

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Proteomické rozlišení srsti psích plemen
Proteomic differentiation of hairs of different dog breeds

Bc. Karin Humpoláková

Vedoucí práce: doc. Mgr. Ing. Štěpánka Kučková, Ph.D.

Studijní program: Učitelství pro střední školy

Studijní obor: N Bi-Ch

2021

Odevzdáním této diplomové práce na téma *Proteomické rozlišení srsti psích plemen* potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucí práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, 30. 3. 2021

.....
podpis autorky práce

PODĚKOVÁNÍ

Velké poděkování patří paní doc. Mgr. Ing. Štěpánce Kučkové, Ph. D., za její odborné vedení, rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování mé diplomové práce věnovala. Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, Ph.D., za analýzu proteinového složení srsti a výsledky poskytnuté pro účely této práce, RNDr. Pavlu Cejnarovi za provedení analýzy dat z LC-MS/MS, a také pracovníkům laboratoře proteomiky VŠCHT Praha.

Další poděkování patří panu Ing. Janu Mokrému z Národního parku Šumava, který odebral a poskytl k analýze srst vlků žijících ve výběhu Návštěvnického centra Srní. Poděkování patří také všem, kteří umožnili odběr srsti svých psů.

ABSTRAKT

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda je možné rozlišit jednotlivá psí plemena pomocí proteinové analýzy jejich srsti, což by mohlo být využito například při forezním dokazování. V rámci této práce došlo také k porovnání podobnosti psích plemen s vlkem, který byl domestikován, a je tak považován za předchůdce psa. Pro tuto práci byla odebrána srst třem nepříbuzným zástupcům šestnácti psích plemen. K analýze těchto vzorků bylo využito štěpení enzymem trypsinem a poté pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) a LC/MS-MS (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry) byla získána hmotnostní spektra. Získaná data byla vyhodnocena analýzou hlavních komponent PCA (Principal Component Analysis) a lineární diskriminační analýzou LDA (Linear Discriminant Analysis). Po vyhodnocení získaných dat bylo zjištěno, že jednotlivá psí plemena pomocí této metody není možné rozlišit.

KLÍČOVÁ SLOVA

proteomika, srst, pes, plemena, hmotnostní spektrometrie

SUMMARY

The goal of my thesis was to find out whether it is possible to distinguish among individual dog breeds from the protein analysis of their fur. This knowledge could be used, for example, in forensic science. In this work, there was also a comparison of the similarity of dog breeds with a wolf, which was domesticated and is considered as an ancestor of the dog. For this study, the hair of three representatives of sixteen dog breeds was collected. To analyse these samples enzyme cleavage was used a trypsin, and mass spectra were obtained by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry) and LC/MS-MS (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry) methods. The obtained data were evaluated by the PCA (Principal Component Analysis) and LDA (Linear Discriminant Analysis) method. It was found, that individual dog breeds cannot be distinguished using both methods.

KEYWORDS

proteomics, coat, dog, breeds, mass spectrometry

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	SAVCI (<i>Mammalia</i>)	2
2.1.1	Evoluce savců	2
2.1.2	Specifické znaky savců	3
2.1.3	Charakteristika těla savců	3
2.2	SRST	6
2.3	PSOVITÍ	14
2.3.1	Vlk šedý (<i>Canis lupus</i>)	15
2.3.2	Domestikace	17
2.3.3	Pes domácí (<i>Canis lupus familiaris</i>)	18
2.4	PSÍ PLEMENA	24
2.4.1	Border kolie	25
2.4.2	Boxer	25
2.4.3	Čivava	25
2.4.4	Francouzský buldoček	26
2.4.5	Chrt dlouhosrstý a krátkosrstý	26
2.4.6	Jack Russell teriér	27
2.4.7	Jezevčík dlouhosrstý, krátkosrstý, hrubosrstý	27
2.4.8	Jorkširský teriér	27
2.4.9	Mops	28
2.4.10	Německý ovčák	28
2.4.11	Pudl	28
2.4.12	Zlatý retrívr	29
2.4.13	Stafordširský bulteriér	29
2.4.14	Středoasijský pastevecký pes	29
2.5	METODY PRO IDENTIFIKACI PROTEINŮ	30
2.5.1	Hmotnostní spektrometrie	31
2.5.2	Kapalinová chromatografie	37
2.6	METODY IDENTIFIKACE ZVÍŘECÍCH CHLUPŮ	38
2.6.1	Morfologická identifikace zvířecích chlupů	39
2.6.2	Určení zvířecí srsti pomocí DNA	39
2.6.3	Určení zvířecího druhu pomocí MALDI-TOF MS	41

2.7	ANALÝZA HLAVNÍCH KOMPONENT – PCA	42
2.8	LINEÁRNÍ DISKRIMINAČNÍ ANALÝZA - LDA.....	42
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
3.1	Použité chemikálie a roztoky, vybavení	44
3.2	Složení roztoků pro reverzní fázi.....	45
3.3	Příprava matrice	45
3.4	Referenční materiály	45
3.5	Štěpení vzorků	46
3.6	Přečištění na reverzní fázi.....	47
3.7	Měření pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	48
3.8	Statistické vyhodnocení hmotnostních spekter.....	48
3.9	Vyhodnocení programem mMass	49
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
4.1	Vyhodnocení dat pomocí metody hlavních komponent	50
4.2	Vyhodnocení dat pomocí mMass	71
4.3	Vyhodnocení dat pomocí lineární diskriminační analýzy	74
5	ZÁVĚR.....	79
6	LITERATURA.....	80
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	93
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	94
9	SEZNAM TABULEK.....	97

1 ÚVOD

Savci jsou velmi rozšířenou a známou skupinou živočichů, pro které je jedním z typických znaků srst, kterou u jiných živočichů nenajdeme. Srst patří, podobně jako kost, k velmi odolné části těla, a právě proto je její analýza předmětem častého zájmu. Rozlišení kůže či srsti je často potřebné pro určení její pravosti (Solazzo, 2017), ale také při určení druhové příslušnosti ve forenzní vědě (Bertino a Bertino, 2015), protože v dnešní době často dochází k pašování zvířat, a tak se neustále zvyšuje snaha o ochranu živočichů.

K porovnání srsti, respektive chlupů, se nejčastěji využívá morfologické a mikromorfologické zkoumání, které využívá mikroskopických technik (Tridico *et al.*, 2014). Tyto metody však nemusí být dostačující, a proto se využívají náročnější metody. K těmto metodám patří například analýza nukleární DNA, ke které je zapotřebí kořínek chlupu, ten ale často podléhá degradaci (Mills *et al.*, 2000), či analýza mitochondriální DNA vyžadující chlupový stvol. Vzhledem k tomu, že chlupy obsahují proteiny, které jsou odolné, je možné využít proteomické zkoumání, čehož bylo využito i v této práci.

Tato práce navazuje na mou bakalářskou práci týkající se rozlišení zvířecí srsti pomocí hmotnostní spektrometrie. Vzhledem k tomu, že výsledek práce byl pozitivní a ukázalo se, že pomocí této metody lze jednotlivé druhy savců rozpoznat na základě jejich srsti, rozhodla jsem se ve výzkumu pokračovat a zjistit, zda je možné pomocí hmotnostní spektrometrie rozlišit plemena psů. Otázka tedy zní – lze rozpoznat také jednotlivá psí plemena prostřednictvím chlupů?

V této práci byly zkoumány chlupy 17ti plemen psů. Enzymově naštěpené proteiny obsažené v chlupcích byly analyzovány prostřednictvím hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry). Vzorky byly také analyzovány pomocí LC-MS/MS (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry). Získaná spektra byla vyhodnocena pomocí analýzy hlavních komponent PCA (Principal Component Analysis) a lineární diskriminační analýzy LDA (Linear Discriminant Analysis). Kromě porovnání vybraných psích plemen došlo také k určení odlišnosti mezi psy a vlkem.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 SAVCI (*Mammalia*)

Třída savců se řadí do živočišného podkmene obratlovců (*Vertebrata*) spadající do kmene strunatců (*Chordata*). Jedná se o mnohobuněčné organismy, na jejichž stavbě těla se podílejí tři zárodečné listy. Kromě vnějšího a vnitřního zárodečného listu, tedy ektodermu a entodermu, je přítomen i třetí zárodečný list – mezoderm (Gaisler *et al.*, 2007).

Savci se od ostatních živočichů odlišují pomocí specifických znaků, mezi které patří například jejich srst, která je ektodermálního původu, a také krmení mláďat mateřským mlékem produkovaným žlázami, podle nichž také vznikl název savců – *Mammalia*.

Tělo savců je schopné udržovat stálou tělní teplotu a díky této schopnosti se s nimi lze setkat ve všech oblastech naší planety. Savci se přizpůsobili životu na souši, ve vodě, ale také ve vzduchu.

Každý savec má odlišnou velikost, obývá různá prostředí, živí se rozdílnou potravou, proto neexistuje žádný typický savec. Jsou to organismy velice přizpůsobivé, řadí se do nejpokročilejší skupiny obratlovců.

2.1.1 Evoluce savců

Vznik prvních obratlovců je datován v prvohorách, kdy strunatci přešli do sladkých vod, přičemž se předpokládá, že na Zemi se první obratlovci vyskytovali již před 450 miliony let.

Vývoj savců začal již v prvohorách. Třída savců se pravděpodobně vyvinula spolu s třídou ptáků z třídy plazů, u které již na počátku vývoje vznikla linie nazývaná *Therapsida* vedoucí k vývoji právě savců. Během tohoto vývoje začalo nové utváření lebky, zlehčení kostry a přesunutí končetin pod tělo, čímž se malí a draví savci stali více pohybliví. Dále také došlo k vývinu důležitých znaků umožňujících rozdělit vývoj savců od plazů. Mezi znaky plazí linie *Therapsida*, objevující se také u savců, patří teplokrevnost podílející se na regulaci teploty těla společně se srstí. Tato schopnost umožňuje přežití organismů v zimním období.

Rozdílným znakem plazů a savců je například rozmnožování a vývin jedince. U plazů dochází k vývinu ve vejci mimo tělo matky a přežití je tedy závislé na vnějších faktorech, zatímco u savců dochází k vývinu jedince uvnitř dělohy matky.

Evoluce savců probíhala velice pomalu, kdy přechod savců z plazů probíhal plynule, proto není možné určit přesné časové období rozdělení plazů a savců. Předpokládá se, že tento přechod byl dokončen na konci triasu. První savci se však objevili již ve svrchním triasu, kdy se zrodili také dinosaurů, a proto savcům hrozilo vyhynutí. Na konci mezozoika došlo k hromadnému vymírání plazů, čímž se savcům otevřely nové možnosti.

Za předky dnešních savců je považován řád *Eupantotheria*. Nejstarší savci jsou známi z jury a křídy, na jejímž konci došlo ke vzniku různých skupin savců. V tomto období dominovali archaičtí hmyzožravci, prakopytníci a primáti. K prudké diverzitě druhů došlo v kenozoiku a největší rozvoj savců proběhl ve třetihorách. Během tohoto období byly archaické druhy savců nahrazeny dnešními lichokopytníky, sudokopytníky, šelmami, ale vznikly také zcela nové skupiny. Ve čtvrtohorách se savci stali nejvyspělejšími živočichy.

2.1.2 Specifické znaky savců

Jedním ze specifických znaků, kterým se savci odlišují od ostatních živočichů, je péče o potomstvo. Až na výjimku ptakořitných savců se zárodek vyvíjí uvnitř těla matky a následně, již po samotném porodu, se samice stará o svá mláďata, která se rodí v různém stupni dospělosti. Protože ze začátku nejsou mláďata soběstačná, jsou odkázána na pomoc matky. Jsou krmena mateřským mlékem, které je produkováno mléčnými žlázami, k jejichž aktivaci dochází po narození mláďete.

Savci jsou schopni termoregulace, tedy kontroly stálé tělesné teploty, tj. homoiotermie, která se pohybuje v rozmezí teplot mezi 36 °C až 39 °C, teplota obvykle převyšuje teplotu vnějšího prostředí. Stálá tělesná teplota umožňuje život v extrémních podmínkách, proto savci mohou osidlovat téměř každý biom. Přebytknému výdeji tepla zabraňuje izolační vrstva, kterou si savci na těle musí vytvořit. Izolační vrstvu tvoří srst, kůže a podkožní tuk. Podmínkou pro homoiotermii je schopnost svalového třesu.

2.1.3 Charakteristika těla savců

Samčí a samičí jedinci jsou rozlišovány pomocí sekundárních pohlavních znaků, kterými jsou například velikost těla, různě specifické útvary nebo zbarvení jedince závisující na prostředí, ve kterém žijí. Savci jsou velice rozmanitými živočichy.

Tvar lebky je utvořen na základě specializace potravy. Lebka má velkou mozkovnu, obsahuje dva týlní hrboly umožňující spojení s krční páteří. Ve srovnání s ostatními

živočichy je mozek savců největší a zároveň nejsložitější. Hlavním mozkovým centrem je koncový mozek, jehož součástí je kůra mozková. Ta je hluboce zbrázděná, což utváří větší povrch pro přívod většího množství dostředivých vláken, díky tomu může být pod kontrolou více fyzických funkcí.

Oporu těla tvoří páteř složená z obratlů, jejichž počet je u každého druhu savců odlišný. Avšak počet krčních obratlů je u všech druhů stejný, každý druh má celkem sedm krčních obratlů. Měkké orgány jsou chráněny hrudním košem, který je tvořen žebry společně s hrudní kostí.

Končetiny savců byly uzpůsobeny podle výskytu v různém prostředí. Někteří aktivně létající savci mají přední končetiny přeměněna v křídla.

Srdce savců je rozděleno na čtyři části, tedy na pravou a levou předsíň s pravou a levou komorou, díky tomu je okysličená krev oddělená od odkysličené. Krevní oběh je zcela uzavřený a rozdělený na plicní a tělní. Malým krevním oběhem proudí krev mezi srdcem a plícemi, zatímco mezi srdcem a celým tělem cirkuluje krev pomocí velkého krevního oběhu, čímž jsou po těle rozváděny živiny a kyslík. Krev obsahuje bezjaderné červené krvinky, které díky tomu zahrnou více hemoglobinu a podílí se na udržení stálé tělní teploty.

U savců se kvůli jejich sání mateřského mléka vyvinuly svalnaté tváře, ty se u jiných obratlovců nevyskytují. Každý savec požívá odlišný typ potravy, proto se u nich liší také její příjem a trávení. Jejich chrup byl uzpůsoben k trhání a žvýkání potravy, k čemuž napomohlo spojení horní a dolní čelisti kloubem. U mláďat nejprve vyrůstá chrup mléčný, který je následně nahrazen chrupem trvalým. Počet a tvar zubů se u jednotlivých druhů savců liší, a proto lze zuby pokládat za poznávací znak. Slinné žlázy produkují sliny, které v dutině ústní zvlhčí potravu, obalí ji hlenem a chemicky rozštěpí. Jazykem je potrava posunuta do hltanu, poté prochází jícnem a žaludkem, který vylučuje ochranný hlen spolu s kyselinou chlorovodíkovou. Ta uvnitř vytváří kyselé prostředí, to napomáhá k přeměně proenzymu pepsinogenu na aktivní formu – pepsin, zajišťující štěpení bílkovin. V tenkém střevě dochází ke vstřebání živin, v tlustém střevě se vstřebává přebytečná voda a nestrávené zbytky jsou shromažďovány v konečníku.

Savci, jako jediní z živočichů, ve většině případech rodí živá mláďata. Výjimku tvoří nejprimitivnější savci – ptakořitní, do kterých se řadí ptakopysk a ježura. Tyto druhy se stále rozmnožují prostřednictvím vajec, která musí být zahřívána, stejně jako je tomu u plazů.

K primitivním savcům se řadí také vačnatci. V případě vačnatců se rodí mláďata málo vyvinutá z důvodu nepřítomnosti pravé placenty, vývoj tedy následně probíhá ve vaku matky. U vyspělých savců je zárodek až do narození uložen v děloze matky. S matkou je spojen placentou, prostřednictvím které je zajišťováno dýchání, příjem potravy a vylučování. Počet rozmnožovacích období i délka březosti samice je u každého druhu jiná.

Smyslové orgány slouží k rozeznávání okolního prostředí. Jedním z nejvyvinutějších smyslů savců je sluch, který je u savců kvůli vnějšímu uchu nápadný, tvořený složitě tvarovaným ušním boltcem. Střední ucho obsahuje tři sluchové kůstky – kladívko, třmínek a kovádlíku, vzniklé přeměnou čelistního kloubu ryb, obojživelníků a plazů. Ve vnitřním uchu je uložen rovnovážně-sluchový orgán tvořen blanitým labyrintem. Důležitým smyslem je také čich, prostřednictvím kterého savci vyhledávají kořist, očichávají potravu, a také rozeznávají prostředí. Po čichu je druhotně používán hmat, hmatové receptory jsou uloženy v kůži i v chlupové bradavce.

Povrch těla savců je tvořen z kůže. Ta je složena z prokrvené škáry, na kterou nasedá pokožka. Neustále dochází k tvorbě nových kožních buněk, které vytlačují staré buňky na povrch kůže. Na povrchu kůže, stejně jako u plazů, dochází k rohovatění, odumírání a odlupování starých buněk. U většiny druhů savců se v kůži nacházejí pigmenty, ty zapříčiňují různá zbarvení jedinců. Vícevrstevnou pokožku tvoří vnější vrstva odumřelých buněk a má ochrannou funkci. Škára, tedy vnitřní vrstva kůže, je silná vrstva, obsahující velké množství žláz, krevní cévy a zakončení nervů. Mezi žlázy, které jsou obsaženy ve škáře, patří potní a mazové, které se následně přeměnily také ve žlázy pachové a mléčné. Mazové žlázy ústí do chlupových váčků a vyměšují chemické látky. Pachové žlázy se společně s chlupy podílí na řízení tělesné teploty nebo na ochlazování prostřednictvím potu. Pod kůží je umístěno podkožní vazivo prostoupeno tukem, který slouží jako zásobárna živin a spolu se srstí zabraňuje ztrátám tepla.

2.2 SRST

Jedinečným poznávacím znakem je srst. Srst je rohovitý útvar na povrchu těla savců, podobně jako u ptáků peří, které má stejně jako srst původ v rohovině. Peří však, na rozdíl od srsti, pochází z plazích šupin. Původ srsti není zcela jasný. Předpokládá se, že chlupy a šupiny se vyvíjely zároveň, nebo se vyvinuly až po vývoji šupin (Gaisler, 2007).

O vzniku srsti pojednává více teorií a mezi vědci tak panují rozepře. Jedna z teorií hovoří o tom, že srst vznikla jako zcela nová struktura, zatímco další teorie, která je zastávána darwinisty, nasvědčuje o vývoji ze šupin plazů. Díky zrohovatělé kutikule pokrývající chlup je možné srst dobře uchovat, což je důvod, proč může být srst součástí fosilních nálezů. V těchto nálezech se srst vyskytuje jako funkční struktura bez evolučního vývoje, to zajišťuje větší pravděpodobnost teorie o nové struktuře, není to však prokázáno. Vědci se neshodují ani v otázce – proč se srst u savců vyvinula, obecně se tvrdí, že srst vznikla za účelem tepelné izolace těla, což není zpochybněno, ale ani dokázáno (Bergman, 2004).

Jednou z funkcí srsti je ochrana těla před vnějšími vlivy, srst se také podílí na udržování stálé tělesné teploty, slouží jako hmatový orgán nebo je využívána při maskování či varování nepříteli. U každého druhu je srst přizpůsobena podmínkám, ve kterých daný jedinec žije. Savci jsou v závislosti na periodických změnách podnebí nuceni srst obměňovat. Tento proces je označován jako línání srsti, při kterém staré chlupové cibulky zrohovávají a odloučí se od papil, na kterých se následně vytvoří nové (Gaisler, 2007).

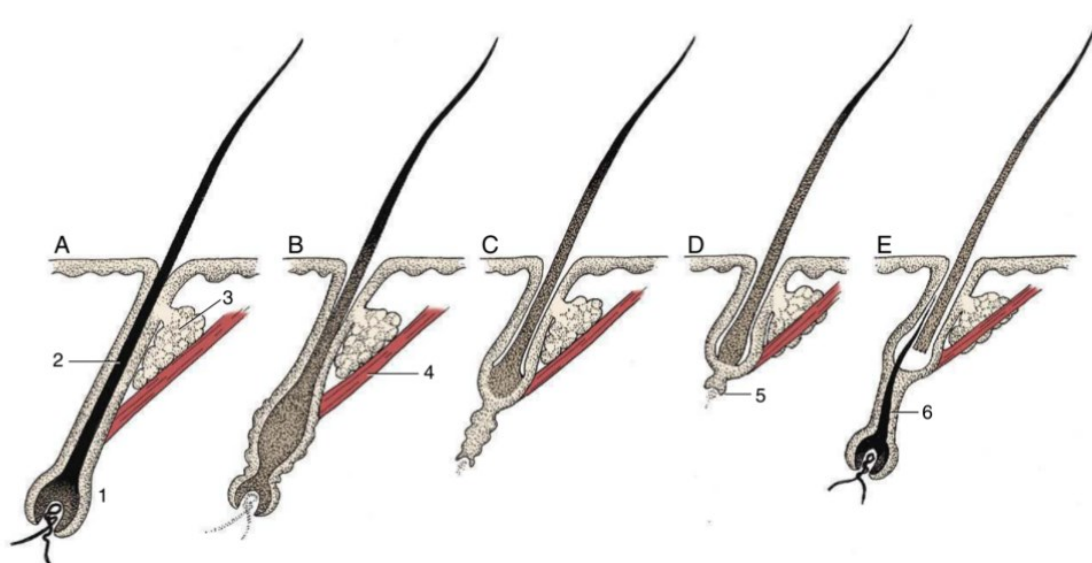
Srst kryje rohovatějící pokožku a je maštěna sekretem z mazových žláz. Zbarvení srsti i její délka jsou dány geneticky a jsou charakteristické pro daný druh savců. Vyskytuje se v různých typech – rovná, ale také vlnitá i kudrnatá. Typ srsti závisí na buňkách uložených na dně chlupového váčku tvořící vláknité svazky.

U některých savců může srst zcela chybět nebo být nahrazena dalšími specializovanými útvary vzniklými modifikací chlupů, pravděpodobně jejich splynutím a přeměnou. Takovými útvary jsou ostny, rohovité šupiny nebo rohovité zakončení prstů – nehet, dráp, kopyto.

Srst je derivátem epidermis, vrstevnatého rohovatějícího epitelu, který je částí kůže. Je tvořena množstvím chlupů, které jsou rozlišeny na kořen, vlasový folikul (váček) a střední část – osu.

Chlup (*pilus*) vytváří společně s kožní žlázou, vazivovým pouzdrém a hladkosvalovým vzpřimovačem chlupu jeden celek. Část chlupu sahající nad pokožku se označuje jako stvol, část chlupu zasazená v kůži je označována jako kořen.

Vznik chlupu, i ostatních kožních derivátů, je založen na odstupe epitelového pruhu, který směřuje do škárového vaziva. Toto vazivo vytvoří chlupovou papilu, která je vtlačena do epitelových buněk a ty ji obklopí. Tvorba chlupů je pomalým procesem, který probíhá v cyklech, při kterých se střídá růstová a klidová fáze. Fáze cyklu jsou zobrazeny na obrázku 1. Během anagenní fáze je vlasový folikul plně funkční, následuje začínající katagenní fáze, kdy začíná degradace folikulu pokračující až do pozdní katagenní fáze. Při telogenní fázi jsou folikuly již degradované, dochází k postupnému uvolnění chlupu a začíná se formovat nový vlasový váček. Poté opět začíná anagenní fáze, kdy je nový vlasový váček aktivován, začíná růst nový vlas a celý cyklus se opakuje (Dyce *et al.*, 2009).



Obr. 1. Jednotlivé fáze cyklu růstu chlupu (Dyce *et al.*, 2009). A – anagenní fáze, B – začínající katagenní fáze, C – pozdní katagenní fáze, D – telogenní fáze, E – začínající anagenní fáze.

2.2.1.1 Vnější stavba chlupu

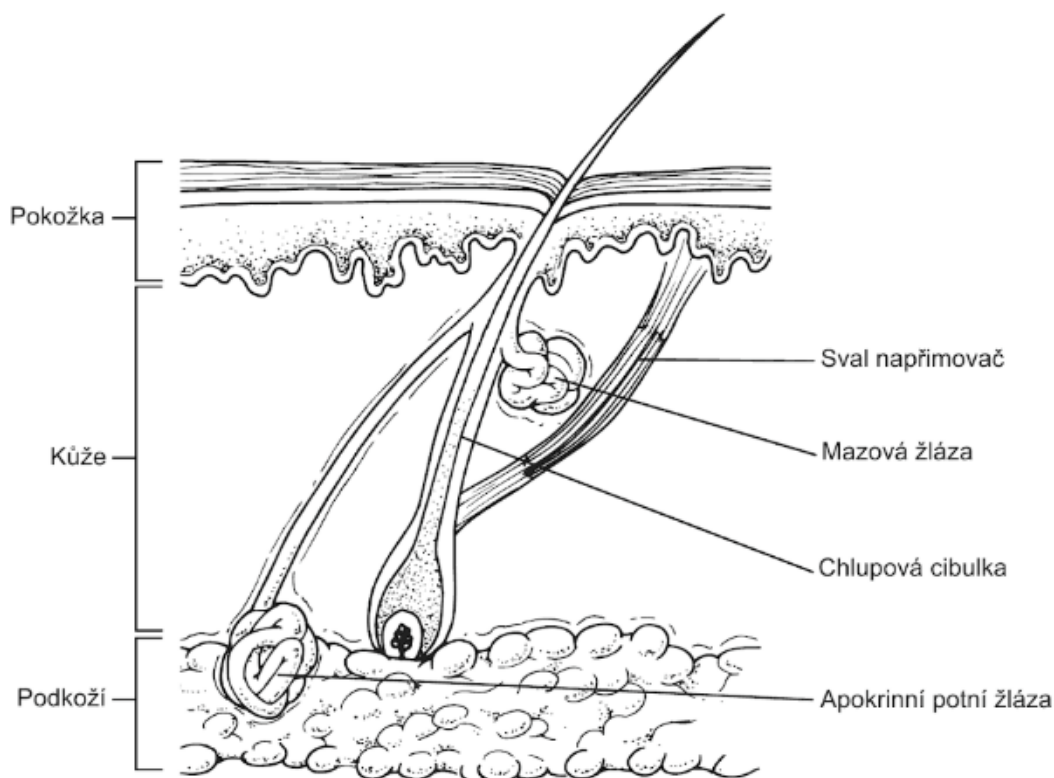
Pod pokožkou je chlup uchycen kořínkem, který se nachází na střední části chlupu – ose obklopené vlasovým váčkem tvořeným pokožkovým a kožním pouzdrém. Ve vlasovém kořínku se nachází vnější kořenové pouzdro. Chlupová papila je obklopena epitelovými buňkami, ze kterých se vytvoří chlupová cibulka, do té pronikají nervová vlákna a vlasečnice zajišťující výživu chlupu. Chlupová cibulka je uložena ve chlupovém folikulu. Obsahuje zárodečné buňky, ze kterých následně vyroste chlup a vytvoří se vrstva folikulu.

Část chlupu, který vyčnívá nad kůži, se nazývá supradermální část nebo také stvol, a jedná se o již mrtvou tkáň. Chlupový kmen nemá metabolickou aktivitu a jeho tvar a pevnost je udržována strukturou vytvořené uvnitř chlupového váčku.

Na chlupovou cibulku se upíná sval, nazývaný vzpřimovač chlupů. Vzpřimovač je veden od pokožky k ose chlupu. Svalová vlákna vzpřimovače jsou drobná, hladká a inervována sympatikem, ten vztyčuje nebo naopak stlačuje chlup ke kůži, čímž mění izolační vlastnosti srsti. V chladném počasí se vzpřimovač chlupu podílí na udržení tělní teploty, chladem se zkrátí, čímž dojde k naježení srsti (obr. 2). Další funkcí vzpřimovače chlupu je také vytlačování sekretu z mazové žlázy (Miholová a Lipský, 1999).

Mazová žláza je umístěna mezi chlupem a pokožkou. Mazová žláza, jejíž základ se vychlipuje v polovině trámce epitelových buněk, se vyvíjí společně s chlupy. Mazové žlázy produkují maz, jenž je odváděn do chlupového folikulu a po povrchu chlupu se dostává dále na kůži. Maz na povrchu kůže vytváří antibakteriální vrstvu.

Růst chlupu zajišťují především živiny z aminokyselin obsahující síru, které zajišťují pevnost a odolnost chlupu. Sirnými aminokyselinami obsaženými v chlupu jsou například methionin či cystein, chlupy potřebují také vitamíny a minerální látky.



Obr. 2. Průřez kůže s vnější stavbou chlupu (Reece, 2010).

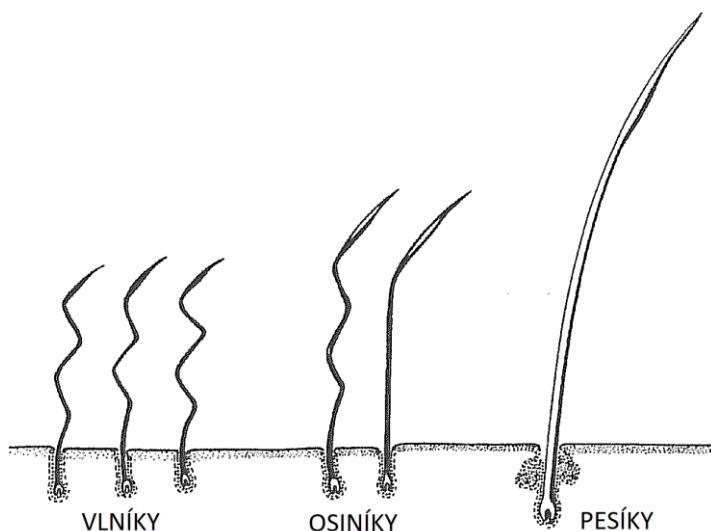
2.2.1.2 Vnitřní stavba chlupu

Chlup je tvořen z tyčinkovité řady buněk. Chlupová vrstva obsahuje tři části – kutikulu, kortex a medullu.

Medulla – dřeň chlupu je tvořena volnými úzkými buňkami, obsahuje smršťené buňky epiteliálních struktur a také keratin. Dřeň tvoří střední část chlupu – osu. Osa chlupu může mít různou strukturu, může být jak souvislá, tak fragmentovaná, nebo může být zredukována. Kortex je poloprůhledná hustá vrstva tvořící výplň mezi dřením a kutikulou. Obsahuje buňky naplněné keratinem a pigmentové buňky zbarvující srst různými odstíny. Kutikula je vnější vrstva chlupu, také nazývaná korová vrstva. Tato vrstva je tvořena bezbarvými, tenkými, zrohovatělými buňkami, které se překrývají. Buňky kutikuly jsou tvořeny keratinovými mikrofilamenty, ty mohou být koronální – prstencovitě obepínající chlup, či imbrikátní, které přesahují a kolem chlupu jsou umístěny ve více řadách. Kutikula obsahuje pigment, zpevňuje kortex, a také chrání chlup před mechanickým poškozením.

2.2.1.3 Typy chlupů

Dva základní chlupy, které tvoří srst jsou podsada a pesíky. Podsada vyrůstá z chlupové cibulky a vytváří izolaci, která je důležitá pro udržení homoitermie. Utváří ji jemné chlupy – vlníky a osíníky. Chlupy podsady mají různou délku a z kůže vyrůstají kolmo. Pesíky jsou delší, tvrdší a vyčnívající chlupy překrývající podsadu. Z kůže vyrůstají šikmo, jejich hlavním úkolem je chránit pokožku před přímým kontaktem s vodou a zamezit tak případnému podchlazení, díky obsahujícím pigmentům také určují zbarvení srsti. Jednotlivé typy chlupů jsou zobrazeny na obrázku 3 níže.



Obr. 3. Typy chlupů tvořící srst – podsada (vlníky a osíníky) a pesíky (Gaisler, 2007).

U savců se mimo tyto základní typy chlupů vyskytují také chlupy specifické.

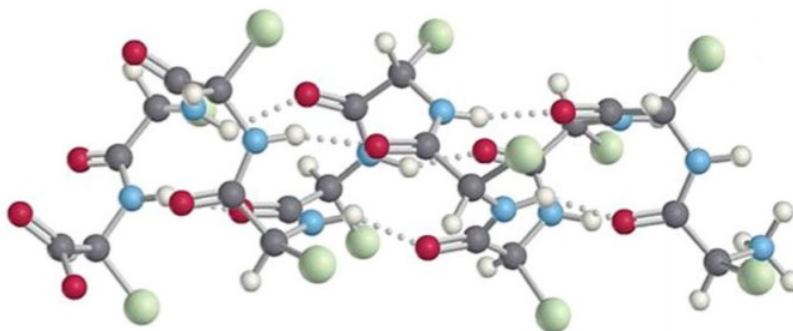
Mezi specifické typy chlupů patří například hmatové chlupy, což jsou dlouhé, pružné chlupy, jejichž kořen je obklopen krevním zálivem. Jedná se o chlupy se smyslovou funkcí, protože se v oblasti jejich kořene vyskytují nervová zakončení. Díky bohatému prokrvení a inervaci chlupových váčků je zajišťována hmatová funkce. V klidové fázi jsou chlupy přitisklé k tělu, pokud se krevní záliv zalije krví, dojde k jejich vzpřímení. Dále se mezi specializované chlupy řadí také štětiny, oční brvy či žíně, tedy silné, dlouhé chlupy s nápadným leskem, které často tvoří hřívu (Dyce *et al.*, 2009; Miholová a Lipský, 1999).

2.2.1.4 Chemické složení chlupu

Chlup obsahuje různé typy chemických látek, jedním z nich jsou proteiny (např. keratiny) či pigment – melanin.

Stavební bílkovinou obsaženou v srsti jsou především keratiny, které patří mezi skleroproteiny. Jedná se o proteiny vláknité struktury s tmelovou substancí v intracelulárních prostorech, která zabraňuje průniku látek skrz epidermis. Keratiny se podílejí na výstavbě intermediárních filament cytoskeletu chlupů, vlasů, peří, ale také nehtů či rohů. Keratiny jsou nerozpustné ve vodě a jsou odolné proti chemickým i fyzikálním vlivům. Chrání chlupy před poškozením. Jejich tvrdost a pružnost je způsobena disulfidickými můstky (Wang *et al.*, 2016).

