT., Berkovic SF., Brodie MJ., Buchhalter J., Cross JH., (2010): Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 51, 676–685
- 13 Borrello M.G., Alberti L., Arighi E., Bongarzone I., Battistini C., Bardelli A., Pasini B., Piutti C., Rizzetti M.G., Mondellini P., Radice M.T., and Pierotti M.A.. (1996): The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase C, *Mol. Cell. Biol*, 16, 2151 - 2163
- 14 Brabletz A., (2017): *Kynologia Łowiecka. Podział psów myśliwskich w zależności od ich zastosowania łowieckiego*; Oficyna Wydawnicza

- FORESTER, Warszawa ISBN: 978-83-60450-43-7, 123-130
- 15 Brabletz A., (2017): Kynologia Łowiecka. Rasy psów myśliwskich według klasyfikacji Międzynarodowej Federacji Kynologicznej FCI, Oficyna Wydawnicza FORESTER, Warszawa, ISBN: 978-83-60450-43-7, 105-122
 - 16 Bryk D., Olejarz W., Zapolska-Downar D., (2014) : Kinazy aktywowane mitogenami i ich znaczenie w patogenezie miażdżycy, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 68, 10-22
 - 17 Chan ME., Arvey RD., (2012): Meta-Analysis and the Development of Knowledge, *Perspect Psychol Sci*, 7(1), 79-92
 - 18 Chavrier P., Goud B., (1999): The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport, *Curr Opin Cell Biol*, 11, 466– 475
 - 19 Chen WV., Maniatis T., (2013): Clustered protocadherins, *Development*, 140, 3297–3302
 - 20 Chen S., Tang DD., (2014): c-Abl tyrosine kinase regulates cytokinesis of human airway smooth muscle cells, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 50 (6), 1076-83
 - 21 Ciampolini R., Cecchi F., Bramante A., Casetti F., Presciuttini S., (2011): Genetic variability of the Bracco Italiano dog breed based on microsatellite polymorphism, *Italian Journal of Animal Science* 10(4), 59
 - 22 Cole J., Franke D., Leighton E., (2004): Population structure of a colony of dog guides, *Journal Animal Science* 82: 2906–2912
 - 23 Cooper SR., Jontes JD., Sotomayor M., (2016): Structural determinants of adhesion by Protocadherin-19 and implications for its role in epilepsy, *eLife*, 5, e18529
 - 24 Cowell J.K., (2014): LGII: from zebrafish to human epilepsy. In: *Progress in Brain Research* (Ed. by K.S. Ortrud), pp. 159–79. Elsevier, Oxford, UK
 - 25 Cox R., Mason-Gamer RJ., Jackson CL., Segev N., (2004): Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers, *Mol Biol Cell*, 15, 1487– 1505
 - 26 Dazzo E., Leonardi E., Belluzzi E., Malacrida S., Vitiello L., Greggio E., Tosatto S., Nobile C., (2016): Secretion-Positive LGII Mutations Linked to Lateral Temporal Epilepsy Impair Binding to ADAM22 and ADAM23 Receptors, *PLOS Genetics*, 12,10
 - 27 Depienne C., LeGuern E., (2012): PCDH19-related infantile epileptic encephalopathy: an unusual X-linked inheritance disorder. *Human Mutation* 33:627–634
 - 28 Deschain T., Fabricius J., Berendt M., Fredholm M., Karlskov-Mortensen P., (2021): The first genome-wide association study concerning idiopathic epilepsy in Petit Basset Griffon Vendeen, *International Foundation for Animal Genetics*, 52, 762–766
 - 29 Dibbens LM., Tarpey PS., Hynes K., Bayly MA., Scheffer IE., Smith R., Bomar J., Sutton E., Vandeleur L., Shoubridge C., Edkins S., Turner SJ., Stevens C., O’Meara S., Tofts C., Barthorpe S., Buck G., Cole J., Halliday K., Jones D., (2008): X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment, *Nature Genetics*, 40, 776–781
 - 30 Duffy M.J., McKiernan E., O’Donovan N., McGowan P.M., (2009): Role of ADAMs in cancer formation and progression, *Clin. Cancer Res.*, 15, 1140-1144
 - 31 Durick, K., Wu R.Y., Gill G.N., and Taylor S.S., (1996): Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain. *J. Biol. Chem.*, 271, 12691 - 12694
 - 32 Dyakowska J., (1981): Z historii polskiego piśmiennictwa kynologicznego, *Pies*,

