



Norges veterinærhøgskole

Mutasjonsfrekvensen i Multidrug resistance 1 (MDR1)-genet hos collie i Norge

The prevalence of mutation within Multidrug Resistance 1 (MDR1) Gene in the Norwegian Collie population

Josefin Hultman, Linda Nordin, Evalinn Pedersen
Kull 2008

Fordypningsoppgave
Smådyrmedisin

Veiledere Lars Moe, Christine Grøndahl, Kristin Prestrud

Institutt for sports- og familiedyrmedisin
Seksjon for smådyrsykdommer

Oslo, november 2013



Innhold

Forord	4
Sammendrag	4
Innledning	5
MDR1-genet og dannelsen av P-glykoprotein	6
Mutasjonen i MDR1-genet	8
Bivirkninger ved svikt i barrierene	9
Medikamenter	12
P-glykoproteinsubstrater	13
Makrosykliske laktoner (ML)	13
Kortisol	14
Kjemoterapeutika og antimikrobielle agens	14
Øvrige P-glykoproteinsubstrater	15
P-glykoproteininhibitorer	15
Onkologi og MDR1-genet	16
P-glykoprotein hos andre arter, med hest som eksempel	17
Organer med P-glykoprotein hos hest	17
Kliniske tilfeller som omhandler overdose hos hest	17
Materiale og metoder	18
Materiale	18
Litteraturmateriale	18
Genetisk materiale	19
Metode	20
Statistiske metoder	21
Resultater	22

Diskusjon.....	24
Feilkilder	26
Utvalg.....	26
Antall.....	28
Analysemetoden.....	28
Gyldighet utenfor studiepopulasjonen	28
MDR1-mutasjonen og avl.....	29
Veterinærens rolle	30
Konklusjon	30
Takk til bidragsytere	31
Summary	31
Referanser	32
Vedlegg	44
1. Utlisting av databasen	44
2. Medforfattererklæring.....	44

Forord

Vi har hørt om ivermektinsensitivitet hos collie under veterinærutdanningen. Siden vi ikke har funnet studier gjort i Norge innen området, syntes vi det var et godt tema på fordypningsoppgaven. Dessuten har forskning fra andre land vist en relativt høy frekvens av mutasjonen i Multidrug resistance 1 (MDR1)-genet, som er årsaken til overfølsomheten. Dette var enda en grunn til at vi ønsket å se hvor aktuell mutasjonen var i Norge. I tillegg ønsket vi å informere veterinærer om sensitiviteten hos collie. Med utgangspunkt i fordypningsoppgaven ønsket vi derfor å skrive en artikkel som kunne publiseres i et tidsskrift for veterinærer, som for eksempel Norsk veterinærtidsskrift (NVT).

Sammendrag

Tittel: Mutasjonsfrekvensen i Multidrug resistance 1 (MDR1)-genet hos collie i Norge

Forfattere: Josefin Hultman, Linda Nordin, Evalinn Pedersen

Veiledere: Lars Moe, Christine Grøndahl, Kristin Prestrud

Formål: Hensikten med dette studiet var å anslå forekomsten av Multidrug resistance 1 (MDR1) mutasjonen hos collie i Norge. Dessuten var formålet å informere veterinærer om MDR1-genets funksjon og sensitiviteten hos collie for enkelte legemidler.

Design: Tverrsnittstudie.

Materiale og metode: Blodprøver ble samlet inn i 2006 til 2012 fra 63 langhårede collier for analyse av MDR1-genotyping.

Resultat: MDR1-mutasjonen fantes hos 54 av 63 collier. 28 av hundene var homozygote for mutasjonen, 26 av hundene var heterozygote, og 9 var wildtype.

Konklusjon og klinisk relevans: Forekomsten av MDR1-mutasjonen hos norsk collie er høy. Veterinærer bør derfor ved administrering av P-glykoproteinsubstrater (P-gp), som for eksempel ivermektin, ha kjennskap til bivirkninger som kan oppstå og eventuelt håndtering av disse.

Innledning

I 1983 fant Preston og Seward en korrelasjon mellom ivermektinsensitivitet og collie. Dette var første gang sammenhengen ble gitt oppmerksomhet (1,2). Noen år senere ble det utført en studie der det ble observert nevrologiske symptomer hos enkelte collier som fikk ivermektinbehandling (3) og Mealey fikk et stort gjennombrudd innen dette området i 2001. Da beskrev hun en delesjonsmutasjon i Multi Drug Resistance 1 (MDR1) genet (4) på kromosom 14 (5) hos ivermektinsensitive collier (4). Et nyere navn på dette genet er ATP-Binding Casette sub family B member 1 eller ABCB1 (6), men i denne oppgaven kommer MDR1-benevnelsen til å bli benyttet.

MDR1-genet koder for P-glykoprotein (P-gp), en transmembran proteinpumpe (7), som uttrykkes i blant annet endotelceller i hjernens kapillærer (8), i tarmen (9), gallegangsceller (10), nyrer (11), placenta (12) og testikler (13). Proteinpumpens funksjon er å føre xenobiotika fra det intracellulære til det ekstracellulære rom (14).

Ved en mutasjon i MDR1-genet øker den perorale absorpsjonen av medikamenter (15) som binder til P-gp. Bivirkninger som kan oppstå ved administrering av slike P-gp substrater omfatter sentralnervøse (CNS) symptomer som for eksempel ataksi, letargi, blindhet, kramper og koma (16). Hos mutasjonspasienter kan det derfor bli aktuelt med individuell medisinerings av P-gp substrater, slik at valg av legemiddel og dose tilpasses hver enkelt collie, avhengig av genotypen.

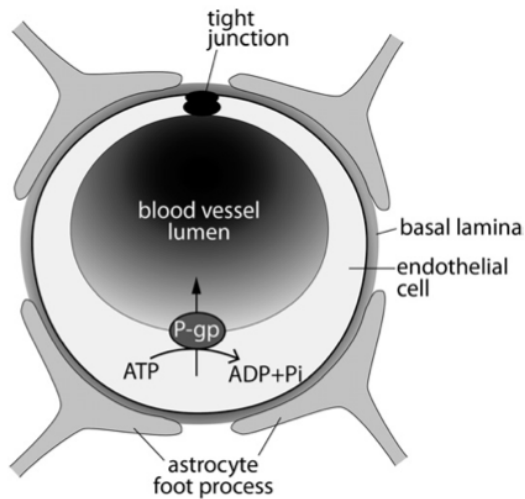
Mutasjonen i MDR1-genet er sett hos flere gjeterhundraser (17), som for eksempel shetland sheepdog, old english sheepdog, australian shepherd (18) og border collie (5), men ifølge andre studier er det collie som har høyest mutasjonsfrekvens (19). Det var størst sannsynlighet for å oppdage mutasjonen hos collierasen. Vårt mål var å undersøke MDR1-mutasjonsforekomsten hos hund i Norge og på bakgrunn av de publiserte resultatene valgte vi å studere collie. I tillegg ønsket vi å få mer kunnskap innen området og formidle den til andre veterinærer og dyreeiere.

MDR1-genet og dannelsen av P-glykoprotein

I 1976 ble det for første gang beskrevet et glykoprotein i kolchicin resistente eggceller fra kinesiske hamstre. Proteinene som fikk navnet P-glykoprotein (P-gp) var inkorporert i eggcellenes plasmamembran, og cellene viste en signifikant korrelasjon mellom kolchicin resistens og mengde av P-gp. Dette var ifølge forfatterne Juliano og Ling første gang det ble bevist en sammenheng mellom P-gp og medikamentell resistens (20).

Senere, på 1980-tallet, ble genet som koder for P-gp identifisert. Siden genet overuttrykkes i multidrug resistente tumorceller, ble det kalt for Multi Drug Resistance 1 (MDR1) gen (7). Et annet nyere navn på dette genet som også brukes synonymt i litteraturen er ABCB1 (6). Navnet skyldes at genet tilhører ATP-Binding Cassette (ABC) superfamilie, som er blant de største proteinfamiliene hos alle arter. Genene på denne kassetten koder for transportproteiner, som for eksempel Multidrug Resistance associated Protein (MRP) og Breast Cancer Resistant Protein (BCRP) (21). Både MRP og BCRP er involvert i multidrug resistens i likhet med P-gp, men de virker også delvis på andre substrater enn P-gp substrater. Enkelte substrater kan i tillegg være målgruppe for mer enn en type transportprotein (22,23).

Mus har tre ulike gener som koder for P-gp: MDR1, MDR2 og MDR3 (24). Dette kan sammenliknes med hund og menneske som har to MDR-gener (25). Disse genene er MDR1 og MDR3, der den sistnevnte også har navnet MDR2 i litteraturen. Selv om hund har to MDR-gener, er det i dag bare MDR1 som ser ut til å ha multidrug resistente egenskaper (26). Derfor er det inntil videre MDR1-genet hos hund som er av størst interesse. Dette genet ligger på kromosom 14 og består av 27 eksoner (5). Det varierer mellom artene hvilket kromosom MDR-genene ligger på, men det kan nevnes at de hos menneske ligger på kromosom 7, hos mus kromosom 5, hos sau kromosom 4 og hos hamster kromosom 1 (25).



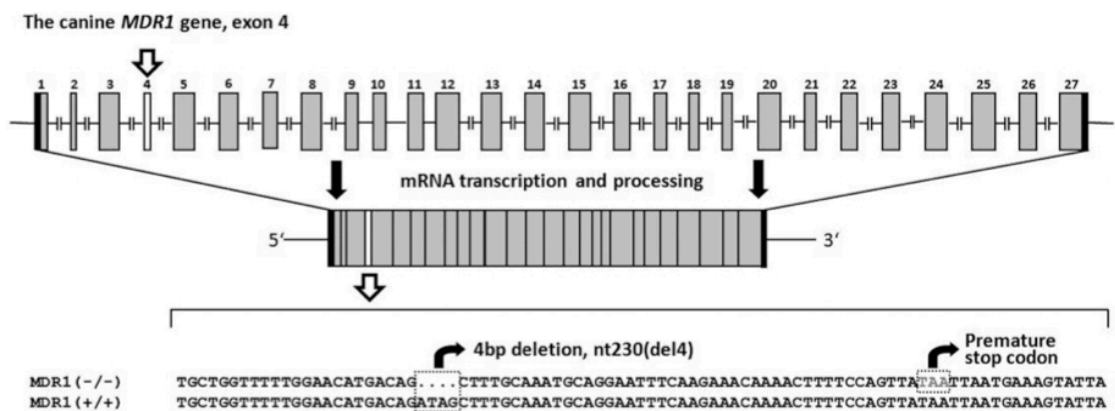
Figur 1. P-glykoprotein er en ATP-drevet transportør som forflytter intracellulære P-gp substrater til ekstracellulært rom. Figuren viser den transmembrane pumpens plassering i blod-hjernebarrieren (BBB). Figuren er direkte hentet fra: Merola V. M.; Eubig P.A. 2012, Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocylic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats, *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*; 42: 2, 313-333.

ABC-genene, som koder for flere transportproteiner, finnes både hos eukaryote og prokaryote organismer (27). Prokaryote organismer bruker disse proteinene til å transportere substanser, som for eksempel sukker, inn i cellene. Eukaryote organismer, derimot, bruker proteinene til å blant annet forflytte xenobiotika ut av cellene (21). Et av de viktigste transportproteinene hos eukaryote er P-gp. Funksjonen til P-gp, foruten å flytte xenobiotika ut av cellene, er delvis ukjent. Derfor er det uvisst om proteinet også flytter endogene substanser (28). Videre finnes P-gp i organer som er involvert i ekskresjon eller sekresjon. Her er P-gp viktig for å forhindre en oppkonsentrasjon av legemidler i cellene. Dette gjør P-gp ved aktivt å pumpe xenobiotika ut av cellene (se Figur 1) (29). P-gp finnes mellom blod og vev i flere organer, og bidrar til barrieren mot potensielt farlige stoffer for organismen (30,31). P-gp er derfor viktig for sikkerhet og effektivitet av medikamenter, siden de er involvert i absorpsjon og distribusjon i kroppen (10).

Det er stor likhet mellom DNA-sekvensene som koder for P-gp hos ulike arter. Det indikerer at sekvensene er relativt godt evolusjonert konserverte, men det finnes visse forskjeller og de er plassert i proteinets N-terminale region (32).

