

ence of the age of honey bee queens and dose of semen on condition of instrumentally inseminated queens kept in cages with 25 worker bees in bee colonies. *J. Apic. Sci.* 52, 23-33. **3. Chuda-Mickiewicz B.**, 1998 – Wychów matek i trutni. [W:] *Pszczelnictwo* (red. J. Prabucki). Wyd. Promocyjne „Albatros”, Szczecin. **4. Chuda-Mickiewicz B., Prabucki J.**, 1998 – The effect of rearing queens from eggs and larvae. *Pszczeln. Zesz. Nauk.* 42 (2), 27-28. **5. Chuda-Mickiewicz B., Ostrowski T., Prabucki J.**, 1993 – Przewodnik do zajęć kursowych na tytuł: Wykwalifikowany pszczelarz i mistrz pszczelarski. WODR Barzkowice. **6. Eckert J.E.**, 1934 – Studies in the number of ovarioles in queen honeybees in relation to body size. *J. Econ. Entomol.* 27 (3), 629-635. **7. Gąbka J.**, 2009 – Wychów matek pszczelich metodą Jentera. *Pszczelarstwo* 6, 12-13. **8. Gąbka J.**, 2013 – The number of spermatozoa in the spermatheca and the onset of oviposition in naturally mated and instrumentally inseminated honey bee queens. XXXVIII Internat. Apicult. Congress Apimondia. Kijów, Ukraina, 141. **9. Gąbka J., Madras-Majewska B., Kamiński Z., Ochnio M., Hońko S.**, 2009 – The influence of open brood in rearing colonies on eggs acceptance in different egg age. *Ann. Warsaw Univ. of Life Sc. – SGGW, Anim. Sci.* 46, 59-62. **10. Gąbka J., Kamiński Z., Madras-Majewska B.**, 2010 – The influence of development stage of brood used for rearing honeybee queens on the number of obtained queen cells. *Rocz. Nauk. PTZ* 6 (4), 241-245. **11. Gąbka J., Ochnio M., Kamiński M., Madras-Majewska B.**, 2011 – Effect of age of eggs used for rearing honey bee queens on the number of received queen cells. *J. Apic. Sci.* 55 (1), 47-52. **12. Gąbka J., Zajdel B., Skorupka M., Ostaszewska T., Kamaszewski M.**, 2014 – Effect of honey flow on acceptance of bee eggs at different age in rearing colonies. *Med. Weter.* 70 (12), 760-761. **13. Gąbka J., Muszyńska R., Zajdel B.**, 2016 – Number of spermatozoa in the spermatheca of honey bee queens inseminated with small doses of semen and kept in an incubator in cages with different numbers of workers. *Med. Weter.* 72(8), 488-490. **14. Harizanis P.C.**, 1991 – Infestation of queen cells by the mite *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 22, 533-538. **15. Hoopingarner R., Farrar C.L.**, 1959 – Genetic control of size in queen honey bees. *J. Econ. Entomol.* 52 (4), 547-548. **16. Jenter K.**, 1983 – Eine neue Königinnen-Zuchtmethod aus dem Ei oder der Eilarve im „Umsteckverfahren“. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* 4, 101-103. **17. Jordan R.**, 1960 – Die Zucht der Königin, ausgehend vom Ei. *Bienenwatter* 81 (1), 3-7. **18. Mackensen O.**, 1964 –