- 3-4, 15-17, Związek Kynologiczny w Polsce
- 33 Edery, P., Lyonnet S., Mulligan L.M., Pelet A., Dow E., Abel L., Holder S., Nihoul F.C., Ponder B.A., and Munnich A., (1994): Mutations of the RET protooncogene in Hirschsprung's disease, *Nature*, 367, 378-380
- 34 Ekenstedt KJ., Oberbauer AM., (2013): Inherited epilepsy in dogs, *Top Companion Anim Med.*, 28, 51-58
- 35 Ekenstedt KJ., Patterson EE., Mickelson JR., (2012): Canine epilepsy genetics, *Mamm Genome*, 23, 28-39
- 36 Ekenstedt KJ., Patterson EE., Minor KM., Mickelson JR., (2011): Candidate genes for idiopathic epilepsy in four dog breeds, *BMC Genet*, 12, 38
- 37 Emond MR., Biswas S., Jontes JD., (2009): Protocadherin-19 is essential for early steps in brain morphogenesis, *Developmental Biology*, 334, 72-83
- 38 Farias FH., Zeng R., Johnson GS., Wininger FA., Taylor JF., (2011): A truncating mutation in ATP13A2 is responsible for adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis in Tibetan terriers. *Neurobiol Dis* 42:468-474
- 39 Field A.P., and Gillett R., (2010): How to do a meta-analysis, *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 63, 665-694
- 40 Forelle D., (1972): Nasi królowie i ich psy, *Pies*, 1-3, 26-27, Związek Kynologiczny w Polsce
- 41 Frank M., Kemler R., (2002): Protocadherins, *Curr Opin Cell Biol.*, 14:557-562
- 42 Frank M., Kemler R., (2002): Protocadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, 14, 557-562
- 43 Frank M., Kemler R., (2002): Protocadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, 14,557-562
- 44 Fukata Y., Adesnik H., Iwanaga T., (2006): Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science*,313 (5794), 1792-5
- 45 Gaitan Y., Bouchard M., (2006): Expression of the delta-protocadherin gene Pcdh19 in the developing mouse embryo, *Gene Expression Patterns*, 6, 893-899
- 46 Garbacz A., (2018): Analiza wybranych rejonów DNA mitochondrialnego u gończego polskiego, SGGW, praca magisterska
- 47 Głazewska I., Prusak B., (2012): Evaluation of the effectiveness of introducing new alleles into the gene pool of a rare dog breed: Polish Hound as the example, *Czech J. Anim. Sci.*, 57, 248-254
- 48 Głowacka J., (2020): Markery neutralne jako wskaźnik zmienności pomiędzy wybranymi rasami psów, SGGW, praca inżynierska
- 49 Goleman M., Balicki I., Radko A., Jakubczak A., Fornal A., 2019, Genetic diversity of the Polish Hunting Dog population based on pedigree analyses and molecular studies. *Livestock Science* Vol. 229, s. 114-117
- 50 Greenberg D.A. & Pal D.K., (2007): The state of the art in the genetic analysis of the epilepsies. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 7, 320-8
- 51 Grimm J., Sachs M., Britsch S., Di Cesare S., Schwarz-Romond T., Alitalo K., Birchmeier W., (2001): Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation, *The Journal of Cell Biology*, Volume 154, Number 2, 345-354
- 52 Gui J., Andrew AS., Andrews P., Nelson HM., Kelsey KT., Karagas MR., Moore JH., (2010): A simple and computationally efficient sampling approach to covariate adjustment for multifactor dimensionality reduction analysis of epistasis, *Hum Hered*, 70 (3), 219-25
- 53 Gui J., Moore JH., Williams SM., Andrews P., Hillege HL., van der Harst P.,