Mutasjonen i MDR1-genet

Toksisiteten med ivermektin har lenge vært kjent hos collierasen (1,2). I 2001 fant forskere en frameshift delesjonsmutasjon i MDR1-genet som er årsaken til ivermektinoverfølsomheten. MDR1-mutasjonen er autosomal recessiv (33) og selve delesjonen består av 4 basepar (se Figur 2). Delesjonen gir et for tidlig stoppkodon og dermed avsluttes syntesen av proteinet for tidlig, slik at det dannes dysfunksjonelle P-gp. Individuer som er homozygote for mutasjonen i MDR1-genet, mangler derfor funksjonelle P-gp (4) og heterozygote individer har færre funksjonelle P-gp enn wildtype individer (6).



Figur 2. Illustrasjonen viser delesjonsmutasjonen i MDR1-genet i ekson 4 som gir et for tidlig stoppkodon. Figuren er direkte hentet fra: Geyer,J.; Janko,C., 2012, Primary Treatment of MDR1 Mutant Dogs with Macroyclic Lactones, Curr.Pharm.Biotechnol., 13, 6, 969-986.

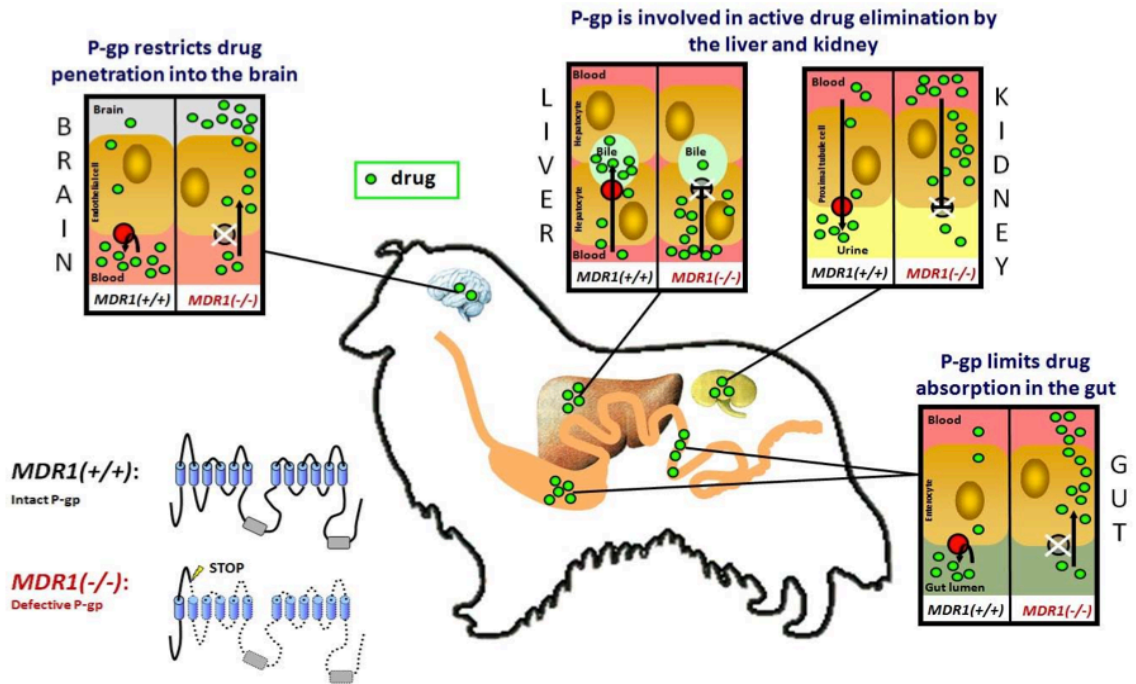
Hos individer som har mutasjonen, absorberes xenobiotika som også er P-gp substrater i større grad over tarmen og skilles i mindre grad ut via nyrer og galle. Dessuten kan P-gp substrater penetrere blod-hjernebarrieren og oppkonsentreres i hjernen hos collier med dysfunksjonelle P-gp. I en studie gjort på mus som var homozygote for MDR1-mutasjonen, har man sett at det kan utvikles nevrotoksisitet (34). Det har også blitt observert toksisk gastritt og myelosuppresssjon hos homozygote collier som ble behandlet med et P-gp substrat (35). Videre er det også sett en påvirkning av hypothalamus-hypofyse-binyre (HPA) aksens hos collie (36). MDR1-genets produkt, P-gp, har derfor vist seg til å ha en stor betydning for individets beskyttelse mot xenobiotika og naturlige xenotoksiner (34).

Undersøkelser har vist at det finnes en allelforbindelse i MDR1-genet mellom gjeterhunder og enkelte mynderaser. Mutasjonen i MDR1-genet er funnet på et lokus som er felles for alle rasene. Dette tyder på at enkelte mynderaser og gjeterhunder deler en felles stamfar som var opprinnelsen til MDR1-mutasjonen, og at mutasjonen derfor har skjedd en gang (18). Årsaken til MDR1-mutasjonens opprinnelse er fortsatt ukjent, men man tror den kan skyldes en palindromsekvens som gir ustabilitet i genet (4,37), siden en palindromsekvens er funnet i nærheten av delesjonsområdet (4). Mutasjonen i MDR1-genet er også sett hos andre gjeterhundsraser som shetland sheepdog, old english sheepdog, australian shepherd (18), border collie (5), hvit gjeterhund, schæfer samt enkelte mynderaser som for eksempel langhåret whippet (17).

Mutasjonen i MDR1-genet har en stor betydning for behandling av dyr i veterinærmedisin. Mange substanser som brukes ved behandling av hund er P-gp substrater, og det er derfor viktig å kartlegge om individet er hetero- eller homozygot for MDR1-mutasjonen. Dette bør påvirker valg av behandling, samt dosering. For å bestemme hundens genotype, kan veterinæren ta DNA-materiale fra hunden ved en blodprøve (38) eller svaberprøve fra munnslimhinnen (39) og sende disse til et laboratorium for genanalyse.

Bivirkninger ved svikt i barrierene

Collie med MDR1-mutasjonen er klinisk friske. De vanlige serum biokjemi og andre fysiologiske parametre er normale, men kliniske symptomer kan oppstå etter administrering av P-gp substrater (34). Mutasjonen kan påvirke absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon av P-gp substrater, avhengig av hvilket legemiddel som blir brukt (14). P-gp uttrykkes i ulike organer som nevnt på side 5 (se Figur 3) (8-13).



Figur 3. P-glykoproteinets lokalisering i ulike organ hos collie. Figuren er direkte hentet fra: Geyer, J.; Janko, C., 2012, Primary Treatment of MDR1 Mutant Dogs with Macrocylic Lactones, *Curr.Pharm.Biotechnol*, 13, 6, 969-986.

Hjernen er anatomisk adskilt fra det sirkulerende blodet gjennom blod-hjernebarrieren (BBB). Endotelceller i hjernens kapillærer er poreløse og sitter tett sammen med tight-junctions, slik at legemidler har vanskelig for å penetrere. Lipofile substanser kan likevel passere cellemembranen gjennom passiv diffusjon (40). Passasjen av lipofile molekyler til det sentrale nervesystemet forhindres av P-gp (41). En defekt i P-gp vil derfor øke konsentrasjonen av P-gp substrater i hjernen (42). Hundene kan da utvikle alvorlig neurologisk toksisitet (43) og det kan oppstå kliniske symptomer som hypersalivering, mydriasis, desorientering, ataksi, CNS depresjon, og blindhet (3,4,44-46). Ved neurologisk undersøkelse kan man se tetraparese, nedsatt proprioepsjon (47), fraværende dazzlerefleks og fraværende direkte og indirekte pupillrefleks (48). Ved progredierende forløp eller høyere legemiddeldose er det observert padlebevegelser, oppkast, hyperventilering, bradykardi, tremor, letargi, anfall, koma og død (4,49-51).

Økt penetrasjon av P-gp substrater til hjernen er sannsynligvis den mest relevante kliniske konsekvensen av MDR1-mutasjonen, da det som tidligere nevnt kan gi nevrotoksiske bivirkninger (34). P-gp uttrykkes også i endotelet andre steder i kroppen, som blod-testis barrieren (13) og placenta (12). En mutasjon kan derfor potensielt utgjøre en risiko for testiklene og fosteret ved eksponering av toksiske substanser hos morddyret (8). I placenta finnes P-gp i syncytiotropoblast plasmamembran, og her

pumper den xenobiotika som gis under drektigheten tilbake til morens sirkulasjon (52). Enkelte legemidler, som for eksempel makrosykliske laktoner, kan gi misdannelser hos fosteret dersom fosteret mangler funksjonelle P-gp. Dette er vist i forsøk gjort på mus, der 100% av fostrene som var homozygote for MDR1-mutasjonen hadde misdannelser i form av ganespalte. 30 % av de heterozygote fostrene og ingen av de mutasjonsfrie fostrene hadde ganespalte (12).

En mutasjon i MDR1-genet vil også føre til økt peroral biotilgjengelighet av P-gp substrater (53). Absorpsjonen av xenobiotika i tarmen vil øke om P-gp er ufunksjonelle, og eliminasjon gjennom lever og nyrer vil reduseres (54-56). P-gp uttrykkes på apikal side av tarmepitelceller (9), i canikulær membran av hepatocytter i leveren (10) og i luminær membran av epitelceller i proksimale nyretubuli (11). Cytokrom P450 3A (CYP 3A) samvirker med P-gp i tarmens enterocytter for å forhindre peroral absorpsjon av legemidler. CYP 3A metaboliserer legemidler inne i enterocytten, mens P-gp pumper legemidler tilbake til tarmlumen. Legemidler kan da igjen diffundere inn i enterocytten og på denne måten eksponeres for CYP 3A ved sykluser flere ganger, eller skilles ut av kroppen med feces (14). Om hunden har ufunksjonelt P-gp, vil derfor den perorale biotilgjengeligheten av P-gp substrater øke (53,57). Når legemidlet er tatt opp over tarmen og kommet over i blodsirkulasjonen, fremmer P-gp ekskresjon av legemidlet i galle (58) og urin (59). Dersom individet har en MDR1-mutasjon og produserer defekte P-gp, vil derfor elimineringen av P-gp substrater reduseres (56).

Hos mennesker er MDR1-polymorfisme assosiert med økt risiko for å utvikle ulike sykdommer, som for eksempel renalt karsinom (60) og ulcerativ kolitt (61). Det spekuleres om ulcerativ kolitt skyldes en inflammatorisk eller toksisk komponent syntetisert av intestinale bakterier. Komponenten kan da fungere som P-gp substrat og dermed få innpass i enterocytten om P-gp er ufunksjonelt (14,60). Hos MDR1-homozygote mus med *Helicobacter bilis* infeksjon er det også sett diaré, vekttap og inflammatory bowel disease (IBD). Om hunder med MDR1-mutasjonen har lettere for å utvikle IBD enn andre hunder, vil eventuelt videre kliniske studier vise (62).

Behandling

Varigheten av de kliniske symptomene som kan oppstå ved administrering av ivermektin er avhengig av dose og halveringstid. Ivermektintoksisitet kan vare fra dager til uker (16). Hunden kan trenge langvarig hospitalisering. Det er for eksempel rapportert et tilfelle der en hund ble fullstendig frisk etter å ha vært komatøs i 7 uker (63).

Væsketerapi, termoregulering og nøye overvåkning er viktig hos pasienter som viser symptomer på forgiftning (64). Om hunden utvikler respirasjonsdepresjon, er intubering, oksygentilførsel og trykkventilering nødvendig. Ved bradykardi kan det gis atropin (16). Studier viser at en bør unngå å bruke diazepam som sedasjonsmiddel ved kramper eller anfall som er induisert av ivermektin siden begge legemidlene virker på GABA-reseptoren (65). Det anbefales heller å bruke barbiturater eller propofol med forsiktighet (49). En bør ikke gi brekningsmiddel eller aktivt kull til hunden om den allerede viser nevrologiske symptomer, på grunn av risikoen for aspirasjonspneumoni (66).