Relation of semen volume to success in artificial insemination of queen honey bees. *J. Econ. Entomol.* 57, 581-583. **19. Örosi Pal Z.**, 1964 – Die Eierstocke der Bienenköniginnen nach ihrer Aufzuchtmethod. *Deutsche Bienenwirtschaft* 15, 11, 225-228. **20. Ostrowska W.**, 1974 – Gospodarka pasieczna. PWRiL, Warszawa. **21. Pidek A.**, 1987 – Wychów matek pszczelich. PWRiL, Warszawa. **22. Pidek A.**, 1992 – Wpływ metod wychowu na jakość matek pszczelich. *Pszczelarstwo* 6, 11. **23. Pidek A.**, 1999 – Metody wychowu matek pszczelich. *Sądecki Bartnik, Stróże*. **24. Sieger R.**, 1983 – Das Zuchtverfahren Jenter auf dem Prüfstand. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* 10, 312-317. **25. Skowronek W., Skubida P.**, 1988 – Wpływ warunków wewnętrznych rodziny wychowującej i sposobu poddawania larw na liczbę i jakość uzyskanych matek. *Pszczeln. Zesz. Nauk.* 32, 3-18. **26. Soczek Z.**, 1965 – Wpływ niektórych metod wychowu matek pszczelich na liczbę ich rurek jajnikowych. *Pszczeln. Zesz. Nauk.* 9, 63-76. **27. Tworek A.**, 1986 – Ramka Jentera to postęp w hodowli. *Pszczelarstwo* 3, 5-7. **28. Weaver N.**, 1957 – Effect of larval age on dimorphic differentiation of the female honey bee. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 50 (3), 283-294. **29. Weiss K.**, 1969 – Zuchtstoffalter und Königinnenausbildung. XXII Internat. Beekeep. Congres, 616-619. **30. Wilde J.**, 2002 – Produkcja mleczka pszczelego bez przekładania larw. *Biuletyn Naukowy* 18 (5), 107-112. **31. Winston M.L.**, 1987 – The biology of the honey bee. Harvard Univ. Press. Cambridge, London. **32. Woyke J.**, 1960 – Naturalne i sztuczne unasienianie matek pszczelich. *Pszczeln. Zesz. Nauk.* 6, 183-275. **33. Woyke J.**, 1962 – Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee Wld* 43, 21-25. **34. Woyke J.**, 1971 – Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination. *J. Apicult. Res.* 10 (1), 45-55. **35. Woyke J.**, 1987 – The cause of inclining of honeybee eggs in comb cells. XXXI Internat. Apicult. Congress Apimondia, Warszawa, 181. **36. Woyke J., Jasiński Z.**, 1979 – Number of worker bees necessary to attend instrumentally inseminated queens kept in incubator. *Apidologie* 10, 149-155. **37. Woyke J., Jasiński Z.**, 1980 – Influence of the number of attendant workers on the results of instrumental insemination of honeybee queens kept at room temperature. *Apidologie* 11, 173-180. **38. Woyke J., Jasiński Z.**, 1982 – Influence of the number of attendant workers on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated queens kept outdoors in mating nuclei. *J. Apicult. Res.* 21, 129-133.

Miopatia ze spichrzaniem polisacharydów (PSSM) u konia domowego

Patrycja Parzyszek, Joanna Gruszczyńska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt

Rabdomioliza (azoturia) to miopatia, która może prowadzić do niewydolności nerek, a także zaburzeń pracy serca. Chorobę tę charakteryzuje niszczenie mięśni szkieletowych [7]. Może ona występować w dwóch formach – **sporadycznej oraz przewlekłej**. Takie jednostki chorobowe jak miopatia ze spichrzaniem polisacharydów (PSSM) czy nawracający rozpad mięśni szkieletowych (RER) powodują postać przewlekłą [8]. W 1992 roku dr Stephanie Valberg zdiagnozowała PSSM jako przyczynę rabdomiolizy wysiłkowej u koni. Od tego czasu chorobę stwierdzono u ponad 30 ras konia domowego [1, 15]. Pierwsze były jednak zdiagnozowane konie rasy AQH (american quarter horse) oraz ras pokrewnych i to właśnie u AQH oraz american paint horse odnotowuje się najwyższą częstość wy-

stępowania tej choroby. Od 1995 roku badania dotyczące diagnostyki, przyczyn oraz sposobu leczenia PSSM finansuje American Quarter Horse Association (AQHA) [4].

Opis choroby – typy PSSM

Miopatia ze spichrzaniem polisacharydów (Polysaccharide Storage Myopathy – PSSM) jest dziedziczną chorobą dotyczącą konie różnych ras i w różnym wieku. Dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący, a charakteryzuje ją nieprawidłowe gromadzenie się glikogenu oraz pochodnych polisacharydów w mięśniach szkieletowych [4, 6]. Zaburzenia te prowadzą do gromadzenia się niedostępnego biologicznie wielocukru w glikolitycznych włóknach mięśniowych typu 2 (szybko kurczących się) [3]. Leczenie polega na stosowaniu diety wysokotłuszczowej bogatej w błonnik, o niskiej zawartości skrobi, w połączeniu z wysiłkiem fizycznym. Przeprowadzone do tej pory badania wykazały, że wyróżnia się dwa typy PSSM – typ 1 (PSSM1) oraz typ 2 (PSSM2).