- Navis G., Van Gilst WH., Asselbergs FW., Gilbert-Diamond D. A., (2013): Simple and Computationally Efficient Approach to Multifactor Dimensionality Reduction Analysis of Gene-Gene Interactions for Quantitative Traits, 8(6), e66545
- 54 Gulløv C.H., Toft N., Baadsager M.M.N. & Berendt M., (2011): Epilepsy in the Petit Basset Griffon Vendeen: prevalence, semiology, and clinical phenotype. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 1372–8
- 55 Gumbiner BM., (2005): Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 622–634
- 56 Heske L., Nødtvedt A., Hultin Jäderlund K., (2014): A cohort study of epilepsy among 665,000 insured dogs : incidence, mortality and survival after diagnosis, *The Veterinary Journal*, 202 ,471 – 476
- 57 Hirano S., Takeichi M., (2012): Cadherins in brain morphogenesis and wiring, *Physiological Reviews*, 92, 597–634
- 58 Izycka N., Sterzynska K., Januchowski K., Nowak-Markwitz E., (2019): Semaphorin 3A (SEMA3A), protocadherin 9 (PCDH9), and S100 calcium binding protein A3 (S100A3) as potential biomarkers of carcinogenesis and chemoresistance of different neoplasms, including ovarian cancer — review of literature, *Ginekologia Polska*, vol. 90, no. 4, 223–227
- 59 Jareb M., Banker G., (1997): Inhibition of axonal growth by brefeldin A in hippocampal neurons in culture, *J Neurosci*, 17, 8955– 8963
- 60 Jokinen TS., Metsähonkala L., Bergamasco L., Viitmaa R., Syrjä P., Lohi H., Snellman M., Jeserevics J., Cizinauskas S., (2007): Benign Familial Juvenile Epilepsy in Lagotto Romagnolo Dogs, *J Vet Intern Med.*, 21, 464-471
- 61 Kato M., (2006): A new paradigm for West syndrome based on molecular and cell biology. *Epilepsy Res*, 70 (suppl 1), S87–95
- 62 Katz ML., Farias FH., Sanders DN., Zeng R., Khan S., (2011): A missense mutation in canine CLN6 in an Australian shepherd with neuronal ceroid lipofuscinosis, *J Biomed Biotechnol* , 198042
- 63 Katz ML., Khan S., Awano T., Shahid SA., Siakotos AN., (2005): A mutation in the CLN8 gene in English Setter dogs with neuronal ceroid-lipofuscinosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 327, 541–547
- 64 Katz ML., Rustad E., Robinson GO., (2017): Canine neuronal ceroid lipofuscinoses: Promising models for preclinical testing of therapeutic interventions. *Neurobiol Dis.*,108:277–287.
- 65 Kazimierski A., (2014): Ogary i gończe polskie. Ogary i gończe polskie Związek Kynologiczny w Polsce oddział Opole, Opole, 8-10
- 66 Kearsley-Fleet L., O'Neill DG., Volk HA., Church DB., Brodbelt DC., (2013): Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK., *Vet Rec.*, 172, 13, 338
- 67 Kiecker C., Lumsden A., (2005): Compartments and their boundaries in vertebrate brain development, *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 553–564
- 68 Kim YJ., Kang TC., (2015): The role of TRPC6 in seizure susceptibility and seizure-related neuronal damage in the rat dentate gyrus, *Neuroscience*, 29, 307, 215-30
- 69 Koskinen L.L.E., Seppälä E.H., Belanger J.M., Arumilli M., Hakosalo O., Jokinen P., Nevalainen E.M., Viitmaa R., Jokinen T.S., Oberbauer A.M., Lohi H., (2015): Identification of a common risk haplotype for canine idiopathic epilepsy in the ADAM23 gene, *BMC Genomics*, 16, 465
- 70 Koskinen M., (2003): Individual assignment using microsatellite DNA reveals