Keratin má mnoho podobného i rozdílného s biopolymerem obsaženým v tkáních zvířat, a to kolagenem. Kolagen i keratin jsou složeny z peptidických řetězců tvořených specifickými sekvencemi aminokyselin. Tyto polypeptidické řetězce se díky velkému zastoupení aminokyselin alaninu a glycinu seskupují a stáčí za vytvoření α -helixů (obr. 4). V případě keratinů dochází k dimerizaci těchto řetězců, zatímco u kolagenu dochází k seskupování v trojici. Dalším rozdílem mezi kolagenem a keratinem je to, že kolagen je součástí matrix, zatímco keratin je produkován ve vnitřním prostředí keratinocytů. Ty po produkci keratinu odumírají. Keratiny obsahují velké množství síry, která je součástí aminokyselin cysteinu a methioninu (Florian, 2007; Marshall *et al.*, 1991; McKittrick *et al.*, 2012).

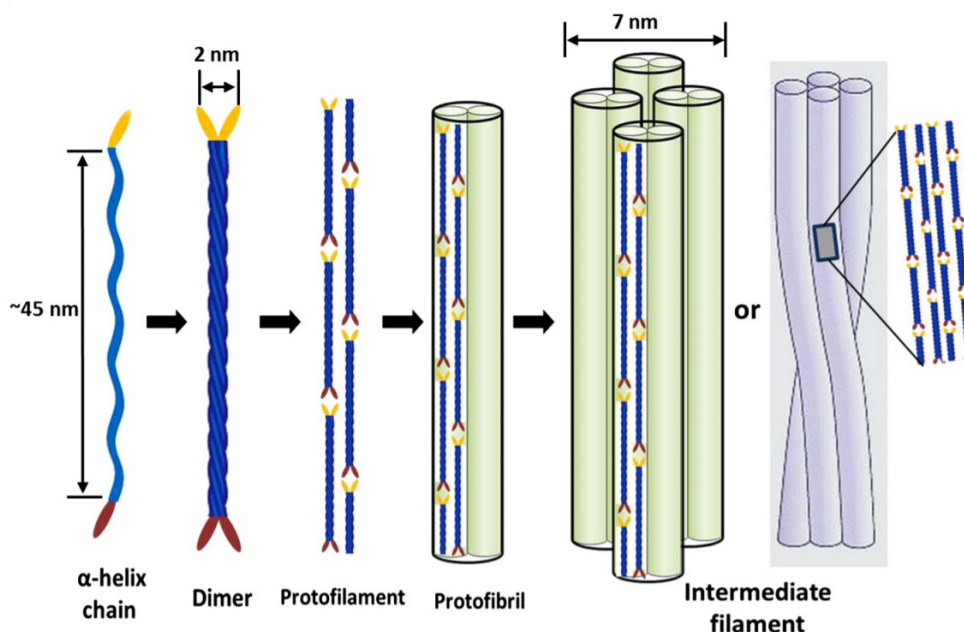


Obr. 4. Struktura α -helixu (Wang *et al.*, 2016).

Keratiny jsou stabilní chemické látky, ale může docházet k rozpadu peptidické vazby. Tyto vazby vznikají reakcí karboxylové skupiny jedné aminokyseliny s aminoskupinou další aminokyseliny.

Keratiny jsou rozděleny dle množství disulfidických můstků na tvrdé a měkké. Platí, čím více je v daném keratinu disulfidických můstků, tím je keratin tvrdší a pevnější. V chlupech jsou zastoupeny především tvrdé keratiny (Florian, 2007; Marshall *et al.*, 1991; McKittrick *et al.*, 2012).

Keratiny dělíme také podle jejich sekundární struktury na α -keratiny tvořící α -helix, a β -keratiny, které tvoří β -skládaný list. Vlákná α -keratinu dimerizují a ze vzniklých dimerů vznikají protofilamenta (obr. 5), ta spolu vytváří protofibrily. Seskupení čtyř protofibril, respektive osmi proflament, vytváří intermediární filamentum, tj. střední vlákno. Intermediární filamenta α -keratinů jsou složena z různých druhů bílkovin s nižším obsahem síry. Molekulová hmotnost pro α -keratiny se obvykle pohybuje v rozmezí 40–68 kDa, zatímco u β -keratinů je tato hodnota nižší, pohybuje se v rozmezí 10–22 kDa (Wang *et al.*, 2016).



Obr. 5. Přeměna šroubovice alfa-keratinu v intermediárním filamentu (Wang *et al.*, 2016).

V chlupech jsou přítomny α -keratiny, které jsou bohaté na aminokyseliny – cystein, glycin a serin. α -keratiny se nacházejí u všech obratlovců, zatímco u plazů a ptáků jsou navíc

přítomny β -keratiny. Celkový počet α -keratinů je mnohem větší u savců než u ptáků (Greenwold, 2014), což je způsobeno tím, že u ptáků jsou rychle překrývány β -keratiny, které peří obsahuje ve velkém množství (Alibardi, 2013).

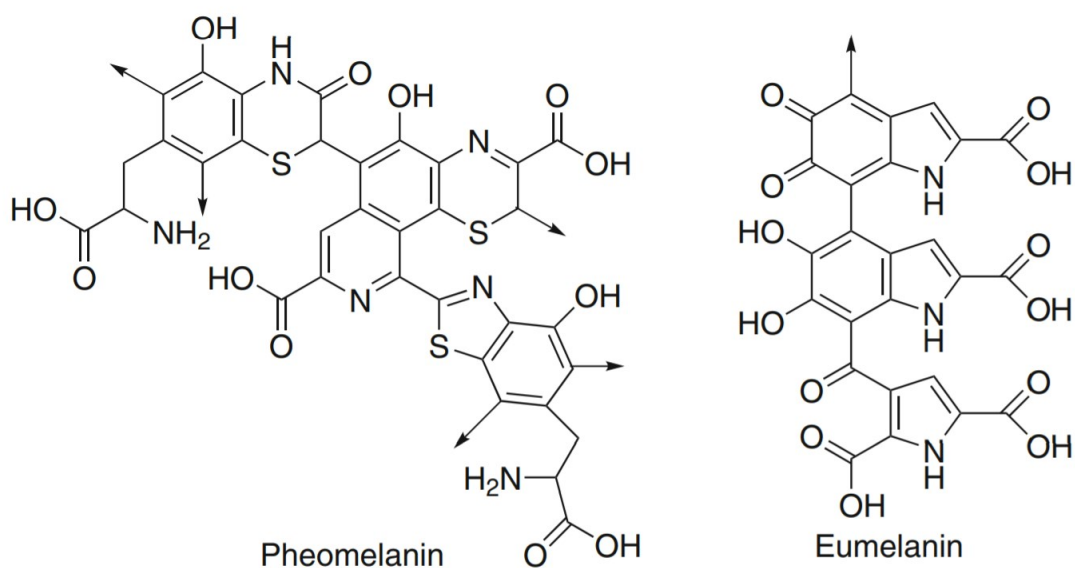
Keratiny přítomny v chlupech se rozdělují na keratiny typu I a typu II. Keratiny typu I jsou tvořeny kyselým proteinem, zastoupeny keratiny 3 až 38, zatímco keratiny typu II obsahují protein zásaditý, jsou těžší a zastoupeny keratiny 81 až 86.

α -šroubovice keratinu vytváří dimer, ve skutečnosti se ale jedná o heterodimer, který je tvořený kyselým a bazickým keratinovým vláknem. Tato vlákna vytváří dvoušroubovici s N-koncem a C-koncem, stejně jako je tomu u jiných polypeptidů. U tohoto heterodimeru rozlišujeme také helikální úseky a vazebná místa, která heterodimer stabilizují (Wang *et al.*, 2016).

Další chemickou látkou obsaženou v chlupech jsou pigmenty, tedy látky odpovědné za barvu chlupu. Pigmenty absorbují světlo a odráží dané vlnové délky světla, proto se jeví jako barevné. Jsou vázány na chromatocyty. Hlavním pigmentem vyskytujícím se u savců je melanin.

Melaniny jsou deriváty aminokyseliny tyrosinu. Jsou jedny z nejdominantnějších látek, které se podílejí na zbarvení kůže, vlasů a chlupů. Chemické i fyzikální vlastnosti melaninů se liší v závislosti na jejich druhu. Melaniny se v chlupech vyskytují ve dvou typech, jako eumelanin a pheomelanin (obr. 6). Produkují různé barvy, od červené až po černou. Pheomelanin je pigment světlé barvy, zatímco eumelanin je pigment hnědé až černé barvy (Riley, 1997; Solano, 2014).

Biosyntéza vzniku melaninu je u obratlovců lokalizována ve specializovaných organelách – melanosomech melanogenních buněk. Melaninové granule jsou následně endocytovány do epitelálních buněk. Jedná se o proces nazývaný cytokrinní přenos (Riley, 1997).



Obr. 6. Struktura eumelaninu a pheomelaninu (Sansinenea et al., 2015).

2.3 PSOVITÍ

Čeď psovití (*Canidae*) patřící mezi řád savců – šelem (*Carnivora*) zahrnuje několik rodů, mezi které patří také rod *Canis*. Do tohoto rodu patří například šakal, kojot či vlk. Psovití jsou rozděleni do tří podskupin – *Borophaginae*, *Hesperocyoninae*, které jsou řazeny mezi vyhynulé, a existující podskupinu *Caninae* zahrnující vlka, lišku či psa domácího.

Psovité šelmy se vyskytují na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Každý hlavní ekosystém je obýván psovitou šelmou, například polární liškou žijící v pusté tundře Arktidy, fenkem obývajícím saharskou poušť či americkou liškou šedou preferující zalesněné plochy. Většinou však obývají otevřené louky a pastviny.

I přes to, že velikost jednotlivých zástupců této skupiny se liší, tvar těla psovitých je podobný. Psovití mají obvykle vzpřímené špičaté uši, dlouhé tlapy, nohy přizpůsobené k běhu a huňaté ocasy. Psovité šelmy mají protáhlou obličejovou část lebky. Všichni psovití mají na předních končetinách vyvinuté čtyři prsty a tzv. „paspárek“, neboli zakrnělý pátý prst, na zadních končetinách mají pouze čtyři prsty. Každý prst je zakončen tupým drápem.

Jejich čich patří mezi nejlepší ze všech savců. Specializované boční nosní žlázy během lapání po dechu poskytují vlhkost. K označení svého území využívají pachové žlázy přítomné na hřbetní straně ocasu v oblasti sedmého až devátého ocasního obratle. Tato žláza produkuje těkavé terpeny (Padilla a Hilton, 2015).

Psovití jsou predátoři. Jedná se o masožravce živící se velkými i malými zvířaty, ale také mršinou či zeleninou a ovocem. K lovení kořisti využívají špičáky umožňující rozdrtit kosti. Kořist pronásledují na dlouhé vzdálenosti, dokud se kořist neunaví. Jsou tedy více přizpůsobeny vytrvalosti než rychlosti.

Jedná se o společenská zvířata žijící společně v malých skupinách, ve kterých je dominantní pár chovající mláďata v podzemním doupěti. K rozmnožování dochází zpravidla koncem zimy a mláďata se rodí v polovině či na konci jara. Mláďata otvírají své oči přibližně dva týdny po narození a jsou kojena po dobu čtyř až šesti týdnů.

Psovití spolu komunikují různými zvuky a schopnost komunikace je nejvíce vyvinuta u společenských druhů. Ke komunikaci využívají vytí, vrčení nebo také štěkání, které je doprovázeno pohyby ušima či ocasu. Zvuky vydávají také v případě ochrany svého území nebo odvrácení agrese.

Někteří zástupci psovíť jsou důležití pro obchod s kožešinami, například liška – druhé nejdůležitější zvíře v chovu na kožešinu, využívá se ale také kojot či šedý vlk. V Evropě jsou psovité šelmy loveny i pro zábavu. Někteří jsou považováni za škůdce člověka, a tak populace mnoha druhů byly zničeny. Kojoti a vlci jsou pronásledováni z důvodu zabíjení jedinců ve stádech ovcí a dobytka.

2.3.1 Vlk šedý (*Canis lupus*)

Vlk šedý je rozšířený druh savce, největší z psovíť šelem, který se vyznačuje velkou variabilitou habitatů. Vzhledem k tomu je jejich fenotypová variabilita, tedy například velikost, barva či hmotnost, rozdílná. Obývají obrovské oblasti severní polokoule. Nynější velké populace žijí např. na Aljašce, v Michiganu či Wisconsinu. Vlci obývají různá stanoviště – tundry, lesy, pastviny, ale také pouště. Největší žijící divokou psovitou šelmou jsou šedí vlci, kteří jsou považováni za předka psa domácího.

Vlci se vyskytují s různým zbarvením srsti, která bývá zbarvena od bílé, rezavé až po hnědou, šedou a černou. Zbarvení se odvíjí od regionu. Základní barvou vlčí srsti je šedožlutá. Na zádech, ramenou a také špičce ocasu se vyskytují výrazné černé skvrny. Základní barvu končetin představuje šedá. Šedí vlci mají hustou podsadu, která jim poskytuje vynikající izolaci proti chladným podmínkám.

Vlci se liší svou velikostí podle toho, kde žijí. Vlci žijící na severu jsou obvykle větší než vlci žijící na jihu. Hlavu má vlk, oproti psím typům, kterým se podobá (ovčák a vlčák), širší, oči

šikměji posazené, dále mají vlci kratší uši a delší nohy, huňatý ocas a široký hrudník. Vlčí lebka a tlama je protáhlá, což je předpokladem pro dobře vyvinutý čich. Vlk má také vynikající sluch, jeho zrak je ale nejméně rozvinutým smyslem. Ze struktury zubů je viditelná rozmanitá strava, má silné čelisti a jejich špičky jsou velké. Přední tlapy mají větší než zadní a jejich stopy jsou podobné stopám psů.

Ve volné přírodě se vlci dožívají nižšího věku nežli v zajetí, zde se věk dožití pohybuje i okolo 16 let. Vlci jsou vagilní masožravci, kořist představují velcí, ale i malí obratlovci, bezobratlí, zdechliny či rostliny. Loví nemocné či slabé jedince, díky čemuž pomáhají stádům stát se silnějšími. Bez potravy vydrží vlci až dva týdny. Při lovu potravy hraje roli několik faktorů, těmi jsou velikost, početnost a zranitelnost kořisti. Nejlepším smyslem vlka je čich, pomocí kterého dokáže zavětrít kořist až na několik kilometrů. Vlčí útok má pět fází. Nejprve dochází k lokaci kořisti, která může být náhodná nebo může dojít ke stopování prostřednictvím čichu. Pokud se kořist nedá na útěk, vlk se k ní přibližuje co nejvíce, když se kořist začne pohybovat, je vlky pronásledována, pokud se nehýbe, kořist opouští. Po pronásledování nastává útok, v případě malé kořisti dochází k útoku co nejdříve formou několika kousnutí. U větších kořistí pohybujících se ve stádu běží vlci podél stáda a vybírají nejvíce zranitelného jedince. Pronásledování nebývá dlouhé (Packard, 2003). Vlci „ožívají“ a loví především v noci v oblastech osídlenými lidmi. Jejich hlavními kořistmi je jelen, los, bizon či ovce.

Vlci se sdružují v takzvaných smečkách kooperujících při lovu potravy, rozmnožování i obraně svého teritoria. Smečka je hierarchicky uspořádána, dominance se projevuje především v oblasti krmení či rozmnožování a mění se v závislosti na síle jednotlivých členů. Dominantní nad celou smečkou je tzv. alfa samec a alfa samice. Vlčí smečka je tvořena z dospělého páru a mláďat. Má v průměru sedm členů, může mít však až 30 členů. Po dvou a více letech odcházejí vlci hledat partnera, založit nové území a smečku. Ti, kteří zůstávají ve smečce, později nahrazují rodiče.

Ke komunikaci s ostatními vlky využívají vytí. Vyjí, když se shromažďují za lovem, když truchlí, nebo pokud se nějaký člen smečky oddělil, čímž mu napomáhají najít cestu zpět. Vytí také slouží jako ochrana nebo komunikace s ostatními smečkami. Vlci mají největší tendenci výt během soumraku, než odejdou lovit a poté po jejich návratu.

Vlci jsou divokým předkem dnešních domestikovaných psů. Vlk je v České republice řazen mezi kriticky ohrožené druhy.

2.3.2 Domestikace

Domestikace je proces dlouhodobého charakteru, je doprovázen hromaděním malých změn na obou stranách vztahu, který probíhá mezi lidmi a populacemi živočichů (Zeder, 2012). Spočívá v dávném partnerství mezi psy (*Canis lupus familiaris*) a lidmi, které pravděpodobně bylo založeno na lidské potřebě pomoci s lovem či stádem nebo také včasné varování před nepřáteli, zatímco psi „na oplátku“ získali úkryt, zdroj potravy a společnost.

Domestikaci živočichů lze rozdělit do tří typů – komenzální domestikaci, přímou cestu domestikace a domestikaci kořisti (Zeder, 2012). V případě komenzální cesty dochází k velké účasti ze strany živočichů, kteří se do okolí lidských obydlí dostávají za účelem přiživení na dostupných zbytcích potravy, zatímco lidé se do tohoto procesu zapojují později. Komenzální cesta domestikace je velice pravděpodobná i v případě psa domácího, kdy se vytvořil vztah mezi vlky a lidmi (Coppinger a Coppinger, 2001). Přímá cesta domestikace je charakterizována jako člověkem cíleným přetvářením určitého druhu živočicha na domácí formu pro různé účely a živočich je tedy již od počátku chován v zajetí. Takovým příkladem je chov koně, osla či králíka (Larson a Burger, 2013). Do posledního druhu domestikace, tedy domestikace kořisti, lze zařadit živočichy, kteří byli původně loveni ve volné přírodě. Aby došlo ke zjednodušení lovu, začali lidé tyto živočichy chovat v zajetí. Jedná se o hospodářská zvířata, jako je například ovce, koza či tur domácí (Larson a Burger, 2013).

Domestikací vlka obecného vznikl pes domácí již minimálně před mnoha tisíci lety, pravděpodobně na různých místech severní polokoule, kde vlci žili volně. Vlci se postupně stávali méně agresivními a méně se báli lidí, a tak docházelo k rozvoji soužití mezi nimi.

V oblastech, kde se nevyskytují velké kořisti a potravní síť tak vykazuje malou rozmanitost, se vlci objevili také u skládek. Právě s tím souvisí hypotéza o divergenci předků domácích psů, kteří jsou uznáváni jako poddruh vlka šedého. Hypotéza uvádí, že tyto sociální poznávací schopnosti byly předpokladem k domestikaci (Packard, 2003). Na základě rychlosti změn DNA tří nalezených psů na archeologických nalezištích vědci určili, že k zahájení domestikace došlo před 20 až 40 tisíci lety. Výzkum provedl Krishna Veeramah, který řekl, že proces domestikace psů byl zahájen přestěhováním vlků na okraj táborů lovců a sběračů, kde se vlci živili zbytky. Ti vlci, kteří byli méně agresivnější, byli v procesu domestikace úspěšnější a s lidmi navázali vztah, který zprvu nebyl pro lidi nijak

výhodný, postupem času si však s vlky vytvořili vztah, který se nakonec vyvinul v takový, jaký dnes vidíme u psů (Briggs, 2017). O tom, jak se z vlků vyvinuli psi, se neustále diskutuje.

Tým bioarcheologa G. Larsona provedl analýzu, dle které na základě mitochondriální DNA došlo k domestikaci evropských vlků před 15 tisíci lety, zatímco k domestikaci asijských vlků později, a to přibližně před 12 tisíci lety. Asijské psi byli následně přepraveni do Evropy a vytlačili zde původní evropské paleolitické psy (Frantz *et al.*, 2016).

K domestikaci pravděpodobně docházelo v rozdílných obdobích, čehož je důsledkem variabilita tělesné stavby a velikost psů. V průběhu domestikace došlo k morfologickým změnám, a to ke zmenšení hmotnosti mozku v porovnání s vlkem, dále došlo ke zmenšení smyslových center – pes nemá ocasní pachovou žlázu a jejich čenich je kratší. U psů došlo k prodloužení střev, díky čemuž se pes stal všežravcem. V rámci domestikace došlo také k psychologickým změnám, a to například ke změně hlasového projevu, kdy vlci oproti psům neštěkají, pouze kňučí a vyjí, došlo ale také ke zhoršení samostatnosti. U psů se naopak zlepšila cvičitelnost.

Chování a morfologické rozdíly mezi vlky a psy jsou důsledkem výběru člověka vedoucí k požadovaným rysům chování či schopnosti učit se a plnit úkoly. Vlci se pohybovali v blízkosti lidských sídel, kde se přižívovali na zbytcích, díky tomu si částečně zvykli na přítomnost člověka.

2.3.3 Pes domácí (*Canis lupus familiaris*)

Pes domácí je považován za poddruh vlka. Jedná se o domestikovaného savce patřícího mezi psovité šelmy. Pes domácí patří mezi první druh, který byl domestikován a vyšlechtěn pro různá chování či smyslové schopnosti.

Pes je člověkem využíván při lovu, pastevectví, ochraně nebo také jako pomoc v policejní či vojenské společnosti. Nynější lidská společnost využívá psa také k pomoci lidem se zdravotním postižením a terapii.

Domácí psi se svým předkům, tedy vlkům, podobají tím, že žijí ve smečce s danou hierarchií. Domácí psi mohou být aktivní kdykoli během dne i noci.

K původu psa domácího lze zařadit genetickou divergenci od vlka a jeho domestikaci, ale také vývoj psa domácího na jednotlivé typy a plemena. Byly provedeny genetické studie,

kteře srovnávají psy s vlky. Tyto studie však prokazují oddělené skupiny, což vykazuje, že příbuzný předek psa je již zaniklý, tudíž psi nejsou geneticky příbuzní s nynějšími vlky (Frantz *et al.*, 2020; Larson a Bradley, 2014).

Příbuznost mezi vlkem a psem byla prokázána na základě analýzy v oblasti mitochondriální DNA. I přes to, že mezi psy, šakaly a kojoty se sekvence lišily více, nežli v případě psa a vlka, se odborníci přiklánějí k teorii, že pes má polyfyletický původ, který vypovídá o tom, že předkem psa domácího není pouze vlk, ale za další předky psa považují kojota, šakala a další.

Psa řadíme mezi dravce, masožravce, a proto stejně jako ostatní, i pes má silné svaly či kardiovaskulární systém umožňující vytrvání a sprint, dalším znakem dravce jsou zuby, které umožňují chycení a trhání kořisti. Svaly umožňují skok a pohání nohy vpřed. Chodidla jsou malá, psi chodí po špičkách.

Hmotnost i velikost se u jednotlivých jedinců liší. Psi mívají hnědé oči, čímž se od vlků liší. Vlci totiž mívají oči vždy žluté nebo světle zbarvené. Domácí psi jsou z hlediska tvaru a velikosti velice rozdílní.

Dýchací systém psů, stejně jako koček, hraje důležitou roli nejen v přijímání kyslíku a eliminaci odpadních plynů, ale také při regulaci teploty, protože u nich nedochází k pocení kůži. Vzhledem k tomu, že psi mají v kůži malé množství potních žláz, regulují svou tělesnou teplotu lapáním po dechu a pocením tlapkami. Výměnu tepla umožňují nosní spirály mezi tepnami a žilami na povrchu čelistní kosti.

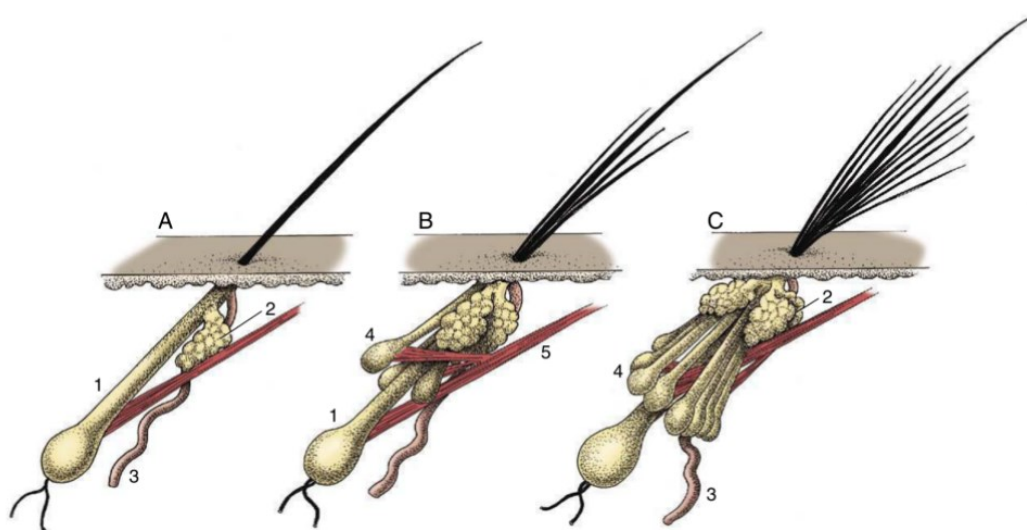
Komunikaci psů s prostředím umožňuje zrak, čich, sluch i chuť. Vizuální systém psa je vyvinutý ke zdatnému lovu, zatímco ostrost jeho zraku je špatná. Psi mají zrak uzpůsobený k vidění za špatných světelných podmínek, mají tedy velké zornice. Rychlé určení přesného místa zvuku umožňuje psům pohyblivost uší, kterou zajišťuje více než osmnáct svalů. Pes je schopen uši naklánět, otáčet, zvedat nebo spouštět.

2.3.3.1 Srst psů

Psí srst se rozděluje na dvě varianty, takzvanou „double“, kterou najdeme u psů pocházejících z chladnějších klimatických podmínek složenou z hrubých pesíků a jemných spodních chlupů, a srst nazývanou „single“, která má pouze vrchní chlupy.

Vlasové folikuly psa se vyvíjejí již před narozením, ale zpravidla začínají růst až po jeho narození. První chlupy se objevují u 29denního zárodku psa kolem očních víček, vrchního pysku a brady, tyto vyvinuté dlouhé hmatové vousy na obličejí jsou duté. Folikuly klasických chlupů se na kůži začínají objevovat v předzárodkové fázi na hlavě a krku. Při běžném vývoji srsti jsou chlupy nejvíce vyvinuty kolem hlavy, na břicho a ocasu. Zárodky základních chlupů se vyvíjejí poměrně v rovnoměrné vzdálenosti. Jak kůže roste, zvětšuje se její povrch a vyvíjí se nové zárodky chlupů mezi již vytvořenými, což má za následek seskupení několika skupin folikulů dohromady. Později se primární zárodek vyvine do sekundárního, tento proces je zahájen již před narozením a dokončen po narození (Evans a Lahunta, 2013).

U štěněte se obvykle vyskytují pouze jednoduché chlupy, které vyrůstají z každého vnějšího otvoru folikulu na kůži. Sekundární folikuly tvoří vlákna intenzivních bazofilních buněk, které z původního místa, přilehlého k mazové žláze primárního folikulu, prostupují hlouběji do kůže. Chlupy jsou na kůži viditelné po třech až čtyřech týdnech po narození, kdy je u každého primárního folikulu možné vidět růst dvou až tří sekundárních chlupů tvořících podsadu. V osmi až deseti týdnech jsou sekundární folikuly uspořádány okolo centrálních a postranních primárních chlupů, jsou umístěny na stejné straně jako apokrynní žlázy. Následuje tvorba sekundárního folikulu až do pubertálního období, kdy se objeví šest a více chlupů v otvoru jednoho folikulu (obr. 7). Základní chlupy jsou větší a mají plně vyvinutou dřeň. Jejich nervy a krevní zásobování je lépe vyvinuto než u sekundárních folikulů. Při vývoji se chlupy štěněte mění z načechraných chlupů v drsné, u dospívajících psů rostou chlupy hojně, zatímco u starých psů již dochází k řídnutí srsti, chlupy jsou kratší a postupně ztrácí barvu, tedy šednou. Spolu s křehnutím chlupů klesá pružnost kůže a podkožní tkáň (Evans a Lahunta, 2013).



Obr. 7. Vývoj postnatálního vlasového folikulu psa (Dyce et al., 2009). A – jednoduchý folikul přítomný týden po narození; B – komplexní vlasový folikul (12 týdnů po narození); C – složitější folikul (28 týdnů po narození). 1 – primární vlasový folikul; 2 – mazová žláza; 3 – kanál sladké žlázy; 4 – sekundární vlasový folikul; 5 – vzpřimovač chlupu.

Vlasová pokožka dospělého psa obsahuje komplexní vlasový folikul, což je svazek chlupů, který rozděluje společné otvory na povrchu. Komplexní vlasové folikuly jsou běžně seskupeny do skupin po dvou až třech folikulech vytvářející řadu. Typická komplexní skupina je složena ze sekundárních (podsadových) chlupů a dlouhých, tvrdých základních (krycích) chlupů. Různá plemena mají odlišné počty skupin folikulů a různé množství chlupů v komplexním vlasovém folikulu. Například hladkosrstý jezevčík či pudl mají 400 až 600 skupin na cm^2 srsti, zatímco německý ovčák či rottweiler mají pouze 100 až 300 skupin na cm^2 srsti. Stejně tak se liší počet chlupů ve skupině, například u rottweilera je to 9–15 chlupů, u jezevčíka pouze 2–5 chlupů. Je pravidlem, že plemena, která mají větší počet vlasových skupin, mají jemnější chlupy (Evans a Lahunta, 2013).

Vlasový folikul psa je z části tvořen hladkým svalem mazové žlázy, která se vyskytuje ve shlucích. Hladké svalstvo vzniká z externího pláště kořínku každého vlasového folikulu a poté se spojuje jako společný svalový svazek, který vstupuje do pokožky. Při stahu hladkého svalstva se celý svazek folikulů nadzvedne a obsah mazových žláz se vyprázdní do společného obalu folikulu, který je sdílen všemi chlupy. Potní žláza je přidružena ke každému souboru vlasových folikulů. Každý sekreční pór se nachází hluboko v podkožní tkáni. Prodloužení póru přechází ve vyměšovací trubici potní žlázy vstupující do pokožky

podél skupiny folikulu a vyprázdní se do otvoru mazové žlázy. Potní žlázy nemají u psů hlavní vliv při tepelné regulaci. Mastný sekret pocházející ze žláz vlasových folikulů udržuje pokožku jemnou a pružnou, vstupuje také do osy chlupů, čímž jim dodává lesk.

Oblast vlasového folikulu psích chlupů obsahuje kmenové buňky, kde probíhají různé periody, během nichž dochází ke zpomalení růstu. Při této fázi jsou mrtvé vlasy držící se folikulu kompletně odpojeny od neaktivního kožního váčku. Po proměnné periodě vstupují nečinné kmenové buňky do organogenní periody, ve které dochází k regeneraci nových vlasových kořínek a obnovení produkce chlupu. V tuto chvíli vypadne starý vlas, který je nahrazen novým. U jednotlivých plemen lze pozorovat odlišné tempo růstu během různých ročních období (Evans a Lahunta, 2013).

Bylo zjištěno, že například průměrný růst chlupu u samce bigla byl 0,4 mm za den v zimě a 0,34 mm v létě (Butler a Wright, 1981). U samce chrta byl denní růst chlupu 0,04 mm v létě a 0,18 mm na podzim (Gunaratman a Wilkinson, 1983). Na základě tohoto zjištění lze tvrdit, že denní přírůst chlupů je vyšší v chladnějším období roku. U kříženců a nečistokrevných plemen je však růst chlupu individuální v různých částech těla (Evans a Lahunta, 2013). Opětný růst po zastřížení srsti je zobrazen na níže uvedeném obrázku 8.

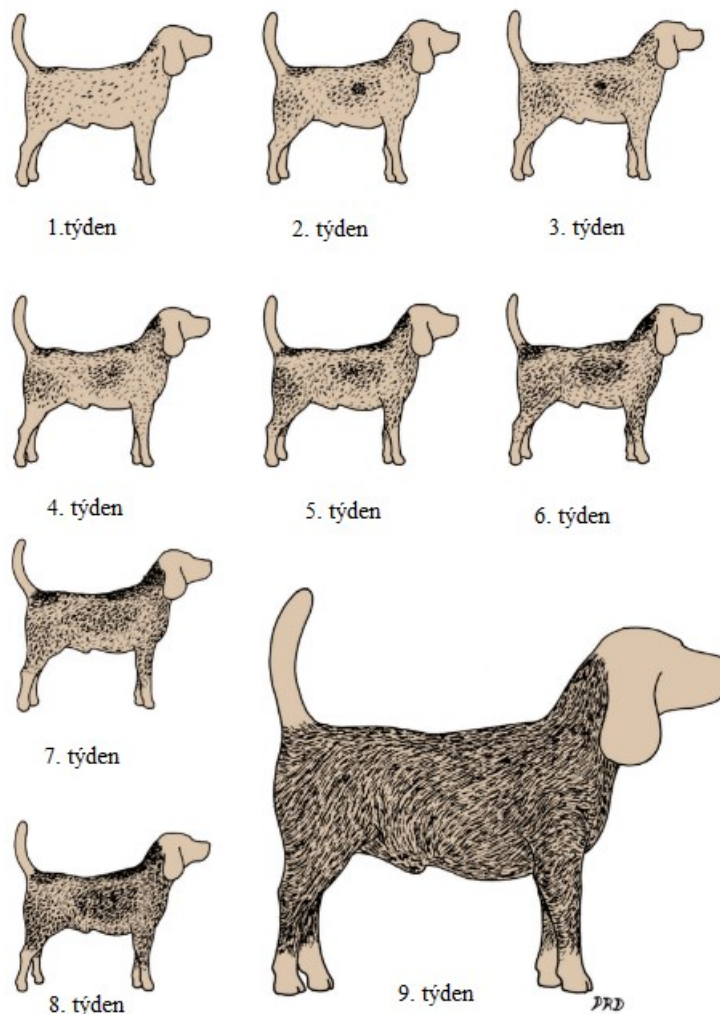
Proces obměny srsti je postupný, takže pes nikdy nezůstává bez srsti. Uvolňování chlupů je do určité míry řízeno geneticky, ale je také ovlivňováno vnějším prostředím, kdy závisí například na sezónních změnách teploty. Bylo pozorováno, že u krátkosrstých psích plemen dochází k vypadávání chlupů po celý rok, zatímco u dlouhosrstých plemen dochází k sezónnímu línání dvakrát ročně (Evans a Lanhuta, 2013).