PSSM1 warunkowany jest przez zmutowany gen *GYS1*. Forma niezmutowana koduje syntazę glikogenu (glycogen synthase – GS). Mutacja ta polega na zamianie argininy na histydynę w kodonie 309, co skutkuje wytwarzaniem zmienionej formy syntazy glikogenu. W niektórych przypadkach zaobserwowano również występowanie mutacji związanej z receptorem rianodyny (*RYR1*), odpowiedzialnej za złośliwą hipertermię koni [3, 10]. Badania przeprowadzone przez Valberg i wsp. [16, 17] wykazały, że konie dotknięte PSSM, których nie karmiono paszą wysokotłuszczową o niskiej zawarto-

Tabela 1

Częstość występowania PSSM u dziewięciu ras koni i kuców, z podziałem na płęć [19]

Rasa	Liczba	PSSM +		PSSM –		PSSM + (%)
		♂	♀	♂	♀	
Zimnokrwiste	7	4	2	0	1	86
Morgan	11	4	3	1	3	64
Czysta krew arabska	34	11	10	6	7	62
Kuce	8	4	1	1	2	62
Appaloosa	16	5	4	2	5	56
Tennessee walking horse	6	1	2	2	1	50
Quarter horse	68	16	12	25	15	41
Paint	27	4	5	9	9	33
Gorącokrwiste	14	4	0	5	5	28
Pełna krew angielska	22	4	2	10	6	27

ści skrobi, miały 1,8 razy wyższe stężenie glikogenu w mięśniach, stwierdzono także deficyt energii podczas pracy oraz utrzymującą się zwiększoną aktywność kinazy kreatynowej.

Badania genetyczne setek koni ze zdiagnozowaną miopatią ze spichrzaniem polisacharydów wykazały, że nie zawsze przyczyną choroby była mutacja genu *GYS1*. Osobniki te określono jako typ 2 (PSSM2), a diagnozę oparto na biopsji mięśni, która wykazała skupiska glikogenu mięśniowego. Choć do tej pory nie stwierdzono przyczyn PSSM2, w większości przypadków zalecenia dotyczące postępowania z chorymi osobnikami były takie, jak w typie 1 [4].

Predyspozycje rasowe

Najwyższą częstość występowania choroby notuje się u koni rasy quarter horse i pokrewnych, paint oraz gorącokrwistych. Valentine i Cooper [19] przeprowadzili badania na 225 koniach i kucach. Największy udział osobników dotkniętych PSSM zanotowano u koni zimnokrwistych – 86% (6 na 7 zbadanych osobników). Wśród badanych najczęściej było koni rasy quarter horse, z których 41% (28 osobników) zdiagnozowano jako PSSM-pozytywne. Dane dla ras, u których zanotowano 6 lub więcej przypadków PSSM przedstawiono w tabeli 1.

Badania przeprowadzone przez innych autorów wykazały, że spośród 1251 koni z podejrzeniem choroby nerwowo-mięśniowej, aż u 40% zdiagnozowano PSSM. W badaniach uwzględniono 50 ras koni, wśród których aż 63% osobników zdiagnozowanych jako PSSM-pozytywne było rasy quarter horse i pokrewnych, 12% to konie zimnokrwiste, a 9% – gorącokrwiste [9, 18].

Objawy kliniczne

Objawy kliniczne występują w obu typach choroby i pojawiają się w momencie wzrostu aktywności kinazy kreatynowej (CK), zazwyczaj do poziomu ponad 20 000-40 000 U/l, a nawet ponad 100 000 U/l, przy normie 300 U/l [3]. Choroba może objawiać się z różną intensywnością – od łagodnej sztywności do silnego bólu i kurczu mięśni [3]. Stwierdzono, że średni wiek pojawienia się objawów klinicznych PSSM różni się w zależności od rasy: u koni quarter horse około 5. roku życia, u ras gorącokrwistych około 7. roku życia, a u ras zimnokrwistych około 8. roku życia [15].

Najczęstszym obserwowanym objawem jest nietolerancja wysiłkowa. Równie często notuje się sztywność mięśni, postępującą kulawizną kończyn miednicznych, podwyższoną częstotliwość oddechów, pocenie się, ból mięśni [15] oraz mioglobiniurię [3, 12]. Partie mięśniowe najsilniej dotknięte objawami chorobowymi to mięsień zadu (pośladkowy), mięśnie półbłoniasty i półścięgnisty oraz mięsień najdłuższy grzbietu [15].