- unambiguous breed identification in the domestic dog. *Animal Genetics* 34(4), 297-301
- 71 Koskinen, L.L.E., Seppälä, E.H., Weissl, J., (2017): ADAM23 is a common risk gene for canine idiopathic epilepsy. *BMC Genet* 18, 8
- 72 Kryspin R., (1957): *Ogar Polski*, Pies, 5, 7-8, Związek Kynologiczny w Polsce
- 73 Kumar S., Stecher G., Tamura K., (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Mol Biol Evol.*, 33, 7, 1870 – 1874
- 74 Kuroda H., Mochizuki S., Shimoda S., Chijiwa M., Kamiya K., Izumi Y., Watanabe M., Horinouchi H., Kawamura M., Kobayashi K., Okada Y., (2010): ADAM28 is a serological and histochemical marker for non-small cell lung carcinoma, *Int. J. Cancer*, 127, 1844-1856
- 75 Leonardi E., Sartori S., Vecchi M., Bettella E., Polli R., Palma LD., Boniver C., Murgia A., (2014): Identification of four novel PCDH19 mutations and prediction of their functional impact, *Annals of Human Genetics* ,78, 389–398
- 76 Li J., Chen L., Wang N., Jiang G., Wu Y., Zhang Y., (2017): Effect of synaptic adhesion-like molecule 3 on epileptic seizures: Evidence from animal models, *Epilepsy & Behavior*, 69, 18 - 23
- 77 Liang S., Wei X., Gong C., Wei J., Chen Z., Deng J., (2013): A disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis, *Hum. Immunol.*, 74, 648-657
- 78 Liu Q., Chen Y., Kubota F., Pan JJ., Murakami T., (2010): Expression of protocadherin-19 in the nervous system of the embryonic zebrafish, *The International Journal of Developmental Biology*, 54, 905–911
- 79 Lorenzo M.J., Gish G.D., Houghton C., Stonehouse T.J., Pawson T., Ponder B.A., and Smith D.P., (1997): RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2, *Oncogene*, 14, 763 - 771
- 80 Lu J., Tiao G., Folkert R., Hecht J., Walsh C., Sheen V., (2006): Overlapping expression of ARFGEF2 and Filamin A in the neuroependymal lining of the lateral ventricles: Insights into the cause of periventricular heterotopia, *J. Comp. Neurol.*, 494, 476-484
- 81 Lupke L., Distl O., (2005): Microsatellite marker analysis of the genetic variability in Hanoverian Hounds, *J. Anim. Breed. Genet* 122, 131–139
- 82 Łakomik-Kaszuba G., (2021): *Noblesse Oblige*, 100 lat kynologii w wolnej Polsce, 14-15, Oficyna Wydawnicza Oikos sp. z o.o.
- 83 Marcinkowski T., (2015a): Rozwój użytkowy psów myśliwskich ras polskich w łowiectwie (I), *Brać Łowiecka* 2/2015, 80-82
- 84 Marcinkowski T., (2015b): Rozwój użytkowy psów myśliwskich ras polskich w łowiectwie (II), *Brać Łowiecka* 5/2015, 72-77
- 85 Mei X., Wu S., Bassuk AG., Slusarski DC., (2013): Mechanisms of prickle1a function in zebrafish epilepsy and retinal neurogenesis, *Dis Model Mech*, 6 (3), 679-88
- 86 Melville SA., Wilson CL., Chiang CS., Studdert VP., Lingaas F., (2005): A mutation in canine CLN5 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs, *Genomics*, 86, 287–294
- 87 Mitsui Y., Mochizuki S., Kodama T., Shimoda M., Ohtsuka T., Shiomi T., Chijiwa M., Ikeda T., Kitajima M., Okada Y., (2006): ADAM28 is overexpressed in human breast carcinomas: implications for carcinoma cell proliferation through cleavage of insulin-like growth factor binding protein-3,

- Cancer Res., 66, 9913-9920
- 88 Mochizuki S., Okada J., (2007): ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.*, 98, 621-628
- 89 Mochizuki S., Okada Y., (2009): ADAM28 as a target for human cancers, *Curr. Pharm. Des.*, 15, 2349-2358
- 90 Mochizuki S., Shimoda M., Shiomi T., (2004): ADAM28 is activated by MMP-7 and cleaves insulin-like growth factor binding prote-in-3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 79-84
- 91 Moore HJ., (2003): Cross Validation Consistency for the Assessment of Genetic Programming Results in Microarray Studies, Springer, Applications of Evolutionary Computing, EvoWorkshops 2003, Lecture Notes in Computer Science, vol 2611
- 92 Moore M.W., Klein R.D., Farinas I., Sauer H., Armanini M., Phillips H., Reichardt L.F., Ryan A.M., Carver M.K., and Rosenthal A., (1996): Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF, *Nature*, 382, 76-79
- 93 Motsinger AA., Ritchie MD., (2006): Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies, *Hum Genomics*, 22(5), 318-28
- 94 Musiał M., 2012: Powojenny Gończy Polski, *Biuletyn Klubu Ogara i Gończego Polskiego* 1 (10), 13-17
- 95 Oberbauer AM., Belanger JM., Grossman DI., Regan KR., Famula TR., (2010): Genome-wide linkage scan for loci associated with epilepsy in Belgian shepherd dogs. *BMC Genet* 11, 35, Pubmed reference: 20441595
- 96 Pacheco-Rodriguez G., Moss J., Vaughan M., (2002): BIG1 and BIG2: brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors, *Methods Enzymol*, 345, 397- 404
- 97 Pakozdy A., Patzl M., Zimmermann L., Jokinen TS., Glantschnigg U., Kelemen A., Hasegawa D., (2015): LGI Proteins and Epilepsy in Human and Animals, *J Vet Intern Med*, 29 (4), 997-1005
- 98 Palak K., Czas na łowy, *Biuletyn Klubu Ogara i Gończego Polskiego* 1 (10) 2012, 7
- 99 Parra D., Mendez S., Canon J., Dunner S., (2008): Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence, *Animal Genetics*, 39 (1), 1-7
- 100 Patterson EE., Armstrong PJ., O'Brien DP., Roberts MC., Johnson GS., Mickelson JR., (2005): Clinical description and mode of inheritance of idiopathic epilepsy in English springer spaniels., *J Am Vet Med Assoc*, 226, 1, 54 - 58
- 101 Patterson EE., Mickelson JR., Da Y., Roberts MC., McVey AS., O'Brien DP., Johnson GS., Armstrong PJ., (2003): Clinical characteristics and inheritance of idiopathic epilepsy in Vizslas, *J Vet Intern Med* 2003, 17(3), 319
- 102 Pichel, J.G., Shen L., Sheng H.Z., Granholm A.C., Drago J., Grinberg A., Lee E.J., Huang S.P., Saarma M., Hoffer B.J., Sariola H., and Westphal H., (1996): Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF., *Nature*, 382, 73-76
- 103 Podell M., Fenner WR., Powers JD., (1995): Seizure classification in dogs from a non referral-based population, *J Am Vet Med Assoc*, 206, 1721-1728
- 104 Potschka H., Fischer A., von Rüden EL., Hülsmeier V., Baumgärtner W., (2013): Canine epilepsy as a translational model?, *Epilepsia*, 54, 571-579
- 105 Prusak B., Głazewska I., Gralak B., (2014) : Nierekombinujące markery DNA