Existuje několik typů chlupů, různé délky, tloušťky, tvaru průřezu i barvy u různých i stejných druhů plemen. Psi chlupy lze rozdělit na šest typů (Evans a Lanhuta, 2013).

Rovné chlupy jsou pevné, štětinaté a často sytě zbarvené. Někdy jsou také nazývané ochranné nebo krycí chlupy. Jedná se o hlavní a největší chlupy ve vlasovém folikulu, jsou nejdelšími chlupy mající silnou medullu a slabý kortex, jejich osa může být rovná či zahnutá.

Štětiny se nachází na hřbetu, jsou slabší, jemnější a blíže k podsadě. Začátek chlupu může být vlnitý, konec chlupu je podobný rovnému chlupu. Slouží jako ochranné chlupy.

Vlnité štětiny jsou vlnité a dobře vyvinuté. Jedná se o největší sekundární chlupy.



Obr. 8. Obnovení srsti po zastřížení ročního psa (Evans a Lanhuta, 2013, upraveno).

Štětinaté vlnité chlupy jsou dlouhé, jemné chlupy, kratší a jemnější než vlnité štětiny s méně vyvinutou štětinou a menší medullou. Jsou vlnité ve spodní části osy a největší z podsadových chlupů.

Dlouhé vlnité chlupy mají velmi zvlněnou osu s malou štětinou na konci. Medulla je velmi malá a může být přerušena. Tento typ chlupů je podobný vlně.

Jemné vlnité chlupy jsou kratší a jemnější než předchozí typ. Tyto chlupy jsou nejjemnější chlupy podsady, často vlnité, krátké s velice málo vyvinutou štětinou na konci.

Vznik štětin na špičce osy chlupu určuje, že nejproduktivnější je růst v rané fázi, protože špička osy má větší průměr než zbytek osy. Existují tři druhy srsti podle délky, a to normální srst podobající se srsti divokých psů, kterou má například německý ovčák, dále krátká srst

a dlouhá srst. Délka chlupu je řízena individuálně geneticky. Krátká srst převládá nad dlouhou a rovná či vlnitá srst ustupuje před hrubou srstí. U většiny plemen je délka i varianta sezónní srsti ovlivněna teplotou okolí a klimatem (Evans a Lanhuta, 2013).

2.4 PSÍ PLEMENA

Divergenci psů v různá plemena pravděpodobně vyvolal přechod kočovného životního stylu člověka na usedlý život založený na zemědělství, nikoli lovu. Nynější psí plemena vznikla prostřednictvím takzvaného „bottleneck-efektu“, tedy genetického driftu.

Psi prošli během několika let fenotypovou změnou a pomocí umělé selekce způsobené lidmi byli formováni do dnešních moderních psích plemen. Ta se liší velikostí, hmotností, délkou i zbarvením srsti, nebo také chováním. Dnes je již více než tisíc identifikovaných plemen psů, z nichž pouze přibližně 20 % je uznáváno kynologickými kluby (Mehrkam a Wynne, 2014). Psi byli selektivně chováni pro různé smyslové schopnosti, fyzické vlastnosti či chování. Byli vychováni pro různé druhy lovu, hlídání nebo pastvu hospodářských zvířat.

První důkazy o výrazných plemenech psů se objevily zhruba před třemi až čtyřmi tisíci lety (Mehrkam a Wynne, 2014). Vědci se shodují, že většina dnešních plemen psů představuje nedávný vývoj, který je pozůstatkem dávných rozmanitých procesů domestikace. Odlišné proporce těla a také schopnosti mohou být důsledkem toho, že v období domestikace vedli lidé kočovný styl života, psi se s nimi šířili, a tak se vyvinula populace psů. Plemena se začala rozvíjet přibližně před 500 lety z poměrně homogenního genofondu (Hirst, 2019).

Biologicky jsou plemena psů skupiny v rámci poddruhu *C. familiaris*, které se velmi podobají jeden druhému na základě řady charakteristik (Mehrkam a Wynne, 2014). Jedna hypotéza tvrdí, že plemena psů pocházejí z ras přizpůsobujících se různým prostředím s malým či žádným lidským selektivním chovem (Coppinger a Coppinger, 2001), zatímco alternativní hypotéza tvrdí, že základem pro založení plemen psů byla umělá selekce člověkem, jejíž základem bylo spojení psů s podobnými vlastnostmi (Mehrkam a Wynne, 2014).

Bez ohledu vzniku plemen, je dnes široká variace psích plemen produkována a udržována probíhající lidskou selekcí specifických mutací a kombinací velikosti, typu srsti a její barvy (Coppinger a Coppinger, 2001).

2.4.1 Border kolie

Border kolie je středně velký pes s mandlovýma očima, která jsou projevem inteligentního výrazu a jsou charakteristickým znakem tohoto plemene. Barva očí může být hnědá nebo modrá. Jedná se o „atletické“ plemeno, které je velice energické a vyžaduje každodenní cvičení, vynikají také svou poslušností. Border kolie byly vyšlechtěny pro shromažďování a kontrolu ovcí. Jsou považovány za jedno z nejinteligentnějších plemen.

U border kolií existují dva typy srsti – drsná a hladká. Hrubá vnější srst je středně dlouhá, zatímco hladká srst je kratší. Hrubá srst tvoří osrstění na nohou, hrudi a bříše. Obličej, uši, chodidla i přední končetiny jsou pokryty krátkou, hladkou srstí. Osrstění hladkými chlupy je minimální. Oba typy srsti jsou husté a nepromokavé, občas mohou být zvlněné. Srst je nejčastěji černá s bílou barvou na obličejí, krku, nohou a špičce ocasu. Zbarvení však může být různé – hnědé, červené i modré.

2.4.2 Boxer

Boxeři byli původně chováni jako strážní psi, dnes jsou rodinnými společníky s vysokou hladinou energie, a proto potřebují spoustu pohybu. Jedná se o středně velké, svalnaté psy s inteligencí, ostražitostí a nebojácností, ale i přes to jsou přátelští. Toto plemeno pochází z Německa a bylo vyšlechtěno ve strážného, pracovního a společenského psa.

Mnoho boxerů má zkrácený ocas a uříznuté uši, pokud uši nejsou uříznuty, jsou středně velké a visí dolů. Oči jsou tmavě hnědé barvy. Charakteristickým znakem pro boxery je široká, tupá tlama. Má silné končetiny, jeho svaly jsou dobře vyvinuté a tvrdé. Boxeři netolerují horké počasí, proto je potřeba dbát na to, aby nedošlo k jejich přehřátí, zároveň potřebují ochranu před chladem, protože mají krátkou srst.

Srst boxerů je přiléhavá, krátká a lesklá. Často je plavé nebo žíhané barvy s bílými znaky na nohou a podbříšku, které se často rozpínají až ke krku a hlavě. Žíhaná srst je tvořena řídkými až hustými černými pruhy na žlutém podkladu. Bílé zbarvení vylepšuje vzhled psa, nesmí však být zastoupeno z více než jedné třetiny srsti. S bílým zbarvením je spojena jejich hluchota, a proto toto zbarvení není žádoucí.

2.4.3 Čivava

Nejčastější teorie tvrdí, že toto plemeno má původ v Mexiku. Čivava je nejmenším plemenem na světě. U vrcholu hlavy mají měkké místo, protože nedošlo ke spojení kostí.

Čivavy mají velké ostnaté uši, krátké a špičaté čenichy, a velké kulaté oči. Jedná se o velmi společenské psy, kteří mají rádi pozornost. Mohou být více náchylnější ke štěkání než velcí psi.

Mají dva druhy srsti, jedním typem je hladká krátká srst, druhá měkká a dlouhá srst lemující uši a nohy. Hladkosrstá čivava má hladkou, lesklou srst, která přiléhá k tělu, na krku má hustou delší srst, na hlavě a uších je srst tenčí a její ocas je chlupatý. Dlouhosrstá čivava má měkkou srst, která je buď rovná či mírně zvlněná. Oproti hladkosrsté čivavě má „opeřený“ ocas, na krku má také hustou srst a na nohou jsou chlupy delší. Barva srsti je velice rozmanitá, může být černá, bílá, plavá, šedá, stříbrná, žíhaná či v dalších kombinacích.

2.4.4 Francouzský buldoček

Francouzský buldoček je plemeno vyšlechtěné zkřížením krysaříka a již zaniklého toy bulldoga. Jedná se o hlídajícího psa s mírným a přátelským temperamentem. Je znám svým plochým obličejem čtvercového tvaru spolu s velkýma ušima. Je malý s mohutným svalnatým tělem. Oči buldočka jsou tmavé, téměř černé.

Srst francouzského buldočka je krátká, jemná a lesklá. Podle standardu jsou uznávané barvy bílé, krémové nebo plavé, které mohou být jakkoli červené. Barva srsti souvisí s genetickými zdravotními problémy.

2.4.5 Chrt dlouhosrstý a krátkosrstý

Chrti jsou psi vyšlechtěni na rychlost a lov, při kterém nepoužívají čich, ale velmi dobře vyvinuté oči. Jedná se o vysoké, štíhlé, šlachovité psy. Chrti jsou přátelští, neagresivní a inteligentní.

Chrti krátkosrstí mají dlouhou a úzkou hlavu, uši vyhozené dozadu a tmavé oči naznačující inteligenci. Mají krátkou, hladkou a přiléhající srst jakékoli barvy, ta může být plavá, černá, červená, šedá či bílá. Srst může být i žíhaná.

Chrti dlouhosrstí mají neobvykle silné přední tlapy, dlouhou, ne příliš úzkou lebku, oči jsou tmavé a uši jsou posazené v zadní části hlavy. Srst chrtů dlouhosrstých chránící před studeným vzduchem je složena ze silných chlupů. Na žebrech, předních i zadních končetinách je srst dlouhá a velmi jemná. U dospělých psů podél hřbetu směrem dozadu je srst krátká. Jejich uši jsou dobře osrstěné. Vyskytuje se ve všech barvách.

2.4.6 Jack Russell teriér

Jack Russell je malý teriér s původem v Anglii. Byl vyšlechtěn především k lovu lišek. Jedná se o energické, přátelské a chytré psí plemeno. Hlava je směrem k očím zúžená, oči jsou mandlového tvaru, tmavě zbarvené. Uši jsou malé na přední části hlavy.

Jejich srst je převážně bílého zbarvení s černými, hnědými nebo žlutohnědými fleky. Srst je buď hladká, středně hrubá nebo hrubá. Psi s hrubou srstí mohou mít na ocasu nebo tváři delší chlupy nežli psi s hladkou srstí, a mají náznak obočí a vousů. Hladká srst není tvořena dlouhými chlupy a je hustá. „Zlomená“ srst je velice podobná hladké srsti, ale má stopové chlupy na hlavě, obličejí, nohou i těle. Všechny typy srsti mají podsadu s hrubou strukturou.

2.4.7 Jezevčík dlouhosrstý, krátkosrstý, hrubosrstý

Jezevčíci jsou psi využíváni pro myslivost, patří ke společenským, přátelským a oddaným plemenům, ale mají svůj rozum. Mají zavalité tělo s krátkými nohami, přední tlapky jsou nepřiměřeně velké.

Existují tři typy srsti – hladká (krátká) srst, dlouhá a hrubá srst. Jezevčík dlouhosrstý má mírně zvlněnou přibližně pět centimetrů dlouhou srst, která na uších vytváří volánky. Líná dvakrát ročně, a to na jaře a na podzim. Hrubosrstý jezevčík má na dotek hrubou a krátkou vrchní srst s měkčí podsadou, vyžadující speciální péči. Tvrdé chlupy se nacházejí všude na těle kromě čelistí, obočí a uší. Krátkosrstý jezevčík má lesklou, velmi krátkou a jemnou srst. Zbarvení srsti je různé, nejčastěji však červená (měďnatá, rezavá), či černá. Zbarvení může být jednobarevné či pálené.

2.4.8 Jorkširský teriér

Jorkširský teriér je plemeno malého vzrůstu, které pochází se Spojeného království. Dříve byl využíván k lovu hlodavců, dnes je především společenským psem. Hlava jorkšírů je poměrně malá a plochá, oči tmavé a středně velké, uši jsou malé a vztyčené.

Srst jorkšírů je rovná a rovnoměrně rozdělena na obě strany těla. Jejich srst je hedvábná a velmi podobná lidským vlasům. Na těle je srst dokonale rovná a středně dlouhá a zbarvená tmavě šedě až černě, zatímco na hlavě a končetinách je srst zářivě zlatavá. U kořene uší a na tlamě je srst mírně tmavší. Chlupy jsou u kořene tmavší než na špičce chlupu, což je způsobené slunečním světlem. Štěňata se rodí černá a srst jim zesvětlá obvykle po roce. Srst tohoto plemene je považována za hypoalergenní.

2.4.9 Mops

Mops je plemeno z Dálného východu. Má zdánlivě mrzutý pohled, ale je přítulným, bojovným, tvrdohlavým a soběstačným psem. Pro mopse je typická citová závislost na člověku, vyžaduje intenzivní kontakt. Obvykle funí a chrápe, protože má zkrácený čenich. Jejich ocas se pevně kroutí přes bok. Má velkou a kulatou hlavu s velkýma očima, na tvářích má hluboké a výrazné vrásky.

Mopsí srst je jemná, hladká a lesklá, může být plavé či černé barvy, světlá barva může mít různé odstíny. Srst je krátká a dvojitá.

2.4.10 Německý ovčák

Německý ovčák je jedno z nejrozšířenějších i nejinteligentnějších plemen na světě. Je využíván v mnoha odvětvích kynologie, je věrný a vyrovnaný. Ovčáci jsou středně velcí a mohutní psi. Mají mírně klenuté čelo, dobře vyvinutou čelist, středně velké, špičaté uši natočené dopředu a oči co nejtmavší barvy.

Srst líná dvakrát ročně. Na spodní straně bývá delší než na zbytku těla. Srst je dvojitá, střední délky. Vnější srst bývá hustá, chlupy jsou rovné, drsné a přiléhající k tělu. Hlava spolu s vnitřní částí ucha a obličejem, nohy a tlapy jsou pokryty krátkou srstí. Na krku je srst delší a silnější. Zadní části předních končetin a zadní končetiny jsou pokryty delší srstí. Zbarvení srsti je černé s červenohnědými, hnědými nebo šedými znaky.

2.4.11 Pudl

Pudl patří mezi nejinteligentnější plemena a je všestranný. Pudl je rovně stavěný. Jeho hlava je zaoblená, krk stoupá ze silných ramen, přední i zadní končetiny jsou rovné a tlapy poměrně malé. Jeho oči jsou tmavé a mají oválný tvar, uši by měly přiléhat k hlavě. Ocas je dlouhý a vysoko nasazený.

Srst pudlů se od srsti ostatních plemen liší tím, že není dvojitá, protože netvoří podsadu. Srst je velmi hustá a má přirozeně kudrnatou strukturu. Od ostatních chlupů se liší také tím, že chlupy se nachází převážně v růstové fázi, proto neustále dorůstá. I když líná, srst se zamotává do okolní srsti a nevypadne, proto je potřeba ji vyčesávat. U pudlů se vyskytuje srst dvou typů – kadeřavá a šňůrová. Kadeřavá srst je hedvábná a nadýchaná, velmi jemná a hustá, zatímco šňůrová srst je spletená a přiléhavá, ale stejně jako kadeřavá je hustá a jemná.

2.4.12 Zlatý retrívř

Zlatí retrívři byli vyšlechtěni ve Velké Británii. Jedná se o klidné, přátelské plemeno, které vyhledává společnost lidí. Využívají se jako canisterapeutičtí, vodící či asistenční psi. Zlatý retrívř je středně velký lovecký pes s širokou lebkou, kulatýma hnědýma očima a nepříliš dlouhým čenichem, který je černý, ale stářím mění svou barvu na růžovou. Uši má svěšené.

Zlatý retrívř má nepromokavou podsadu. Jeho srst je hladká či zvlněná s krémovým až zlatavě rudým zbarvením. Srst je bohatá a přiléhá k tělu. Podsada je měkká, v létě udržuje chlad a v zimě naopak teplo. Líná na jaře a na podzim. Na předních částech končetin mají zlatí retrívři mírné osrstění, zatímco na přední části krku, zadních částech končetin a spodní části ocasu je osrstění hustší. Srst na hlavě, předních částech končetin a tlapkách je krátká.

2.4.13 Stafordširský bulteriér

Stafordširský bulteriér je středně velké plemeno pocházející z Anglie. Je statečným, nebojácným a obětavým psem s velkým sebevědomím. Na svou velikost je velmi silným plemenem s krátkou hlavou. Jeho oči jsou kulaté, středně velké a tmavé barvy. Stafordští bulteriéři mají svalnatý, krátký krk a široký hrudník. Mají středně dlouhý ocas, který se ke špičce zužuje.

Srst je hladká a krátká těsně přiléhající k tělu. Srst líná každoročně, ale ztráta chlupů je minimální. Vyskytuje se ve více barevných variantách, např. bílá, rezavá či černá, ale může dojít i k jejich kombinaci.

2.4.14 Středoasijský pastevecký pes

Středoasijský pastevecký pes se využíval k hlídání stád i vesnic před predátory, jako byli vlci či medvědi. Jsou to velcí psi s robustním tělem. Jsou odvážní, nedůvěřiví vůči cizím a snadno přizpůsobiví klimatickým podmínkám. Uši a ocas se kupírují, aby útočící šelmy neměly uchopením možnost tohoto psa zabít. Hlava je velmi pevná, krk je nízko nasazený a tělo je poměrně široké.

Toto plemeno má srst tvořenou velmi hustými a dlouhými pesíky. Srst je rovná, krátká či středně dlouhá se silnou podsadou, která má za následek silné línání dvakrát ročně. V letním období je srst obvykle řidší, v zimě je naopak hustá. Nejběžnější zbarvení srsti je kombinace bílé a černé, další vyskytující se barvou je plavá, která nabývá různých odstínů.

2.5 METODY PRO IDENTIFIKACI PROTEINŮ

K identifikaci proteinů lze využít velké množství metod, mezi tyto metody patří například dvoudimenzionální elektroforéza, nukleární magnetická rezonance, rentgenová krystalografie, Edmanovo odbourávání, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie nebo také imunochemické metody.

U dvoudimenzionální elektroforézy je vzorek proteinů rozdělen dle velikosti nabitých částic prostřednictvím isoelektrické fokusace. Vlivem změny pH ztrácí částice, která se pohybuje v gelu, náboj a poté je protein pomocí klasické elektroforézy rozdělen dle molekulové hmotnosti. Výsledkem dvoudimenzionální elektroforézy je dvourozměrná proteinová mapa.

Rentgenová krystalografie je metodou umožňující určit prostorovou strukturu molekul. Metoda je založená na vychýlení rentgenových paprsků, který dopadá na protein. Při této metodě je důležité ponechat látku vykrytalizovat a poté krystal zkoumané látky ozářit monochromatickým rentgenovým zářením. Zkoumaná látka při ozáření paprsek ohýbá.

Nukleární magnetická rezonance je analytická metoda, při které je možné pozorovat chování atomového jádra v magnetickém poli. Během analýzy je protein vystaven pulsům rádiové frekvence a na základě tohoto záření skrz vzorek v silném magnetickém poli je možné určit vzdálenost mezi různými částmi proteinů, což umožní zjistit informace o struktuře analyzované látky. Nukleární magnetická rezonance se využívá ke zkoumání nízkomolekulárních látek a k objasnění struktury velkých molekul.

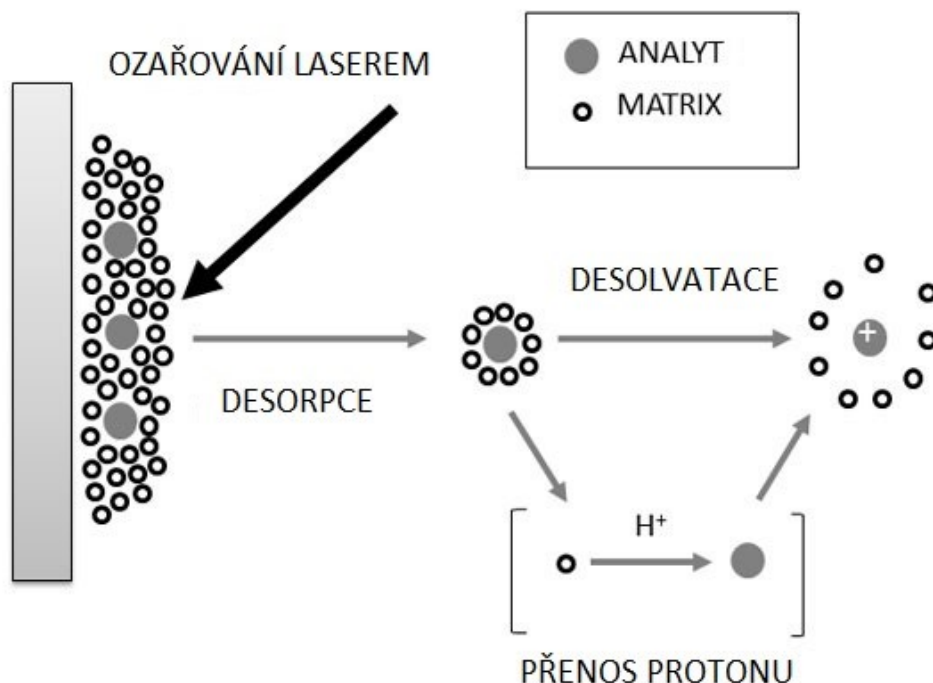
Princip metody Edmanova odbourávání spočívá ve specifické reakci fenyliothiokyanátu s α -aminoskupinou na N-konci polypeptidového řetězce, kdy následným okyselením pomocí kyseliny trifluoroctové (TFA) dojde k odštěpení N-koncové aminokyseliny ve formě cyklického derivátu a peptidový řetězec je tak zkrácen. Tento derivát přechází v prostředí 25% kyseliny trifluoroctové ve stabilnější formu, ve které mohou být aminokyseliny určeny například pomocí tenkovrstvé chromatografie (Smith, 2001). Metoda Edmanova odbourávání je již automatizována a spřažena s některou z metod hmotnostní spektrometrie. Jednou z těchto metod je metoda prováděna jak v roztoku, tak v gelu, a nese označení LC-Fluorescence-MS/MS, při které nejprve dochází k fluorescenčnímu označení N-konce proteinů. Proteiny jsou dále redukovány, alkylovány a štěpeny trypsinem. Případně přítomný pyroglutamát, který v polypeptidickém řetězci může vznikat posttranslační modifikací, je odstraňován enzymem – pyroglutamát aminopeptidasou (Koolman a Röhm, 2012). Vzniklé

peptidy jsou následně separovány a detekovány kapalinovou chromatografií spřažené s tandemovou hmotnostní spektrometrií a fluorescenčním detektorem. Tato metoda je časově méně náročná s vysokou citlivostí, která je až dvakrát vyšší než v případě klasického Edmanova odbourávání (Vecchi *et al.*, 2019).

2.5.1 Hmotnostní spektrometrie

Teoretické základy hmotnostní spektrometrie (MS) položil v roce 1913 J. J. Thompson, jenž zacílil proud částic neonu přes elektrické a magnetické pole a umístěním desky v proudu iontů změřil odchylku jeho částic. Hmotnostní spektrometrie je metoda založena na separaci iontů v silném magnetickém poli.

V minulosti byla metoda hmotnostní spektrometrie využívána pouze ke studiu nízkomolekulárních organických látek, v 90. letech minulého století však došlo k využívání této metody také pro biologické makromolekuly, a to díky objevení techniky umožňující převedení velké molekuly do plynné fáze (Káš, *et al.*, 1999). K tomuto účelu se dnes využívá především metoda Electrospray Ionization (ESI) či metoda Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI-TOF) (obr. 9).



Obr. 9. Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF (Hoffmann a Stroobant, 2007, upraveno).

Nyní je hmotnostní spektrometrie hojně využívanou metodou pro identifikaci proteinů (Bryson *et al.*, 2020; Tasaki, 2020; Solazzo 2017). Je to velice účinná identifikační, ale zároveň destruktivní metoda, kterou lze využít společně s plynovou či kapalinovou chromatografií. Hmotnostní spektrometrie umožňuje určit primární strukturu analyzované látky tím, že určí její aminokyselinovou sekvenci a odhalí posttranslační a chemické modifikace proteinů.

U hmotnostní spektrometrie můžeme rozlišit dva typy analýzy – kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativní analýza se využívá pro identifikaci nízkomolekulárních sloučenin či při zjišťování struktury vysokomolekulárních sloučenin. Kromě těchto informací poskytuje tato metoda informace o složení a struktuře povrchu organických látek, biomolekulách a izotopických poměrech atomů vzorku.

Její princip je založen na detekci iontů. Měření je prováděno hmotnostním spektrometrem, iontově-optickým přístrojem, který rozlišuje ionty na základě poměru hmotnosti a náboje. Ionty vznikají ionizací vzorku, ta může být pozitivní nebo negativní v závislosti na typu nabitých částic (Havliš, 1999). Při měření je vzorek nejprve převeden do plynné fáze, čímž vzorek získává určitý náboj, následně dojde v analyzátoru k separaci iontů, která je zjišťována z pohybu nabitě částice ve vakuu a detektor vysílá signál, který je zpracován jako spektrální výstup v podobě hmotnostního spektra.

V případě hmotnostní spektrometrie existují dva fundamentální principy, a to takzvané peptidové mapování (PMF) a sekvenování peptidových fragmentů (PFS) (Bouchal *et al.*, 2003). Pro svou jednoduchost je přednostně využíváno peptidové mapování, které dobře slouží pro identifikaci relativně čistých proteinových vzorků. Pokud se však nezdaří identifikace pomocí tohoto principu, využívá se sekvenování peptidových fragmentů. K fragmentaci a současné detekci vznikajících peptidových fragmentů může být využito celé řady metod hmotnostní spektrometrie, která využívá laserové desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI). Takovou metodou je například MALDI-MS využívající takzvaný „post-source decay“, kdy dochází k fragmentaci mezi iontovým zdrojem a detektorem (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2013), dále tandemová MALDI-MS/MS spjatá s disociací indukovanou kolizí (CID), při které jsou vybrané ionty aktivovány srážkou s neutrální molekulou plynu (Sleno a Volmer, 2004), nebo tandemová hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF (Chaurand *et al.*, 1999; Thiede *et al.*, 2005).

2.5.1.1 Štěpení trypsinem

Základním předpokladem pro analýzu pomocí hmotnostního spektrometru je rozštěpení proteinů na peptidové fragmenty. Toto štěpení probíhá chemicky nebo enzymaticky. Enzymatické štěpení je častější vzhledem k tomu, že enzymy štěpí polypeptidy a proteiny na specifických místech, což zajišťuje reprodukovatelnost (Switzar *et al.*, 2013). Enzymatická aktivita závisí na teplotě a také na hodnotě pH, což je pro každý enzym specifické. Pokud by došlo k překročení teploty, enzym by se stal nestabilním, při překročení dané hodnoty pH by mohlo rovněž dojít až k denaturaci.

Jedním z nejvíce využívaných enzymů v proteomice je trypsin. Ten je syntetizován ve formě proenzymu trypsinogenu ve slinivce břišní obratlovců. Trypsin byl první objevenou proteázou a je často využíván k hydrolytickému štěpení keratinů pocházející ze vzorků chlupů (Cardamone, 2010; Solazzo, 2017).

Trypsin patří mezi serinové proteázy, kdy přítomná aminokyselina serin zaujímá funkci nukleofilu. Místo, ve kterém dojde k rozštěpení vazby, určuje takzvaná „kapsa specifity“, která je součástí enzymu. V případě trypsinu obsahuje „kapsa“ záporně nabitý zbytek, což způsobuje, že trypsin přednostně štěpí peptidové vazby na karboxylových koncích bazických (tedy kladně nabitých) aminokyselin. Trypsin katalyzuje hydrolyzu za argininem a lysinem, a proto při štěpení za využití trypsinu, vznikají peptidy s argininem či lysinem na C-konci. Pokud by za těmito bazickými aminokyselinami následoval prolin, ke štěpení by nedošlo.

Vzhledem k tomu, že rychlost hydrolyzy závisí na typu aminokyselinového zbytku, tak v případě vazby s lysinem probíhá štěpení rychleji nežli štěpení vazby obsahující arginin. Pokud za peptidovou vazbou následuje kyselý aminokyselinový zbytek, dochází ke snížení rychlosti hydrolyzy. Štěpení v přítomnosti trypsinu probíhá v laboratoři obvykle při teplotě 37 °C po dobu několika hodin za podmínek mírně zásaditého prostředí, pokud je doba štěpení příliš dlouhá, dochází k autolýze trypsinu, pro jejíž oddálení je nutné přidat malé množství vápenatých iontů (Vaňková, 1999).

K izolaci proteinů jsou kromě enzymatického a neenzymatického způsobu také využívány další metody, mezi které patří například extrakce a fragmentace proteinů, jako je například dvoukrokový tepelný hydrolytický proces (THP) (Tasaki, 2020; Tasaki a Kaneoka, 2019).

2.5.1.2 Izolace peptidů pomocí reverzní fáze ZipTip C₁₈

Před analýzou vzorku hmotnostním spektrometrem je zapotřebí fragmenty přechistit a zakonzentrovat, k čemuž se využívají mikrokolonky s reverzní fází. Mikrokolonky jsou podobné špičkám automatických pipet, přičemž na konci každé mikrokolonky je pevně zafixované chromatografické médium. Po nasátí vzorku dochází k jeho navázání na reverzní fázi, následnému promývání a eluování, abychom získali čisté vzorky bez nežádoucích nečistot a mohly být využity přímo v hmotnostní spektrometrii. Reverzní fáze postup analýzy urychluje.

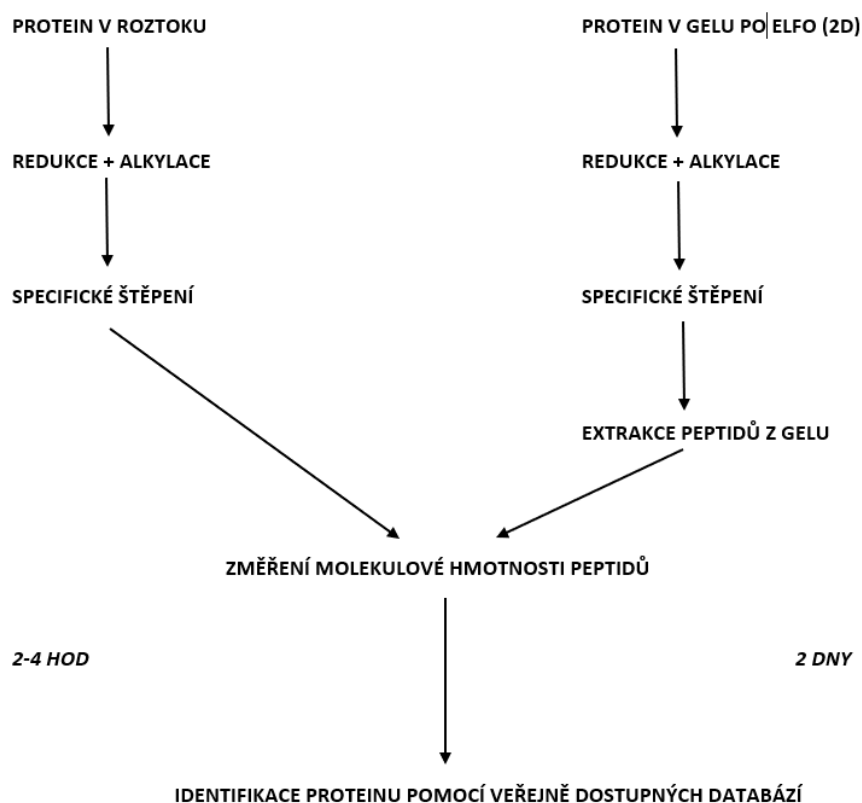
2.5.1.3 Metoda peptidového mapování

Metoda peptidového mapování je využívána pro identifikaci, ale zároveň pro analýzu proteinů. Jedná se o metodu založenou na principu rozštěpení vzorku chemickými či enzymatickými činidly, přičemž dnes jsou nejvíce používány proteolytické enzymy, kterým může být například trypsin nebo chymotrypsin. Trypsin je využíván především pro jeho specifitu a schopnost vytvářet peptidy o délce 10–20 aminokyselin, které jsou vhodné pro analýzu hmotnostní spektrometrií.

Principem je předpoklad zisku souboru peptidů unikátního pro určitý protein.

Tato metoda je velice účinná a také citlivá pro analýzu proteinů. Lze určit změny, jako je například substituce jedné aminokyseliny, a proto se tato metoda využívá k pozorování struktury proteinů. Při studování molekuly je důležité, aby analyzované proteiny obsahovaly dané identické sekvence (Vaňková, 1999).

V závislosti na vlastnostech látky probíhá peptidové mapování dvěma způsoby (obr. 10). Pokud je v roztoku obsažena dostatečná koncentrace, dochází k denaturaci proteinu, během které jsou disulfidické můstky přerušeny redukcí a poté pomocí alkylace zablokovány. Následně je peptidový řetězec rozštěpen za vzniku směsi peptidů a dochází k určování molekulových hmotností pomocí hmotnostní spektrometrie. Jednotlivé molekulové hmotnosti se nachází v databázi napomáhající identifikaci proteinů. V případě směsi látek je nejprve potřeba elektroforetického rozdělení, obarvení gelu a redukce vzorku. Následuje alkylace a štěpení za vzniku peptidového štěpu, ten je nutné z gelu vymýt. Pomocí první metody lze identifikovat proteiny během pár hodin, v případě druhé metody se však identifikace pohybuje v intervalu několika desítek hodin.



Obr. 10. Schéma dvou typů peptidového mapování (Laboratorní techniky biochemie; VŠCHT, 2006, upraveno).