Intravenøs lipidterapi kan forkorte de kliniske symptomene hos hunder, men studier viser ulike resultater. En border collie som fikk i seg en overdose av ivermektin viste raskt bedring etter inntak av intravenøs lipidterapi (48). Hunden hadde ikke MDR1-mutasjon og P-gp var derfor intakte i hjernen. Intravenøs lipidterapi bedret derimot ikke situasjonen da tre homozygote hunder for MDR1-mutasjonen ved et tilfelle fikk i seg ivermektin og viste tegn på stupor og koma (67). Den hypotetiske forklaringen bak mekanismen med terapien er at lipidene trekker til seg lipofile xenobiotika til en plasma-lipidfase, slik at mindre P-gp substrater kommer over i vevene (68). Intravenøs lipidterapi er ennå ikke bevist å ha effekt (69), men det anbefales å gi dette om det kliniske forløpet er alvorlig som ved uttalt stupor, koma eller anfall (70).

Medikamenter

Mange medikamenter som brukes innen veterinærmedisin er blitt studert og konkludert med å være P-gp substrat. Sannsynligvis finnes det ytterligere et flertall veterinære preparater som skulle komme innen gruppen P-gp substrat om de ble undersøkt nærmere (14). P-gp substrat er stoffer som aktivt transporteres av P-gp ved å binde til en

lomme inne i P-gp (71). Kjennetegn for P-gp substrat er at de ofte er lipofile (72) og naturlige forbindelser eller syntetiske derivater av naturlige forbindelser (64).

P-glykoproteinsubstrater

Makrosykliske laktoner (ML)

Ivermektin, selamektin, doramektin, milbemycin oxim og moksidektin er makrosykliske laktoner (ML) som også er P-gp substrat (73). Hos pattedyr innebærer dette at P-gp aktivt hindrer makrosykliske laktoner fra å få tilgang til blant annet hjernen. Dermed beskyttes pattedyr fra å bli forgiftet (34). Virkningsmekanismen til ML er at de bindes til GABA- (74,75) og glutamat-gated kloridkanaler hos artropoder og nematoder (76,77), som gir en letal paralysse hos disse (78). ML er nevrotoksiske ved ulike perorale doser hos hunder som er homozygote for MDR1-mutasjonen: moksidektin ved $\geq 400 \mu\text{g}/\text{kg}$ (38), ivermektin ved $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (3,46) og milbemycin oxim ved $\geq 5 \text{ mg}/\text{kg}$ (44).

Administreringsmåte av ML har betydning for doseringen for å unngå bivirkninger (79). Topikal administrering av selamektin (80) og moksidektin er relativt sikkert å bruke på ivermektinsensitive collier, siden man kan gi opptil fem ganger anbefalt dose uten bivirkninger (81). Man har likevel sett neurologiske symptomer hos homozygote hunder behandlet med $15 \text{ mg}/\text{kg}$ selamektin peroralt (79). Ivermektin kan administreres peroralt, subkutant og som påføringsvæske. I tillegg har ivermektin en halveringstid på 1,8 dager (82). Den lange halveringstiden må tas hensyn til ved valg av behandlingsfrekvens til sensitive collier. For eksempel har man sett nevrotoksiske symptomer ved ivermektinbehandling $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ gitt hver dag over en lengre periode til heterozygote hunder (14,83). Behandling over flere dager vil føre til, på grunn av den lange halveringstiden, at den totale dosen av ivermektin bygges opp i blodet og til slutt når toksisk nivå. En hyppig behandlingsfrekvens med ivermektin over flere dager bør derfor unngås. Homozygote hunder har større risiko for å utvikle toksisitet enn heterozygote hunder, siden det kan utvikles nevrotoksitet kun etter én injeksjon $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (79).

Selamektin, ivermektin, milbemycin oxime och moksidektin kan med sikkerhet gis til MDR1-homozygote hunder forutsatt at de gis på en korrekt administreringsmåte og i parasittforebyggende doser (79).

Kortisol

Kortisol er et kjent P-gp substrat (84) som er med i hypothalamus-hypofyse-binyre (HPA) aksens (85). Det er gjort studier på mus og collie der man har studert om et fravær av P-gp påvirker HPA-aksen. Studiene viste en hemming av HPA-aksen hos hunder som var homozygote for MDR1-mutasjonen sammenliknet med de uten mutasjonen. (36) Mekanismen bak hemmingen er at mer kortisol enn normalt penetrerer inn i hjernen, siden hunden har en MDR1-mutasjon, som gir en sterkere negativ feedback. Dette fører til at mindre Adrenokortikotrop Hormon (ACTH) skilles ut og dermed produseres det mindre kortisol i binyrebarken. Hos en frisk hund er det av mindre betydning om stresshormonet kortisol er lavt. Om hunden, derimot, blir akutt dårlig med for eksempel sepsis, er stresshormon livsnødvendig (86). Fenomenet der det er for lite stresshormon i de situasjoner der mer kortisol kreves, kalles relativ binyresvekkelse (Relative Adrenal Insufficiency, RAI) (85). RAI-hunder som har sepsis må få direkte behandling med lave doser av kortikosteroider siden det da kan gjenopprettes hemodynamisk stabilitet og dermed bidra til å reversere et septisk sjokk (87).

Glukokortikoider brukes ofte sammen med kjemoterapeutika ved behandling av lymfom. Det finnes mange bivirkninger ved behandling med høye doser glukokortikoider. Derfor er det blitt studert om dette medikamentet virkelig er nødvendig ved behandling av lymfom (88). I en studie der hunder med IBD ble gitt glukokortikoider kunne en oppregulering av P-gp i tarmepitelets lymfocytter observeres (89).

Kjemoterapeutika og antimikrobielle agens

Vincristine (90) docetaxel (91), paclitaxel (53), vinblastine (34), etoposide (61), mitoxantrone (92,93), actinomycin D (94) og doxorubicin (95) er P-gp substrater og kjemoterapeutika, og noen av disse er også CYP 3A substrater (14). Vincristine og

doxorubicin gir beinmargstoksisitet, som kan gi neutropeni og trombocytopeni, samt gastrointestinal toksisitet. Bivirkningene viste en høyere prevalens hos hunder med MDR1-mutasjonen enn hos hundene uten (96). For å unngå bivirkninger kan man genotype individene for MDR1-mutasjon. Om nøyropeni <1000 nøytrofile/ μ l har oppstått etter behandling med kjemoterapeutika, kan bredspektret antibiotika gis for å redusere risikoen for infeksjoner (97).

Erytromycin er et P-gp substrat (98), men også en hemmer av P-gp (99). En studie gjort på rotter har vist at erythromycin senker galleutskillingen av doxorubicin og øker plasmakonsentrasjonen av doxorubicin (100).

Øvrige P-glykoproteinsubstrater

Immunsuppressiver (cyclosporine A (101), tacrolimus (102)), hjertemedisiner (digoxin (101), verapamil (72), diltiazem (103), quinidine (104), talinolol (105), losartan (106)), opioider (morphine (107), loperamide (42), fentanyl (72)), steroidhormoner (cortisol (108), dexamethasone (101), aldosteron (108)), antimikrobielle agens (tetracyklin (109), levofloxacin (110)), fexofenadine (111), cimetidine, ranitidine (112), domperidone og ondansetron (42) er P-gp substrat som gir individer med en MDR1-mutasjon bivirkninger ved en for høy dosering. I en artikkel av Mealey (2006) spekulerer forfatteren om sensitivitet mot acepromazin og butorfanol hos homozygote hunder i form av uttalt CNS-depresjon (64).

P-glykoproteininhibitorer

Blant de medikamentene som brukes idag, finnes det et flertall P-gp inhibitorer. Disse virker hemmende på P-gp, og dette innebærer at P-gp substrat som gis sammen med inhibitorene får en økt absorpsjon og redusert utskilling (79). Det har derfor blitt gjort flere studier hvor en ser på hvordan P-gp inhibitorer kan brukes for å øke effekten av blant annet kjemoterapeutika hos kreftpasienter. I en studie gjort av Östen Jonsson så en at P-gp aktiviteten minsket hos multidrug resistente cellelinjer når P-gp inhibitoren carvedilol ble gitt. Dermed økte også sensitiviteten til doxorubicins cytotoksisitet (113). En bør unngå å gi P-gp inhibitorer sammen med kjemoterapeutika som har et smalt

terapeutisk indeks siden toksiske bivirkninger kan oppstå (6). Enkelte legemidler er både inhibitor og P-gp substrat slik som: Quinidin, verapamil, erythromycin, cyclosporin och tacrolimus (114). Andre P-gp inhibitorer er: Atorvastatin (115), bromocriptine (116), carvedilol (113), erythromycin (117), itraconazole (118), ketoconazole (117), meperidine, metadon (107), pentazocine (107) og progesteron (119).

Onkologi og MDR1-genet

Når det gjelder ulike typer av kreft som blod-, bryst-, eggstokks-, lunge- og nedre gastrointestinalkreft kan tumorcellene innen humanmedisinen utvikle resistens mot kjemoterapi. Årsaken til resistensen hos kreftceller har blant annet blitt sett i sammenheng med P-gp og MRP som begge fungerer som pumper i tumorcellenes plasmamembran og dermed transporterer cytostatika ut fra cellene (120). Da disse transportproteinene oppreguleres i kreftceller, øker dermed cellenes evne til å overleve. Graden av P-gp uttrykt i kreftceller er avgjørende for hvordan pasienten svarer på behandlingen med den type cytostatika som er P-gp substrat (121). MDR1 uttrykkes i kreftceller fra vev som normalt ikke skulle uttrykke dette genet. Dette skyldes delvis at MDR1 blir aktivert av malign transformasjon (121), det vil si prosessen der en ellers normal celle får egenskaper som utmerker en tumorcelle (122). Det ser blant annet ut som at MDR1 kan begynne å uttrykkes da det er mutasjon av tumorsupressor genet p53 eller ved aktivering av ras onkogener (121).

Ettersom transportproteinene kan påvirke kreftbehandlingene der P-gp substrat brukes, går enkelte regimer ut på å blokkere syntesen av MRP og P-gp. Det bør også nevnes at ikke alle resistente tumorceller uttrykker P-gp og MRP i høy grad tross at de er resistente. Derfor finnes det sannsynligvis andre gener i ATP-Binding Cassette (ABC) transportprotein superfamilien som kan ha innvirkning på om en kreftcelle viser resistens eller ikke (120).

Det finnes kliniske studier som viser at osteosarkom hos menneske og hund likner hverandre. Både hund og menneske viser overuttrykk av P-gp i kreftcellene, som påvirker kreftherapien. I en studie på hund med osteosarkom viste det seg at disse cellene begynte å uttrykke P-gp i en større grad da de ble utsatt for doxorubicin. Dette

gjorde at effekten av doxorubicin ble redusert. Ved samtidig administrering av verapamil, som er en P-gp hemmer, ble effekten av doxorubicin betydelig bedre. Videre viste det seg at overuttrykk av P-gp førte til at effekten av vincristin, som også er et cytostatikum, men med struktur forskjellig fra doxorubicin, virket dårligere hos disse cellene (123). Dette kan forklare av multidrug-resistens som innebærer at tumorceller som er resistente for en toksisk substans også viser resistens for andre substanser tross at disse kan være både strukturelt og funksjonelt forskjellige (124).

P-glykoprotein hos andre arter, med hest som eksempel

Forekomsten av P-gp har blitt bekreftet hos de arter som er blitt undersøkt for dette, som hund, kylling (125), sau (126), hund, gris, rotte, hamster og mus (25). Med dette som bakgrunn, var det en sterk tro på at også hest skulle ha funksjonelt P-gp. I en studie ble ileum fra hest undersøkt for P-gp. Studien konkluderte med at hest har P-gp og at hest har MDR1-genet som koder for P-gp. Forfatterne pekte på hvordan P-gp påvirker farmakologien hos hest og at temaet burde undersøkes nærmere (127).

Det er vist stor likhet mellom P-gp sekvensene hos de ulike artene. Hestesequensen har en overenstemmelse med 91,5% hos hund, 90,3% hos menneske, 90% hos sau og 88% hos mus (32).

Organer med P-glykoprotein hos hest

I 2008 ble det gjort en svensk studie der P-gp i ulike vev ble undersøkt hos hest. Her ble det fastslått at P-gp uttrykkes mest i duodenum og proksimale jejunum og mindre i distale jejunum, ileum, caecum og colon. Videre viste studien at P-gp ble uttrykt i nyrer, lever og blodlymfocytter hos hest (32).