- jako nowe narzędzia analiz w hodowli zwierząt (cz. 2), Przegląd Hodowlany, 2, 1 - 3
- 106 Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira MA., Bender D., Maller J., Sklar P., Bakker PIW., Daly MJ., Sham PC., (2007): PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81, 559–575
- 107 Raman M., Chen W., Cobb M.H., (2007): Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26, 3100-3112
- 108 Ritchie D.M., Dupont WD., Hahn WL., Parl FF., Roodi N., Moore HJ. Bailey RL., (2001): Multifactor-Dimensionality Reduction Reveals High-Order Interactions among Estrogen-Metabolism Genes in Sporadic Breast Cancer, *The American Society of Human Genetics*, 69, 138–147
- 109 Romeo, G., P. Ronchetto, Y. Luo, V. Barone, M. Seri, I. Ceccherini, B. Pasini, R. Bocciardi, M. Lerone, H. Kaariainen (1994): Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease, *Nature*, 367, 377-378
- 110 Ruthel G., Banker G., (1999): Role of moving growth cone-like “wave” structures in the outgrowth of cultured hippocampal axons and dendrites, *J Neurobiol*, 39, 97– 106
- 111 Sanchez M.P., Silos S., Frisen I.J., He B., Lira S.A., and Barbacid M., (1996): Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF, *Nature*, 382:70–73
- 112 Sanders DN., Farias FH., Johnson GS., Chiang V., Cook JR., (2010): A mutation in canine PPT1 causes early onset neuronal ceroid lipofuscinosis in a Dachshund, *Mol Genet Metab*, 100, 349–356
- 113 Sano K., Tanihara H., Heimark RL., Obata S., Davidson M., St John T., Taketani S., Suzuki S., (1993): Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system, *The EMBO Journal*, 12, 2249–2256
- 114 Sano K., Tanihara H., Heimark RL., Obata S., Davidson M., St John T., Taketani S., Suzuki S., (1993): Protocadherins: A large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J.* 1993;12:2249–2256
- 115 Scheffer IE., Turner SJ., Dibbens LM., Bayly MA., Friend K., Hodgson B., Burrows L., Shaw M., Wei C., Ullmann R., Ropers HH., Szepetowski P., Haan E., Mazarib A., Afawi Z., Neufeld MY., Andrews PI., Wallace G., Kivity S., Lev D., (2008): Epilepsy and mental retardation limited to females: an under-recognized disorder, *Brain*, 131, 918–927
- 116 Schuchardt, A., V. D'Agati, B.L. Larsson, F. Costantini, and V. Pachnis., (1994): Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine, kinase receptor Ret., *Nature*, 367, 380-383
- 117 Schwartz-Porsche D., (1986): Epidemiological, clinical and pharmacokinetic studies in spontaneously epileptic dogs and cats. *ACVIM*, vol 4 II:1161–1163
- 118 Seppala EH., Jokinen TS., Fukata M., Fukata Y., Webster MT., Karlsson EK., Kilpinen SK., Steffen F., Dietschi E., Leeb T., Eklund R., Zhao X., Rilstone JJ., Lindblad-Toh K., Minassian BA., Lohi H., (2011): LGI2 truncation causes a mitting focal epilepsy in dogs. *PLoS Genetics*, 7, 7
- 119 Seppala EH., Koskinen LL., Gullov CH., Jokinen P., Karlskov-Mortensen P., Bergamasco L., Baranowska Korberg I., Cizinauskas S., Oberbauer AM., Berendt M., Fredholm M., Lohi H., (2012): Identification of a novel idiopathic epilepsy locus in Belgian Shepherd dogs, *PLoS ONE*, 7, 3
- 120 Shapiro L., Love J., Colman DR., (2007): Adhesion molecules in the nervous