2.5.1.4 Metoda MALDI-TOF MS

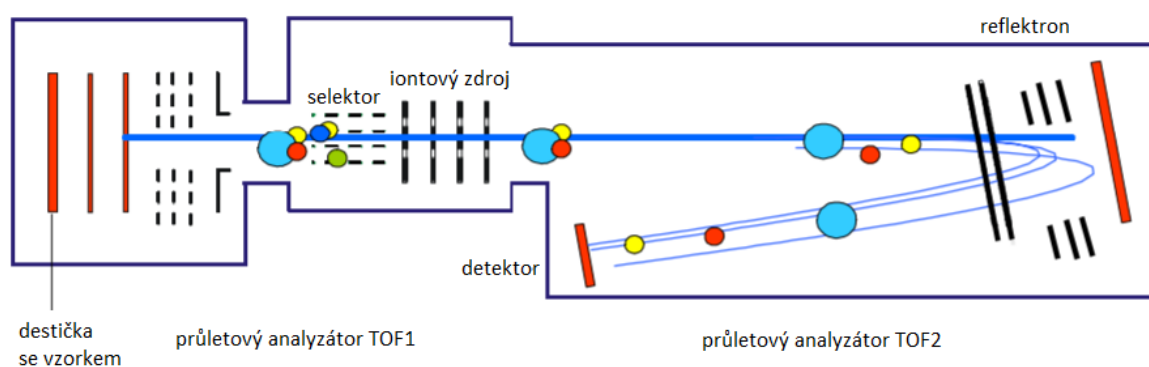
Ke stanovování hmotnosti peptidů se nejčastěji používá hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která dokáže identifikovat proteiny prostřednictvím peptidového mapování. Jedná se o metodu založenou na spojení ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem letu umožňující změření doby průletu iontů (Havliš, 1999). Zaostření iontů se stejným poměrem hmotnosti a velikosti náboje, a také odklonění nepotřebných iontů, umožňuje elektrická čočka společně s deflektorem.

Metoda MALDI je založena na vykrystalizování látky spolu s nízkomolekulární matricí, pokud by se nevyužila matrice, molekuly vzorku by byly přímo ionizovány, a to by vedlo k jejich nežádoucímu štěpení.

Matricí většinou bývají slabé organické kyseliny schopné absorpce energie z laserového záření, prostřednictvím nichž se na molekuly vzorku přenáší ionizační energie. Díky matrici

je umožněno měření molekulových hmotností více látek (Havliš, 1999). Při přenosu dochází k zablokování štěpení molekuly.

Vzorek je smíchán s matricí a ponechán na kovové destičce, kde dochází k vykrytalizování. Kovová destička se vloží do přístroje, kde jsou krystaly ozářeny pomocí laserového paprsku, čímž dochází k odpaření látky do vakua. Vzorek je matricí chráněn před přímým laserovým ozářením, protože právě matrice absorbuje většinu světelné energie. Pohlcením této energie matrice zároveň excituje, ve vakuové komoře přechází matrice z pevné fáze do plynné za vzniku hustého oblaku plynu. V důsledku srážek neutrálních molekul vzorku s nabitými ionty matrice se uvnitř oblaku formuje výsledný produkt, tedy ionizovaný vzorek (Hosseini a Martine-Chapa, 2017). Ionty získají stejnou hodnotu kinetické energie a jsou dále urychlovány do prvního analyzátoru TOF, zde letí přibližně stejnou rychlostí a stále blízko u sebe. Pouze částice vybrané hmotnosti prolétají selektorem a pokračují přes iontový zdroj, který urychlí jejich pohyb do druhého analyzátoru TOF. Zde dochází k separaci iontů na základě rozdílných hodnot poměru hmotnosti a náboje m/z . Jejich rychlost závisí právě na jejich hmotnosti. Použití reflektoru prodlužuje dráhu, na které dochází k separaci, a tím je docíleno lepšího rozlišení výsledného hmotnostního spektra. Čas přiletu jednotlivých separovaných složek je zaznamenávám detektorem, jehož výstupem je hmotnostní spektrum (Pusch *et al.*, 2003). Uspořádání analyzátor TOF/TOF je zobrazeno na následujícím obrázku 11.



Obr. 11. Průletový analyzátor TOF/TOF (Push *et al.*, 2003, upraveno).

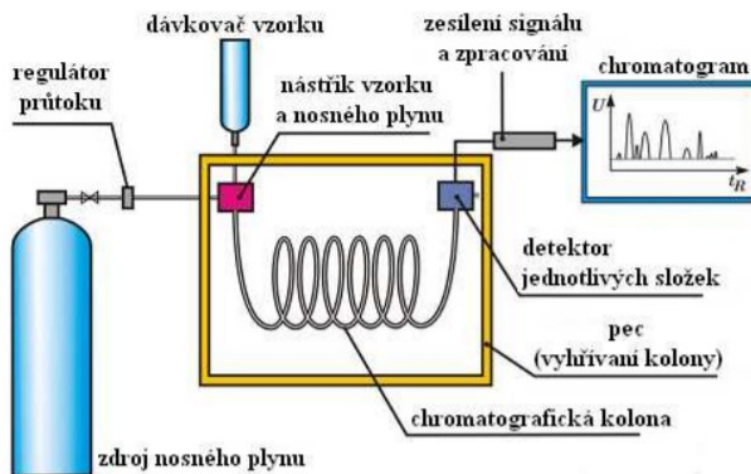
2.5.2 Kapalinová chromatografie

Další technikou, která se nyní pro identifikaci proteinů využívá mnohem více, je hmotnostní spektrometrie spojená se separací peptidových štěpů pomocí kapalinové chromatografie. Touto metodou je možné během jediné analýzy identifikovat velké množství proteinů obsažených ve vzorku (Paoletta *et al.*, 2013).

Kapalinová chromatografie je separační metoda, při které jsou ionty či molekuly vzorku rozpuštěny v mobilní fázi, kterou je kapalina. Rozpuštěné látky interagují s druhou (stacionární) fází v rozdílné míře, kdy jsou složky odděleny na základě jejich afinity k mobilní/stacionární fázi, tzn. že pokud mají komponenty různou polaritu, budou složky kolonou migrovat různou rychlostí.

Kapalinová chromatografie se skládá z nástřikového zařízení, tj. injektoru, předkolony, která má ochrannou funkci, analytické kolony, která udržuje stacionární fázi v rovnováze s rozpouštědlem a detektoru měřícího analytický signál eluentu (obr. 12).

Kapalinová chromatografie se využívá při analýze netěkavých či tepelně nestálých sloučenin, které není možné analyzovat plynovou chromatografií.



Obr. 12. Kapalinový chromatograf (www.hgb.vsb.cz).

Kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (LC-MS) je technika nejčastěji s využitím elektrosprejové ionizace (ESI) umožňující aplikace na velké množství biologických molekul, či s využitím ionizace atmosférického tlaku (API). Spojení je žádoucí

z hlediska citlivosti a specifity hmotnostní spektrometrie. Vzorek prochází kolonou naplněnou stacionární fází a dochází k jeho rozdělení na základě různé afinity k mobilní a stacionární fázi. Ztrátou vodíkových kationtů dochází k ionizaci vzorku a následně vzorek přechází do vakuové komory hmotnostního spektrometru.

Jednou z kombinačních metod kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je například Ultra Performance Liquid Chromatography kombinovaná s hmotnostní spektrometrií využívající ionizaci elektrosprejem, kdy digescí keratinu vznikají peptidy, které obsahují druhově specifické sekvence. Ty pak mohou být rozlišeny pomocí technik hmotnostní spektrometrie (UPLC/ESI-MS) (Tonetti *et al.*, 2019). Tato metoda je objektivní, umožňuje analyzovat také vzorky chlupů nebo vlasů degradovanými obarvením (Tang *et al.*, 2014; Vineis *et al.*, 2017).

2.6 METODY IDENTIFIKACE ZVÍŘECÍCH CHLUPŮ

Vzhledem k tomu, že vlasy i chlupy jsou velice odolné vůči chemickým reakcím, což je způsobeno pokrytím zrohovatělou kutikulární vrstvou, jsou často využívány při soudně-znaleckém posuzování (Bergman, 2004).

Srst je velmi odolná a může zůstat neporušená i tisíce let, proto ji lze využít při taxonomickém posuzování archeologických nálezů, ale také může sloužit jako stopa nebo přímý důkaz v kriminalistice. Její identifikace je důležitá i v rámci nelegálního obchodu (Ahmed *et al.*, 2018). Věda zabývající se zkoumáním trichologického materiálu živočichů pro policejní vyšetřování je nazývána forenzní trichologie. Trichologickým materiálem nejsou pouze lidské vlasy, ale také právě zvířecí chlupy. Pomocí morfologických a metrických znaků, jako je bazální šířka, délka, kutikulární vzor, morfologie kořínku a další, je možné stanovit původ zvířete.

K identifikaci se využívá folikul obsahující jeden pesíkový chlup či celý svazek s podsadovými chlupy, protože samotný podsadový chlup nenese dostatečné množství informací, které jsou potřebné pro identifikaci. K identifikaci chlupů jsou využívány jak makroskopické, tak mikroskopické analýzy.

2.6.1 Morfologická identifikace zvířecích chlupů

Cílem morfologické identifikace zvířecích chlupů, využívané pod zkratkou MIAH (Morphological Identification of Animal Hairs), je zařazení daného zvířete do konkrétního taxonu na základě morfologické analýzy jeho chlupu (Tridico *et al.*, 2014).

Úroveň určovaného taxonu závisí na typu a stavu chlupu a také na dostupnosti srovnávacího materiálu. Nejdůležitějším typem chlupů pro rozlišení jsou krycí chlupy, které obsahují nejlépe určující charakteristiky (Ahmed *et al.*, 2018).

K detekci identifikačních rysů se využívá mikroskopické zkoumání, k čemuž se používají elektronové mikroskopy. Mezi ně patří například skenovací elektronový mikroskop (SEM – Scanning Electron Microscope), transmisní elektronový mikroskop (TEM – Transmission Electron Microscope) či optický mikroskop (Farag *et al.*, 2015; Štefan a Hladík, 2012).

Skenovací elektronový mikroskop umožňuje černobílé zobrazení povrchu vzorku za pomoci speciálního detektoru. Detektor je vybaven elektromagnetickými čočkami, které usměřují a zaostřují elektron na určité místo vzorku, dochází k interakci a vzniká signál, který je emitován z povrchu vzorku a dopadá na elektron (Ul-Hamid, 2018). Transmisní elektronový mikroskop umožňuje zobrazení vnitřní struktury vzorku pomocí prošlých elektronů. Ty nejprve prochází vzorkem a poté jsou detekovány. Analýza chlupu prováděna elektronovou mikroskopií je nejen časově náročná, ale je také závislá na zpracování, či na kvalitě mikroskopu a samotné odbornosti mikroskopování.

Při použití světelného mikroskopu vzniká obraz díky tomu, že světlo ze zdroje je rozptýleno povrchem, vzniklé rozptýlené světlo je vedeno soustavou skleněných čoček a dopadá na detektor. Světelnou mikroskopií lze reálný obraz pozorovat přímo (Ul-Hamid, 2018).

Mikroskopie chlupů poskytuje jak informace kvalitativní, tak kvantitativní. Pomocí mikroskopických metod již lze poměrně dobře druhově rozlišit chlupy domácích zvířat. V případě srsti zvířat volně žijících nemusí samotná mikroskopie stačit (Sato *et al.*, 2010).

2.6.2 Určení zvířecí srsti pomocí DNA

Analýza DNA je v dnešní době hojně využívanou metodou pro identifikaci trichologického vzorku. Genetická analýza probíhá pomocí deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která je součástí chlupů. Při genetickém zkoumání se využívá mitochondriální DNA z chlupového

stvolu a nukleární DNA z kořínku chlupu. Pomocí této analýzy můžeme, kromě zvířecího druhu, zjistit také barvu srsti, krevní skupinu nebo projevy některých chorob.

Analýze však většinou předchází již zmiňovaná mikroskopie (*podkapitola 2.6.1*), která napomáhá rozlišit znečištění povrchu trichomu, které by mohlo způsobit problémy při analýze prostřednictvím DNA. Zkoumané vzorky je tedy zapotřebí před genetickou analýzou přečistit (Elkins, 2012). Mikroskopie se dále využívá pro zjištění vhodnosti testování vzorku. Pokud vzorek obsahuje kořen, lze využít testování pomocí jaderné DNA, nazývané analýzou krátkého tandemu (STR – Short Tandem Repeat). Chlupy, které byly zbaveny kořene lze podrobit testování mitochondriální DNA.

Při přečištění je vzorek nejprve ponořen do sterilní zkumavky naplněné fyziologickým roztokem, poté je vzorek opláchnut ethanolem a na čistém filtračním papíře jsou z bazální části chlupu odříznuty dva úseky o délce 1 cm. Odstřížky jsou umístěny do sterilních zkumavek, kdy první z úseku slouží k samotné analýze a druhý úsek je využit jako kontrola substrátu (Elkins, 2012).

Následuje extrakce DNA, zjištění její kvality a kvantity a vlastní analýza. V literatuře se objevuje například postup, kterým se autoři snažili vzájemně rozlišit vybrané savčí druhy pomocí morfologického zkoumání srsti a analýzy jedno-nukleotidových polymorfismů (SNP) genu pro cytochrom. Použitá DNA pro tuto analýzu pocházela z krycích chlupů. Výsledky studie ukázaly, že všechny zvířecí druhy od sebe nelze rozlišit pouze na základě morfologického zkoumání. Tato metoda je však využitelná pro rozlišení lidských vlasů i psích a kočičích chlupů za předpokladu, že vzorky byly dostatečně přečištěny od lidské mitochondriální DNA, kterou člověk na zvířata snadno přenesl a ulpívá na kutikulární vrstvě jejich srsti (Sato *et al.*, 2010).

Kromě výše uvedené analýzy SNP se k identifikaci zvířecích druhů využívá metoda RLFP neboli polymorfismus délky restrikčních fragmentů, multiplex PCR či přímé sekvenování. Metoda multiplexní PCR využívá druhově specifické primery a je vhodná pro analýzu směsného vzorku, který obsahuje DNA z různých druhů zvířat (Kitano *et al.*, 2007).

Genetická analýza je považována za vysoce spolehlivou metodu, nicméně ani její použití není vždy stoprocentní.

2.6.3 Určení zvířecího druhu pomocí MALDI-TOF MS

Zatímco některé zvířecí chlupy jsou rozličného vzhledu a k jejich rozlišení stačí pouze mikroskopické metody, u některých, vzájemně více příbuzných druhů, je rozlišení složitější. V takovém případě lze využít analýzu DNA (*podkapitola 2.6.2*), alternativním způsobem druhového rozlišení může být studie založená na komparaci proteinů přítomných v chlupu (Solazzo, 2017).

Určení zvířecího druhu prostřednictvím chlupů za využití hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS bylo provedeno v roce 2017 Carolinou Solazzo. Ta svůj výzkum provedla na zvířatech Severní Ameriky a ve své práci tak popsala analýzu chlupů pocházející z muzea Museum Conservation Institute. Její analýza umožnila získání peptidových profilů, které byly následně vyhodnoceny programem mMass (Solazzo, 2017).

Při analýze byly vzorky nastříhány, očištěny od nežádoucích kontaminantů pomocí ethanolu. Navíc mohou být vzorky také delipidizovány směsí chloroformu a methanolu (v objemovém poměru dva ku jedné) (Nakamura *et al.*, 2002). Následně byly vzorky rozmělněny v tekutém dusíku, bylo přidáno 200 μ l 8M močoviny/ 50 mM Tris/40 nM dithiothreiolu (DTT) při pH 8 a ponecháno k působení přes noc. K tomuto roztoku o objemu 100 μ l bylo přidáno 2,8 mg jodoctové kyseliny a vzorek byl ponechán ve tmě po dobu čtyř hodin, roztok byl dále zředěn 300 μ l 50mM hydrogenuhličitanem amonným o pH 8. 50 μ l vzorku bylo poté štěpeno přidávkem 0,5 μ g trypsinu při teplotě 37 °C po celou noc a po enzymovém rozkladu byl vzorek vysušen a resolubilizován v 10 μ l 0,1% kyselině trifluorctové (TFA). Výsledek výzkumu ukázal, že některé zvířecí druhy od sebe lze odlišit, ale u některých druhů se rozlišení nepodařilo z důvodu nenalezení významných rozdílů v hmotnostních spektrech (Solazzo, 2017).

2.7 ANALÝZA HLAVNÍCH KOMPONENT – PCA

K interpretaci dat lze použít metodu analýzy hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis), která se využívá pro rozbor velkých souborů dat z hmotnostního spektrometru či DNA mikroskopů měřící hladiny tisíců proteinů a mRNA ve velkém množství vzorků, protože umožňuje výrazné zjednodušení statické analýzy.

Analýza hlavních komponent je matematický algoritmus snižující rozměrnost dat při zachování většiny variací v datové sadě (Jolliffe, 2002). Metoda hlavních komponent vyhledává rozdíly, nebo naopak podobnosti mezi jednotlivými daty a zjišťuje jejich vzájemnou propojenost, čímž dochází k jejich vyhodnocování. Tato metoda umožňuje redukci počtu proměnných, ale zároveň zachovává objem informací, vzorky jsou poté vykresleny, což umožňuje vizuální posouzení podobností a rozdílů. Redukce dat probíhá tak, že jsou promítána do nižších dimenzí nazývaných hlavní komponenty.

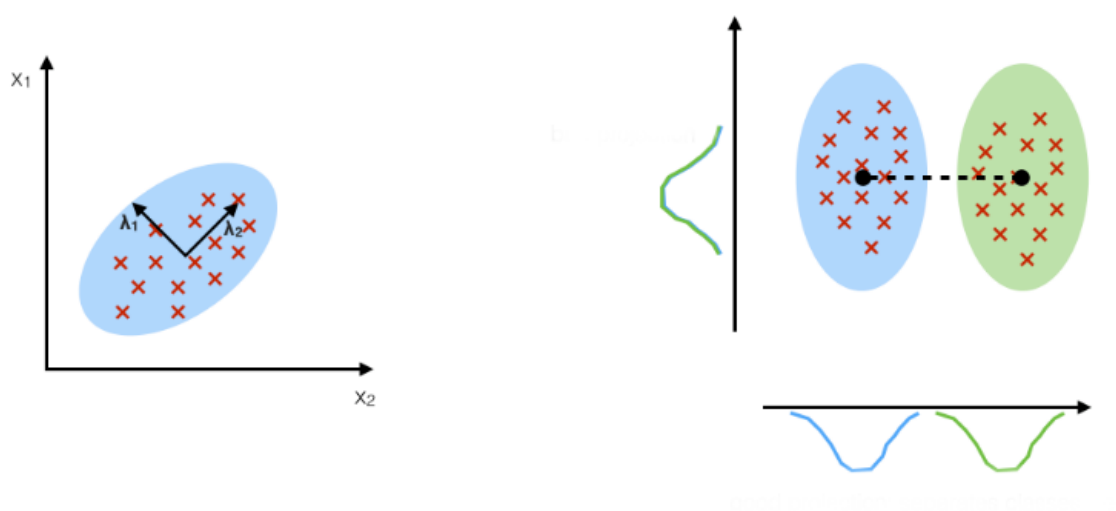
Základním principem je transformace původního obsáhlejšího souboru závislých (tj. korelovaných) proměnných menším souborem vzájemně nezávislých (tj. nekorelovaných). PCA identifikuje nové proměnné, nazývané hlavní komponenty, které jsou lineární kombinací původních proměnných. Při geometrickém sestavení PCA musí být nalezena tzv. první komponenta, tedy směr hlavní osy, tj. směr indikovaný největší celkovou odchylkou (Jombart *et al.*, 2010), druhá komponenta je směr nekorelovaný s první komponentou, podél kterého vzorky vykazují největší odchylku (Ringnér, 2008; Abdi a Williams, 2010). Každá komponenta může být interpretována jako směr nekorelovaný s předchozími komponenty, které maximalizují rozptyl vzorků při promítnutí na komponentu. Nejčastěji se využívají trojrozměrné vizualizace, ve kterých se vzorky promítají na komponenty nebo se vykreslují podle jejich korelace s komponentami (Ringnér, 2008).

2.8 LINEÁRNÍ DISKRIMINAČNÍ ANALÝZA - LDA

Další metodou umožňující vizualizaci dat je metoda LDA (Linear Discriminant Analysis). LDA se používá k oddělení dvou skupin, jejíž hlavní myšlenkou je maximalizovat oddělitelnost mezi těmito skupinami vytvořením nové lineární osy a promítání datových bodů na tuto osu. Tato metoda sleduje typ bodů, funkcí či podprostoru poskytující větší diskriminaci pro oddělení dat. Cílem je najít linii, která maximalizuje oddělení tříd, proto je potřeba definice separačního opatření.

Jedná se o typ lineární kombinace využívající různé datové položky a aplikující funkci k samotné analýze více tříd. K nalezení střední hodnoty datových bodů každé třídy se používá střední vektor. Za vhodná data se považují ta, u nichž je invariance ve třídě minimální a variabilita mezi ostatními třídami je maximální.

Rozdíl mezi PCA a LDA spočívá v tom, že PCA hledá atributy s největšími odchylkami, zatímco LDA se snaží maximalizovat oddělení známých kategorií (obr. 13).



Obr. 13. Rozdíl mezi PCA a LDA (Raschka, 2014).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a roztoky, vybavení

Při štěpení vzorků byl použit proteolytický enzym trypsin (Sigma) spolu s hydrogenuhličitanem amonným (NH_4HCO_3).

K přípravě roztoku na ZipTip byl použit acetonitril (CH_3CN , ACN) a kyselina trifluoroctová (TFA).

Chemikálie:

Acetonitril, ACN (Sigma)

2,5-dihydroxybenzoová kyselina, DHB (Sigma)

Hydrogenuhličitan amonný, NH_4HCO_3 (Fluka)

Lyofilizovaný trypsin (Sigma)

Trifluoroctová kyselina, TFA (Sigma)

Peptide Calibration Standard II, PEP II (Bruker Daltonics)

Roztoky:

Aktivační roztok (100% ACN)

Ekvilibrační roztok (0,2% TFA)

Eluční roztok (100% ACN, 0,2% TFA v obj. poměru 1:1)

Kalibrační roztok (DHB, PEP II, v obj. poměru 1:1)

Pracovní roztok trypsinu (lyofilizovaný trypsin, 50 mM NH_4HCO_3 , v obj. poměru 1:50)

Roztok DHB (150 μl 100% ACN, 250 μl 0,2% TFA, 100 μl H_2O , ~ 9 mg DHB)

Roztok TFA (10% TFA)

Pro analýzu vzorků bylo využito:

Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Německo)

Kapalinový chromatograf UHPLC Dionex Ultimate3000 RSLC nano (Dionex, Německo) spojený s ESI-Q/TOF Maxis Impact hmotnostním spektrometrem (Bruker Daltonics, Německo)

Mikrokolony ZipTip C₁₈ (Millipore Corporation)

Thermomixer compact (Eppendorf)

3.2 Složení roztoků pro reverzní fázi

Reverzní fáze ZipTip byla promývána různými roztoky, mezi ně patřil aktivační roztok, ekvilibrační roztok a eluční roztok.

Aktivační roztok tvořil 100% acetonitril. Ekvilibrační roztok tvořila 0,2% kyselina trifluoroctová ve vodě. Eluční roztok obsahoval 50% acetonitril a 0,1% kyselinu trifluoroctovou.

3.3 Příprava matrice

Pro měření pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF bylo potřeba připravit matrici, což byla směs 150 µl acetonitrilu, 250 µl trifluoroctové kyseliny o koncentraci 0,2 %, 100 µl vody a 8–9 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB).

Ke vzorku byla matrice přidána po jeho přečištění.

3.4 Referenční materiály

K analýze byly využity chlupy psů odlišných plemen. Od každého plemene byli analyzováni tři zástupci různého stáří, kteří nebyli příbuzní. S výjimkou dvou plemen – jezevčika dlouhosrstého a jorkširského teriéra, u těchto plemen byli analyzováni pouze dva zástupci. Analyzováno bylo celkem 17 plemen, a také došlo k porovnání jejich příbuznosti s vlkem. Srst vlka pocházela z Národního parku Šumava – návštěvnické centrum Srní.

Analyzovanými plemeny byly border kolie, čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík hrubosrstý, jezevčík krátkosrstý, jorkširský teriér, německý ovčák, mops, pudl, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký pes a zlatý retrívr.

Seznam analyzovaných plemen a věk zkoumaných jedinců, je uveden níže v tabulce 1.

Tab. 1. Seznam analyzovaných plemen a věk jednotlivých zástupců.

<i>PLEMENO</i>	<i>VĚK</i>	<i>PLEMENO</i>	<i>VĚK</i>
<i>Border kolie</i>	8 měsíců	<i>Jezevčík krátkosrstý</i>	10,5 roku
	7 let		11 let
	13 let		13 let
<i>Boxer</i>	2 roky	<i>Jorkširský teriér</i>	7 let
	4 roky		3 roky
	11 let	<i>Mops</i>	8 let
<i>Čivava</i>	2,5 roku		3 roky
	3 roky		7 let
<i>Francouzský buldoček</i>	7 let	<i>Německý ovčák</i>	15 let
	6 měsíců		10 let
	1 rok		7 let
<i>Chrt dlouhosrstý</i>	6 let	<i>Pudl</i>	8 měsíců
	5 let		1 rok
	5 let		5 let
	5 let		4 měsíce
<i>Chrt krátkosrstý</i>	4 roky	<i>Zlatý retrívr</i>	9 měsíců
	12 let		14 let
	14 let		11 let
<i>Jack russell</i>	3 roky	<i>Stafordširský bulteriér</i>	9 let
	3 roky		3 roky
	5 let		13 měsíců
<i>Jezevčík dlouhosrstý</i>	2,5 roku	<i>Středoasijský pastevecký</i>	5 let
	4 roky		8 let
<i>Jezevčík hrubosrstý</i>	4 roky	<i>Vlk</i>	Jednalo se o směs chlupů více jedinců, nelze určit věk.
	7 let		
	7 let		

3.5 Štěpení vzorků

Vzorky srsti byly před jejich zpracováním skladovány za laboratorní teploty v uzavíratelných obalech, aby nedošlo ke kontaminaci či nežádoucí výměně.

Všechny chlupy byly rozstříhány na přibližně stejné části o délce $\pm 0,5$ cm na předem ethanolem vyčištěné podložce. Nastříhané části byly poté pomocí vydezinfikované pinzety vloženy do Eppendorfových zkumavek.

Vzorky byly štěpeny pomocí pracovního roztoku trypsinu o objemu 15 μ l, který byl přidán do každé zkumavky se vzorkem. Po celou dobu štěpení byly chlupy zcela ponořeny

v roztoku. Štěpení probíhalo po dobu čtyř hodin v thermomixeru za teploty 37 °C za míchání s frekvencí 300 rpm.

3.6 Přečištění na reverzní fázi

Okamžitě po ukončení došlo k tzv. přečištění na reverzní fázi, které kromě přečištění vzorku zajišťuje také jeho zakoncentrování. Při tomto procesu byla používána automatická nastavitelná mikropipeta, na které byla nasazena speciální pipetovací špička obsahující reverzní fázi, konkrétně ZipTip C₁₈ od firmy Millipore Corporation.

Přečištění vzorku na reverzní fázi předcházela její aktivace. Postup použití reverzní fáze ZipTip C₁₈ lze popsat pomocí několika kroků. Jednotlivé kroky byly využity pro všechny analyzované vzorky.

V první řadě došlo k aktivaci reverzní fáze ZipTip C₁₈, která byla zakotvena ve špičce pipety. K aktivaci došlo promytím pomocí 15 µl aktivačního roztoku, což se opakovalo desetkrát. Následně došlo k desetinásobnému promytí stejným objemem, tedy 15 µl, ekvilibračním roztokem.

Peptidy vzniklé štěpením byly navázány promytím analyzovaného vzorku, promytí bylo zopakováno desetkrát. Z důvodu odstranění možných přítomných nečistot byl zopakován bod ekvilibrace, promytí bylo provedeno desetkrát.

Navázané peptidové štěpy z reverzní fáze byly eluovány do mikrozkušavky pomocí elučního roztoku. K eluci bylo využito roztoku o objemu 15 µl. Reverzní fáze byla následně desetkrát promíchána v mikrozkušavce, čímž došlo k zakoncentrování a uvolnění peptidů do roztoku.

Po promíchání reverzní fáze bylo do mikrozkušavky odebráno 5 µl vzorku a přidáno k 5 µl matrice, směs byla opět promíchána. Zbylá část vzorku, tedy 10 µl, bylo ponecháno k vysušení za laboratorní teploty a následné analýze pomocí kapalinové chromatografie.

Následovalo kápnutí analyzovaného vzorku o objemu 1,2 µl na kapkovací destičku, na kterou byl vzorek umístěn celkem pětkrát, tj. byl nanesen na pět spotů.

Vzhledem k tomu, že mikrokolonka byla použita vícekrát, bylo zapotřebí její přečištění, pomocí kterého došlo k odstranění nevytříděných peptidových štěpů z reverzní fáze, čehož bylo docíleno desetinásobným promytím elučního roztoku o objemu 15 µl.

Pro každý vzorek byl zopakován stejný postup.

3.7 Měření pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

K hmotnostní analýze chlupů psích plemen bylo v této práci využito hmotnostního spektrometru MALDI-TOF/TOF Autoflex Speed od společnosti Bruker Daltonics. Pro tuto metodu byla nezbytná ocelová destička, na kterou byl nanášen vzorek smíchaný s matricí. Destička obsahovala tzv. spoty, tj. ohraničená kruhová políčka, která jsou strojem snadno rozpoznatelná a zaměřená.

Jak již bylo uvedeno (*kapitola 3.6*), při měření pomocí této hmotnostní spektrometrie bylo zapotřebí smíchání vzorku s matricí, došlo tedy ke smísení 5 μ l vzorku s 5 μ l matrice. Jako matrice byl použit předem připravený roztok DHB. Vzorek smísený s matricí byl nanesen na ocelovou měřicí destičku, na které vzorky vykrytalizovaly. Od každého vzorku bylo na destičku nanášeno pět spotů, vzorek byl na každý spot nanášen v objemu 1,2 μ l. Na ocelovou měřicí destičku byly nanášeny také kalibrační standardy, směs peptidů o známých hmotnostech, k čemuž byl použit Peptide Calibration Standard II obsahující devět standardních peptidů, který byl smíchan s matricí totožnou pro vzorky v objemovém poměru jedna ku jedné.

Jednotlivé vzorky musely na destičce nejprve vykrytalizovat. Po zaschnutí vzorků byla ocelová měřicí destička vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF, na destičku bylo vloženo napětí o velikosti 20 kV. Pomocí standardu byla provedena kalibrace a došlo k měření, které probíhalo v pozitivním reflektorovém módu v rozmezí 900–4500 Da. Spektra byla získána při nastavení výkonu laseru na 80–90 % a každé spektrum bylo složeno z celkového počtu 3000 laserových pulsů.

3.8 Statistické vyhodnocení hmotnostních spekter

Naměřená spektra z hmotnostního spektrometru byla zpracována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Při analýze hlavních komponent došlo k porovnání naměřených spekter, vyhledání jejich podobností a rozdílů, následnému zobrazení proměnných a zjištění vzájemné propojenosti. PCA byla provedena v softwarovém programu R, verze 4.0.2. Spektra byla vyhodnocována pomocí normalizace 2.

LDA a PCA analýza dat získaných metodou LC-MS/MS byla provedena panem RNDr. Pavlem Cejnarem z Ústavu počítačové a měřicí techniky, VŠCHT Praha, čímž mu patří mé poděkování.

3.9 Vyhodnocení programem mMass

Naměřená spektra zástupců jednotlivých plemen získaná hmotnostní spektrometrem MALDI-TOF byla vyhodnocena pomocí programu mMass, verze 5.5.0, a následně porovnána mezi sebou. Tento program umožňuje analýzu hmotnostních spekter a také například modelově štěpit sekvence proteinů.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

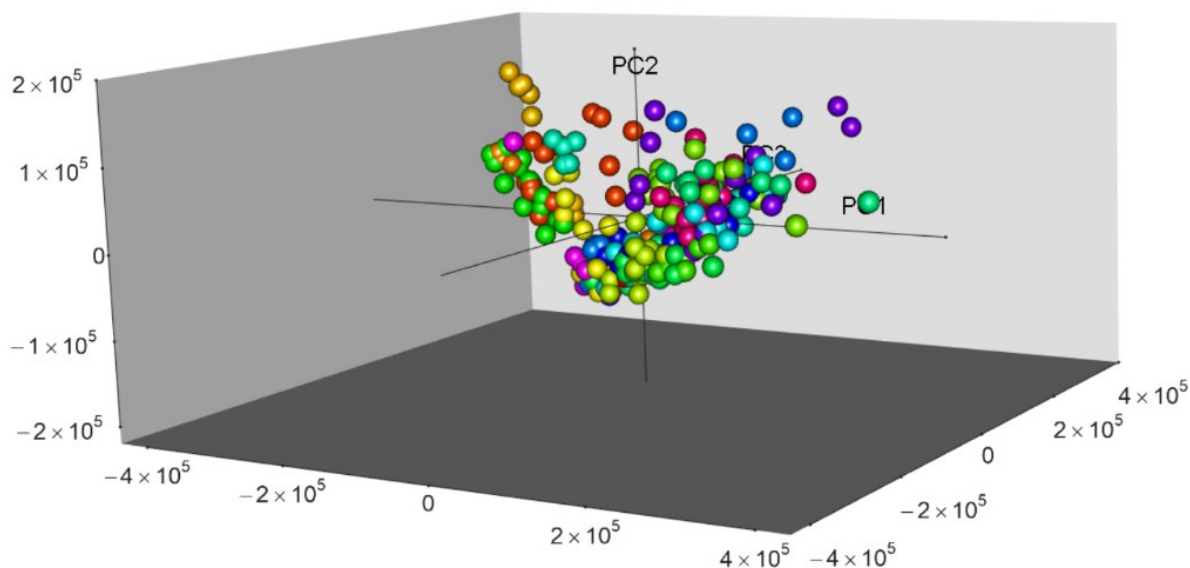
Pro zjištění možnosti rozlišit jednotlivá plemena psů pomocí jejich srsti byly v této práci využity dvě techniky hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a LC-MS/MS s vyhodnocováním dat pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a lineární diskriminační analýzy (LDA).

Spektra pocházející z hmotnostního spektrometru byla dále zpracována programem mMass, a také vyhodnocena a porovnána pomocí PCA. Tím byla spektra zredukována na jednotlivé body, které by se v rámci plemen měly ideálně shlukovat do klastrů. Pokud by se podařilo odlišit od sebe jednotlivá psí plemena, pak by se tyto klastry (bodové shluky) nepřekrývaly. Nejprve byla porovnána všechna plemena společně s vlkem, plemena samostatně bez vlka a dále pak byla plemena rozdělena do několika skupin na základě různých charakteristik – podobnosti a rozdílnosti ve velikosti těla či srsti.