Kliniske tilfeller som omhandler overdose hos hest

Det finnes et tilfelle beskrevet om en 11 måneder gammel shetlandspionny som fikk en overdose med ivermektin. Normal dosering av ivermektin for denne hesten er ifølge

forfatterne 0,2 mg/kg, mens dosen hesten fikk var 5,4 mg/kg. Dette er en massiv overdose siden hesten har fått over 25 ganger anbefalt dose. Shetlandspannyen viste i begynnelsen symptomer som vanskeligheter med å reise seg, kramper og bevisstløshet. Deretter var ponnyen sløv, hadde dårlig perifer puls, kalde ben og ører, lav temperatur og forlenget kapillærfyllningstid. Dessuten var pupillene, palpebral og truerefleksen fraværende og hesten hadde spontan horisontal nystagmus. Drøyt 70 timer etter overdoseringen av ivermektin hadde ponnyen fortsatt nevrologiske symptomer. Ponnyen fikk så intravenøs lipidterapi som ble gjentatt to ganger. Allerede etter første infusjon svarte ponnyen positivt på behandlingen da nystagmusen sluttet og den fikk tilbake pupillrefleksene i begge øynene. Hesten ble overvåket og etter andre lipidinfusjon fikk hesten tilbake bevisstheten og restituerte deretter. Studien viste at intravenøs lipidterapi var en effektiv behandling ved overdose av ivermektin hos hest (128).

Informasjonen om MDR1 hos hest er veldig begrenset. Det finnes for eksempel få studier på P-gp substrat og om det forekommer mutasjon i MDR1-genet hos hest er uvisst. Det er et behov for å undersøke P-gp betydning hos hest på flere områder.

Materiale og metoder

Materiale

Litteraturmateriale

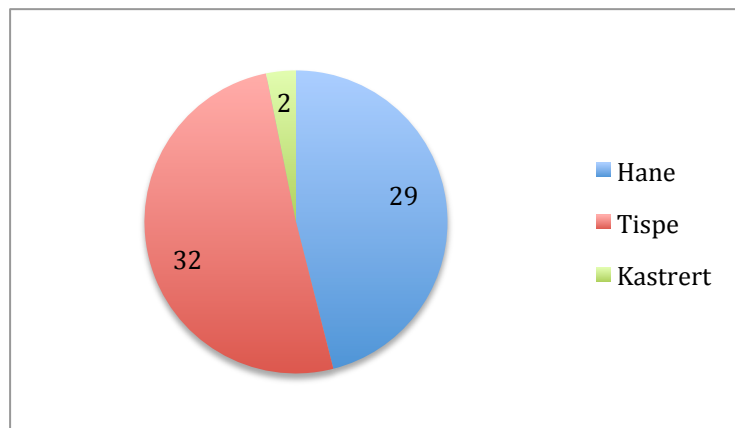
Litteraturdelen er basert på artikler som er funnet via søkemotorer som: Pubmed, Wiley Online Library, Science Direct, Highwire Press samt Norges veterinærhøgskoles (NVHs) tidsskriftsarkiv (American Journal of Veterinary Research, Journal of the American Veterinary Medical Association og Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics). Artikler som vi ikke har hatt tilgang til via NVH har vi bestilt fra andre høyskoler eller universiteter i Norge. Bøker har også blitt brukt i litteraturdelen, disse er Ivermectin and Abamectin (W.C. Campbell), Essentials of Genetics 6th edition (W. S. Klug, M. R. Cummings, C. A. Spencer), Efflux Transporters and the Blood-brain Barrier (Eve M. Taylo) og Physiology of Domestic Animals (Ø. V. Sjaastad, K. Hove,

O. Sand). Muntlig informasjon er fått fra professor Lars Moe, Norsk Collieklubb og Svenska Colliklubben. Vi har også fått informasjon via mailutveksling med Jordbruksverket, Hundsport og Svenska Colliklubben.

Genetisk materiale

EDTA-blodprøver ble tatt fra 100 collier fra utstillinger og klinikker fra hele Norge i tidsperioden 2006-2012. Innsamlingen av de 100 blodprøvene ble basert på hvilke hunder som i perioden 2006-2012 møtte opp på utstillingene samt på klinikkene. Dessuten krevdes samtykke av hundeeierne. Hundene som kom til klinikkene var både syke og friske, men kliniske symptomer og diagnosen til de syke hundene var ukjent. MDR1 status hos de 100 colliene var ukjente ved blodprøvetaking.

Av de 100 blodprøvene, ble det tatt ut 63 prøver for analyse for MDR1-mutasjonen. Dette skjedde ved tilfeldig utvalg med random number generator som ga et ubundet slumpmessig utvalg. Colliene vi da fikk var omtrent likt fordelt mellom kjønnene. Figur 4 viser denne fordelingen, der 29 av hundene var hanner, 32 var tisper og 2 var kastret av ukjent kjønn. Aldersfordelingen hos individene er ukjent, men gjennomsnittsalder var 7,8 år.



Figur 4. Kjønnfordelingen av studiepopulasjonen angitt i antall: 29 hanner, 32 tisper og 2 kasterte av ukjent kjønn.

Metode

Blodprøvene ble frosset ved -20°C for senere DNA-analyse. Prøvene ble våren 2013 analysert for MDR1-mutasjonen ved Norges veterinærhøgskole (NVH) i Oslo, Institutt for basalfag og akvamedisin, Seksjon for genetikk. Totalt ble 500 ng genomisk DNA ekstrahert fra hvite blodceller fra antikoagulert EDTA-fullblod. Dette ble gjort ved at plasma og blodceller ble separert ved hjelp av en mekanisk separator i et plasma BD P100 rør. Deretter ble den mekaniske separatoren tatt bort. Buffy coat ble isolert og videre brukt til analyse for genomisk DNA. Deretter ble det brukt en kommersiell standardprotokoll for ekstrahering av DNAet (129).

Videre ble det gjort PCR-amplifikasjon av fragmentene ved et standard PCR (Polymerase chain reaction) oppsett (130). PCR baseres på å bruke et enzym kalt DNA-polymerase som syntetiserer kopier av den ønskede gensekvensen gjennom flere sykluser. Forward- og reversprimer brukes for å guide DNA-polymerase til å kopiere gensekvensen av interesse. Disse primerne ble laget ved programmet «Primer3» utifra hundesekvensen v.3.1 (131). PCR-reaksjonen består av tre steg: Første steget er at DNAet som skal kloneres denatureres til enkeltråder. I steg to bindes primerne til det denaturerte DNA. I det siste steget tilsettes DNA-polymerase og bygger på primerne ved å tilsette nukleotider slik at det dannes dobbeltrådet DNA. Det ble utført totalt 28 PCR-sykluser på DNA.

PCR-produktene ble deretter sekvensert ved standard Sanger sekvensering på en Applied biosystem 3500xL (132). Ved standard Sanger sekvensering tilsettes det enkeltrådet DNA i et testrør. I røret tilsettes også DNA-polymerase, fluorescerende merkede deoksyribonukleotidene dATP, dCTP, dGTP og dTTP i ulike farger samt en primer i 3'-enden. Nukleotidene som ble tilsatt i rørene er i dideoksyform og har en OH-gruppe som ikke kan danne bånd med en annen nukleotid, som gjør at tilveksten av DNA-syntesen terminerer når en av disse nukleotider binder inn. DNA-fragmentene separeres i en elektroforesegel der de lengste sekvensene beveger seg kortest siden disse har en større molekylvekt. Gelen scannes av en laser som avbilder dideoksynukleotidene som fargetopper i et kromatogram (130). Dette kan senere analyseres i programmet Genemapper 5 (133).

Prøvene ble analysert ved fragmentanalyse, og verifisert ved sekvensering på et antall av hundene samt at det i hver analyse ble kjørt kontrollindivider av kjente genotyper.

Statistiske metoder

95% konfidensintervallet:

$$n \cdot p > 5$$

$$n \cdot (1 - p) > 5$$

Om overstående forhold oppfylles får nedenstående formel anvendes:

$$\sigma = \sqrt{\frac{p \cdot (1 - p)}{n}}$$

$$n = 63$$

$$p_{\text{Wildtype}} = 0,143$$

$$p_{\text{Heterozygot}} = 0,413$$

$$p_{\text{Homozygot}} = 0,444$$

Antall og frekvens i denne studien oppfyller de to nevnte kriterier for å bruke en normalfordelingskurve:

$$\sigma_{\text{Wildtype}} = \sqrt{\frac{0,143 \cdot (1 - 0,143)}{63}} = 0,044102 \approx 0,044$$

$$\text{andel} - 1,96 \cdot \sigma \leq p \leq \text{andel} + 1,96 \cdot \sigma$$

$$0,143 - 1,96 \cdot 0,044 \leq p \leq 0,143 + 1,96 \cdot 0,044$$

$$0,057 \leq p \leq 0,23$$

$$\sigma_{Heterozygot} = \sqrt{\frac{0,413 \cdot (1 - 0,413)}{63}} = 0,0620 \approx 0,062$$

$$0,413 - 1,96 \cdot 0,062 \leq p \leq 0,413 + 1,96 \cdot 0,062$$

$$0,29 \leq p \leq 0,53$$

$$\sigma_{Homozygot} = \sqrt{\frac{0,444 \cdot (1 - 0,444)}{63}} = 0,06259 \approx 0,063$$

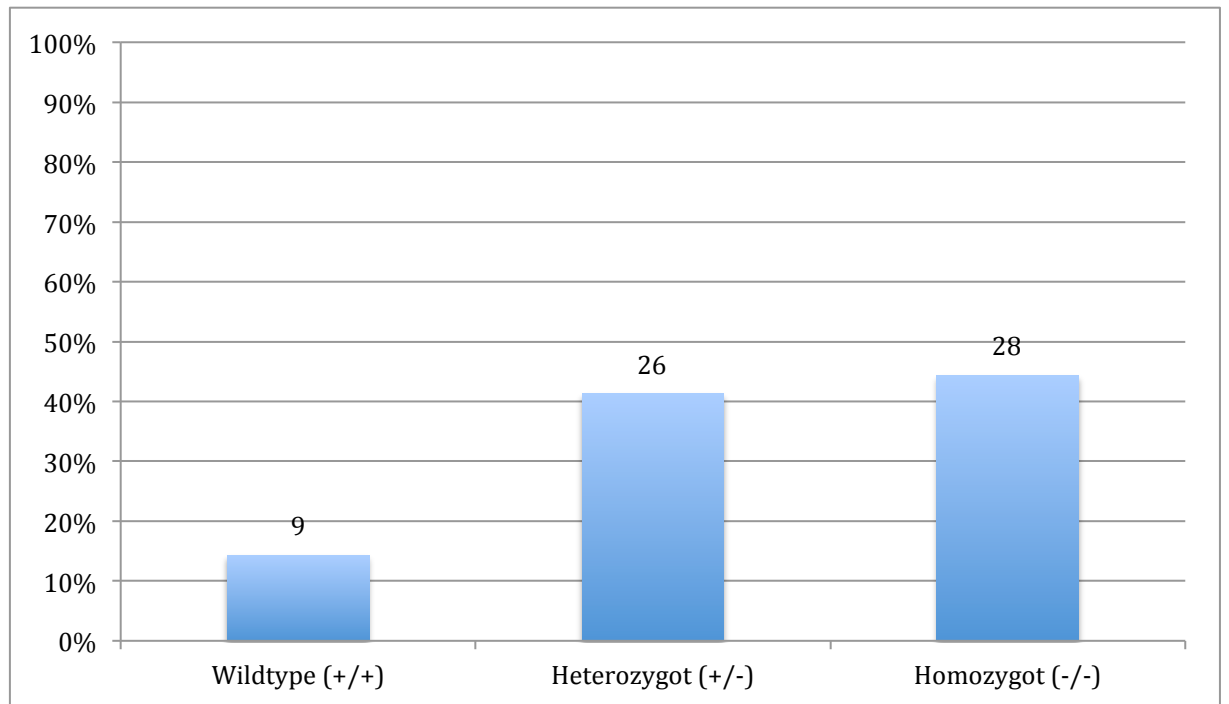
$$0,444 - 1,96 \cdot 0,063 \leq p \leq 0,444 + 1,96 \cdot 0,063$$