- system: structural insights into function and diversity, *Annual Review of Neuroscience*, 30, 451–474
- 121 Sheen VL., Ganesh VS., Topcu M., Sebire G., Bodell A., Hill RS., Grant PE., Shugart YY., Imitola J., Khoury SJ., Guerrini R., Walsh CA., (2004): Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex, *Nat Genet*, 36, 69–76
- 122 Shi L., Yue J., You Y., Yin B., Gong Y., Xu C., Qiang B., Yuan J., Liu Y. & Peng X., (2006): Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin induced MAPK activation. *Cellular Signalling* 18, 1995–2003
- 123 Silva J., Sharma S., Cowell JK., (2015): Homozygous Deletion of the LGI1 Gene in Mice Leads to Developmental Abnormalities Resulting in Cortical Dysplasia, *Brain Pathol*, 25 (5), 587-97
- 124 Steinberg MS., (2007): Differential adhesion in morphogenesis: a modern view, *Current Opinion in Genetics & Development*, 17, 281–286
- 125 Suzuki ST., (1996): Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily, *Journal of Cell Science*, 109, 2609 – 2611
- 126 Szpiech A., Rosenberg N., (2011): On the size distribution of private microsatellite alleles. *Theor Popul Biol.* 80(2), 100–113
- 127 Terracciano A., Trivisano M., Cusmai R., De Palma L., Fusco L., Compagnucci C., Bertini E., Vigevano F., Specchio N., (2016): PCDH19-related epilepsy in two mosaic male patients, *Epilepsia*, 57, e51–55
- 128 Thiffault I., Farrow E., Smith L., Lowry J., Zellmer L., Black B., Abdelmoity A., Miller N., Soden S., Saunders C., (2016): PCDH19-related epileptic encephalopathy in a male mosaic for a truncating variant, *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 170, 1585–1589
- 129 Thomas WB., (2010): Idiopathic epilepsy in dogs and cats, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40, 161–179
- 130 Togawa A., Morinaga N., Ogasawara M., Moss J., Vaughan M., (1999): Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors, *J Biol Chem*, 274, 12308–12315.131 Togawa G., Miyoko S., Itsuki U., Yumi O., and Hinako Y., (2019): A Retrospective Study of Canine Idiopathic Epilepsy in Referral Centers in Japan. *Journal of Azabu University*132Uriarte A., Maestro Saiz I., (2016): Canine versus human epilepsy: are we up to date?, *Journal of Small Animal Practice*, 57, 115–121
- 133 van Harssel JJ., Weckhuysen S., van Kempen MJ., Hardies K., Verbeek NE., de Kovel CG., Gunning WB., van Daalen, E., de Jonge MV., Jansen AC., Vermeulen R., Arts WF., Verhelst H., Fogarasi A., de Rijk-van Andel JF., Lindhout D., De Jonghe P., Koeleman BP., Suls A., (2013): Clinical and genetic aspects of PCDH19-related epilepsy syndromes and the possible role of PCDH19 mutations in males with autism spectrum disorders, *Autism*, 14 (1), 23 - 34
- 134 van Rootselaar AF., Groffen AJ., de Vries B., Callenbach PMC., Santen GWE., Koelewijn S., Vijfhuizen LS., Buijink A., Tijssen MAJ., van den Maagdenberg AMJM., (2017): δ -Catenin (CTNND2) missense mutation in familial cortical myoclonic tremor and epilepsy, *Neurology*, 89 (23), 2341-2350
- 135 Vanhalst K., Kools P., Staes K., van Roy F., Redies C., (2005): delta-Protocadherins: a gene family expressed differentially in the mouse brain, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1247–1259
- 136 Vila C., Amorim R., Leonard J.A., Posada D., Castroviejo J., Petrucci - Fonseca