Vzorky všech plemen psů byly kromě hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF analyzovány také kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS, kde získané výsledky byly vyhodnoceny metodami PCA a LDA.

4.1 Vyhodnocení dat pomocí metody hlavních komponent

Na obrázku 14 je zobrazen graf znázorňující rozlišení všech 17ti analyzovaných plemen společně s vlkem. Rozlišení bylo provedeno pro zjištění příbuznosti mezi psy a vlky. I přes to, že psi pocházejí z již zaniklých druhů vlků (Frantz *et al.*, 2020; Larson a Bradley, 2014), lze vidět, že existuje podobnost mezi dnešními vlky a psy. Nedošlo k oddělení samotných plemen, ani k oddělení vlka, jejich klastry se tedy překrývají, vykazují podobnost a na základě tohoto tvrzení lze tedy mluvit o jejich příbuznosti (respektive o velmi podobném proteinovém složení srsti zahrnující velmi podobné primární struktury proteinů).

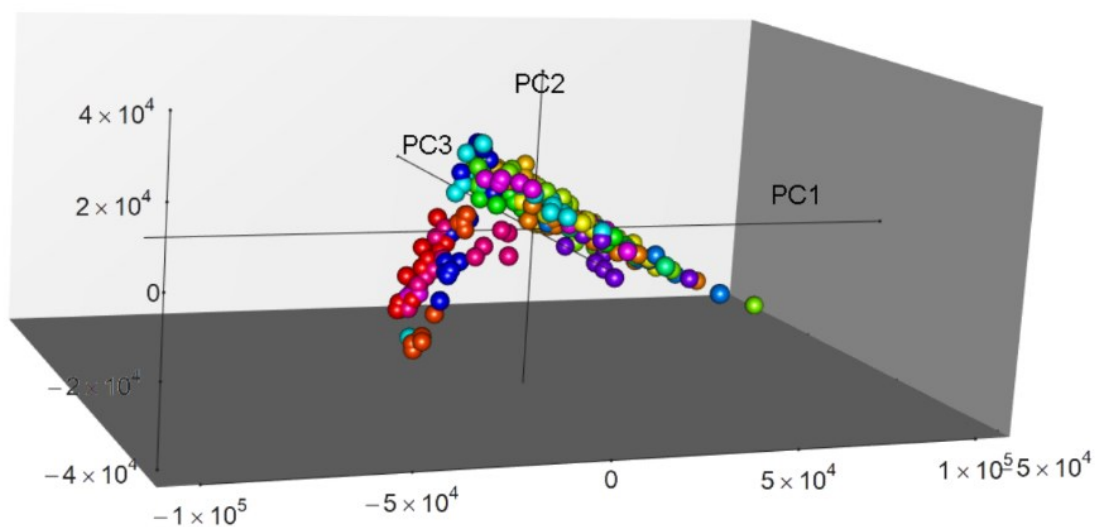


Obr. 14. Celkový náhled na porovnání všech analyzovaných plemen – *border kolie, boxer, čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík hrubosrstý, jezevčík krátkosrstý, jorkširský teriér, mops, německý ovčák, pudl, zlatý retrívr, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký a vlka.*

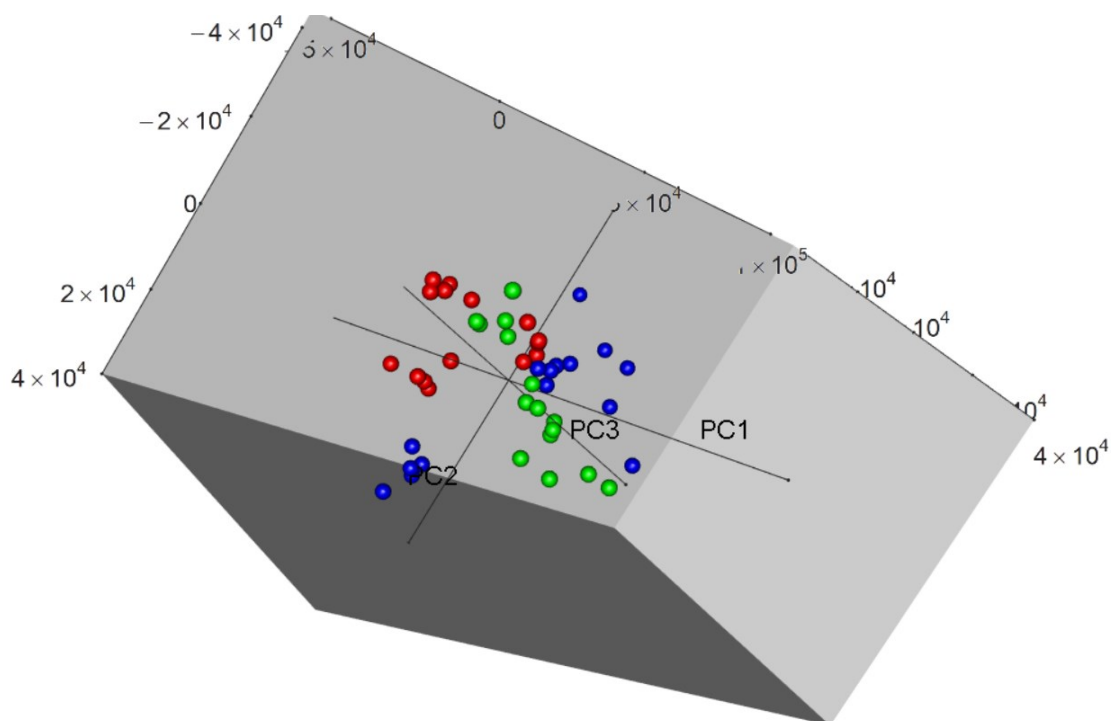
Na následujícím obrázku 15 došlo k porovnání všech plemen mezi sebou. Obrázek 15 ukazuje, že se klastry jednotlivých plemen překrývají a nedochází tedy k jejich žádoucímu oddělení. Všechna plemena psů jsou součástí jednoho shluku. Lze si všimnout, že levou část shluku tvoří chrt dlouhosrstý, zlatý retrívr a pudl, proto bylo provedeno vyhodnocení pouze pro tyto tři skupiny. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 16.

Na obrázku 16 je vidět, že jednotlivá analyzovaná plemena – chrt dlouhosrstý, pudl a zlatý retrívr, mezi sebou není možné rozlišit, protože dochází k prolínání bodových klastrů.

Prolínání skupin je způsobeno podobností spekter, jelikož z nich je pak odvozeno umístění bodů v 3D grafech. Vzhledem k prolínání jednotlivých skupin (plemen), a také porovnání velkého množství vzorků, byla psí plemena zkoumána na základě velikosti psů, poté také na základě jejich podobné srsti.

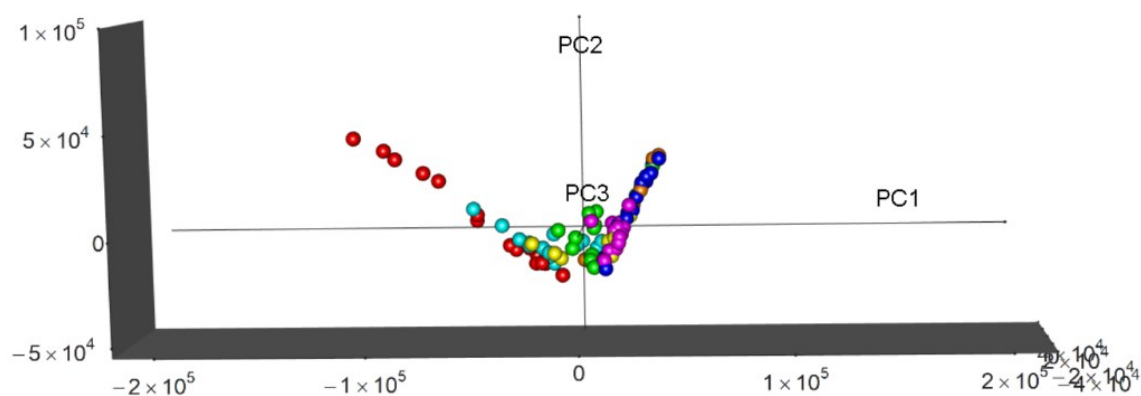


Obr. 15. Vyhodnocení rozlišitelnosti všech plemen – *border kolie*, *boxer*, *čivava*, *francouzský buldoček*, *chrt dlouhosrstý*, *Jack Russell teriér*, *jezevčík dlouhosrstý*, *jezevčík hrubosrstý*, *jezevčík krátkosrstý*, *jorkširský teriér*, *mops*, *německý ovčák*, *pucl*, *zlatý retrívr*, *stafordširský bulteriér*, *středoasijský pastevecký*.



Obr. 16. Porovnání rozlišitelnosti *chrt dlouhosrstého*, *zlatého retrívra* a *pudla*.

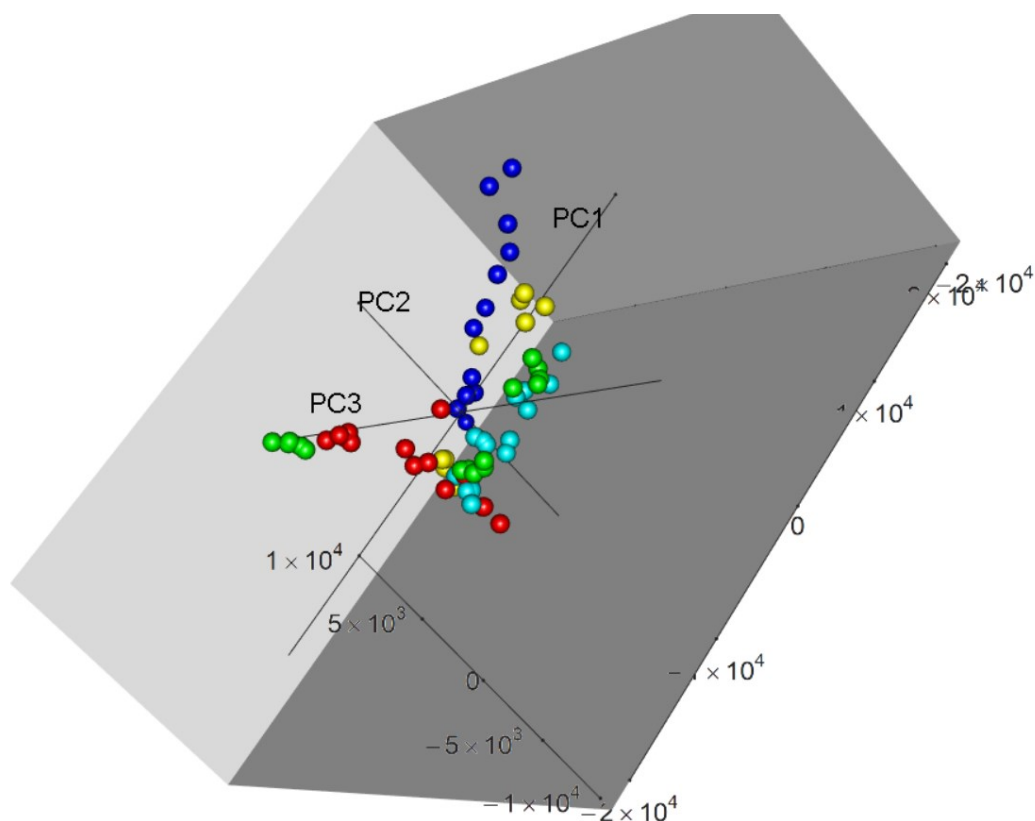
Na základě velikosti plemen bylo provedeno vyhodnocení pro velké, středně velké a malé psy. Na obrázku 17 je zobrazeno vyhodnocení pro velké psy, do kterých byl zařazen boxer, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, německý ovčák, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký pes a zlatý retrívř.



Obr. 17. Rozlišení plemen dle jejich velikosti těla – boxer, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, německý ovčák, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký pes, zlatý retrívř.

Na obrázku 17 je viditelné prolnutí klastrů, která jsou rozdělená na dvě části. Levá část shluku je tvořena chrtem dlouhosrstým, zlatým retrívřem a německým ovčákem zasahujícího i do pravé strany grafu. Na pravé straně shluku dochází k prolnutí skupin bodů zbývajících plemen – boxera, chrta krátkosrstého, stafordširského bulteriéra, středoasijského pasteveckého psa a německého ovčáka. K rozlišení mezi přibližně stejně velkými psími plemeny tedy nedochází. Nicméně, jak vyplývá z grafu, chrta dlouhosrstého je možné odlišit od boxera, chrta krátkosrstého, stafordširského bulteriéra a středoasijského pasteveckého psa.

Na následujícím obrázku 18 je zobrazeno rozlišení border kolie, jezevčíka dlouhosrstého, jezevčíka hrubosrstého, jezevčíka krátkosrstého a pudla.

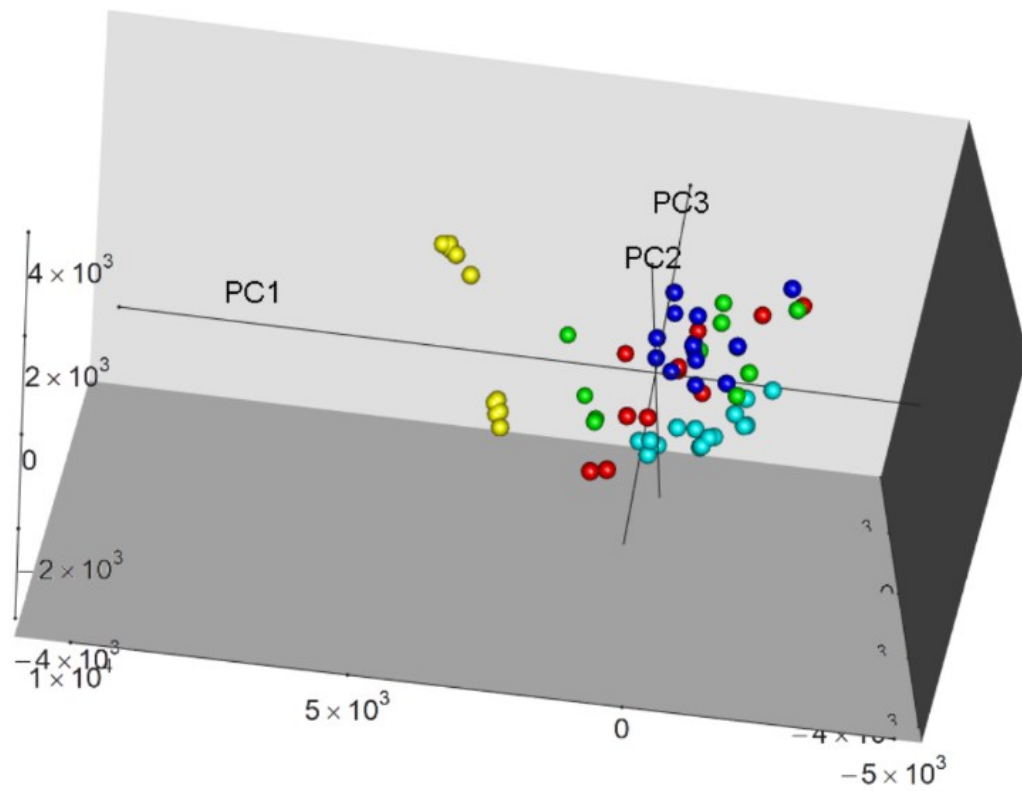


Obr. 18. Výsledky rozlišitelnosti *border kolie*, *jezevčíka dlouhosrstého*, *jezevčíka hrubosrstého*, *jezevčíka krátkosrstého* a *pudla*.

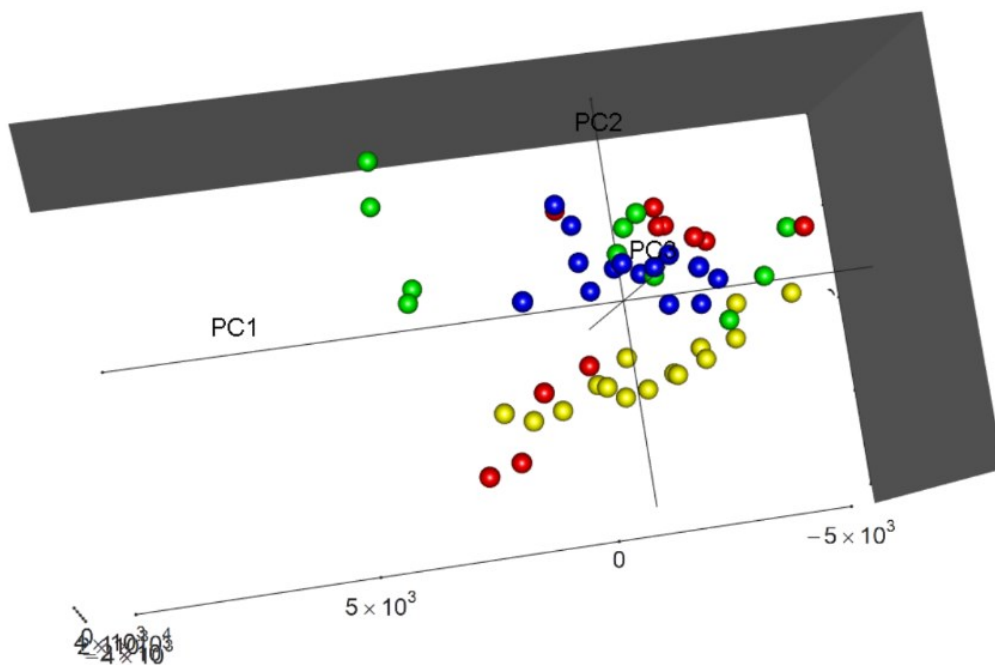
Z obrázku 18 je patrné, že ani mezi těmito psími plemeny není jasné rozlišení, i přes to, že v případě *border kolie* je vidět patrné oddělení od ostatních plemen, dochází i tak k překrývání klastrů se spektry *jezevčíka dlouhosrstého* a *pudla*. K hojnému překrytí dochází u *pudla*, *jezevčíka hrubosrstého* a *jezevčíka dlouhosrstého*, *jezevčíka krátkosrstého*.

Na obrázku 19 je vyobrazené rozdělení malých plemen psů, konkrétně *čivavy*, *francouzského buldočka*, *Jack Russell teriéra*, *jorkširského teriéra* a *mopse*.

Obrázek 19 zobrazuje vzdálená spektra *jorkširského teriéra* od spekter ostatních plemen, spektra se tedy liší, což vypovídá o tom, že *jorkširského teriéra* od těchto ostatních plemen lze rozeznat. Bodové shluky zbylých plemen se překrývaly, nicméně klastř získaný analýzou srsti *čivavy* se od ostatních o něco málo vzdaluje, proto byl dále proveden pokus o rozlišení *čivavy*, *francouzského buldočka*, *Jack Russell teriéra* a *mopse* (obr. 20).

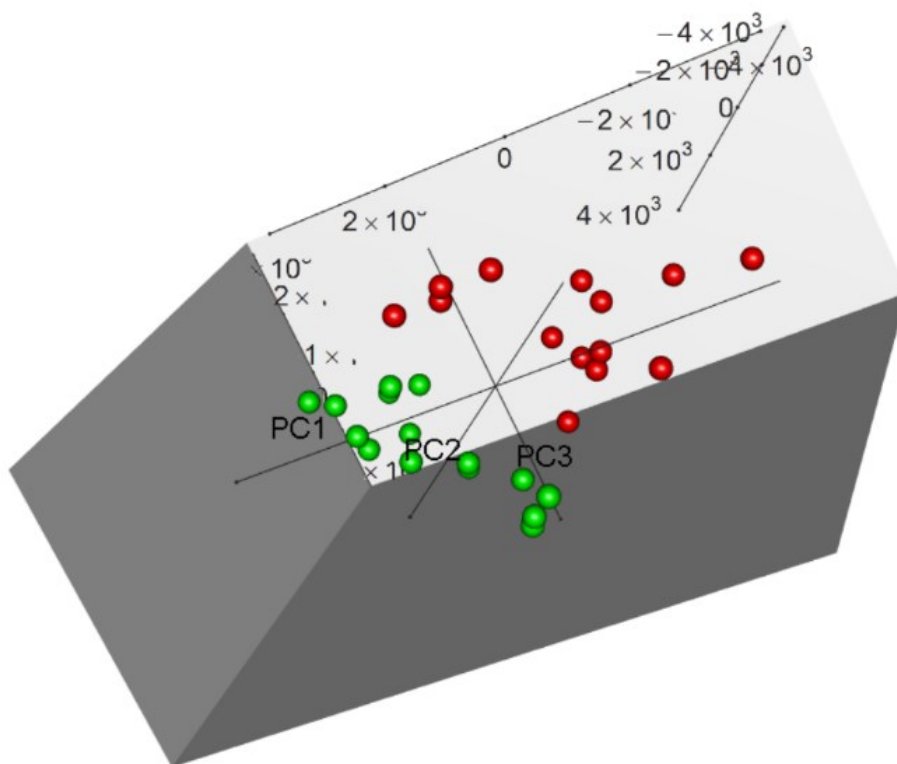


Obr. 19. Rozlišení malých plemen – čivava, francouzský buldoček, Jack Russell teriér, jorkširský teriér, mops.



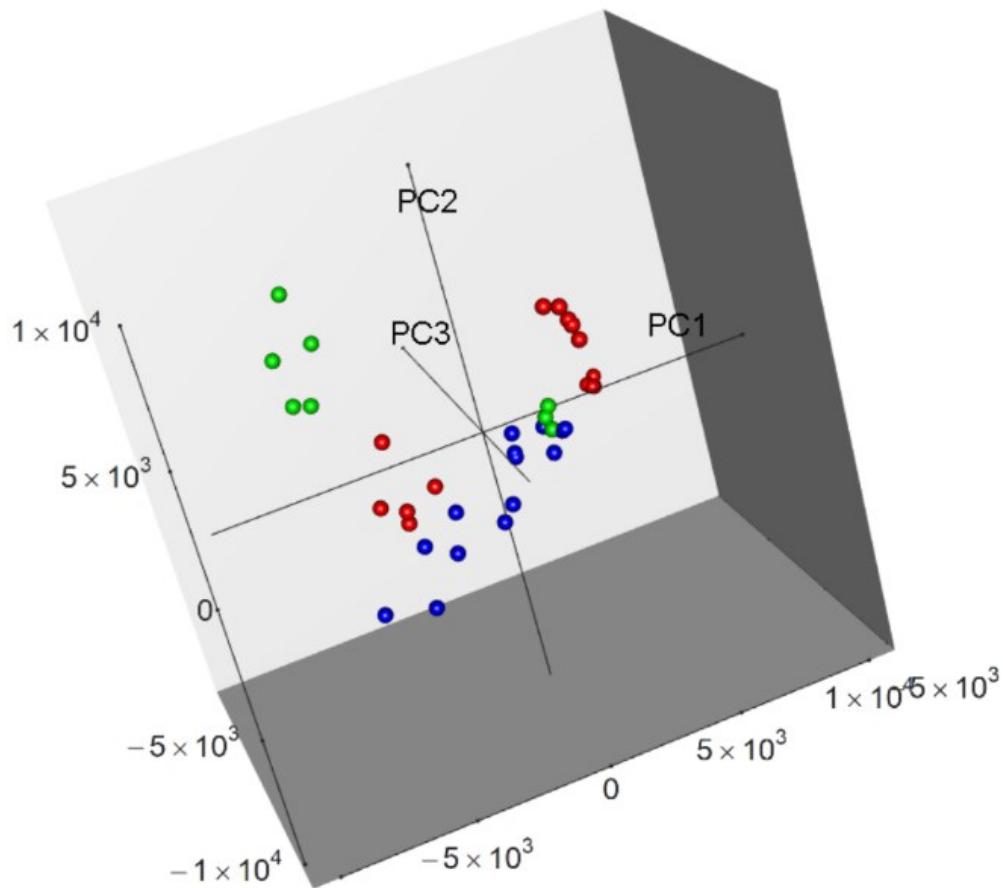
Obr. 20. Rozlišení čivavy, Jack Russell teriéra, francouzského buldočka a mopse.

Z obrázku 20 je patrné, že jednotlivá plemena – čivavu, Jack Russell teriéra, francouzského buldočka a mopse, mezi sebou nelze rozlišit, neboť se výsledky mezi sebou stále překrývají. Po důkladnějším pozorování si však lze všimnout malé odchylky mezi čivavou a mopsem (bodové shluky obou plemen jsou od sebe poměrně daleko a nepřekrývají se), proto bylo provedeno pouze jejich rozlišení, které je zobrazeno na níže uvedeném obrázku 21.



Obr. 21. Rozlišení mezi dvěma plemeny – čivavou a mopsem.

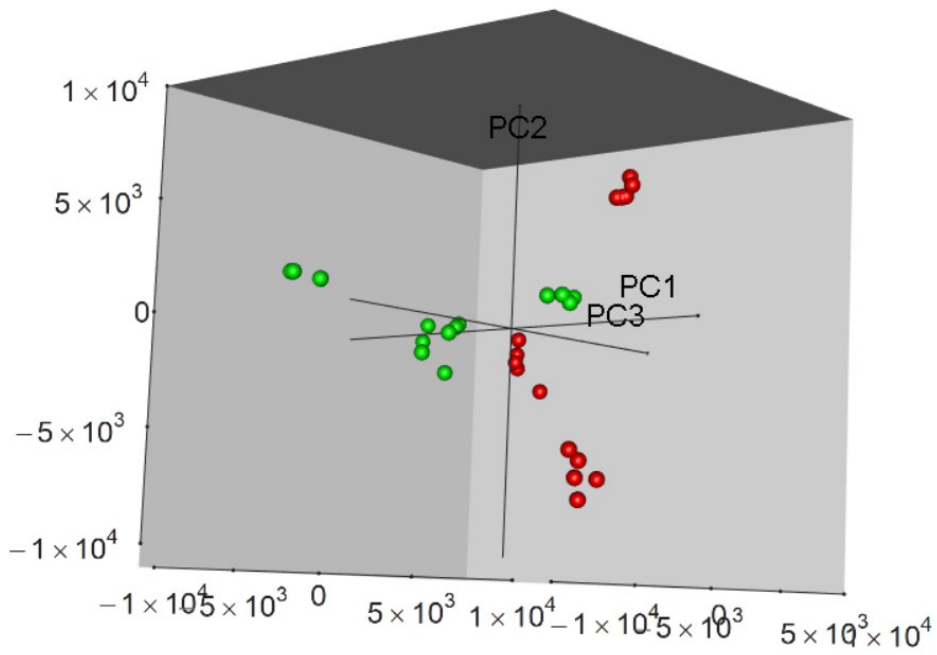
Z obrázku 21 je patrná možnost rozdělení těchto dvou skupin – čivavy a mopse, což svědčí o tom, že jejich hmotnostní spektra jsou odlišná a tato dvě plemena je možné od sebe rozlišit. Další vyhodnocení bylo provedeno pro zjištění podobnosti nebo naopak rozdílů v rámci jednoho plemene, které je rozděleno na různé typy. K vyhodnocení byla vybrána spektra jezevčků – krátkosrstého, dlouhosrstého, hrubosrstého, které se liší typem srsti. Zda je možné rozlišit jednotlivé druhy jezevčků je vyobrazeno na obrázku 22.



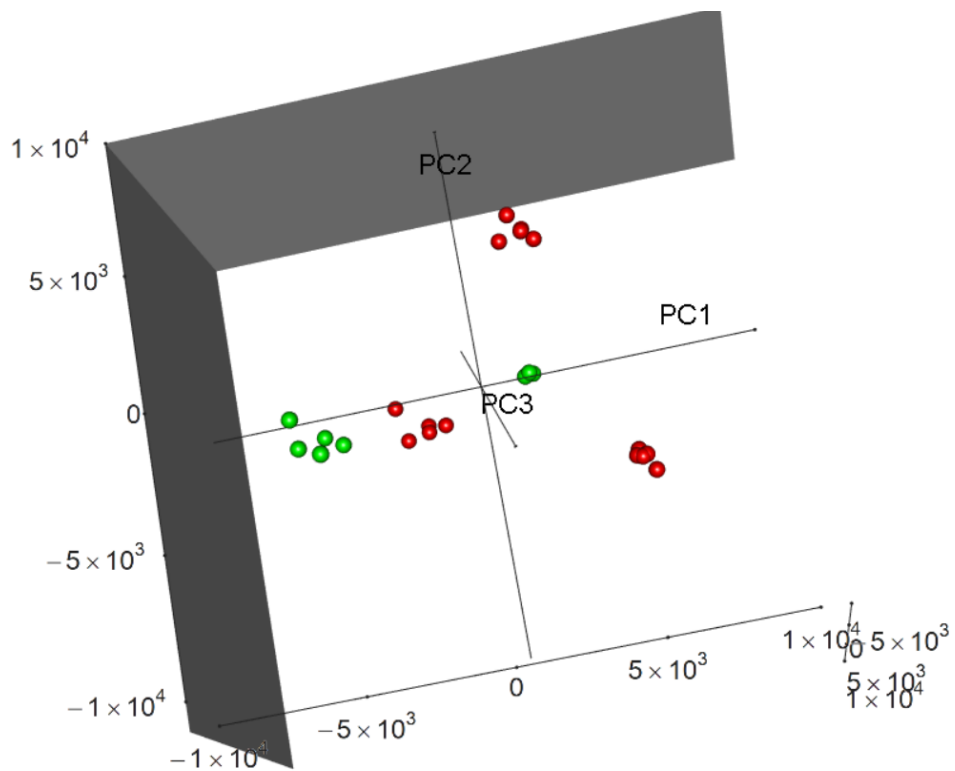
Obr. 22. Rozlišení mezi typy jezevčíků – *jezevčíkem dlouhosrstým* a *jezevčíkem hrubosrstým*, *jezevčíkem krátkosrstým*.

Z obrázku 22 je patrné, že jezevčíka krátkosrstého a jezevčíka dlouhosrstého od sebe rozlišit nelze, jejich klastry se překrývají, což může být způsobeno stejným typem chlupů, tvořící jejich jemnou srst. V případě jezevčíka krátkosrstého a jezevčíka hrubosrstého jsou naznačeny mírné odchylky, stejně jako je tomu v případě jezevčíka dlouhosrstého a jezevčíka hrubosrstého. Na základě tohoto grafu bylo vytvořené vyhodnocení mezi těmito typy jezevčíků lišících se typem srsti, výsledky jsou znázorněny na obrázku 23 a 24.

Na základě těchto obrázků (23 a 24) lze říct, že jezevčíka krátkosrstého i jezevčíka dlouhosrstého není možné pomocí srsti rozlišit od jezevčíka hrubosrstého.

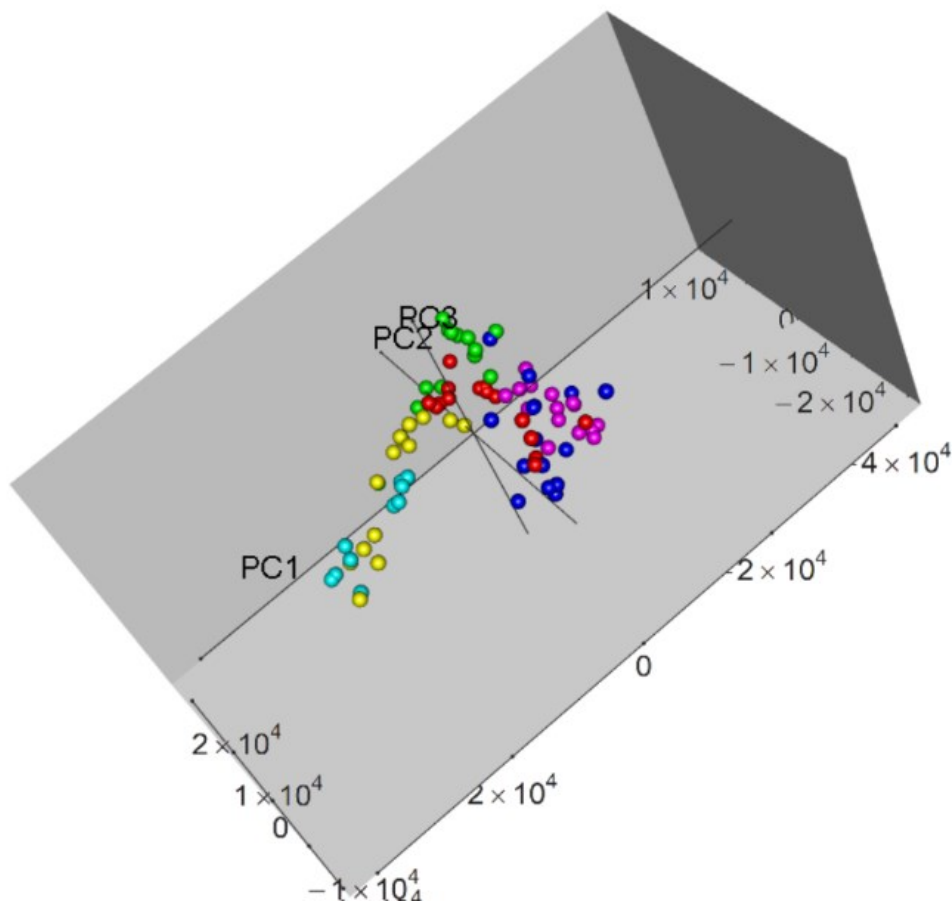


Obr. 23. Rozlišení mezi jezevčičkem krátkosrstým a jezevčičkem hrubosrstým.