$$0,32 \leq p \leq 0,57$$

Resultater

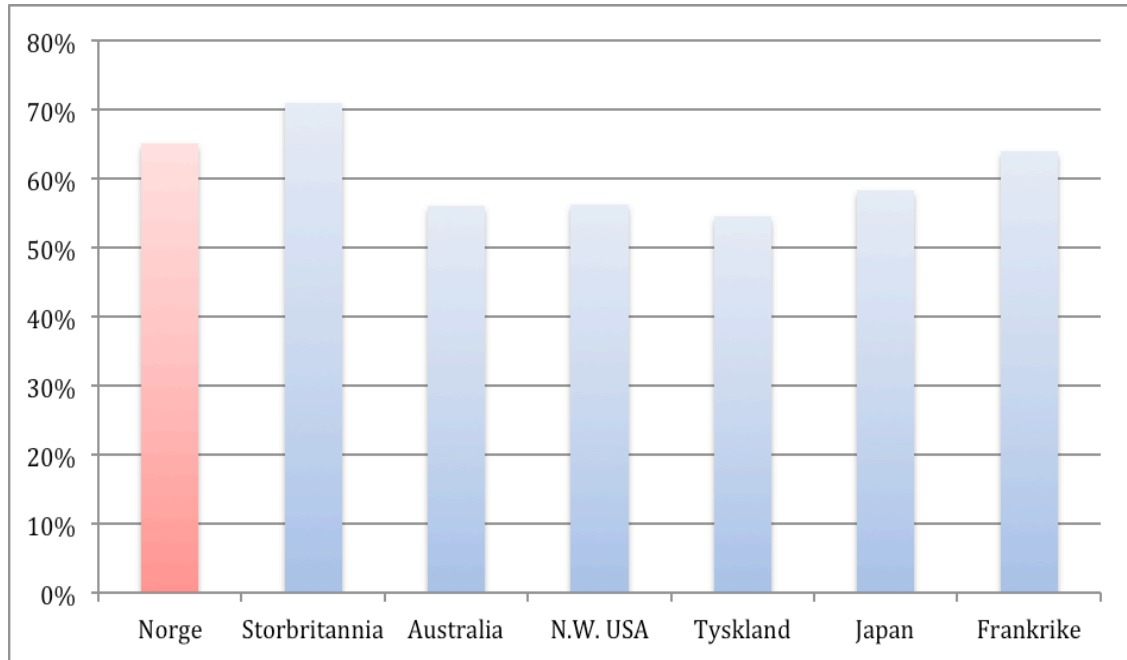
Studiepopulasjonen bestod av 63 langhårede collier av begge kjønn. Colliene var omtrent likt fordelt mellom kjønnene og gjennomsnittsalderen på individene var 7,8 år. Figur 5 viser hovedresultatet av vår studie der fordelingen av genotypen var følgende: 9 (14,3%) wildtype, 26 (41,3%) heterozygote og 28 (44,4%) homozygote for MDR1-mutasjonen. Det vil si at størst andel av de undersøkte hundene var homozygote for mutasjonen og færrest var wildtype.

Resultatet innebærer at hele den norske colliepopulationen med 95 % sikkerhet ligger innenfor de følgende verdier basert på beregninger av 95 % konfidensintervallet: 32-57% av colliene er homozygote for MDR1-mutasjonen med et gjennomsnitt på 44%, 29-53% er heterozygote med et gjennomsnitt på 41% og 6-23% er frie for mutasjonen med et gjennomsnitt på 14%.



Figur 5. Fordeling av Multidrug resistance 1 (MDR1) genotype hos 63 langhårede collier i Norge. Studiet ga følgende resultat: 9 (14,3%) wildtype, 26 (41,3%) heterozygote og 28 (44,4%) homozygote for MDR1-mutasjonen.

Vårt resultat gir en allelfrekvens på 65,1%, som vist i figur 6. Siden et genpar består av to alleler på et spesifikt locus (134) beregnes allelfrekvensen ved å addere antallet alleler for MDR1-mutasjonen og dividere disse med totalantallet alleler i studiepopulasjonen (135). Heterozygote individer har kun ett mutant allel i MDR1-genet mens homozygote har to (136). Derfor vil homozygote hunder telle dobbelt så mye som heterozygote ved utregningen av allelfrekvensen. Figur 6 viser i tillegg til det norske resultatet også allelfrekvensen funnet i studier fra 6 andre land: Storbritannia, Australia, Nordvestre USA (N.W. USA), Tyskland, Japan og Frankrike.



Figur 6. Forekomsten av allelfrekvensen til MDR1-mutasjonen i ulike områder hos collie. MDR1 allelfrekvensen hos langhårede collier i Norge var 65,1% i vår studie. Figuren viser også allelfrekvensen fra studier gjort i andre land: 71,0% i Storbritannia (40 collier med i studien) (19), 56,1% i Australia (33 collier med i studien) (140), 56,3% i Nordvestre USA (N.W. USA, 40 collier med i studien) (139), 54,6% i Tyskland (578 collier med i studien) (5), 58,3% i Japan (12 collier med i studien) (137) og 64,0% i Frankrike (25 collier med i studien) (138).

Diskusjon

Siden MDR1-statusen er ukjent for collier i Skandinavia, valgte vi å gjennomføre en studie for å estimere og kartlegge MDR1-mutasjonsfrekvensen i Norge. Resultatet viste en mutasjonsfrekvens på 44,4% homozygote, 41,3% heterozygote og 14,3% wildtype. Det vil si at omtrent 85% har minst ett mutert MDR1-allel i studiepopulasjonen. Dette viser at det er en utbredt mutasjon blant norske collier og det innebærer at veterinærer i klinisk praksis må anta at alle collier bærer et mutant MDR1-gen.

Figur 6 viser at allelfrekvensen hos norske collier er på 65,1%. Resultatet kan sammenliknes med tidligere studier gjort i andre områder i verden der man har undersøkt allelfrekvensen av MDR1-mutasjonen til: 58,3% i Japan (137), 54,6% i Tyskland (5), 64,0% i Frankrike (138), 56,3% i Nordvestre USA (139), 56,1% i

Australia (140) och 71,0% i Storbritannia (19). Allelfrekvensen i vår studie og de andre studiene er relativt like, og dette øker troverdigheten i studien vi har gjort. Resultatet i de ulike studiene viser at mutasjonen er veldig utbredt i hele verden. Mutasjonen i MDR1-genet er funnet på et lokus som er felles for alle rasene. Dette tyder på at enkelte mynderaser og gjeterhunder deler en felles stamfar som var opprinnelsen til MDR1-mutasjonen, og at mutasjonen derfor har skjedd en gang. Dette styrker hypotesen om at mutasjonen kommer fra et enkelt individ, som beskrives i en artikkel av Neff. Et al. 2004 (18). I artikkelen står det at dette individet var en collie fra Storbritannia som sannsynligvis levde før 1873. Dette kan eventuelt være en forklaring på den høye allelfrekvensen i Storbritannia (71,0%) sammenliknet med resultatet i de øvrige landene.

Det er få studier gjort på collier som er heterozygote for MDR1-mutasjonen. En mulig årsak til dette er at det kan være stort individuelt spenn med tanke på både dose og legemiddel innen den heterozygote populasjonen. De fleste artiklene som tar for seg medikamentelle bivirkninger hos heterozygote individer, henviser til den samme artikkelen. I denne artikkelen beskrives det hvordan en collie som var heterozygot for MDR1-mutasjonen fikk bivirkninger i form av GI-toksisitet og myelosuppresjon ved administrering av visse P-gp substrat, som for eksempel vincristine og doxorubicin. I litteraturen er det også beskrevet forsøk der heterozygote individer tåler mindre doser av parasittmidler enn wildtype, men disse studiene er usikre. Derfor synes vi det blir feil å trekke noen konklusjoner om heterozygote individer og håper det kommer flere studier som tar for seg kliniske bivirkninger hos denne gruppen i framtiden.

Alvorlighetsgraden av bivirkningene som oppstår hos homozygote collier, blir mer uttalt ved økt dosering (73). Det kan nevnes at sentralnervøse bivirkninger også kan oppstå ved overdose av et legemiddel, uten at det er en mutasjon tilstede. Da vil en se de samme symptomene som nevnes for homozygote (48). Alder og body condition score (BCS) har vist seg å ha betydning for utvikling av bivirkninger. Gamle hunder kan være mer utsatt for nevrotoksisitet enn yngre individer, siden P-gp uttrykkes i mindre grad i hjernens BBB hos eldre individer. Studier viser at det er en 72 % reduksjon i uttrykk av P-gp hos hunder som er over 8,3 år sammenliknet med hunder som er yngre enn 3 år (141). Det her er aktuelt for wildtype og spesielt heterozygote individer, da en kan tenke seg at de blir mer sensitive for legemidlene ved økende alder. BCS kan ha en betydning,

siden svært overvektige hunder har ett relativt større distribusjonsvolum og dermed eventuelt lengre halveringstid for medikamenter, for eksempel moksidektin (142,143). Samtidig kan en tenke seg at ekstra fett har en beskyttende funksjon siden legemiddelet da har et større kroppsvolum å distribueres til, slik at plasma- og vevskonsentrasjoner av medikamentet går ned.

Feilkilder

Det er flere faktorer som kan ha påvirket vårt resultat slik som utvalg av studiepopulasjonen, antall collier i studien og analysemetode.

Utvalg

Det er ikke en randomisert studie siden utstillingene og klinikkene var valgt ut på forhånd. Til disse forutbestemte lokalisasjonene har hundeeierne kommet på eget initiativ. Videre har hundeeierne selv sagt ja til å stille hundene sine til disposisjon og hundene må ha vært håndterbare ved blodprøvetaking. Det ble tatt 100 blodprøver og av disse ble det valgt ut 63 stykker ved hjelp av random number generator. Selv om dette var et tilfeldig utvalg, består studiepopulasjonen ikke av et tilfeldig utvalg totalt sett på grunn av de årsaker som tidligere er nevnt.

Utvalget påvirkes av:

- syke eller friske individer
- alder
- slektskap
- kjønn

Fordelingen mellom syke og friske individer som deltar i vår studiepopulasjon er ikke kjent. Om mange syke individer har kommet inn til klinikken med P-gp relaterte symptomer, vil det gi en større andel individer med MDR1-mutasjon i vår studiepopulasjon. Dette kan ha bidratt til en systematisk seleksjonsfeil. Sannsynligheten for at dette skal ha skjedd, anser vi som veldig liten.

Gjennomsnittsalderen på vår studiepopulasjon er 7,8 år. Dette er en relativt høy alder sammenliknet med levetid hos collier som er på 10,7 år (144). Dette kan ha påvirket resultatet gjennom at individer homo- eller heterozygote for MDR1-mutasjonen kan ha blitt avlivet tidligere på grunn av P-gp relaterte årsaker. Det er også en liten mulighet for at andre ukjente faktorer koblet til mutasjonen og P-gp kan påvirke mortaliteten hos collie. Om det er tilfellet, har vårt resultat eventuelt en lavere mutasjonsfrekvens enn i virkeligheten. Dette er sannsynligvis ikke tilfellet, siden vårt resultat ligger omtrent på samme nivå som i andre land, se figur 6. Aldersfordelingen i studiet er ukjent. Om aldersfordelingen er smal, kan dette gi en viss svakhet i vår studie. Dette kan skyldes nært slektskap mellom hundene, der kullsøsken overrepresenterer en viss genotype. Om aldersfordelingen derimot er større, er utvalget mer representativt. Derfor vil sannsynligvis den mest optimale studiepopulasjonen bestå av unge individer fra en tiårs periode, der slektskapet er kjent og tas hensyn til.

Slektskapet mellom colliene i denne studien er også ukjent. Dette har potensialet til å være den største feilkilden i studiet, siden et nært slektskap mellom individene vil påvirke vårt resultat i sterk grad. Det er da en viss risiko for at en spesifikk genotype blir overrepresentert. Om en stor andel av colliene i vår populasjon kommer fra utstillinger, er det en mulighet at oppdrettere med fokus på eksteriør er overrepresentert i vår studie. Dette gir en mindre genpol og kan gi systematiske feil. Videre er det da mulig at visse oppdrettere med andre fokus, som for eksempel bruksområder hos colliene, blir underrepresentert. I hvilken retning dette vil påvirke resultatet, er vanskelig å si. Resultatet kan også ha blitt påvirket av geografisk utbredelse av colliene i studien. Prøvene er tatt fra hunder i hele Norge, men vi vet ikke hvor stor andel som er tatt fra de ulike geografiske områdene. Vi kan derfor ikke utelukke at visse deler av landet er over- eller underrepresentert. Om vi antar at hundene i det spesifikke området kommer fra oppdrettere i nærmiljøet, vil dette da representere en feilkilde.