- F., Crandall K.A., Ellegren H., Nayne R.K., (1999) : Mitochondrial DNA phylogeography and population history of gray wolf *Canis Lupus*, *Molecular Ecology*, 8, 2089 - 2103
- 137 Walters J., Wells-Kilpatrick K., Pandeleos T., (2014): My epilepsy story–PCDH19 alliance, *Epilepsia*, 55, 968–969
- 138 Wei G., Deng X., Agarwal S., Iwase S., Disteché C., Xu J., (2016): Patient Mutations of the Intellectual Disability Gene *KDM5C* Downregulate *Netrin G2* and Suppress Neurite Growth in *Neuro2a* Cells, *J Mol Neurosci*, 60 (1), 33-45
- 139 Wielaender F., Sarviaho R., James F., (2017): Generalized myoclonic epilepsy with photosensitivity in juvenile dogs caused by a defective *DIRAS* family GTPase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 114 (10), 2669-2674
- 140 Wilbe M., Jokinen P., Truve K., Seppala EH., Karlsson EK., (2010): Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex., *Nat Genet*, 42, 250–254
- 141 Wolverton T., Lalande M., (2001): Identification and characterization of three members of a novel subclass of protocadherins, *Genomics*, 76, 66–72
- 142 Yamagata A., Fukai S., (2020): Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of *LGI1-ADAM22*, *Cell Mol Life Sci*, 77 (2), 267-274
- 143 Yamashita S., Chiyonobu T., Yoshida M., Maeda H., Zuiki M., Kidowaki S., Isoda K., Morimoto M., Kato M., Saitsu H., Matsumoto N., Nakahata T., Saito MK., Hosoi H., (2016): Mislocalization of syntaxin-1 and impaired neurite growth observed in a human iPSC model for *STXBP1*-related epileptic encephalopathy, *Epilepsia*, 57 (4), 81-6
- 144 Zhang S., Kwan P., Baum L., (2013): The potential role of *CAMSAP1L1* in symptomatic epilepsy, *Neurosci Lett*, 27, 556, 146-51
- 145 Zhu Q., Wang L., Xiao Z., Xiao F., Luo J., Zhang X., Peng X., Wang X., Sun H., (2013): Decreased expression of *Ras-GRF1* in the brain tissue of the intractable epilepsy patients and experimental rats, *Brain*, 1, 1493, 99-109
- 146 Zielińska S., Głazewska I. (2015): A pedigree - based analysis of mitochondrial DNA diversity in a dog population on the example of German Hovavarts, *Archives Animal Breeding*, 58, 335 – 34212, 7 (1), 79-92
- 147 Zipursky SL., Sanes JR., (2010): Chemoaffinity revisited: *dscams*, *protocadherins*, and neural circuit assembly, *Cell* 143, 343–353

Strony internetowe

[1] <https://www.zkwp.pl/wzorce/354.pdf> - dostęp 30.05.2023

[2] <https://gonczypolski.info.pl/> - dostęp 30.05.2023

[3] <https://www.illumina.com/> - dostęp 30.05.2023

Aneks

Formularz 1

Ankieta wysłana właścicielom psów rasy gończy polski uczestniczącym w badaniu

1. **Płeć psa [M/F]**
2. **Obecny wiek psa [lata]**
3. **W jakim wieku wystąpił pierwszy atak ?**
 - Poniżej szóstego miesiąca życia
 - Między szóstym miesiącem, a szóstym rokiem życia
 - Powyżej szóstego roku życia
4. **Czy pies miał uraz mechaniczny głowy ?**
 - Tak
 - Nie
5. **Czy pies był odrobaczony, miał podane środki przeciwpasożytnicze lub był szczepiony w przeciągu dwóch tygodni przed wystąpieniem drgawek**
 - Tak – podać jakim środkiem i kiedy
 - Nie
6. **Czy była wykonana morfologia i biochemia krwi ?**
 - tak – wykazała nieprawidłowości mogące skutkować drgawkami
 - tak – nie wykazała nieprawidłowości
 - nie była wykonana
7. **Czy było wykonane badanie obrazowe rezonansem magnetycznym ?**
 - tak – wykazało nieprawidłowości mogące skutkować drgawkami
 - tak – nie wykazało nieprawidłowości
 - nie było wykonane
8. **Czy był wykonany zapis elektroencefalograficzny (EEG) ?**
 - tak – wykazał nieprawidłowości mogące skutkować drgawkami
 - tak – nie wykazał nieprawidłowości
 - nie był wykonany