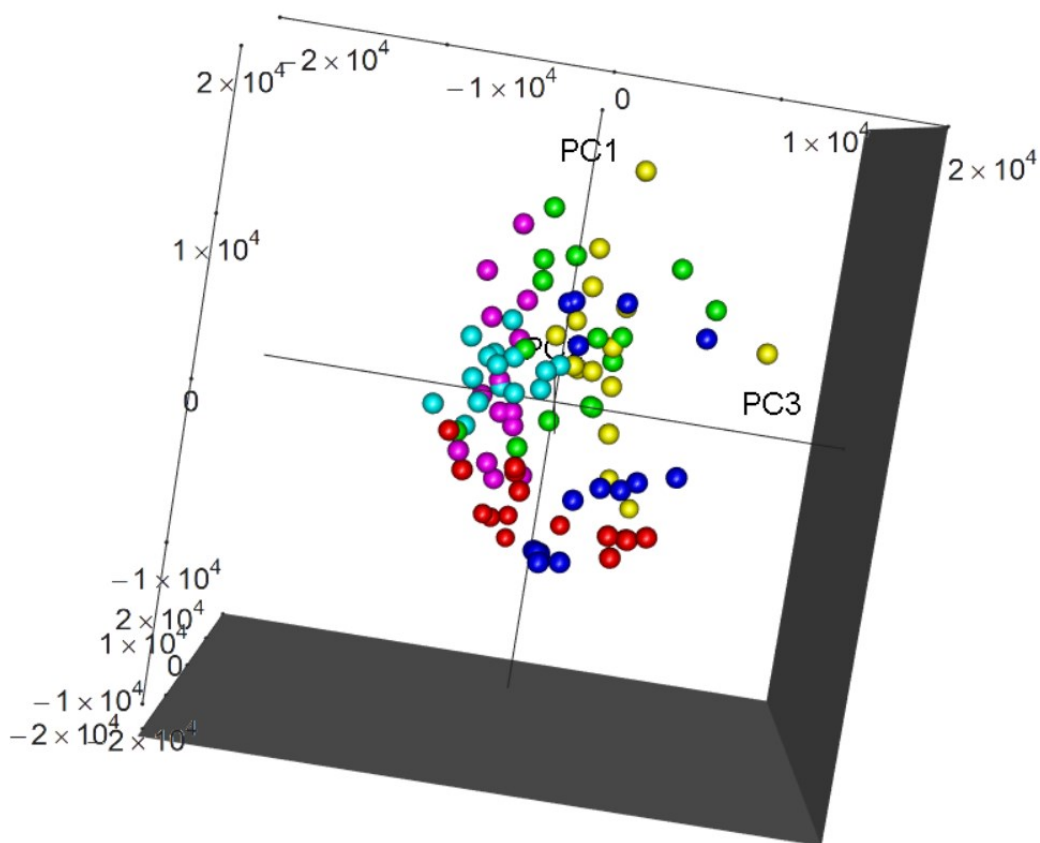
Obr. 24. Rozlišení mezi jezevčičkem dlouhosrstým a jezevčičkem hrubosrstým.

V následujícím hodnocení, zobrazeno na obrázku 25 a 26, bylo provedeno porovnání mezi náhodně vybranými zástupci lišící se svou velikostí těla, jednalo se tedy o kombinaci malého a velkého plemena. Na obrázku 25 je vyobrazeno rozlišení čivavy, jorkširského teriéra, mopse, německého ovčáka, stafordširského bulteriéra a zlatého retrívra. Obrázek 26 znázorňuje rozlišení mezi border kolií, boxerem, jezevčíkem hrubosrstým a krátkosrstým, pudlem a středoasijským pasteveckým psem.



Obr. 25. Rozlišení plemen různé velikosti – čivava, jorkširský teriér, mops, německý ovčák, stafordširský bulteriér, zlatý retrívr.

Obrázek 25 vypovídá o tom, že v případě malých a velkých plemen nejsou výrazné rozdíly. Například v případě zlatého retrívra je patrný rozdíl s čivavou či mopsem, u německého ovčáka lze pozorovat rozdíl společně s jorkširským teriérem, stejně tak je tomu v případě srovnání jorkširského teriéra a stafordširského bulteriéra. U bodových shluků velkých psů – zlatého retrívra, německého ovčáka a stafordširského bulteriéra dochází k překryvu, a tedy není možné je tímto způsobem rozlišit.

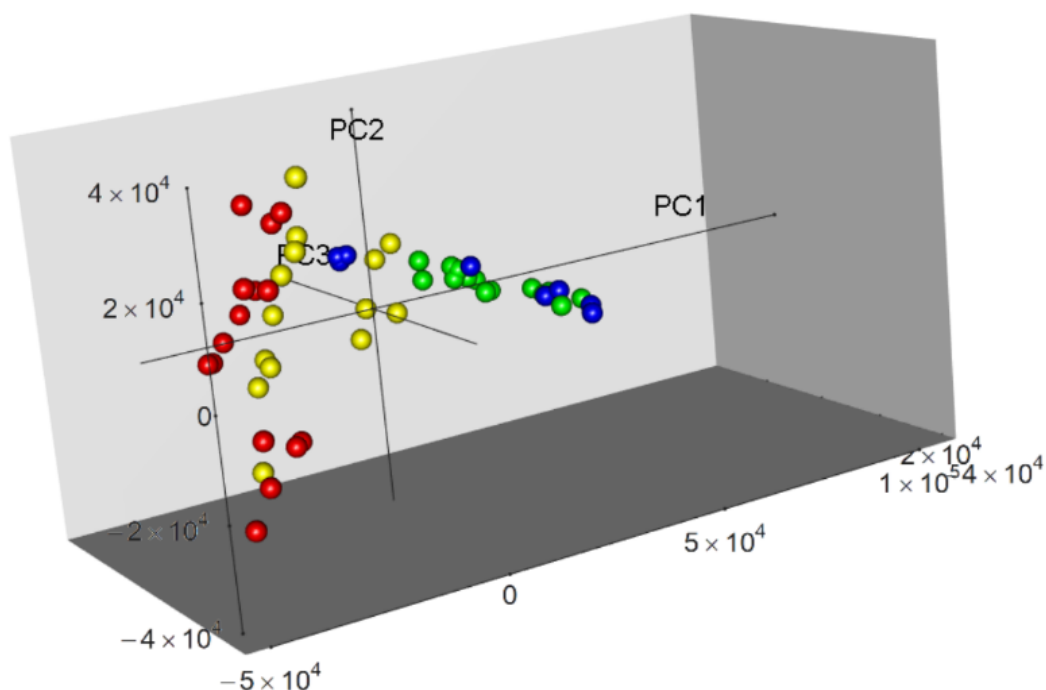


Obr. 26. Rozlišení velkých, středně velkých a malých plemen – *border kolie*, *boxer*, *jezevčík krátkosrstý*, *jezevčík hrubosrstý*, *pudl* a *středoasijský pastevecký pes*.

Protože jsou si spektra vybraných psích plemen podobná, dochází na výše uvedeném obrázku 26 k překrytí jejich redukovaných výsledků – bodových shluků, a není tedy možné tyto plemena od sebe rozlišit. Lze si všimnout rozlišení shluků u jezevčíka krátkosrstého a hrubosrstého jezevčíka, jejichž rozdělení bylo již provedeno (viz obrázek 23). V malé míře je patrný rozdíl u pudla a border kolie, v případě středoasijského pasteveckého psa, boxera a pudla dochází k překryvu, tedy není možné jejich rozlišení.

Dále bylo provedeno porovnání spekter plemen, jejichž srst se podobá. Nejprve byla porovnána psí plemena, jejichž srst je podobná v délce chlupu. Psí plemena byla rozdělena podle dlouhé, středně dlouhé a krátké srsti. Do skupiny s dlouhou srstí byla zařazena tato plemena – border kolie, chrt dlouhosrstý, jezevčík dlouhosrstý a zlatý retrívr (obr. 27). Jorkširský teriér, německý ovčák, pudl a středoasijský pastevecký pes byli zařazeni do plemen se středně dlouhou srstí (obr. 30). Mezi plemena s krátkou srstí byl zařazen boxer, čivava, francouzský buldoček, chrt krátkosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík dlouhosrstý,

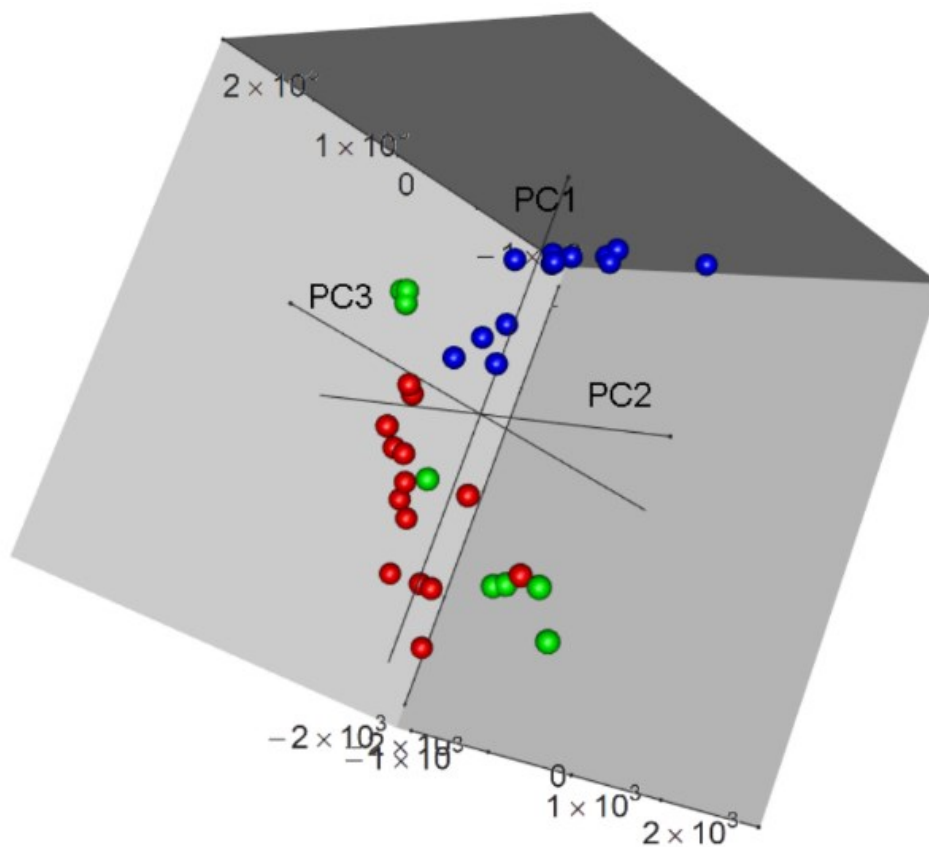
jezevčík krátkosrstý, mops, stafordširský bulteriér, a protože středoasijský pastevecký pes má jak středně dlouhou, tak i krátkou srst, byl do této skupiny zařazen také (obr. 31).



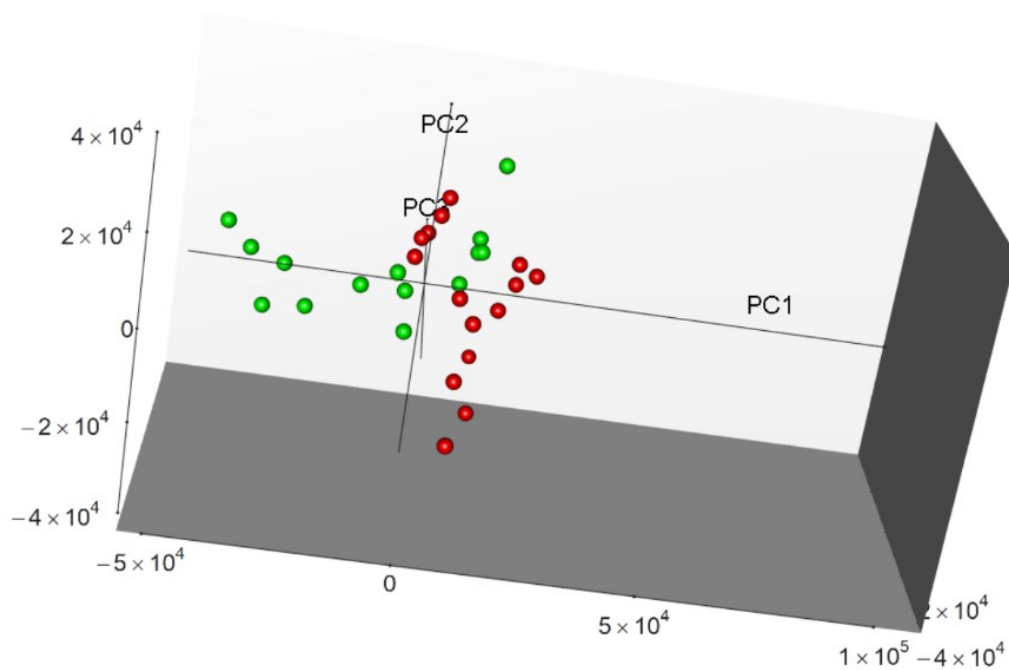
Obr. 27. Rozlišení psích plemen na základě délky jejich srsti. Plemena s dlouhou srstí – border kolie, chrt dlouhosrstý, jezevčík dlouhosrstý a zlatý retrívr.

Při rozlišení plemen psů s dlouhou srstí (obr. 27) bylo zjištěno, že výsledky získané ze srsti chrta dlouhosrstého jsou odlišné od výsledků ze srsti jezevčíka dlouhosrstého a border kolie, což umožňuje tato plemena od sebe rozlišit. Vzhledem k překryvu border kolie a jezevčíka dlouhosrstého a částečnému překrytí se zlatým retrívrem, bylo provedeno další rozlišení (obr. 28). Zda je možné od sebe rozlišit chrta dlouhosrstého a zlatého retrívra, bylo vyhodnoceno a výsledek je uveden na obrázku 29. Z obrázku 28 vyplývá, že v případě srovnání těchto tří plemen je možné od border kolie a jezevčíka dlouhosrstého odlišit zlatého retrívra. V případě porovnání border kolie a jezevčíka dlouhosrstého však rozlišení není možné, jejich bodové výsledky se překrývají.

Rozlišení mezi chrtem dlouhosrstým a zlatým retrívrem také není možné, neboť dochází k překryvu klastrů, jak je patrné z níže uvedeného obrázku 29.

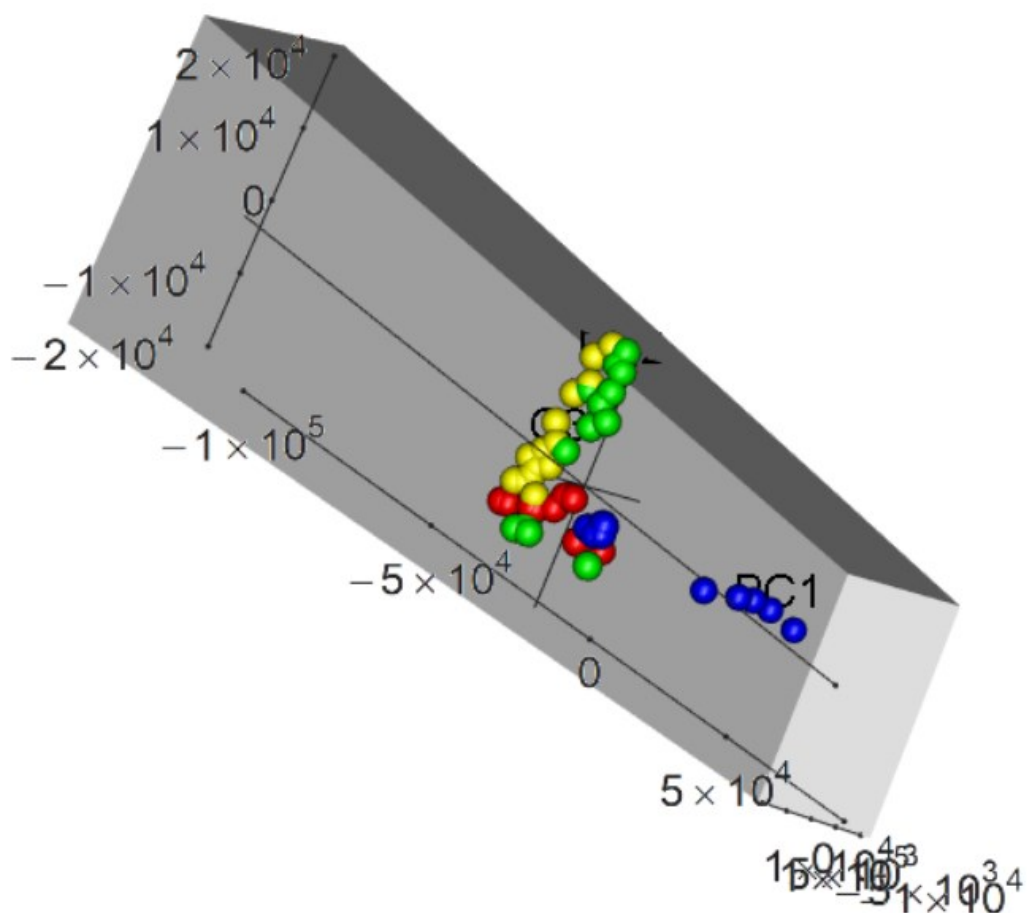


Obrázek 28. Rozlišení *border kolie*, *jezevčíka dlouhosrstého* a *zlatého retrívra*.



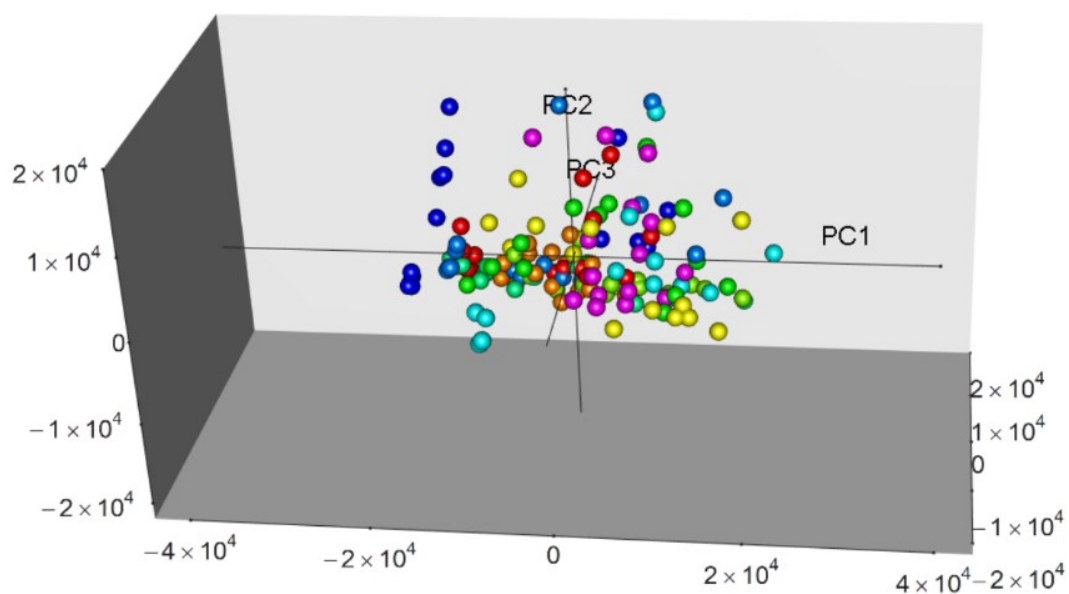
Obr. 29. Rozlišení mezi *chrt dlouhosrstým* a *zlatým retrívrem*.

Při rozlišení psích plemen se středně dlouhou srstí bylo zjištěno, že jorkširského teriéra, německého ovčáka, pudla a středoasijského pasteveckého psa není možné rozlišit, neboť jejich spektra vykazují určitou podobnost a dochází k překrytí jejich klastrů (obr. 30). Lze pouze odlišit jorkširského teriéra od středoasijského pasteveckého psa, o čemž vypovídá separace jejich bodových shluků.

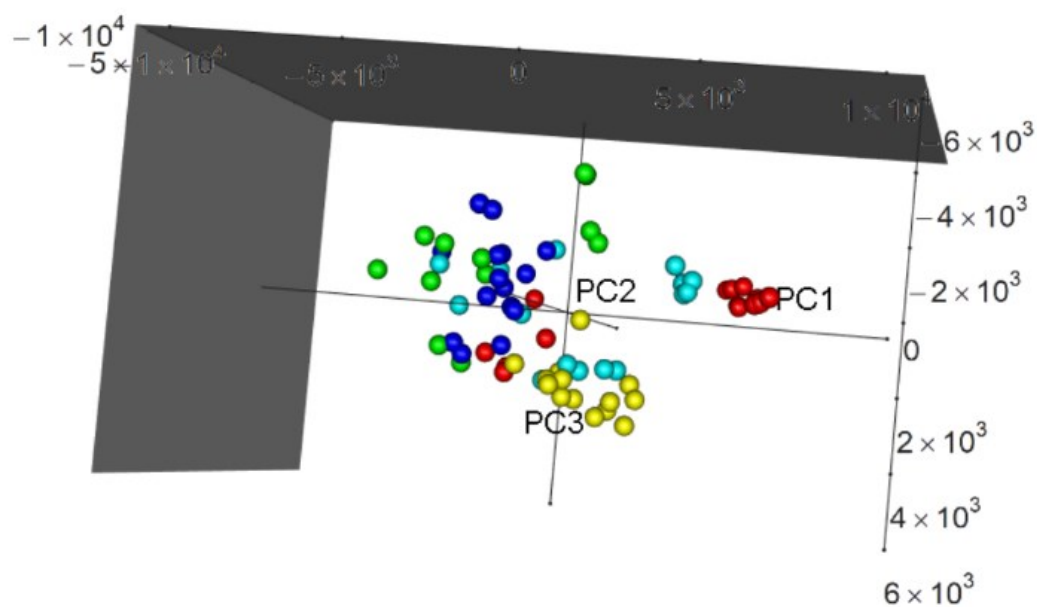


Obr. 30. Rozlišení psích plemen se středně dlouhou srstí – *jorkširského teriéra*, *německého ovčáka*, *pudla* a *středoasijského pasteveckého psa*.

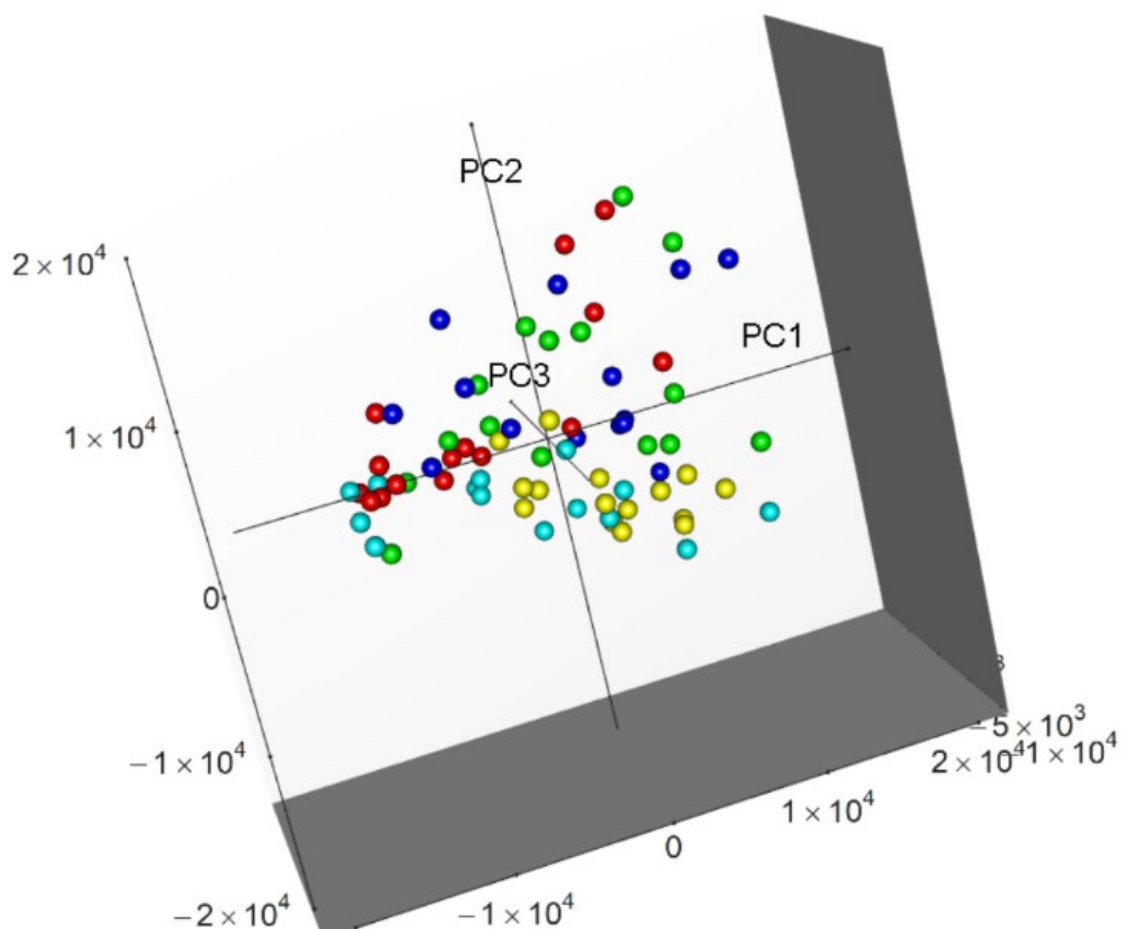
Vzhledem k tomu, že skupina plemen s krátkou srstí je poměrně obsáhlá (obr. 31), bylo provedeno náhodné rozdělení skupiny na dvě poloviny. Toto rozlišení je znázorněno na obrázku 32 a 33.



Obr. 31. Rozlišení mezi psími plemeny s krátkou srstí – *boxer*, *čivava*, *francouzský buldoček*, *chrt krátkosrstý*, *Jack Russell teriér*, *jezevčík krátkosrstý*, *jezevčík hrubosrstý*, *mops*, *stafordšírský bulteriér* a *středoasijský pastevecký pes*.



Obr. 32. Rozlišení psích plemen s krátkou srstí – *francouzského buldočka*, *chrt krátkosrstého*, *jezevčíka hrubosrstého*, *mopse* a *středoasijského pasteveckého psa*.



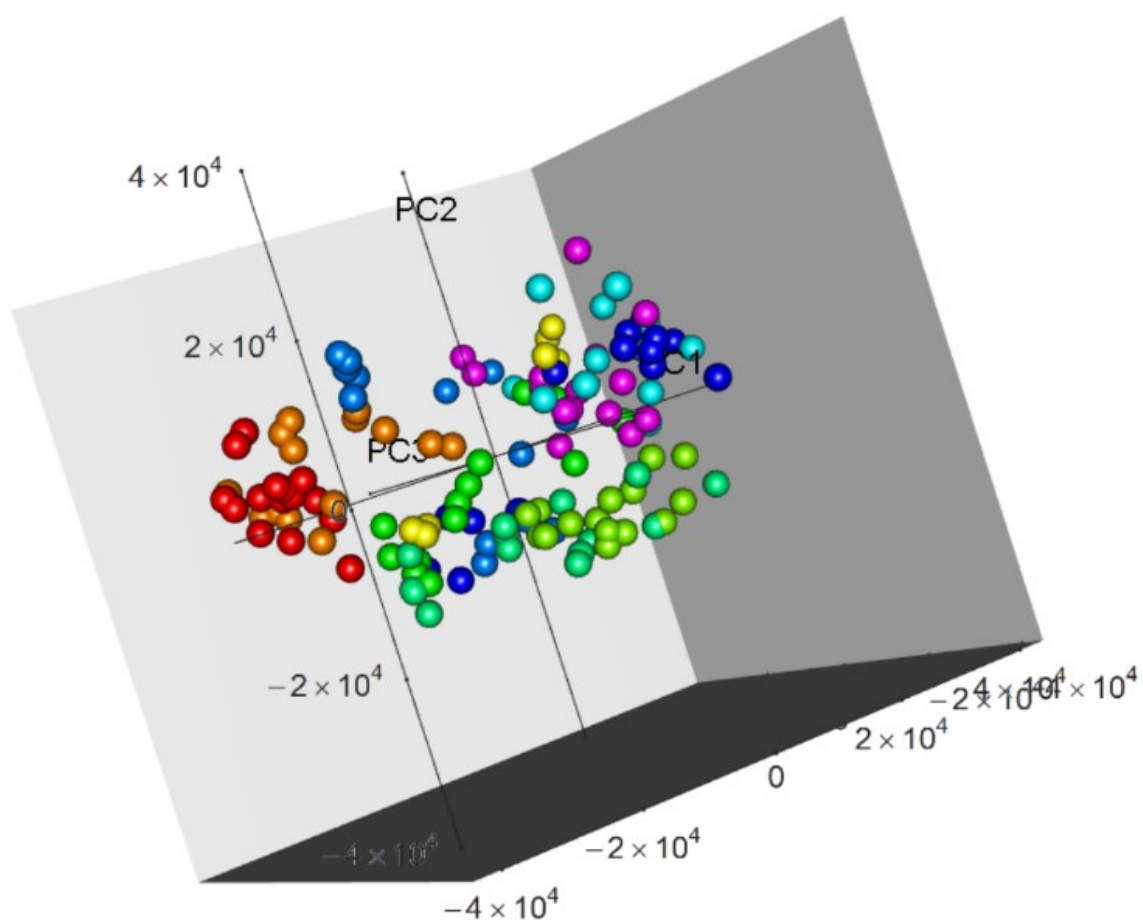
Obr. 33. Rozlišení psích plemen s krátkou srstí – boxer, čivava, jezevčík krátkosrstý, Jack Russell teriér a stafordširský bulteriér.

Z tohoto rozlišení vyplývá (obr. 32), že jednotlivé druhy – francouzského buldočka, chrt krátkosrstého, jezevčíka hrubosrstého, mopse a středoasijského pasteveckého psa, není možné proteomicky rozlišit. Při vyhodnocení další skupiny psích plemen (obr. 33) bylo zjištěno, že ani zástupce této skupiny, do které patřil boxer, čivava, jezevčík krátkosrstý, Jack Russell teriér a stafordširský bulteriér, není možné odlišit. Z celkového porovnání psích plemen s krátkou srstí lze říct, že není možné jejich rozpoznání.

V další části byla psí plemena rozdělena z hlediska typu srsti na plemena s jemnou srstí a plemena s hrubou srstí. Do skupiny psích plemen s jemnou srstí byli zařazeni – čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík krátkosrstý, mops, stafordširský bulteriér a zlatý retrívr (obr. 34).

Do skupiny psích plemen s hrubou srstí byla zařazena tato plemena – border kolie, boxer, jezevčík hrubosrstý, německý ovčák a středoasijský pastevecký pes (obr. 35).

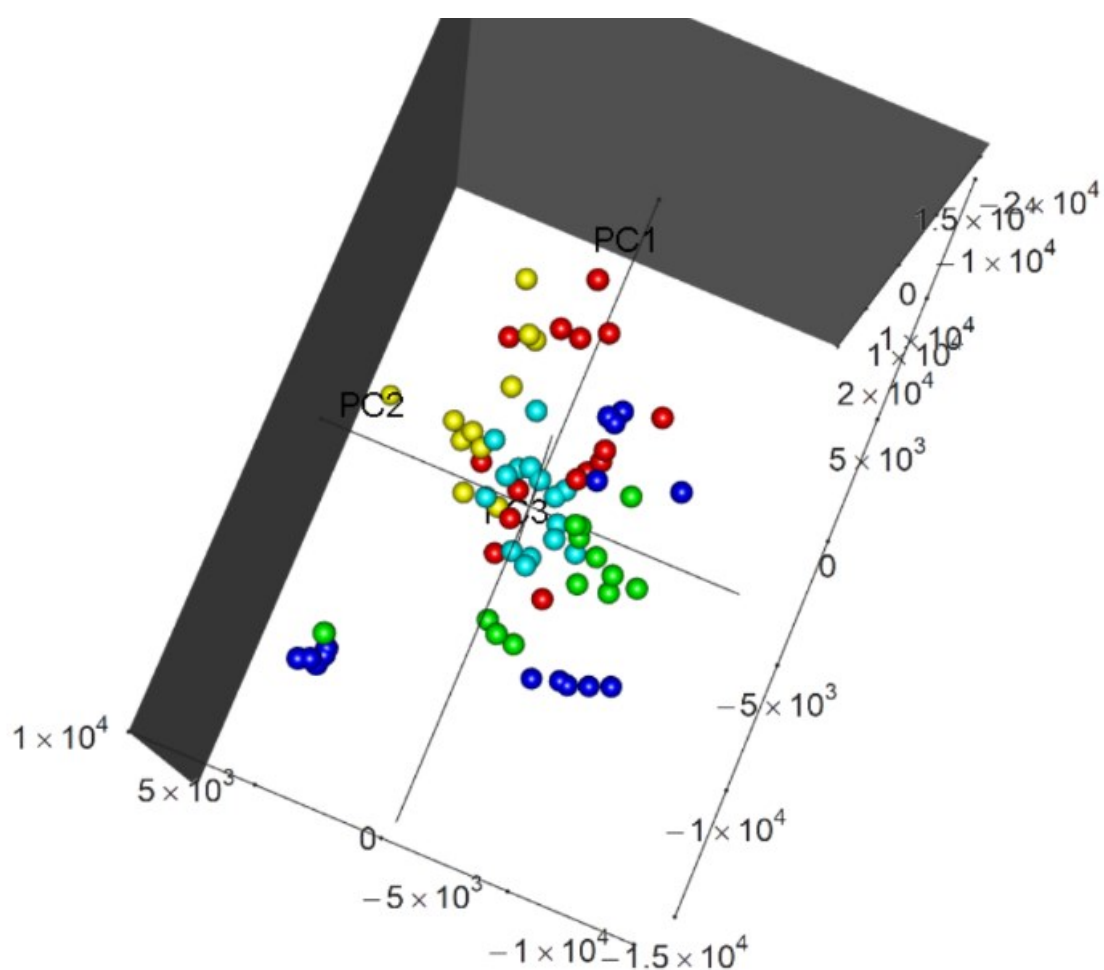
Z obrázku 34 vyplývá, že v rámci rozlišení plemen na základě jemnosti srsti je možné odlišit chrta dlouhosrstého od ostatních skupin – to francouzského buldočka, chrta krátkosrstého, Jack Russell teriéra, jezevčíka dlouhosrstého, jezevčíka krátkosrstého, mopsa i stafordširského bulteriéra, kromě zlatého retrívra, který je stejně jako chrt dlouhosrstý, rozlišitelný od těchto skupin s výjimkou chrta krátkosrstého.



Obr. 34. Rozlišení psích plemen s jemnou srstí – čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík krátkosrstý, mops, stafordširský bulteriér, zlatý retrívr.