MDR1-genet ligger på kromosom 14 (5) som er en autosom og mutasjonen nedarves derfor uavhengig av kjønn (145). I vår studiepopulasjon er koblingen mellom kjønn og MDR1-genotype ukjent, men på grunn av nedarvingsmønstret antas det at variantene av arvematerialet er jevnt fordelt mellom kjønnene. Andre studier har vist at langhårede og korthårede collie har lik allelfrekvens av mutasjonen i MDR1-genet (19). Derfor kan

sannsynligvis vår studiepopulasjon, som består av bare langhårede collier, likestilles med andre studier gjort på både langhårede og korthårede collier.

Antall

Antallet individer brukt i studien har en stor innvirkning på hvor representativt resultatet blir for hele collietopulasjonen i Norge. En større studiepopulasjon gir en sikrere estimering av MDR1-mutasjonsfrekvensen. I vårt tilfelle ble 63 prøver analysert, da dette var praktisk og økonomisk gjennomførbart. 63 individer er et stort nok antall for at kriteriene er oppfylt for å få bruke en normalfordelingskurve. Dette er essensielt for studien, da et 95% konfidensintervall da kan brukes. Dermed får vi en sikker estimering på hvor utbredt mutasjonsfrekvensen i MDR1-genet er hos colliet i Norge.

Analysemetoden

Blodprøvetaking og analyse av blodprøvene kan ha påvirket resultatet i studien. Det er en risiko at det er blitt tatt blodprøve av samme hund flere ganger, for eksempel om samme hund har møtt opp på flere ulike utstillinger. Dette er mindre sannsynlig siden blodprøvene er merket for å skille individene fra hverandre. Andre menneskelige faktorer som kan ha påvirket resultatet, er for eksempel feilmerking av prøver. For å minimere risikoen for feil ved analyse av blodprøvene, har DNA fra et visst antall hunder blitt verifisert ved sekvensering. Ved hver analyse er det også kjørt negative og positive hunder som kontrollindivider. Kvalitetskontrollen som er blitt utført ved genanalysen minimerer sannsynligheten sterkt for at det kan ha oppstått feil under dette steget av studien.

Gyldighet utenfor studiepopulasjonen

Siden vi har et 95% konfidensintervall kan vi med statistisk sikkerhet si at minst 32% av colliene i Norge er homozygote for MDR1-mutasjonen og minst 29% er heterozygote dersom utvalget av studiepopulasjonen er representativt. Vi har tidligere i teksten nevnt faktorer som gjør at vårt studieutvalg ikke er 100% representativt, som for eksempel syke eller friske individer, alder og slektskap. Likevel mener vi at vårt utvalg kan

benyttes for å si noe om hele den norske colliepopulasjonen, siden vi har brukt et så stort antall individer som 63, i tillegg til at vi har forsøkt å unngå så mange systematiske og tilfeldige feil som mulig.

Mutasjonsfrekvensen som vi har kommet fram til, antas å gjelde for Sverige også. Dette tror vi siden det er en relativt stor import og eksport over grensen. Derfor deler trolig den norske og svenske colliepopulasjonen genetisk materiale. Til dags dato har vi ikke funnet noen studie som viser forekomsten av MDR1-mutasjonen hos svensk collie. På samme måte kan det antas at resultatet vårt kan appliseres i andre skandinaviske land, siden det er kort geografisk avstand. Figur 6 viser at allelfrekvensen er relativt lik i alle land, med 54,6 % i Tyskland som laveste frekvens og 71% i Storbritannia som høyeste frekvens. Norge ligger omtrent midt mellom disse to (65,1%), noe som kan tyde på at studien gjort på den norske collierasen også kan appliseres på andre land i verden.

Mutasjonen i MDR1-genen er ikke bare funnet hos langhåret og korthåret collie, men også andre raser som shetland sheepdog, old english sheepdog, australian shepherd (18), border collie (5), hvit gjeterhund, schæfer og enkelte mynderaser som for eksempel langhåret whippet (17). De fleste av disse er gjeterhunderaser og har liknende arvemateriale siden de har felles slektskap (18). Studier viser at disse rasene har en lavere allelfrekvens enn collie (17). Derfor kan sannsynligvis ikke vårt studieresultat appliseres på andre hunderaser.

MDR1-mutasjonen og avl

Ifølge Hardy-Weinberg prinsippet vil allel- og genfrekvensen i en populasjon være konstant fra generasjon til generasjon gitt at seleksjon, mutasjon eller migrasjon ikke skjer. Tanken er at allelene i genpoolen er konstant (135). I dag er det lite fokus på MDR1-mutasjonen i avl, og vi kan derfor anta at allelfrekvensen vi har funnet i dette studiet vil være relativt konstant i nærmeste framtid.

Om collieoppdrettere begynner å selektere for å få bort MDR1-mutasjonen, vil genpoolen reduseres kraftig. Dette kan på sikt gjøre at andre uønskede egenskaper kommer til uttrykk hos colliene. I Norge er det per dags dato liten fokus på MDR1 i avl.

Veterinærens rolle

Ettersom det ikke anbefales å fokusere på mutasjonen i avl, blir ansvaret større for veterinæren. Eier bør bli informert av veterinæren om risikoen knyttet til mutasjonen ved medikamentell behandling. Da kan eier godta at det tas en blodprøve av collien for å finne genotypen på et tidlig stadie, slik at det er kjent om hunden har mutasjonen ved eventuelt senere akutt behandling. Om eier kjenner til colliens genotype på forhånd, er det lettere for veterinæren å tilpasse behandlingen til individet. For å få til dette bør veterinæren ha nok kunnskap om medisiner, doseringer, administrering av P-gp substrater og behandling av bivirkningene som kan oppstå.

I litteraturen finnes det flere anbefalinger som omhandler medisiner av collier med MDR1-mutasjonen, som er tidligere nevnt i denne oppgaven. For eksempel er milbemycin oxim (MO) muligens et sikrere alternativ enn ivermektin ved behandling av demodikose om colliens genotype er ukjent (83). Er individet homozygot for MDR1-mutasjonen skal det være sikkert å gi makrosykliske laktoner om man kun gir i parasittforebyggende doser og følger legemiddelfirmanes anbefalinger. Dosene er da såpass små at det er liten sannsynlighet for at det oppstår nevrotoksiske nivåer.

Det er ikke bare veterinæren som har ansvar, men også legemiddelindustrien. For eksempel informerer Felleskatalogen om blant annet selamektindoser og anbefalinger til ivermektinfølsomme collier (146). Felleskatalogen mangler opplysninger om forsiktighet ved bruk av flere andre P-gp substrater til sensitive collier. En grunn til dette kan være manglende forskning innen området, der ivermektin foreløpig har fått størst fokus.

Konklusjon

Vår studie har vist en høy forekomst av MDR1-mutasjonen hos collie i Norge, som også kan appliseres Sverige og andre land. Derfor er det viktig at veterinærer blir opplyst innen området, slik at de kan gi individuell behandling. Det er også nødvendig med videre forskning, siden bivirkningene ved medikamentell behandling kan være alvorlige. Et økt fokus hos veterinærer, legemiddelindustrien, oppdrettere og eiere vil minske antall tilfeller med symptomer relatert til MDR1-mutasjonen i framtiden.

Takk til bidragsytere

Frode Lingaas og Linn Mari Storengen for analysering av blodprøvene

Ola Brynildsrud Brønstad for statistisk rådgivning

Michael Forsgrens stiftelse for økonomisk støtte

Eierne til colliene som var med i studien

Summary

Title: The prevalence of mutation within Multidrug Resistance 1 (MDR1) Gene in the Norwegian Collie population

Authors: Josefin Hultman, Linda Nordin, Evalinn Pedersen

Supervisors: Lars Moe, Christine Grøndahl, Kristin Prestrud

Objective: To evaluate the mutation frequency of the Multidrug Resistance 1 (MDR1) Gene in the Norwegian Collie population. Further, inform veterinarians about the consequences, side effects of P-gp substrates drugs, dosage and treatment regimen.

Design: Cross-sectional study

Material and methods: Blood was sampled from 63 rough-coated Collies between 2006 to 2012 for MDR1 genotyping analysis.

Results: The MDR1 mutation was identified in 54 of the 63 sampled Collies. The hetero- and homozygote genotype was identified in 26 respectively 28 dogs with the MDR1 Gene mutation.

Conclusions and clinical relevance: The results from this study have shown that the frequency of the MDR1 mutation is high in the Norwegian Collie population. It is therefore of essence to further investigate the properties of the mutated MDR1 Gene, thus getting a deeper understanding of P-glycoprotein substrates interaction and effect in Collies with the MDR1 mutation. Further, inform Norwegian veterinarians of the prevalence of the MDR1 Gene mutation in the Norwegian Collie population, thus avoiding incorrect administration of P-glycoprotein substrate drugs.

Referanser

Bildekilde forside:

- http://www.nist.gov/oles/forensics/biology_dna.cfm (08-01-2013)
- <http://www.akc.org/breeds/collie/index.cfm> (11-02-2013)
- http://www.123rf.com/photo_10042336_blood-sample-in-the-rack.html (11-02-2013)

(1) Preston JM. Adverse reactions to unapproved applications. Vet Rec 1983;112(12):286.

(2) Seward RL. Reactions in dogs given ivermectin. Journal of American Veterinary Medicine Association 1983;183:493.

(3) Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS, Jr, DiPietro JA. Clinical observations in collies given ivermectin orally. Am J Vet Res 1987;48(4):684-685.

(4) Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene. Pharmacogenetics; 2001.11: 8, 727-733 2001.

(5) GEYER J, DÖRING B, GODOY JR, LEIDOLF R, MORITZ A, PETZINGER E. Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. J Vet Pharmacol Ther 2005;28(6):545-551.

(6) Mealey KL. Adverse Drug Reactions in Veterinary Patients Associated with Drug Transporters. VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA-SMALL ANIMAL PRACTICE 2013;43(5):1067.

(7) Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. Proceedings of the National Academy of Sciences 1987;84(9):3004-3008.

(8) Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86(2):695-698.

(9) Li M, Hurren R, Zastawny RL, Ling V, Buick RN. Regulation and expression of multidrug resistance (MDR) transcripts in the intestinal epithelium. Br J Cancer 1999;80(8):1123-1131.

- (10) Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(21):7735-7738.
- (11) HORI R, OKAMURA N, AIBA T, TANIGAWARA Y. Role of P-Glycoprotein in Renal Tubular Secretion of Digoxin in the Isolated-Perfused Rat-Kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266(3):1620-1625.
- (12) Lankas G, Wise L, Cartwright M, Pippert T, Umbenhauer D. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproductive Toxicology* 1998;12(4):457-463.
- (13) Melaine N, Lienard M, Dorval I, Le Goascogne C, Lejeune H, Jegou B. Multidrug resistance genes and P-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, guinea pig, and human. *Biol Reprod* 2002;67(6):1699-1707.
- (14) Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther* 2004;27(5):257-264.
- (15) Mizukami K, Chang HS, Yabuki A, Kawamichi T, Hossain MA, Rahman MM, et al. Rapid genotyping assays for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. *J Vet Diagn Invest* 2012;24(1):127-134.
- (16) Merola VM, Eubig PA. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocylic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. (Special Issue: Common toxicologic issues in small animals.). *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*; 2012.42: 2, 313-333 2012.
- (17) Gramer I, Leidolf R, Doring B, Klintzsch S, Kramer EM, Yalcin E, et al. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Veterinary Journal*; 2011.189: 1, 67-71.23 ref 2011.
- (18) Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, et al. Breed distribution and history of canine mdr1-1 Delta, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(32):11725-11730.
- (19) Tappin SW, Goodfellow MR, Peters IR, Day MJ, Hall EJ, Mealey KL. Frequency of the mutant MDR1 allele in dogs in the UK. *Vet Rec* 2012;171(3):72.
- (20) Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1976;455(1):152-162.
- (21) Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67-113.