9. **Czy objawy występują centralnie (general)?**
- Tak
 - Nie
10. **Czy objawy występują ogniskowo (focal)?**
- Tak
 - Nie
11. **Jak często występują ataki (ile w serii)?**
12. **Jak często występują ataki (pytanie o częstotliwość serii)?**
13. **Czy zostało zastosowane leczenie w kierunku epilepsji ?**
- Tak
 - Nie
14. **Jaki lek został przepisany? [nazwa/ dawka]**
15. **Czy leczenie jest skuteczne (zmniejszona liczba napadów w serii lub zmniejszona liczba serii)?**
- Tak
 - Nie
16. **Czy pies jest poddany długotrwałemu leczeniu / przyjmuje na stałe leki inne niż wymienione w punkcie 14?**
- Tak – podać jakie leki, jaka dolegliwość
.....
 - nie

Tabela 1 Stężenie i czystość produktów izolacji DNA

sample	Nucleic Acid Conc. (ng/μl)	260/280	260/230
ch1	95,5	2,09	2,08
ch2	115,4	1,81	1,95
ch3	106,8	1,87	2,07
ch4	80,6	1,88	2,05
ch5	76,7	2,04	2,07
ch6	70,3	1,89	2,08
ch7	149,4	1,87	2,07
ch8	116,2	1,89	2,02
ch9	55,4	1,84	1,90
ch10	73,1	1,87	2,01
ch11	32,4	1,83	1,87
ch12	37,3	1,88	1,84
z1	119,6	1,89	2,05
z2	54,0	1,87	2,01
z3	60,3	1,86	2,05
z4	45,2	1,88	1,93
z5	42,8	1,85	1,85
z6	44,7	1,83	2,00
z7	64,5	1,84	2,02
z8	111,2	1,87	2,03
z9	50,5	1,86	1,94
z10	73,4	1,85	2,09
z11	66,4	1,86	2,00
z12	121,7	1,88	2,01
z13	12,5	1,73	1,74
z14	47,8	1,86	1,89
z15	40,2	2,08	1,83
z16	27,5	2,08	2,07
z17	20,6	2,01	1,92
z18	42,3	1,81	1,98
z19	60,3	1,88	1,95
z20	46,9	1,94	1,86
z21	21,9	1,89	2,08
z22	33,1	1,84	2,06
z23	44,2	1,85	1,90
z24	30,3	1,79	1,95
z25	23,2	1,91	1,81
z26	84,1	1,84	1,92
z27	68,6	1,98	1,91
z28	77,1	1,88	1,86
z29	26,6	1,89	2,05
z30	27,1	1,88	1,84

z31	37,7	2,00	1,78
z32	24,5	2,07	2,01
z33	83,8	1,9	2,07
z34	80,3	1,89	1,79
z35	17,2	1,92	1,98
z36	10,6	1,78	1,85

Tabela 2 Geny związane z padaczką o znanym wpływie na wzrost i tworzenie neurytów

Gen	Gatunek	Źródło
<i>LG12</i>	pies	(Seppälä i wsp. 2011)
<i>LGII</i>	człowiek, mysz, szczur, danio pręgowany	(Owuor i wsp. 2009; Cowell 2014; Silva i wsp. 2015)
<i>CTNND2</i>	człowiek, mysz	(van Rootselaar i wsp. 2017)
<i>SALM3</i>	szczur	(Li i wsp. 2017)
<i>STXBPI</i>	szczur	(Yamashita i wsp. 2016)
<i>KDM5C</i>	mysz	(Wei i wsp. 2016)
<i>c-ABL</i>	człowiek, szczur	(Chen i wsp. 2014)
<i>Ras-GRF1</i>	człowiek, szczur	(Zhu i wsp. 2013)
<i>CAMSAP1L1</i>	człowiek	(Zhang i wsp. 2013)
<i>TRPC6</i>	szczur	(Kim & Kang 2015)
<i>PK1</i>	człowiek, danio pręgowany	(Mei i wsp. 2013)
<i>DOK5</i>	pies	(Deschain i wsp., 2021)

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW

Aleksandra Garbaś
(czytelny podpis autora)