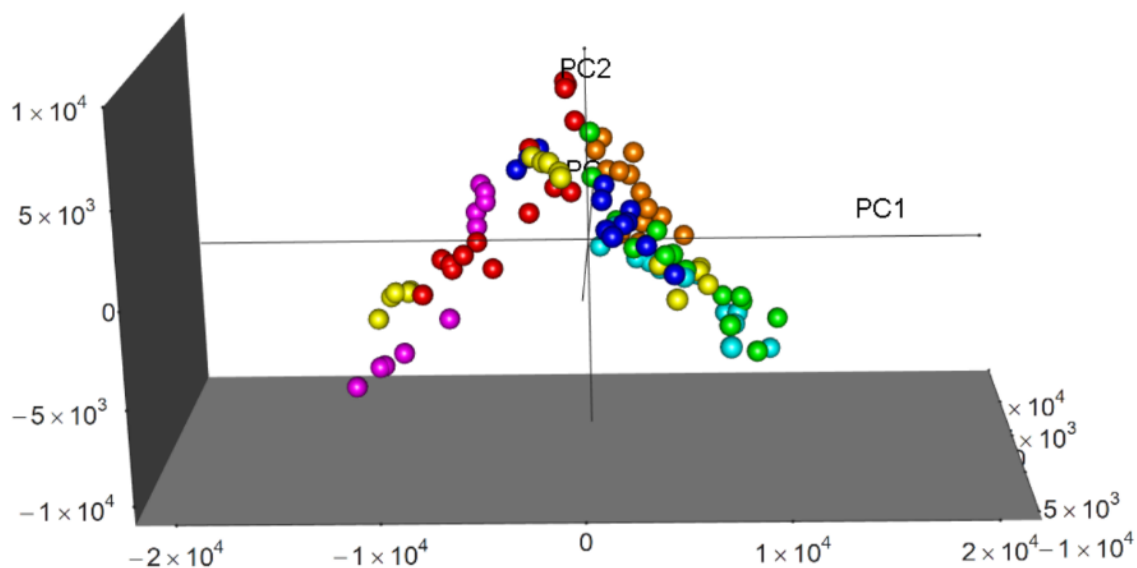
Graf na obrázku 35 vykazuje, že border kolii je možné rozlišit od jezevčika hrubosrstého a německého ovčáka. Zbylé skupiny od sebe nebylo možné rozlišit, neboť došlo k překrytí jejich klastrů, u kterých nebylo možné nalézt náznak separace.

Na níže uvedeném obrázku 36 je znázorněno rozlišení psích plemen s hrubou srstí v kombinaci s plemeny s kadeřavou srstí, tedy pudlem, konkrétně border kolie, boxer, jezevčík hrubosrstý, německý ovčák a středoasijský pastevecký pes, do této skupiny, neboť není tak obsáhla jako skupina plemen s jemnou srstí, byl zařazen také jorkširský teriér, jehož srst je hedvábná.



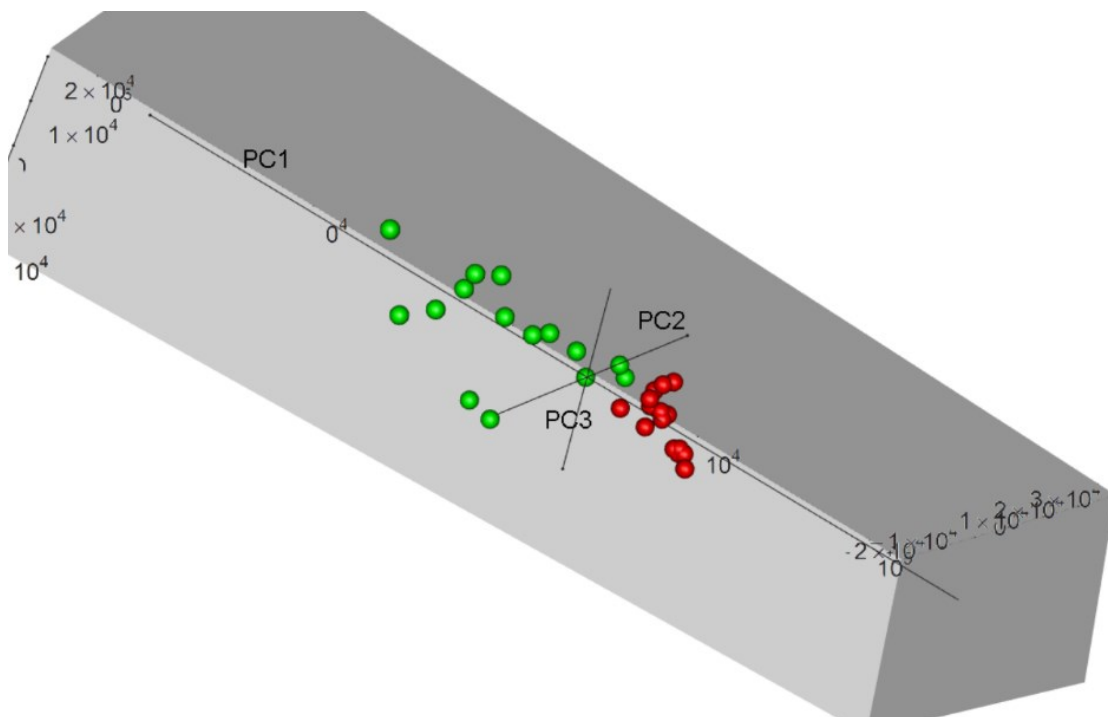
Obr. 35. Rozlišení plemen psů s hrubou srstí – *boxera*, *border kolie*, *jezevčíka hrubosrstého*, *německého ovčáka* a *středoasijského pasteveckého psa*.

Na základě vyhodnocení spekter plemen s hrubou srstí v kombinaci se srstí kadeřavou (obr. 36) lze říci, že spektra jorkširského teriéra, jehož srst je hedvábná, a proto se liší od těchto analyzovaných plemen svou srstí, jsou odlišná od spekter border kolie, boxera, německého ovčáka a středoasijského pasteveckého psa, což je pravděpodobně způsobeno právě odlišnou srstí. Jezevčík hrubosrstý je rozlišitelný od středoasijského pasteveckého psa. Pudla, který se od ostatních plemen také liší srstí, která je kadeřavá, složená ze spirálovitě stočených pesíků a bez přítomnosti podsady, lze odlišit pouze od border kolie, a to i přes to, že má srst rozdílnou i od zbylých plemen. Z důvodu možného oddělení, které plyne z vyhodnocení na obrázku 36, bylo provedeno vyhodnocení rozlišení pudla a středoasijského pasteveckého psa (obrázek 37).



Obr. 36. Rozlišení psích plemen s hrubou srstí v kombinaci s plemeny se srstí kadeřavou a hedvábnou – border kolie, boxer, jezevčík hrubosrstý, jorkširský teriér, německý ovčák, pudl a středoasijský pastevecký pes.

Vyhodnocení mezi pudlem a středoasijským pasteveckým psem ukázalo, že spektra těchto plemen jsou v malé míře odlišná, proto se jejich bodové shluky po vyhodnocení pomocí PCA od sebe podařilo separovat a tyto plemena je tedy možné mezi sebou rozlišit (obr. 37).



Obr. 37. Rozlišení mezi *pudlem* a *středoasijským pasteveckým psem*.

V tabulce 2 je zobrazeno shrnutí rozlišitelnosti zkoumaných plemen mezi sebou. Z této tabulky vyplývá, že jako nejvíce odlišitelné plemeno se jeví chrt dlouhosrstý (odlišitelný od 11 ostatních plemen), po něm následuje jorkširský teriér (rozlišitelný vůči 10 jiným plemenům) a zlatý retrívr (odlišitelný od sedmi plemen). Naopak nejhůře odlišitelný je hrubosrstý jezevčík (jedno plemeno), boxer stejně jako krátkosrstý chrt, dlouhosrstý jezevčík a stafordširský bulteriér (dvě plemena).

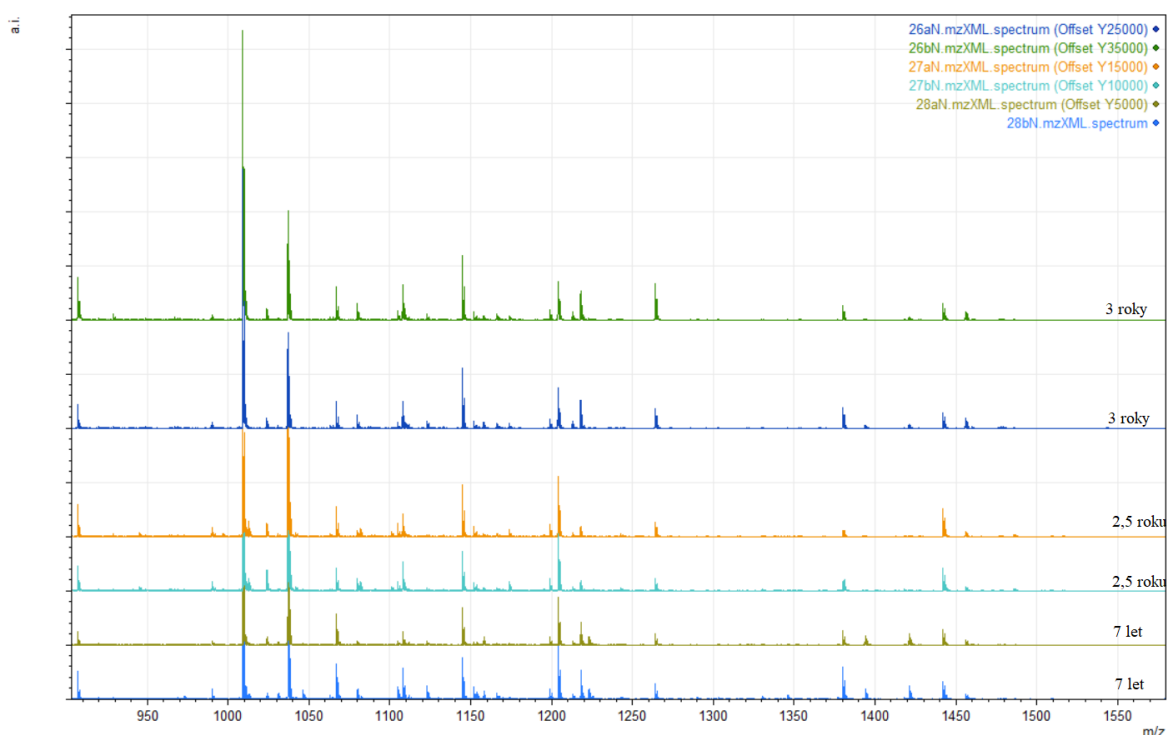
Tab. 2. Rozlišení jednotlivých plemen mezi sebou. ✖ – značí nemožnost rozlišení daných plemen, ✔ – značí rozlišení mezi danými plemeny.

	border kolie	boxer	čivava	francouzský buldoček	chrt krátkosrstý	chrt dlouhosrstý	Jack Russell teriér	jezevčík dlouhosrstý	jezevčík hrubosrstý	jezevčík krátkosrstý	jorkširský teriér	mops	německý ovčák	pucl	zlatý retrivr	stafordširský bulteriér	středoasijský pastevecký pes
border kolie		✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖	✔	✖	✔	✖	✔	✖	✔	✖	✖
boxer	✖		✖	✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖	✖	✖
čivava	✖	✖		✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖	✔	✔	✖	✔	✔	✖	✖
francouzský buldoček	✖	✖	✖		✖	✔	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖	✔	✔	✖	✖
chrt krátkosrstý	✖	✖	✖	✖		✔	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖	✖	✖
chrt dlouhosrstý	✔	✔	✔	✔	✔		✔	✔	✖	✔	✖	✔	✖	✖	✖	✔	✔
Jack Russell teriér	✖	✖	✖	✖	✖	✔		✖	✖	✖	✔	✖	✖	✔	✔	✖	✖
jezevčík dlouhosrstý	✖	✖	✖	✖	✖	✔	✖		✖	✖	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖
jezevčík hrubosrstý	✔	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖		✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖
jezevčík krátkosrstý	✖	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖	✖		✖	✖	✔	✖	✔	✖	✖
jorkširský teriér	✔	✔	✔	✔	✔	✖	✔	✖	✖	✖		✔	✔	✖	✖	✔	✔
mops	✖	✖	✔	✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖	✔		✖	✔	✔	✖	✖
německý ovčák	✔	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✔	✔	✖		✖	✖	✖	✖
pucl	✖	✖	✔	✔	✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖	✔	✖		✖	✖	✔
zlatý retrivr	✔	✖	✔	✔	✖	✖	✔	✔	✖	✔	✖	✔	✖	✖		✖	✖
stafordširský bulteriér	✖	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖		✖
středoasijský pastevecký pes	✖	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✖	✖	✖	✔	✖	✔	✖	✖	✖	

4.2 Vyhodnocení dat pomocí mMass

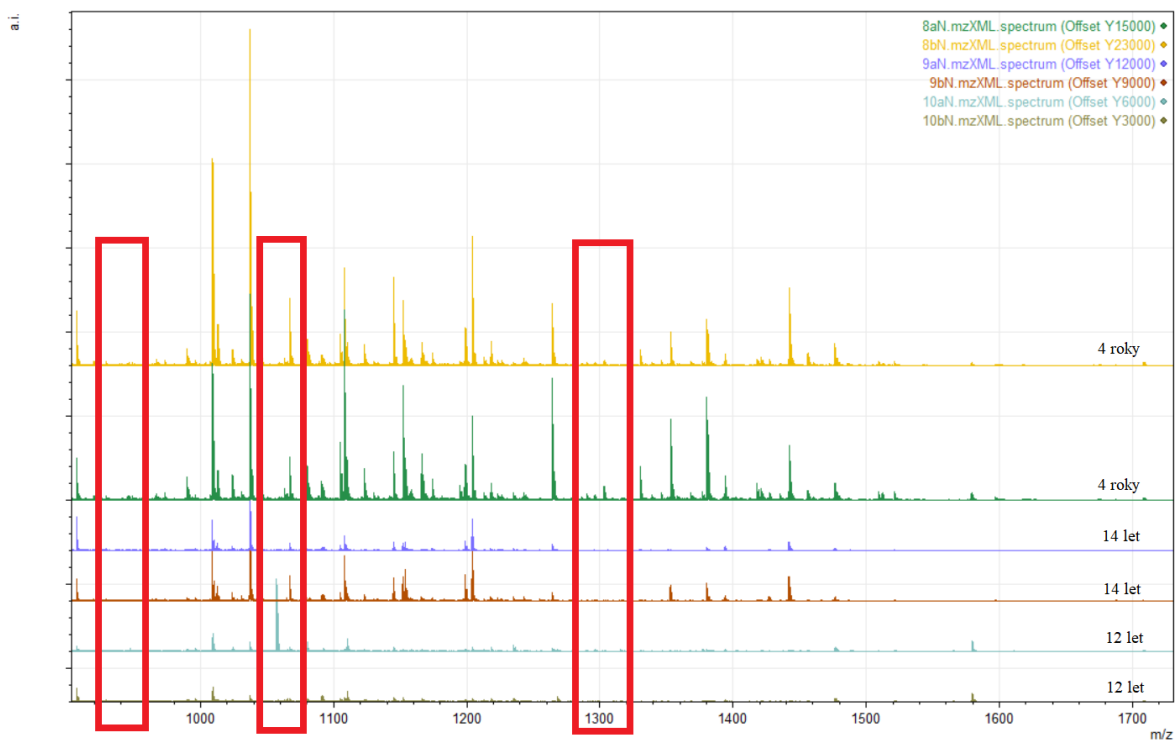
Vzhledem k tomu, že se některá MALDI-TOF spektra zástupců stejného plemene při jejich vyhodnocení pomocí PCA odlišovala, byla provedena úprava postupu analýzy, při které byly chlupy před štěpením očištěny ethanolem. A následně analyzovány stejným postupem, který je popsán v *podkapitole 3.5 a podkapitole 3.6*. Z tohoto důvodu byla spektra dále vyhodnocena pomocí programu mMass, umožňující zobrazení spekter. Výsledná spektra vždy dvou vzorků některých analyzovaných psích plemen jsou uvedena na obrázcích níže.

Na obrázku 38 jsou zobrazena hmotnostní spektra srsti pocházející z čivavy, jedinci byli staří dva a půl roku, tři roky a sedm let. I přes to, že se intenzity píků liší u různě starých jedinců, poloha píků je stejná, což svědčí o podobnosti srsti zkoumaných jedinců.



Obr. 38. Hmotnostní spektrum dvou vybraných analyzovaných vzorků srsti čivavy různého věku.

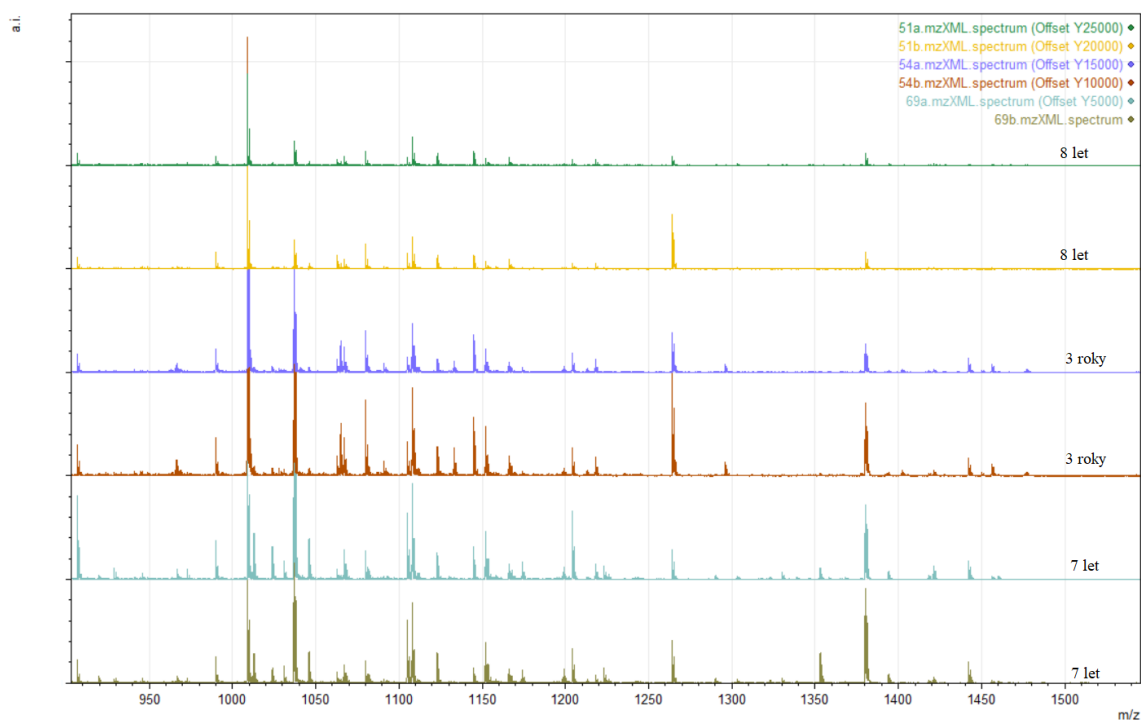
Hmotnostní spektra srsti chřta krátkosrstého, která jsou zobrazena na obrázku 39, vykazují různou intenzitu přítomných peptidů, nicméně poloha píků je až na výjimky stejná u všech třech zástupců tohoto plemene. Odlišnost je viditelná u dvou starších zástupců, jejichž věk, jak je zapsáno v *tabulce 1*, činil 12 a 14 let. U těchto zástupců není zřejmá přítomnost daných peptidů, nepřítomnost peptidů je v grafu označena červeným obdélníkem.



Obr. 39. Hmotnostní spektrum srsti dvou vybraných analyzovaných vzorků srsti chřta krátkosrstého různého věku.

S věkem dochází ke křehnutí chlupů, dochází tedy také k úbytku keratinů, proteinů obsažených v srsti (Evans a Lahunta, 2013). Tento úbytek je možný považovat za příčinu vzniku odlišných spekter získaných ze srsti jedinců stejného plemene, kteří ale již byli vyššího věku, a to čtyři roky, 12 a 14 let. Kvalita srsti je ovlivněna také vnějšími faktory. Srst se také liší v důsledku stravy, kdy nedostatek některých látek může vést právě k poklesu tvorby keratinů. Proteiny představují přibližně 95 % struktury srsti psů. Je uváděno, že 25 až 30 % denního příjmu proteinů je použito k obnově pokožky a srsti, a jakýkoli jejich deficit má za následek zjevné účinky na srst, a to například zmenšení průměru chlupu, velikost cibule či křehnutí chlupu. Vysoká hladina bílkovin ve stravě zajišťuje vysoký příjem aminokyselin obsahujících síru, které jsou nezbytné pro správnou regeneraci buněk srsti (West, 2018). Strukturu chlupu může také ovlivnit stres či onemocnění, mezi které nejčastěji patří hormonální nerovnováha, poruchy trávení aj.

Jak je patrné z grafu na obrázku 40, hmotnostní spektra peptidů přítomných v srsti mopse jsou u všech zástupců tohoto plemena podobná, což může být způsobeno také věkem jedinců, který není tak rozdílný jako v případě chřta krátkosrstého (obr. 39). Věk jedinců činil tři roky, sedm a osm let. Spektra jedinců zastupující toto plemeno jsou si podobná, což může být také důsledek toho, že věk ani u jednoho zástupce nepřesáhl deset let.



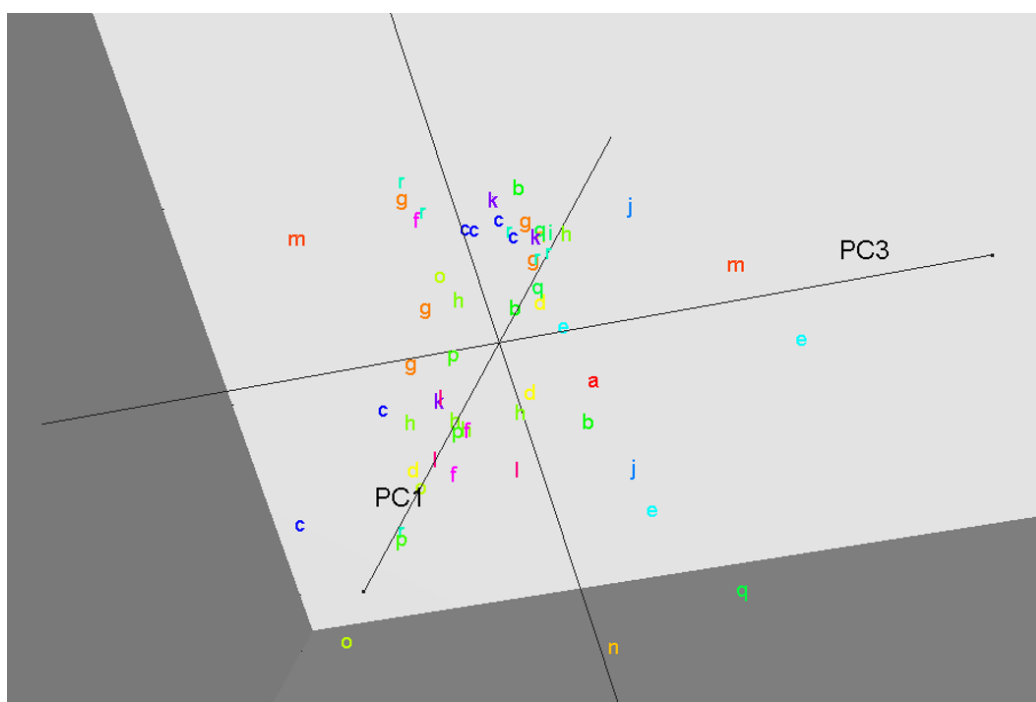
Obr. 40. Hmotnostní spektrum srsti dvou vybraných analyzovaných vzorků srsti mopse různého věku.

4.3 Vyhodnocení dat pomocí lineární diskriminační analýzy

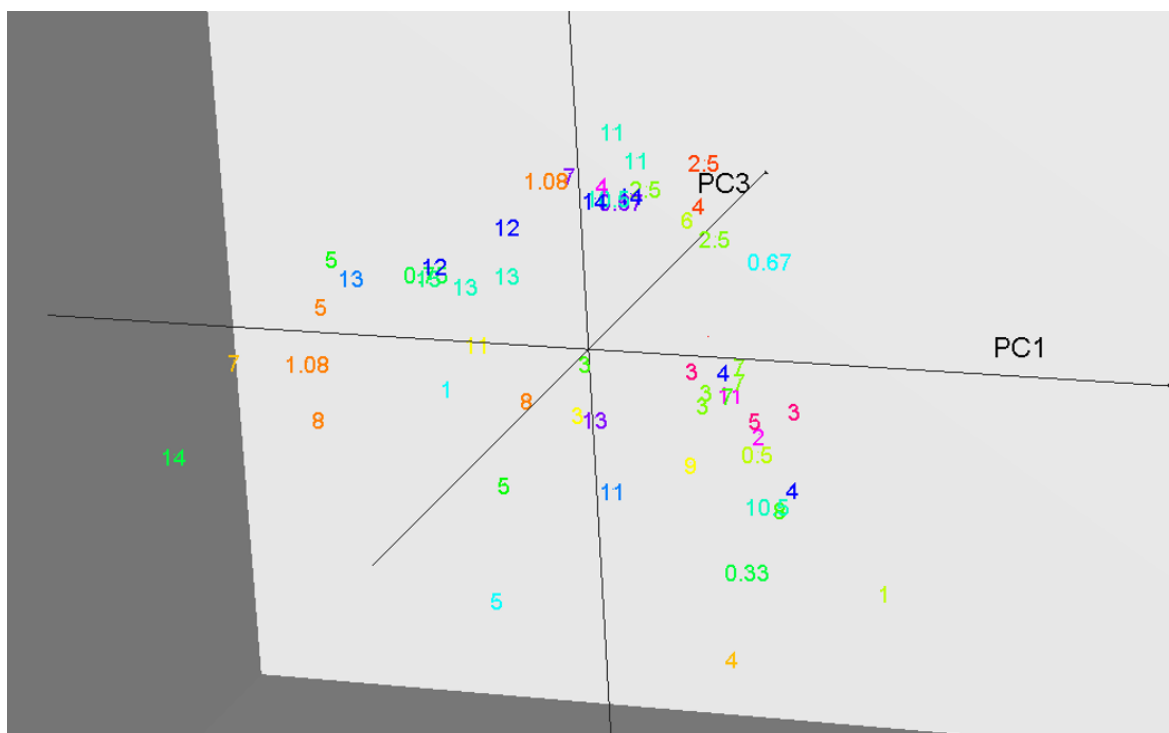
Data pocházející z LC-MS/MS byla vyhodnocena pomocí PCA a lineární diskriminační analýzy (LDA), výsledky jsou uvedeny v grafech níže.

Na obrázku 41 je zobrazen graf zahrnující výsledky rozlišení srsti všech analyzovaných psích plemen včetně vlka. Výsledky ukazují, že ani pomocí kapalinové chromatografie LC-MS/MS spolu s PCA a LDA nedošlo k rozlišení jednotlivých psích plemen, zároveň nebyla prokázána ani odlišnost vlka od ostatních psích plemen. Spektra jednotlivých chlupů se překrývají, což je způsobeno podobným proteinovým složením u psí srsti, kvůli tomu nelze pomocí této metody jednotlivá psí plemena prostřednictvím chlupů od sebe rozlišit.

Jak již bylo uvedeno výše, vzhledem k tomu, že s věkem dochází ke změně ve struktuře chlupů (Evans a Lahunta, 2013), je možné, že tyto změny způsobují odlišnosti ve spektrech a znemožňují rozpoznání jednotlivých psích plemen, proto došlo také k porovnání srsti jedinců na základě rozdílného věku. Výsledky tohoto porovnání jsou vyobrazeny na níže uvedeném obrázku 42.



Obr. 41. Rozlišení srsti všech zkoumaných plemen včetně srsti vlka – *border kolie, boxer, čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russel teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík hrubosrstý, jezevčík krátkosrstý, jorkširský teriér, mops, německý ovčák, pudl, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký pes, vlk, zlatý retrívr.*



Obr. 42. Rozlišení srsti všech zkoumaných plemen včetně srsti vlka na základě věku – *border kolie*, *boxer*, *čivava*, *francouzský buldoček*, *chrt dlouhosrstý*, *chrt krátkosrstý*, *Jack Russel teriér*, *jezevčík dlouhosrstý*, *jezevčík hrubosrstý*, *jezevčík krátkosrstý*, *jorkširský teriér*, *mops*, *německý ovčák*, *pudl*, *stafordširský bulteriér*, *středoasijský pastevecký pes*, *vlk*, *zlatý retrivr*.

Z grafu zobrazeném na obrázku 42 je patrné, že klastry bodů ze spekter získaných z analyzovaných srstí různě starých jedinců se překrývají, proto není možné od sebe jednotlivá plemena rozeznat ani na základě odlišným věků jedinců.

V tabulce 3 jsou vypsány hlavní identifikované proteiny, které se v psí srsti vyskytují.

Tab. 3. Přehled nejčastěji identifikovaných proteinů vyskytujících se v psí srsti. Šedě označené proteiny s dohledanou souvislostí se psí srstí jsou popsány níže.

<i>PROTEIN</i>	<i>POČET UNIKÁTNÍCH PEPTIDŮ</i>
<i>J9P8T8_CANLF</i> Desmoplakin	98
keratin, type II cytoskeletal 1b, keratin 1	24
junction plakoglobin isoform X1	22
<i>ANXA2_CANLF</i> Annexin A2	19
plakophilin-1	19
desmocollin-2 isoform X4	18
keratin, type II cuticular Hb4 <i>E2R489_CANLF</i> ; Keratin 84	16
keratin, type I cytoskeletal 16	13
<i>K22E_CANLF</i> Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	13
<i>A0A5F4CIA4_CANLF</i> Cysteinyglycine-S-conjugate dipeptidase	12
serpin B5 isoform X2	12
<i>F6XRY2_CANLF</i> Eukaryotic translation elongation factor 2	12
keratin, type II cytoskeletal 72	12
ethylmalonyl-CoA decarboxylase isoform X3	12
<i>F1PQ93_CANLF</i> Stratifin	11
keratin, type II cytoskeletal 74	11
heat shock protein beta-1	10
<i>E2QW85_CANLF</i> Elongation factor 1-alpha	10
<i>A0A5F4CDPI_CANLF</i> Periplakin	10
<i>E2R170_CANLF</i> IF rod domain-containing protein, keratin 27	10
trichohyalin isoform X5	10

Ve výše uvedené tabulce 3 jsou vypsány proteiny s klesajícím pořadím unikátních proteinů, u některých proteinů byla dohledána přímá souvislost s výskytem v psí srsti, tyto proteiny jsou v tabulce vyznačeny, u některých proteinů ale přímá souvislost se srstí nalezena nebyla.

Annexin A2 je protein, který se vyskytuje u psů, stejně jako u člověka, v dermální papile, ta je hlavní složkou vlasů signalizující folikulární buňky k prodloužení růstu vlasů. Jedná

se o protein, který je regulován vápníkem, afinita k vápníku je zvýšena aniontovými fosfolipidy.

Ve vlasových folikulech se dále nachází **heat shock protein beta-1**, který pravděpodobně udržuje denaturované proteiny ve složeném stavu a má důležitou roli v odolnosti proti stresu a také při organizaci aktinů. Heat shock protein beta-1 funguje jako molekulární chaperon, ten prostřednictvím své aktivity může regulovat biologické procesy jako například fosforylaci.

Součástí psích chlupů jsou keratiny různých typů, keratin cytoskeletálního typu je důležitý při vytváření epidermálních bariér na kůži, příkladem je **keratin KRT1**, který může regulovat aktivitu kináz. Stejně tak se ve vlasovém folikulu vyskytuje keratin typu II – **keratin cytoskeletal 2 epidermal**, který souvisí s aktivací a keratinizací keratinocytů, dále hraje důležitou roli při vytváření epidermální bariéry, **KRT72** je, stejně jako **KRT74**, specifickou složku keratinových intermediárních vláken ve vlasovém folikulu, jenž má důležitou roli při tvorbě vlasů, či **KRT84** podílející se na regulaci diferenciaci keratinocytů. Keratin typu I – **KRT16**, který působí jako regulátor vrozené imunity v reakci na porušení kožní bariéry, se vyskytuje v kůži. **KRT27** se podílí na aktivitě strukturních molekul a morfogenezi vlasových folikulů.

Junction plakoglobin isoform X1, další protein přítomný v chlupcích psů, je protein regulující buněčnou adhezi, poskytuje spojení mezi klasickými a desmosomálními kadheriny, jejich exprese vede ke zpomalení růstu chlupů. Ve vlasovém folikulu byl také nalezen **serpin**, který je důležitý pro zrání kolagenu.

Dalším proteinem součástí vlasových folikulů je **ethylmalonyl-CoA dekarboxyláza isoforma X3**, který se účastní aktivity enoyl-CoA hydratázy a také β -oxidace mastných kyselin. Dále se v srsti psů vyskytuje protein **periplakin**, který najdeme také u člověka, tento protein je antigenem k onemocnění nazývaném pemfigus způsobující ztrátu kohezivitu keranocytů a tvorbu intraepidermálních puchýřů na kůži.

Mezi protein, u kterého nebyla dohédána přímá souvislost se srstí, je například elongation factor 1-alpha, jedná se o protein podporující vazbu aminoacyl-tRNA na ribozóm během biosyntézy proteinu. Plakophilin je protein s funkcí kadherinové vazby nacházející se převážně v diferencovaných vrstvách pokožky. Cysteinylglycine-S-conjugate dipeptidase se vyznačuje katalytickou aktivitou. Desmocolin je protein nacházející se primárně

v epitelových buňkách důležitý pro buněčnou adhezi. V epiteliálních buňkách se nachází také stratifin. Eukaryotic translation factor 2 je základním faktorem pro syntézu proteinů.

5 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo zjištění, zda je možné od sebe rozpoznat jednotlivá plemena psů a zároveň psů od vlka prostřednictvím jejich chlupů za využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí LC-MS/MS.

Keratiny obsažené v psí srsti byly rozštěpeny pomocí enzymu (trypsinu) na menší fragmenty – peptidy, které byly následně měřeny za pomoci výše uvedených metod, jejichž výsledky byly zpracovány a porovnány pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a lineární diskriminační analýzy (LDA).

Z měření a analýzy vzorků chlupů vlka a jednotlivých plemen psů bylo zjištěno, že není možné od sebe rozlišit vybrané druhy psích plemen od vlka. Zároveň jednotlivá psí plemena, respektive naštěpené proteiny z jejich srsti, vytvářela spektra, která obsahovala podobné rozmístění i intenzitu píků, což vypovídá o jejich podobném proteinovém složení. Nicméně i přes velkou podobnost složení proteinů všech psích plemen, bylo na základě rozdělení plemen do různých kategorií dle daných vlastností zjištěno, že některá psí plemena je možné od sebe rozeznat. Mezi taková plemena patří například středoasijský pastevecký pes, kterého lze odlišit od jorkširského teriéra či pudla, nebo zlatý retrívr odlišitelný od border kolie, ta se liší také od chrta dlouhosrstého. I přes to, že se některá psí plemena od sebe odlišovala, nepodařilo se najít pravidlo na základě kterého by došlo k rozlišení daných psích plemen.