- (22) Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. *Science* 1992;258(5088):1650-1654.
- (23) Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krognann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15665-15670.
- (24) Dhir R, Buschman E, Gros P. Structural and functional characterization of the mouse multidrug resistance gene family. *Bull Cancer* 1990;77(11):1125-1129.
- (25) Begley DJ. P-Glycoprotein: The prototypical BBB efflux transporter. In: Taylo EM, editor. **Efflux Transporters and the Blood-brain Barrier**. 1st ed.: Nova Science Publishers Inc; 2005. p. 108-109.
- (26) Scheffer GL, Kool M, Heijn M, de Haas M, Pijnenborg AC, Wijnholds J, et al. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2000;60(18):5269-5277.
- (27) Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res Microbiol* 2001 0;152(3–4):205-210.
- (28) Oude Elferink RPJ, Zadina J. MDR1 P-glycoprotein transports endogenous opioid peptides. *Peptides* 2001;22(12):2015-2020.
- (29) Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH, Zou MJ. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit* 2004;10(1):RA5-14.
- (30) Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME, Snyder AZ, Finch RA, Sartorelli AC, et al. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(7):3900-3905.
- (31) Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38(9):1277-1287.
- (32) Tydén E, Tallkvist J, Tjälve H, Larsson P. P-glycoprotein in intestines, liver, kidney and lymphocytes in horse. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics* 2009 04;32(2):167-176.
- (33) Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2005;6:123-142.

- (34) Schinkel AH, Smit JJM, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77(4):491-502.
- (35) Mealey KL(1), Bentjen SA(1), Northrup NC(2). Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *J Am Vet Med Assoc* 2003;223(10):1453-1455+1434.
- (36) Mealey KL, Gay JM, Martin LG, Waiting DK. Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in MDR1-1 Δ and MDR1 wildtype dogs. *Journal of Veterinary Emergency & Critical Care* 2007;17(1):61-66.
- (37) LEWIS S, AKGÜN E, JASIN M. Palindromic DNA and Genome Stability: Further Studiesa. *Ann N Y Acad Sci* 1999;870(1):45-57.
- (38) GEYER J, Döring B, GODOY JR, MORITZ A, PETZINGER E. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics* 2005;28(1):95-99.
- (39) Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet* 1993;2(2):159-163.
- (40) Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. *Physiology of Domestic Animals*. . Second ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press; 2010. p. 125-127.
- (41) Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997;8(3):161-170.
- (42) Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 1996;97(11):2517-2524.
- (43) Fecht S, Distl O. Review of prevalence, genetic aspects and adverse effects of the *mdr1-1Delta* mutation in dogs. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2008;115(6):212-219.
- (44) Tranquilli WJ, Paul AJ, Todd KS. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *Am J Vet Res* 1991;52(7):1170-1172.
- (45) Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL, Todd KS, DiPietro JA. Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. *J Vet Pharmacol Ther* 1987;10(1):96-100.
- (46) Fassler PE, Tranquilli WJ, Paul AJ, Soll MD, DiPietro JA, Todd KS. Evaluation of the safety of ivermectin administered in a beef-based formulation to ivermectin-sensitive Collies. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199(4):457-460.

- (47) Krugman L, Bryan JN, Mealey KL, Chen A. Vincristine-induced central neurotoxicity in a collie homozygous for the ABCB1 Delta mutation. *Journal of Small Animal Practice*; 2012;53: 3, 185-187.
- (48) Clarke DL, Lee JA, Murphy LA, Reineke EL. Use of intravenous lipid emulsion to treat ivermectin toxicosis in a Border Collie. *J Am Vet Med Assoc* 2011;239(10):1328-1333.
- (49) Hopper, K. (1,3), Aldrich J(1), Haskins SC(2). Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002;16(1):89-94.
- (50) Houston DM, Parent J, Matushek KJ. Ivermectin toxicosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191(1):78-80.
- (51) Merola V, Khan S, Gwaltney-Brant S. Ivermectin toxicosis in dogs: a retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009;45(3):106-111.
- (52) Atkinson DE, Brice-Bennett S, D'Souza SW. Antiepileptic medication during pregnancy: does fetal genotype affect outcome? *Pediatr Res* 2007;62(2):120-127.
- (53) Sparreboom A, Van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Borst P, et al. Limited Oral Bioavailability and Active Epithelial Excretion of Paclitaxel (Taxol) Caused by P-glycoprotein in the Intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997(5):2031.
- (54) Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RP. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* 2003;52(12):1788-1795.
- (55) Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2002;25(11):1391-1400.
- (56) Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(8):423-429.
- (57) McEntee M, Silverman JA, Rassnick K. Enhanced bioavailability of oral docetaxel by co-administration of cyclosporin A in dogs and rats. *Veterinary & Comparative Oncology* 2003;1(2):105-112.
- (58) Kawahara M, Sakata A, Miyashita T, Tamai I, Tsuji A. Physiologically based pharmacokinetics of digoxin in mdr1a knockout mice. *J Pharm Sci* 1999;88(12):1281-1287.
- (59) Koepsell H, Gorboulev V, Arndt P. Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J Membr Biol* 1999;167(2):103-117.
- (60) Fromm MF. Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk. *Toxicology* 2002;181-182:299-303.

- (61) Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:285-307.
- (62) Maggio-Price L, Shows D, Waggle K, Burich A, Zeng W, Escobar S, et al. *Helicobacter bilis* infection accelerates and *H. hepaticus* infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (*mdr1a*^{-/-}) mice. *Am J Pathol* 2002;160(2):739-751.
- (63) Lovell RA. Ivermectin and piperazine toxicoses in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990;20(2):453-468.
- (64) Mealey KL. Adverse drug reactions in herding-breed dogs: The role of P-glycoprotein. *Compendium on Continuing for the Practicing Veterinarian* 2006;28(1):23-33.
- (65) See AM, McGill SE, Rasis AL, Swindells KL. Toxicity in three dogs from accidental oral administration of a topical endectocide containing moxidectin and imidacloprid. *Aust Vet J* 2009;87(8):334-337.
- (66) Beasley VR, Dorman DC. Management of toxicoses. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990;20(2):307-337.
- (67) Wright HM, Chen AV, Talcott PA, Poppenga RH, Mealey KL. Intravenous fat emulsion as treatment for ivermectin toxicosis in three dogs homozygous for the ABCB1-1 Delta gene mutation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*; 2011, 666-672 2011.
- (68) Crandell DE, Weinberg GL. Moxidectin toxicosis in a puppy successfully treated with intravenous lipids. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009;19(2):181-186.
- (69) Rothschild L, Bern S, Oswald S, Weinberg G. Intravenous lipid emulsion in clinical toxicology. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2010;18:51-7241-18-51.
- (70) Jamaty C, Bailey B, Larocque A, Notebaert E, Sanogo K, Chauny JM. Lipid emulsions in the treatment of acute poisoning: a systematic review of human and animal studies. *Clin Toxicol (Phila)* 2010;48(1):1-27.
- (71) Loo TW, Clarke DM. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J Membr Biol* 2005;206(3):173-185.
- (72) Henthorn TK, Liu Y, Mahapatro M, Ng KY. Active transport of fentanyl by the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289(2):1084-1089.
- (73) Geyer J, Janko C. Treatment of MDR1 Mutant Dogs with Macrocyclic Lactones. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13(6):969-986.

- (74) Brownlee DJA, Holden-Dye L, Walker RJ. Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology* 1997;115(5):553-561.
- (75) Holden-Dye L, Walker RJ. Avermectin and avermectin derivatives are antagonists at the 4-aminobutyric acid (GABA) receptor on the somatic muscle cells of *Ascaris*; is this the site of anthelminthic action? *Parasitology* 1990;101(2):265-271.
- (76) Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS, Eary CH, Suhayda D, Cifelli S, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B 1(a) component. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;15(3):372-378.
- (77) Ostlind DA, Cifelli S, Lang R. Insecticidal activity of the anti-parasitic avermectins. *Vet Rec* 1979;105(8):168-168.
- (78) Arena JP, Liu KK, Paress PS, Frazier EG, Cully DF, Mrozik H, et al. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: Correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J Parasitol* 1995;81(2):286-294.
- (79) Mealey KL. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: Heartworm prevention and pharmacogenetics. *Vet Parasitol* 2008;158(3):215-222.
- (80) Novotny MJ, Krautmann MJ, Ehrhart JC, Godin CS, Evans EI, McCall JW, et al. Safety of selamectin in dogs. *Vet Parasitol* 2000;91(3-4):377-391.
- (81) Paul AJ(1), Firkins LD(1), Hutchens DE(2), Borgstrom M(3). Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the ivermectin-sensitive collie. *Vet Parasitol* 2004;121(3-4):285-291.
- (82) Fink DW, Porras AG. Pharmacokinetics of Ivermectin in Animals and Humans. In: Campbell WC, editor. *Ivermectin and Abamectin*. first ed.: Springer-Verlag; 1989. p. 122.
- (83) Barbet JL, Snook T, Gay JM, Mealey KL. ABCB1-1 Delta (MDR1-1 Delta) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. *Veterinary Dermatology*; 2009.20: (2), 111-114 2009.
- (84) Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992;267(34):24248-24252.
- (85) Beishuizen A, Thijs LG. Relative adrenal failure in intensive care: an identifiable problem requiring treatment? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15(4):513-531.

- (86) Hinshaw LB, Beller BK, Chang AC, Murray CK, Flournoy DJ, Passey RB, et al. Corticosteroid/antibiotic treatment of adrenalectomized dogs challenged with lethal *E. coli*. *Circ Shock* 1985;16(3):265-277.
- (87) Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, et al. Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(4):512-520.
- (88) Zandvliet M, Rutteman GR, Teske E. Prednisolone inclusion in a first-line multidrug cytostatic protocol for the treatment of canine lymphoma does not affect therapy results. *Vet J* 2013.
- (89) Allenspach K, Bergman PJ, Sauter S, Gröne A, Doherr MG, Gaschen F. P-glycoprotein expression in lamina propria lymphocytes of duodenal biopsy samples in dogs with chronic idiopathic enteropathies. *J Comp Pathol* 2006;134(1):1-7.
- (90) Watanabe T(1), Miyauchi S(1), Sawada Y(1), Iga T(1), Hanano M(1), Sugiyama Y(1), et al. Kinetic analysis of hepatobiliary transport of vincristine in perfused rat liver. Possible roles of P-glycoprotein in biliary excretion of vincristine. *J Hepatol* 1992;16(1-2):77-88.
- (91) Wils P(1), Phung-Ba V, Warnery A(1), Lechardeur D(1), Raeissi S(2), Hidalgo IJ(2), et al. Polarized transport of docetaxel and vinblastine mediated by P-glycoprotein in human intestinal epithelial cell monolayers. *Biochem Pharmacol* 1994;48(7):1528-1530.
- (92) Harker WG, Bauer D, Etiz BB, Newman RA, Sikic BI. Verapamil-mediated sensitization of doxorubicin-selected pleiotropic resistance in human sarcoma cells: selectivity for drugs which produce DNA scission. *Cancer Res* 1986;46(5):2369-2373.
- (93) Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 1990;42(3):155-199.
- (94) Jette L, Murphy GF, Leclerc J-, Beliveau R. Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries. *Biochem Pharmacol* 1995;50(10):1701-1709.
- (95) Ohnishi T(1), Tamai I(1), Sakanaka K(1), Sakata A(1), Tsuji, A. (1,3), Yamashima T(2), et al. In vivo and in vitro evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier. *Biochem Pharmacol* 1995;49(10):1541-1544.
- (96) Mealey KL, Fidel J, Gay JM, Impellizeri JA, Clifford CA, Bergman PJ. ABCB1-1Δ Polymorphism Can Predict Hematologic Toxicity in Dogs Treated with Vincristine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008;22(4):996.

- (97) Vail DM. Supporting the Veterinary Cancer Patient on Chemotherapy: Neutropenia and Gastrointestinal Toxicity. *Topics in Companion Animal Medicine* 2009;24(3):122-129.
- (98) Schuetz EG, Yasuda K, Arimori K, Schuetz JD. Human MDR1 and mouse *mdr1a* P-glycoprotein alter the cellular retention and disposition of erythromycin, but not of retinoic acid or benzo(a)pyrene. *Arch Biochem Biophys* 1998;350(2):340-347.
- (99) Hofslie E, Nissen-Meyer J. Reversal of drug resistance by erythromycin: erythromycin increases the accumulation of actinomycin D and doxorubicin in multidrug-resistant cells. *Int J Cancer* 1989;44(1):149-154.
- (100) Kiso S-, Shao HC, Kitaichi K, Furui N, Takagi K, Takagi K, et al. Inhibitory effect of erythromycin P-glycoprotein-mediated biliary excretion of doxorubicin in rats. *Anticancer Res* 2000;20(5):2827-2834.
- (101) Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995;96(4):1698-1705.
- (102) Yokogawa K, Takahashi M, Tamai I, Konishi H, Nomura M, Moritani S, et al. P-glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharm Res* 1999;16(8):1213-1218.
- (103) Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. P-glycoprotein-mediated transcellular transport of MDR-reversing agents. *FEBS Lett* 1993;324(1):99-102.
- (104) Kusuhara H, Suzuki H, Terasaki T, Kakee A, Lemaire M, Sugiyama Y. P-Glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283(2):574-580.
- (105) Wetterich U, Spahn-Langguth H, Mutschler E, Terhaag B, Rösch W, Langguth P. Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: concentration- and dose-dependent absorption in vitro and in vivo. *Pharm Res* 1996;13(4):514-522.
- (106) Soldner A, Benet LZ, Mutschler E, Christians U. Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and caco-2 cell monolayers. *Br J Pharmacol* 2000;129(6):1235-1243.
- (107) Callaghan R, Riordan JR. Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* 1993;268(21):16059-16064.
- (108) Uhr M, Holsboer F, Müller MB. Penetration of Endogenous Steroid Hormones Corticosterone, Cortisol, Aldosterone and Progesterone into the Brain is Enhanced in Mice Deficient for Both *mdr1a* and *mdr1b* P-Glycoproteins. *J Neuroendocrinol* 2002;14(9):753-759.