Nemožnost od sebe rozlišit jednotlivá psí plemena včetně vlka byla prokázána také analýzou pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostním spektrometrií LC-MS/MS. Pomocí této analýzy bylo zároveň zjištěno, že není možné rozlišit psí plemena na základě odlišného věku zkoumaných jedinců, a to ani různě staré jedince v rámci stejného plemena.

I přes to, že bylo prokázána možnost odlišit od sebe některá psí plemena, poznatky v této práci však vedou spíše ke zjištění, že není možné jednotlivá psí plemena od sebe protemicky rozlišit.

6 LITERATURA

A One-Stop Shop for Principal Component Analysis. [Online]. *TowardsDataScience*, 17. 4. 2017. [cit. 14. 9. 2020]. Dostupné z: <https://towardsdatascience.com/a-one-stop-shop-for-principal-component-analysis-5582fb7e0a9c>

A step by step explanation of principal component analysis. [Online]. *Builtin*, 5. 8. 2020. [cit. 14. 9. 2020]. Dostupné z: <https://builtin.com/data-science/step-step-explanation-principal-component-analysis>

ABDI, Hervé; WILLIAMS, Lynne J. Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: Computational statistics*, 2010.

AHMED, Yasser A.; ALI, Safwat; GHALLAB, Ahmed. Hair histology as a tool for forensic identification of some domestic animal species. *EXCLI Journal*, 2018.

ALIBARDI, Lorenzo. Immunolocalization of alpha-keratins and feather beta-proteins in feather cells and comparison with the general process of cornification in the skin of mammals. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2013.

Analýza hlavních komponent a faktorová analýza. [Online]. *Vícerozměrné statistické metody*. [cit. 5. 9. 2020]. Dostupné z: http://www.fsps.muni.cz/~sebera/vicerozmerna_statistika/pca.html.

ANDĚRA, Miloš; HORÁČEK, Ivan. Poznáváme naše savce. 1. vyd. *Mladá fronta*, 1982. ISBN 80-868-1708-3

BARTHOLOMEW, David J. Principal components analysis. *International encyclopedia of education*, 2010.

BEAZLEY, Mitchell. Království zvířat. 1. vyd. *Albatros*, 1983. ISBN 80-00-000121.

BERGMAN, Jerry. Why mammal body hair is an evolutionary enigma. *Creation Research Society Quarterly*, 2004.

BERTINO, Anthony J., BERTINO, Patricia. Forensic Science: Fundamentals & Investigations. 2. vyd., *Cengage learning*, 2015.

Border Collie. [Online]. *Britannica*. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/animal/border-collie>

BOUCHAL, Pavel, *et al.* Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chemické listy*, 2003.

Boxer. [Online]. *The spruce Pets*. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.thesprucepets.com/breed-profile-boxer-1117944>

BRIGGS, Helen. How did dogs become our best friends? New evidence. [Online]. *BBC News*, 19. 6. 2017. [cit. 8. 9. 2020]. Dostupné z <https://www.bbc.com/news/science-environment-40638584>

BRYSON, Warren G., *et al.* Improved two-dimensional electrophoretic mapping of Japanese human hair proteins; application to curved and straight Japanese human hairs; and protein identification by MALDI MS and MS/MS quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Cosmetic Science*, 2020.

BURNIE, David, *et al.* Zvíře. 1. vyd. *Euromedia group k. s.*, 2002. ISBN 80-242-0862-8.

BUTLER, William F., WRIGHT A. I. Hair growth in the greyhound. *Journal of Small Animal Practice*, 1981.

Canidae – coyotes, dogs, foxes, jackals and wolves. [Online]. *Animal diversity*. [cit. 7. 9. 2020]. Dostupné z: <https://animaldiversity.org/accounts/Canidae/>

Canis Lupus. [Online]. *Animal diversity*. [cit. 25. 8. 2020]. Dostupné z: https://animaldiversity.org/accounts/Canis_lupus/

CARDAMONE, Jeanette M. Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR). *Journal of Molecular Structure*, 2010.

Coat and skin appearance in the healthy dog. [Online]. *VCA: Tammy Hunter, Cheryl Yuill*. [cit. 22. 9. 2020]. Dostupné z: <https://vcahospitals.com/know-your-pet/coat-and-skin-appearance-in-the-healthy-dog>.

CONNOR, Steve. Why humans lost their body hair: to stop their brains from overheating as we evolved. [Online]. *Independent*, 17. 2. 2013. [cit. 4. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.independent.co.uk/news/science/why-humans-lost-their-body-hair-to-stop-their-brains-from-overheating-as-we-evolved-8498623.html>.

COPPINGER, Raymond; COPPINGER, Lorna. Dogs: A new understanding of canine origin, behavior and evolution. *University of Chicago Press*, 2002.

COPPINGER, Raymond; COPPINGER, Lorna. Dogs: A startling new understanding of canine origin, behavior & evolution. *Simon and Schuster*, 2001.

ČIHÁK, Radomír. Anatomie 3. 3 vyd. *Grada Publishing, a.s.*, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.

ČMELÍK, Richard; BOBÁLOVÁ, Janette. Metody štěpení proteinů využitelné v proteomické analýze. *Chemické Listy*, 2016.

Definition of liquid chromatography (LC). [Online]. *ChemicoolDictionary*. [cit. 15. 9. 2020]. Dostupné z: https://www.chemicool.com/definition/liquid_chromatography_lc.html

Do dogs shed with the change of the seasons? [Online]. *Pets Thenest: Jane Williams*. [cit. 22. 9. 2020]. Dostupné z: <https://pets.thenest.com/indoor-dogs-shed-11382.html>.

Dog breeds. [Online]. *American Kennel Club*. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.akc.org/dog-breeds/>

Dog fur facts. [Online]. *Dog.com*. [cit. 22. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.dog.com/content/dog-health/dog-fur-facts/>.

Dog's life. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.dogslife.cz/>

DogBeedInfo. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.dogbreedinfo.com/>

Dogster. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.dogster.com/dog-breeds/#B>

DogTime.com. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://dogtime.com/dog-breeds/profiles>

DYCE, Keith M.; SACK, Wolfgang O.; WENSING, Cornelis J. G. Textbook of veterinary anatomy-E-Book. *Elsevier Health Sciences*, 2009.

DYLEVSKÝ, Ivan. Funkční anatomie. 1. vyd. *Grada Publishing, a.s.*, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.

EISENBERG, David. The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003.

ELIÁŠOVÁ, Hana. Forezní trichologie. [Online]. [cit. 4. 9. 2020].

Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi6998/um/1FT_metody_2016.pdf.

ELKINS, Kelly M. Forensic DNA Biology: A laboratory manual. *Academic Press*, 2012.

Etologie psa. [Online]. *Cit.vfu.cz*, 2015. [cit. 10. 9. 2020]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/oz/IVA/etopes.htm>

EVANS, Howard E.; DE LAHUNTA, Alexander. Miller's anatomy of the dog-E-Book. *Elsevier Health Sciences*, 2013.

FARAG, Mayada R., *et al.* Forensic identification of some wild animal hair using light and scanning electron microscopy. *Advances in Animal Veterinary Sciences*, 2015.

FIALA, Pavel; VALENTA, Jiří; EBERLOVÁ, Lada. Stručná anatomie člověka. 1 vyd. *Karolinum*, 2015. ISBN 978-80-246-2693-2.

FLORIAN, Mary-Lou E. Protein facts: Fibrous proteins in cultural and natural history artifacts. *Archetype Publications*, 2007.

FRANTZ, Laurent A. F., *et al.* Animal domestication in the era of ancient genomics. *Nature Reviews Genetics*, 2020.

FRANTZ, Laurent A. F., *et al.* Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science*, 2016.

Fylogeneze savců. [Online]. *SAVCI upol.cz*, 30. 10. 2001. [cit. 4. 9. 2020]. Dostupné z: http://www.savci.upol.cz/teorie/fylogeneze_savci.htm.

GAISLER, Jiří. Zoologie obratlovců. 2. vyd. *Academia*, 2007. ISBN 978-80-200-1484-9.

GAISLER, Jiří; PELIKÁN, Jaroslav. Naši savci. 2. vyd. *Academia*, 1979. ISBN 21-003-78

Getting to the root of fur. [Online]. *National Geographic*, 10. 10. 2014. [cit. 5. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.nationalgeographic.com/science/phenomena/2014/10/10/getting-to-the-root-of-fur/>.

GRANDIN, Temple; DEESING, Mark J. Genetics and the behavior of domestic animals. *Academic press*, 2013.

Gray Wolf. [Online]. *NationalGeographic*. [cit. 30. 8. 2020]. Dostupné z: <https://www.nationalgeographic.com/animals/mammals/g/gray-wolf/>

Gray wolf. [Online]. *National Wildlife Federatiation*. [cit. 30. 8. 2020]. Dostupné z: <https://www.nwf.org/Educational-Resources/Wildlife-Guide/Mammals/Gray-Wolf>

GREENWOLD, Matthew J., *et al.* Dynamic evolution of the alpha (α) and beta (β) keratins has accompanied integument diversification and the adaptation of birds into novel lifestyles. *BMC Evolutionary Biology*, 2014.

Grey wolf. [Online]. *Britannica*. [cit. 30. 8. 2020]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/animal/gray-wolf>

GUNARATNAM, Parameswaran; WILKINSON, G. T. A study of normal hair growth in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 1983.

Hair analysis in forensic science. [Online]. *NewsMedical LifeSciences*, 21. 5. 2019. [cit. 14. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Hair-Analysis-in-Forensic-Science.aspx>

Hair coat and skin conditions in dogs. [Online]. *Pet Insurance*, 16. 10. 2019. [cit. 22. 9. 2020]. Dostupné z: <https://bowwowinsurance.com.au/pet-care/diseases-conditions/hair-coat-and-skin-conditions-in-dogs/>.

HAVLIŠ, Jan. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír*. [Online]. Praha: 5. 8. 1999. [cit. 10. 9. 2020]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-8/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof.html>.

HERMANN, Henry R. Dominance and aggression in humans and other animals: The great game of life. *Academic Press*, 2017.

Hill's. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.hillspet.com/>

HILLENKAMP, Franz; PETER-KATALINIC, Jasna. MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications. *John Wiley & Sons*, 2013.

HIRST, Krist. Dog history: how and why dogs were domesticated. [Online]. *ThoughtCo*, 25. 4. 2019. [cit. 3. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.thoughtco.com/how-and-why-dogs-were-domesticated-170656>

HOFFMANN, Edmond; STROOBANT Vincent. Mass spectrometry, principles and applications. *John Wiley & Sons*, 2007.

HOSSEINI, Samira; MARTINEZ-CHAPA, Sergio O. Fundamentals of drug delivery systems and application of MALDI-TOF-MS in drug delivery. *Fundamentals of MALDI-TOF-MS Analysis*. Springer, 2017.

HOUSECROFT, Catherine E.; SHARPE, Alan G. Anorganická chemie. *Vydavatelství VŠCHT*, 2014.

HUONG, Truong Thanh. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 2014.

CHAURAND, Pierre; LUETZENKIRCHEN, Frank; SPENGLER, Bernhard. Peptide and protein identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1999.

Importance to humans. [Online]. *Britannica*. [cit. 7. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/animal/canine/Importance-to-humans>

JELÍNEK, Jan; ZÍCHÁČEK, Vladimír. Biologie pro gymnázia. 1. vyd. *Nakladatelství Olomouc*, 2007. ISBN 978-80-7182-213-4.

JOLLIFFE, Ian T. Principal component analysis. *Technometrics*, 2003.

JOMBART, Thibaut; DEVILLARD, Sébastien; BALLOUX, François. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Medical Geneomics*, 2010.

KÁŠ, Jan; KODÍČEK, Milan; VALENTOVÁ, Olga. Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. Praha: *Vydavatelství VŠCHT*, 2006.

KEEL, M. Kevin; TERIO, Karen A.; MCALOOSE, Denise. Canidae, Ursidae, and Ailuridae. *Pathology of wildlife and zoo animals; Academic Press*, 2018.

KITANO, Takashi, *et al.* Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *International Journal of Legal Medicine*, 2007.

KODÍČEK, Milan, VALENTOVÁ, Olga, HYNEK, Radovan. Biochemie-chemický pohled na biologický svět. 2. vyd. *Vydavatelství VŠCHT*, 2018. ISBN 978-80-7592-013-3.

KODÍČEK, Milan. Biochemické pojmy: výkladový slovník. *Vydavatelství VŠCHT*, 2004.

KOOLMAN, Jan; RÖHM, Klaus-Heinrich. Barevný atlas biochemie. *Grada*, 2012.

KRÁLOVÁ, Blanka, *et al.* Bioanalytické metody. *Vydavatelství VŠCHT*, 2001.

LARSON, Greger; BRADLEY, Daniel G. How much is that in dog years? The advent of canine population genomics. *PLoS Genet*, 2014.

LARSON, Greger; BURGER, Joachim. A population genetics view of animal domestication. *Trends in Genetics*, 2013.

LEVER, Jake; KRZYWINSKI, Martin; ALTMAN, Naomi. Points of significance: Principal component analysis. *Natural Methods*, 2017.

Liquid Chromatography. [Online]. *Britannica*, [cit. 15. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/chromatography/Plate-height>

Liquid Chromatography. [Online]. *Chemistry LibreText*, 16. 8. 2020. [cit. 15. 9. 2020]. Dostupné z:

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography)

Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) information. [Online]. *ThermoFisher Scientific*. [cit. 13. 9. 2020]. Dostupné z:

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms-information.html>

LORD, Kathryn. A comparison of the sensory development of wolves (*Canis lupus lupus*) and Dogs (*Canis lupus familiaris*). *Ethology*, 2013.

MALDI-TOF MS. [Online]. *VŠCHT PRAHA: Atlas vad*. [cit. 8. 9. 2020]. Dostupné z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/maldi-tof-ms/>.

MARIACHER, Alessia, *et al.* A combined morphological and molecular approach for hair identification to comply with the European ban on dog and cat fur trade. *Peer Chemistry Journals*, 2019.

MARSHALL, Robert C.; ORWIN, Donald F. G.; GILLESPIE, Morton J. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. *Electron Microscopy Reviews*, 1991.

MCKITTRICK, Joanna, *et al.* The structure, functions, and mechanical properties of keratin. *Jom*, 2012.

MEHRKAM, Lindsay R.; WYNNE, Clive D. Behavioral differences among breeds of domestic dogs (*Canis lupus familiaris*): Current status of the science. *Applied Animal Behaviour Science*, 2014.

MECH, L. David. Wolf. *Doubleday*, 2012.

MIHOLOVÁ, Blanka; LIPSKÝ, Dušan. Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat: Středoškolská učebnice. *SZN*, 1999.

MILITKÝ, Jiří; MELOUN, Milan. Metoda hlavních komponent a exploratorní analýza vícerozměrných dat. *Sborník přednášek z konference: Zajištění kvality analytických výsledků*. 2003.

MILLS, Scott L., *et al.* Identifying lynx and other North American felids based on mtDNA analysis. *Conservation genetics*, 2000.

MUSIL, Rudolf. Vznik, vývoj a vymírání savců. 1. vyd. *Praha: Academia*, 1987. ISBN 80-6276-23-6.

NAKAMURA, Akira, *et al.* A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002.

NUMATA, Keiji; KAPLAN, Dave L. Biologically derived scaffolds. *Advanced Wound Repair Therapies*. Woodhead Publishing, 2011.

Opinion: We didn't domesticate dogs. They domesticated us. [Online]. *NationalGeography*, 3. 3. 2013. [cit. 3. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.nationalgeographic.com/news/2013/3/130302-dog-domestic-evolution-science-wolf-wolves-human/>

PACKARD, Jane M. Wolf behavior: reproductive, social, and intelligent. *Wolves: behavior, ecology, and conservation*, 2003.

Practical approach to dimensionality reduction using PCA, LDA and Kernel PCA. [Online]. *Analytics India Magazine*, 12. 4. 2020. [cit. 14. 9. 2020]. Dostupné z: <https://analyticsindiamag.com/practical-approach-to-dimensionality-reduction-using-pca-lda-and-kernel-pca/>

PADILLA, Luis R.; HILTON, Clayton D. Canidae. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Volume 8*, 457–467, 2015. [cit. 21. 8. 2020]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455773978000463>

PAGEL, Mark. What is the latest theory of why humans lost their body hair? Why are we the only hairless primate? [Online]. *Scientific American*, 2007. [cit. 19. 8. 2020]. Dostupné z: <https://www.scientificamerican.com/article/latest-theory-human-body-hair/>.

- PAOLELLA, Sara, *et al.* Identification and quantification of different species in animal fibres by LC/ESI-MS analysis of keratin-derived proteolytic peptides. *Journal of Mass Spectrometry*, 2013.
- PAPÁČEK, Miroslav, *et al.* Zoologie. 3. vyd. *Praha: Scientia*, 2000. ISBN 80-7183-203-0.
- PAULING, Linus; COREY, Robert B. The pleated sheet, A new layer configuration of polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1951.
- PCA vs LDA vs T-SNE – Let's understand the difference between them! [Online]. *Analytics Vidhya*. [cit. 14. 9. 2020]. Dostupné z: <https://medium.com/analytics-vidhya/pca-vs-lda-vs-t-sne-lets-understand-the-difference-between-them-22fa6b9be9d0>
- PetCentral. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://petcentral.chewy.com/>
- PETERSON, Rolf O. The wolf as a carnivore. *Wolves: behavior, ecology and conservation*, 2003.
- PETERSON, Rolf O.; WOOLINGTON, James D.; BAILEY, Theodore N. Wolves of the Kenai Peninsula, Alaska. *Wildlife Monographs*, 1984.
- Petfinder. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.petfinder.com/>
- Pigments for animals and plants. [Online]. *Causes of color*. [cit. 3. 9. 2020]. Dostupné z: <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/7.html>.
- PITT, James J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2009.
- Proč je srst evoluční záhadou? Why mammal body hair is an evolutionary Enigma? [Online]. [cit. 20. 8. 2020]. Dostupné z: <http://kreacionismus.cz/memento/spzo20.html>.
- PUSCH, Wolfgang, *et al.* Mass spektrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics*, 2003, 4.4: 463-476.
- RASCHKA, Sebastian. Linear discriminant analysis. [Online], 3. 8. 2014. [cit. 14. 9. 2020]. Dostupné z: https://sebastianraschka.com/Articles/2014_python_lda.html
- REECE, William. O. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. 2. vyd. *Praha: Grada Publishing, a.s.*, 2010. ISBN 978-80-247-3282-4.

- REICHHOLF, Josef. Savci – průvodci přírodou. 1. vyd. *Praha: Ikar*, 1996. ISBN 80-85944-37-5.
- RILEY, Patrick A. Melanin. *The international journal of biochemistry & cell biology. Elsevier Health Sciences*, 1997.
- RINGNÉR, Markus. What is principal component analysis? *Nature Biotechnology*, 2008.
- ROESSNER, Ute, *et al.* Metabolomics – the combination of analytical biochemistry, biology, and informatics. *Academic Press*, 2011.
- SANSINENEA, Estibaliz; ORTIZ, Aurelio. Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Biotechnology Letters*, 2015.
- SATO, Itaru, *et al.* Forensic hair analysis to identify animal species on a case of pet animal abuse. *International Journal of Legal Medicine*, 2010.
- Savci (Mammalia). [Online]. *Zoologie pro veterinární mediky*. [cit. 19. 8. 2020]. Dostupné z: <http://www.zoologie.frasma.cz/mmp%200309%20savci/savci.html>.
- SAWYER, Roger H., *et al.* Developing antibodies to synthetic peptides based on comparative DNA sequencing of multigene families. *Methods in enzymology. Academic Press*, 2005.
- SHAH, Haroun N.; GHARBIA, Saheer E.; WILEY, John. MALDI-TOF and tandem MS for clinical microbiology. *John Wiley & Sons, Incorporated*, 2017.
- SCHEFFEL, Richard L., *et al.* ABC Přírody. 1. vyd. *Reader's Diget Výběr s.r.o.*, 1996. ISBN 80-902069-0-5.
- SLENO, Lekha; VOLMER, Dietrich A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2004.
- SMITH, John B. Peptide sequencing by Edman degradation. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001.
- SOLANO, Francisco. Melanins: Skin pigments and much more – types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 2014.
- SOLAZZO, Caroline. Follow-up on the characterization of peptidic markers in hair and fur for the identification of common North American species. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2017.

Structure and function of the skin and hair coat in dogs. [Online]. *Pet Place: Virginia Wells*, 3. 8. 2015. [cit. 22. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.petplace.com/article/dogs/pet-health/structure-and-function-of-the-skin-and-hair-coat-in-dogs/>.

SVRŠEK, Jiří. Evoluce savců I. [Online]. *Natura plus*, 1998. [cit. 20. 8. 2020]. Dostupné z: <http://natura.baf.cz/natura/1998/1/9801-9.html>.

SWITZAR, Linda; GIERA, Martin; NIESSEN, Wilfried M. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of Proteome Research*, 2013.

ŠTEFAN, Jiří; HLADÍK, Jiří. Soudní lékařství a jeho moderní trendy. 1. vyd. *Praha: Grada Publishing, a. s.*, 2012. ISBN 978-80-247-3594-8.

ŠUMBERA, Radim. Savci. Vyřešeno? *Vesmír*. [Online]. Praha: 5. 6. 2002. [cit. 21. 8. 2020]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2002/cislo-6/savci-vyreseno.html>.

TANG, Minfeng, *et al.* A real-time PCR method for quantifying mixed cashmere and wool based on hair mitochondrial DNA. *Textile Research Journal*, 2014.

TASAKI, Ken. A novel thermal hydrolysis process for extraction of keratin from hog hair for commercial applications. *Waste Management*, 2020.

TASAKI, Ken; KANEOKA, Lance. Process to extract and recover keratin and keratin associated protein from animal body parts. *U.S. Patent Application*, 2019.

The diversity of mammalian pelage. [Online]. [cit. 1. 9. 2020]. Dostupné z: https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/13158/1/70%281%29_p9-17.pdf.

The study of hair. [Online]. *NationalGeography*. [cit. 14. 9. 2020]. Dostupné z: https://ngl.cengage.com/assets/downloads/forsci_pro0000000541/4827_fun_ch3.pdf

The real Jack Russell. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.therealjackrussell.com/advice/coat.php>

THIEDE, Bernd, *et al.* Peptide mass fingerprinting. *Methods*, 2005.

TONETTI, Christopher., *et al.* Proteomic method for determination of animal hair fibres. *Advances in Fibre Production Science in South American Camelids and other Fibre Animals*, 2019.

TRIDICO, Silvana R. Examination, analysis, and application of hair in forensic science-animal hair. *Forensic Science Review*, 2005.

TRIDICO, Silvana R., *et al.* Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls. *Forensic Science International*, 2014.

UL-HAMID, Anwar. A beginners' guide to scanning electron microscopy. *Springer International Publishing*, 2018.

UniProt. [Online]. [cit. 10. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/>

VAŇKOVÁ, Hana. Peptidové mapy. *Chemické Listy*, 1999.

VECCHI, Malgorzata M.; XIAO, Yongsheng; WEN, Dingyi. Identification and sequencing of N-terminal peptides in proteins by LC-Fluorescence-MS/MS: An approach to replacement of the Edman degradation. *Analytical Chemistry*, 2019.

VetStreet. [Online]. [cit. 16. 9. 2020]. Dostupné z: <http://www.vetstreet.com/>

VINEIS, Claudia, *et al.* Validation of UPLC/ESI-MS method used for the identification and quantification of wool, cashmere and yak fibres. *The Journal of The Textile Institute*, 2017.

Vznik a vývoj psa. [Online]. *Chov zvířat*, 22. 2. 2007. [cit. 9. 9. 2020]. Dostupné z: <http://www.chovzvirat.cz/clanek/181-vznik-a-vyvoj-psa/>

WADE, Nicholas. *Why humans and their fur parted ways*. [Online]. The New York Times, 2003. [cit. 22. 9. 2020]. Dostupné z: <https://www.nytimes.com/2003/08/19/science/why-humans-and-their-fur-parted-ways.html>.

WALDRON, Harry A. Occupational health practice. *Butterworth-Heinemann*, 2013.

WANG, Bin, *et al.* Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 2016, 76: 229-318.

WEST, Trace. Can proteins improve skin and coat condition? [Online]. *Veterinary practice*, 4. 10. 2018. [cit. 22. 9. 2020]. Dostupné z: <https://veterinary-practice.com/article/can-proteins-improve-skin-and-coat-condition>.

WHEWELL, C.S. The chemistry of hair. *The Official Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1961.

WolfWorlds. [Online]. [cit. 25. 8. 2020]. Dostupné z: <https://www.wolfworlds.com/>

Wolves. [Online]. *AnimalCorner*. [cit. 10. 9. 2020]. Dostupné z: <https://animalcorner.org/animals/wolves/>

Your dog's coat: health, hot spots, shedding, issues. [Online]. *Dogtime.com*. [cit. 22. 9. 2020]. Dostupné z: <https://dogtime.com/dog-health/general/407-coat>.

ZAFARINA, Zainuddin; PANNEERCHELVAM, Sundararajulu. Analysis of hair samples using microscopical and molecular techniques to ascertain claims of rare animal species. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 2009.

ZEDER, Melinda. Domestikace zvířat. *Journal of Antropological Research*, 2012.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	Acetonitril
API	Atmospheric Pressure Ionization
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiothreiol
ESI	Electrospray Ionization
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LDA	Linear Discriminant Analysis
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight
MIAH	Morphological Identification of Animal Hair
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFS	Peptide Sequence Fragmentation
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
RLFP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SEM	Scanning Electron Microscope
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STR	Short Tandem Repeat
TEM	Transmission Electron Microscope
TFA	Trifluorooctová kyselina
THP	Thermal Hydrolysis
UPLC/ESI-MS	Ultra Performance Liquid Chromatography

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Jednotlivé fáze cyklu růstu chlupu (Dyce et al., 2009). A – anagenní fáze, B – začínající katagenní fáze, C – pozdní katagenní fáze, D – telogenní fáze, E – začínající anagenní fáze.</i>	<i>7</i>
<i>Obr. 2. Průřez kůží s vnější stavbou chlupu (Reece, 2010).</i>	<i>9</i>
<i>Obr. 3. Typy chlupů tvořící srst – podsada (vlníky a osiníky) a pesíky (Gaisler, 2007).</i>	<i>10</i>
<i>Obr. 4. Struktura α-helixu (Wang et al., 2016).</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 5. Přeměna šroubovice alfa-keratinu v intermediárním filamentu (Wang et al., 2016).</i>	<i>12</i>
<i>Obr. 6. Struktura eumelaninu a pheomelaninu (Sansinenea et al., 2015).</i>	<i>14</i>
<i>Obr. 7. Vývoj postnatálního vlasového folikulu psa (Dyce et al., 2009). A – jednoduchý folikul přítomný týden po narození; B – komplexní vlasový folikul (12 týdnů po narození); C – složitější folikul (28 týdnů po narození). 1 – primární vlasový folikul; 2 – mazová žláza; 3 – kanál sladké žlázy; 4 – sekundární vlasový folikul; 5 – vzpřimovač chlupu.</i>	<i>21</i>
<i>Obr. 8. Obnovení srsti po zastřížení ročního psa (Evans a Lanhuta, 2013, upraveno).</i>	<i>23</i>
<i>Obr. 9. Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF (Hoffmann a Stroobant, 2007, upraveno).</i>	<i>31</i>
<i>Obr. 10. Schéma dvou typů peptidového mapování (Laboratorní techniky biochemie; VŠCHT, 2006, upraveno).</i>	<i>35</i>
<i>Obr. 11. Průletový analyzátor TOF/TOF (Push et al., 2003, upraveno).</i>	<i>36</i>
<i>Obr. 12. Kapalínový chromatograf (www.hgb.vsb.cz).</i>	<i>37</i>
<i>Obr. 13. Rozdíl mezi PCA a LDA (Raschka, 2014).</i>	<i>43</i>
<i>Obr. 14. Celkový náhled na porovnání všech analyzovaných plemen – border kolie, boxer, čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík hrubosrstý, jezevčík krátkosrstý, jorkširský teriér, mops, německý ovčák, pudl, zlatý retrívr, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký a vlka.</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 15. Vyhodnocení rozlišitelnosti všech plemen – border kolie, boxer, čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík hrubosrstý,</i>	

<i>jezevčík krátkosrstý, jorkširský teriér, mops, německý ovčák, pudl, zlatý retrívr, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký.</i>	52
<i>Obr. 16. Porovnání rozlišitelnosti chrta dlouhosrstého, zlatého retrívra a pudla.</i>	52
<i>Obr. 17. Rozlišení plemen dle jejich velikosti těla – boxer, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, německý ovčák, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký pes, zlatý retrívr.</i>	53
<i>Obr. 18. Výsledky rozlišitelnosti border kolie, jezevčíka dlouhosrstého, jezevčíka hrubosrstého, jezevčíka krátkosrstého a pudla.</i>	54
<i>Obr. 19. Rozlišení malých plemen – čivava, francouzský buldoček, Jack Russell teriér, jorkširský teriér, mops.</i>	55
<i>Obr. 20. Rozlišení čivavy, Jack Russell teriéra, francouzského buldočka a mopse.</i>	55
<i>Obr. 21. Rozlišení mezi dvěma plemeny – čivavou a mopsem.</i>	56
<i>Obr. 22. Rozlišení mezi typy jezevčků – jezevčkem dlouhosrstým, jezevčkem hrubosrstým a jezevčkem krátkosrstým.</i>	57
<i>Obr. 23. Rozlišení mezi jezevčkem krátkosrstým a jezevčkem hrubosrstým.</i>	58
<i>Obr. 24. Rozlišení mezi jezevčkem dlouhosrstým a jezevčkem hrubosrstým.</i>	58
<i>Obr. 25. Rozlišení plemen různé velikosti – čivava, jorkširský teriér, mops, německý ovčák, stafordširský bulteriér, zlatý retrívr.</i>	59
<i>Obr. 26. Rozlišení velkých, středně velkých a malých plemen – border kolie, boxer, jezevčík hrubosrstý, jezevčík krátkosrstý, pudl a středoasijský pastevecký pes.</i>	60
<i>Obr. 27. Rozlišení psích plemen na základě délky jejich srsti. Plemena s dlouhou srstí – border kolie, chrt dlouhosrstý, jezevčík dlouhosrstý a zlatý retrívr.</i>	61
<i>Obrázek 28. Rozlišení border kolie, jezevčíka dlouhosrstého a zlatého retrívra.</i>	62
<i>Obr. 29. Rozlišení mezi chrtem dlouhosrstým a zlatým retrívrem.</i>	62
<i>Obr. 30. Rozlišení psích plemen se středně dlouhou srstí – jorkširského teriéra, německého ovčáka, pudla a středoasijského pasteveckého psa.</i>	63
<i>Obr. 31. Rozlišení mezi psími plemeny s krátkou srstí – boxer, čivava, francouzský buldoček, chrt krátkosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík krátkosrstý, jezevčík hrubosrstý, mops, stafordširský bulteriér a středoasijský pastevecký pes.</i>	64

<i>Obr. 32. Rozlišení psích plemen s krátkou srstí – francouzského buldočka, chrt krátkosrstého, jezevčíka hrubosrstého, mopse a středoasijského pasteveckého psa.</i>	64
<i>Obr. 33. Rozlišení psích plemen s krátkou srstí – boxer, čivava, jezevčík krátkosrstý, Jack Russell teriér a stafordširský bulteriér.</i>	65
<i>Obr. 34. Rozlišení psích plemen s jemnou srstí – čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russell teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík krátkosrstý, mops, stafordširský bulteriér, zlatý retrívr.</i>	66
<i>Obr. 35. Rozlišení plemen psů s hrubou srstí – boxera, border kolie, jezevčíka hrubosrstého, německého ovčáka a středoasijského pasteveckého psa.</i>	67
<i>Obr. 36. Rozlišení psích plemen s hrubou srstí v kombinaci s plemeny se srstí kadeřavou a hedvábnou – border kolie, boxer, jezevčík hrubosrstý, jorkširský teriér, německý ovčák, pudl a středoasijský pastevecký pes.</i>	68
<i>Obr. 37. Rozlišení mezi pudlem a středoasijským pasteveckým psem.</i>	69
<i>Obr. 38. Hmotnostní spektrum dvou vybraných analyzovaných vzorků srsti čivavy různého věku.</i>	71
<i>Obr. 39. Hmotnostní spektrum srsti dvou vybraných analyzovaných vzorků srsti chrt krátkosrstého různého věku.</i>	72
<i>Obr. 40. Hmotnostní spektrum srsti dvou vybraných analyzovaných vzorků srsti mopse různého věku.</i>	73
<i>Obr. 41. Rozlišení srsti všech zkoumaných plemen včetně srsti vlka – border kolie, boxer, čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russel teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík hrubosrstý, jezevčík krátkosrstý, jorkširský teriér, mops, německý ovčák, pudl, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký pes, vlk, zlatý retrívr.</i>	74
<i>Obr. 42. Rozlišení srsti všech zkoumaných plemen včetně srsti vlka na základě věku – border kolie, boxer, čivava, francouzský buldoček, chrt dlouhosrstý, chrt krátkosrstý, Jack Russel teriér, jezevčík dlouhosrstý, jezevčík hrubosrstý, jezevčík krátkosrstý, jorkširský teriér, mops, německý ovčák, pudl, stafordširský bulteriér, středoasijský pastevecký pes, vlk, zlatý retrívr.</i>	75

9 SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Seznam analyzovaných plemen a věk jednotlivých zástupců.</i>	46
<i>Tab. 2. Rozlišení jednotlivých plemen mezi sebou. ✘ – značí nemožnost rozlišení daných plemen, ✓ – značí rozlišení mezi danými plemeny.</i>	70
<i>Tab. 3. Přehled nejčastěji identifikovaných proteinů vyskytující se v psí srsti. Šedě označené proteiny s dohledanou souvislostí se psí srstí jsou popsány níže.</i>	76