- (109) Kavallaris M, Madafiglio J, Norris MD, Haber M. Resistance to tetracycline, a hydrophilic antibiotic, is mediated by P- glycoprotein in human multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;190(1):79-85.
- (110) Ito T(1), Yano I(1), Tanaka K(1), Inui, K.-I. (1,2). Transport of quinolone antibacterial drugs by human P-glycoprotein expressed in a kidney epithelial cell line, LLC-PK1. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282(2):955-960.
- (111) Cvetkovic M, Leake B, Fromm MF, Wilkinson GR, Kim RB. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab Disposition* 1999;27(8):866-871.
- (112) Collett A, Higgs NB, Sims E, Rowland M, Warhurst G. Modulation of the permeability of H2 receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288(1):171-178.
- (113) Jonsson O, Behnam-Motlagh P, Persson M, Henriksson R, Grankvist K. Increase in doxorubicin cytotoxicity by carvedilol inhibition of P-glycoprotein activity. *Biochem Pharmacol* 1999;58(11):1801-1806.
- (114) Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75(1):13-33.
- (115) Boyd RA, Stern RH, Stewart BH, Wu X, Reyner EL, Zegarac EA, et al. Atorvastatin coadministration may increase digoxin concentrations by inhibition of intestinal P-glycoprotein-mediated secretion. *J Clin Pharmacol* 2000;40(1):91-98.
- (116) Orlowski S, Valente D, Garrigos M, Ezan E. Bromocriptine modulates P-glycoprotein function. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244(2):481-488.
- (117) Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, et al. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* 1999;16(3):408-414.
- (118) TAKARA K, TANIGAWARA Y, KOMADA F, NISHIGUCHI K, SAKAEDA T, OKUMURA K. Cellular Pharmacokinetic Aspects of Reversal Effect of Itraconazole on P-Glycoprotein-Mediated Resistance of Anticancer Drugs. *Biol Pharm Bull* 1999;22(12):1355-1359.
- (119) Barnes KM, Dickstein B, Cutler GB, Fojo T, Bates SE. Steroid transport, accumulation, and antagonism of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *Biochemistry* 1996;35(15):4820-4827.
- (120) Cancer multidrug resistance. *Nat Biotechnol* 2000; Suppl:IT18-20.

- (121) Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 1992;255(5043):459-462.
- (122) Nationalencyklopedin. Transformation. Available at: <http://www.ne.se/lang/transformation/330494>. Accessed 05/11, 2013.
- (123) Mealey KL, Barhoumi R, Rogers K, Kochevar DT. Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line. *Cancer Lett* 1998;126(2):187-192.
- (124) Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970;30(4):1174-1184.
- (125) Barnes DM. Expression of P-glycoprotein in the chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2001;130(2):301-310.
- (126) Longley M, Phua SH, van Stijn TC, Crawford AM. Isolation and mapping of the first ruminant multidrug resistance genes. *Anim Genet* 1999;30(3):207-210.
- (127) Natalinil CC, Linardil RL. Identification of multi-drug resistance gene (MDR1) in equine ileum. *Ciência Rural* 2006;36(1):298-300.
- (128) Bruenisholz H, Kupper J, Muentener CR, Dally A, Kraemer T, Naegeli H, et al. Treatment of ivermectin overdose in a miniature Shetland Pony using intravenous administration of a lipid emulsion. *J Vet Intern Med* 2012;26(2):407-411.
- (129) Waters J, Dhare V, Benjamin A, Sekar A, Kumar A, Prahalad S, et al. A practical and novel method to extract genomic DNA from blood collection kits for plasma protein preservation. *J Vis Exp* 2013 (75) doi: 10.3791/4241.
- (130) Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Recombinant DNA Technology. In: Carlson G, editor. *Essentials of genetics*. 6th edition ed.: Pearson international edition; 2007. p. 390-393.
- (131) Rozen S, Skaletsky H. Primer3. Available at: <http://primer3.sourceforge.net/history.php>. Accessed 11/15, 2013.
- (132) Life technologies. Applied Biosystem. Available at: <http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/brands/applied-biosystems.html>. Accessed 10/25, 2013.
- (133) Life technologies. Genemapper Software 5.0. 2012; Available at: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4476603A.pdf>. Accessed 10/25, 2013.

- (134) Nussbaum R, McInnes R, Willard H. The Human Genome and the Chromosomal Basis of Heredity. In: Dimock K, Thiel M, editors. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 7th edition ed.: Saunders Elsevier; 2007. p. 6-7.
- (135) Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Population Genetics. In: Carlson G, editor. Essentials of Genetics. 6th edition ed.: Pearson education; 2007. p. 490-491, 492.
- (136) Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Mendelian Genetics. In: Carlson G, editor. Essentials of Genetics. Sixth Edition ed.: Pearson International Edition; 2007. p. 41.
- (137) Kawabata A, Momoi Y, Inoue-Murayama M, Iwasaki T. Canine *mdr1* gene mutation in Japan. *J Vet Med Sci* 2005;67(11):1103-1107.
- (138) Hugnet C, Bentjen SA, Mealey KL. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 2004.27: 4, 227-229. 2004.
- (139) Mealey KL, Bentjen SA, Waiting DK. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of Collies from the northwestern United States. *American Journal of Veterinary Research*; 2002.63: 4, 479-481. 2002.
- (140) Mealey KL, Munyard KA, Bentjen SA. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary Parasitology*; 2005.131: 3/4, 193-196. 2005.
- (141) Pekcec A, E.L. Schneider, Baumgärtner W, V.M. Stein, Tipold A, Potschka H. Age-dependent decline of blood–brain barrier P-glycoprotein expression in the canine brain. *Neurobiol Aging*;32:1477-1485.
- (142) Vanapalli SR(1), Hung Y-(1), Fleckenstein L(1), Dzimianski MT(2), McCall JW(2). Pharmacokinetics and dose proportionality of oral moxidectin in beagle dogs. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 2002;23(7):263-272.
- (143) Lallemand E(1), Bousquet-Melou A, Toutain, P.-L. (1,3), Lespine A(2), Alvinerie M(2). Estimation of absolute oral bioavailability of moxidectin in dogs using a semi-simultaneous method: Influence of lipid co-administration. *J Vet Pharmacol Ther* 2007;30(5):375-380.
- (144) C. Tengs. Levealder hos hund i Norge. Oslo: Norges veterinærhøyskole; 1999.
- (145) Nationalencyklopedin. Autosom. Available at: <http://www.ne.se/lang/autosom>. Accessed 10/22, 2013.

(146) Felleskatalogen. Stronghold. 2012; Available at:
<http://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/stronghold-pfizer-564195>. Accessed 10/31,
2013.

Vedlegg

1. Utlisting av databasen

2. Medforfattererklæring

Medforfattererklæring (en pr student)

Som medforfattere for følgende fordypningsoppgave:
Mutasjonsfrekvensen i Multidrug resistance 1 (MDR1) gen hos collie i Norge

Skrevet av:
 Josefin Hultman, Evalinn Pedersen og Linda Nordin

Bekrefter vi at følgende student:
 Josefin Hultman
 har bidratt i arbeidet med over nevnte fordypningsoppgave som angitt i tabellen under:

Vancouver-kriterier*		Er dette kriteriet oppfylt for denne studenten? (Ja eller Nei)	Denne studentens bidrag i denne delen av oppgaven er (omtrentlig %andel)
1 (a, b eller c) og 2 (a eller b) og 3 må være oppfylt for å kvalifisere til forfatterskap for en vitenskapelig artikkel			
1a	Vesentlig bidrag til ide og planlegging av oppgaven	Ja	33%
1b	Vesentlig bidrag til å framskaffe de data oppgaven bygger på	Ja	33%
1c	Vesentlig bidrag i analyse og tolkning av data	Ja	50%
2a	Vesentlig bidrag i skriveprosessen	Ja	40%
2b	Kritisk evaluering av innholdet i oppgaven	Ja	30%
3	Gjennomlesing og godkjenning av den endelig versjon av oppgaven	Ja	25%

Merknader:

Dato, navn, signatur og mobiltelefon til alle forfatterne:

Dato:	Navn: Josefin Hultman	Signatur:	Mob: 41373442

*Medforfattererklæringen er laget med utgangspunkt i *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.icmje.org/index.html>)

Medforfattererklæring (en pr student)

Som medforfattere for følgende fordypningsoppgave:
Mutasjonsfrekvensen i Multidrug resistance 1 (MDR1) gen hos collie i Norge

Skrevet av:
 Josefin Hultman, Evalinn Pedersen og Linda Nordin

Bekrefter vi at følgende student:
 Evalinn Pedersen
 har bidratt i arbeidet med over nevnte fordypningsoppgave som angitt i tabellen under:

Vancouver-kriterier*		Er dette kriteriet oppfylt for denne studenten? (Ja eller Nei)	Denne studentens bidrag i denne delen av oppgaven er (omtrentlig %andel)
1 (a, b eller c) og 2 (a eller b) og 3 må være oppfylt for å kvalifisere til forfatterskap for en vitenskapelig artikkel			
1a	Vesentlig bidrag til ide og planlegging av oppgaven	Ja	33%
1b	Vesentlig bidrag til å framskaffe de data oppgaven bygger på	Ja	33%
1c	Vesentlig bidrag i analyse og tolkning av data	Ja	25%
2a	Vesentlig bidrag i skriveprosessen	Ja	20%
2b	Kritisk evaluering av innholdet i oppgaven	Ja	40%
3	Gjennomlesing og godkjenning av den endelig versjon av oppgaven	Ja	50%

Merknader:

Dato, navn, signatur og mobiltelefon til alle forfatterne:

Dato:	Navn: Evalinn Pedersen	Signatur:	Mob: 41070346

*Medforfattererklæringen er laget med utgangspunkt i *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.icmje.org/index.html>)

Medforfattererklæring (en pr student)

Som medforfattere for følgende fordypningsoppgave:
Mutasjonsfrekvensen i Multidrug resistance 1 (MDR1) gen hos collie i Norge

Skrevet av:
 Josefin Hultman, Evalinn Pedersen og Linda Nordin

Bekrefter vi at følgende student:
 Linda Nordin
 har bidratt i arbeidet med over nevnte fordypningsoppgave som angitt i tabellen under:

Vancouver-kriterier*		Er dette kriteriet oppfylt for denne studenten? (Ja eller Nei)	Denne studentens bidrag i denne delen av oppgaven er (omtrentlig %andel)
1 (a, b eller c) og 2 (a eller b) og 3 må være oppfylt for å kvalifisere til forfatterskap for en vitenskapelig artikkel			
1a	Vesentlig bidrag til ide og planlegging av oppgaven	Ja	33%
1b	Vesentlig bidrag til å framskaffe de data oppgaven bygger på	Ja	33%
1c	Vesentlig bidrag i analyse og tolkning av data	Ja	25%
2a	Vesentlig bidrag i skriveprosessen	Ja	40%
2b	Kritisk evaluering av innholdet i oppgaven	Ja	30%
3	Gjennomlesing og godkjenning av den endelig versjon av oppgaven	Ja	25%

Merknader:

Dato, navn, signatur og mobiltelefon til alle forfatterne:

Dato:	Navn: Linda Nordin	Signatur:	Mob: 41377139

*Medforfattererklæringen er laget med utgangspunkt i *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.icmje.org/index.html>)