W tabeli 2. przedstawiono objawy kliniczne zaobserwowane u 250 koni różnych ras i typów dotkniętych PSSM oraz stężenie kinazy kreatynowej (CK) i transaminazy asparaginowej (AST), których poziom wraz z dehydrogenazą mleczanową (LDH) w surowicy może być podwyższony, szczególnie gdy występuje wysiłkowa rhabdomyoliza, bądź gdy próbki bada się w 4-6 godzin po wysiłku [20]. Podczas przeprowadzonych badań ustalono, że częstość występowania choroby nie jest

Tabela 2

Objawy kliniczne i klinikopatologiczne u różnych ras koni z PSSM [20]

Rasa/typ	Typowe objawy kliniczne (w kolejności malejącej)	CK/AST
Pogrubione	Nieprawidłowy ruch kończyn miednicznych Słabe umięśnienie zadu, grzbietu lub ogólnej budowy Słaba wydajność / brak energii Nietolerancja (ćwiczeń) ruchu Ciężka rhabdomyoliza Spontaniczne leżenie z niezdolnością do podniesienia się Epizodyczne kolki	Zazwyczaj w normie do nieznacznie podwyższonego. Znaczący wzrost związany z ciężką rhabdomyolizą AST>500 U/l wskazuje na PSSM
Pokrewne quarter horse	Rhabdomyoliza wysiłkowa Nieprawidłowy ruch kończyn miednicznych Wady postawy pod siodłem Słaba wydolność / brak energii Powracające bóle Epizodyczne kolki Ogólny zanik mięśni	Może być bardzo wysoki u koni z rhabdomyolizą wysiłkową, zwłaszcza gdy zbadano 4-6 h po wysiłku. Zostanie prawidłowa lub nieznacznie wzrosła u koni z innymi objawami
Gorącokrwiste	Słaba wydolność / brak energii Wady postawy pod siodłem Powracające bóle Nieprawidłowy ruch kończyn miednicznych Rhabdomyoliza wysiłkowa Epizodyczne kolki	Jak u pokrewnych quarter horse
Czysta krew arabska	Rhabdomyoliza wysiłkowa Słaba wydolność / brak energii Nieprawidłowy ruch kończyn miednicznych	Jak u pokrewnych quarter horse
Pełna krew angielska i kłusaki amerykańskie	Rhabdomyoliza wysiłkowa Słaba wydolność / brak energii Nieprawidłowy ruch kończyn miednicznych Wady postawy pod siodłem (folbluty)	Jak u pokrewnych quarter horse
Amerykański koń miniaturowy	Słabe umięśnienie Brak energii	Trwały wzrost od łagodnego do umiarkowanego
Inne rasy	Niektóre lub wszystkie powyższe	Niektóre lub wszystkie powyższe

*CK – kinaza kreatynowa; AST – transaminaza asparaginowa

zależna od płci, jednak radbomioliza wysiłkowa występuje częściej u klaczy z PSSM, natomiast nieprawidłowy ruch kończyn miednicznych, charakteryzujący się drzeniem, częściej występuje u samców.

Diagnostyka

Okolo 80% przypadków PSSM możliwe jest do rozpoznania podczas przesiewowego testu wysiłkowego [3], jednak ostateczną diagnozę można postawić po wykonaniu mikroskopowej oceny biopsji mięśni lub badań genetycznych. W zależności od rasy konia z podejrzeniem PSSM, postępowanie diagnostyczne jest różne (rys. 1).

Test wysiłkowy. To pierwsze badanie diagnostyczne, jakie można wykonać. Wysiłek polega na tym, że koń porusza się przez 15 minut stępem i klusem na lonży. Krew pobiera się dwukrotnie – przed rozpoczęciem oraz 4-6 godzin po zakończonym wysiłku. Próbkę poddaje się analizie w kierunku poziomu kinazy kreatynowej (CK) i transaminazy asparaginianowej (AST). Górna granica stężenia CK i AST wynosi odpowiednio 350 U/l i 425 U/l [19]. U zdrowych osobników poziom aktywności CK nie zmienia się, natomiast u chorych poziom obu enzymów różni się w zależności od rasy: u american quarter horse po 4 godzinach od testu podwyższony jest minimum trzykrotnie, a u ras zimnokrwistych i gorąckrwistych wartości te mieszczą się w normie lub są nieznacznie podwyższone (tab. 3).

Tabela 3

Powysiłkowe wartości CK i AST u różnych ras koni [19]

Rasa koni	Poziom enzymu (U/l)	
	CK	AST
Gorąckrwiste	323	331
Zimnokrwiste	459	537
American quarter horse	2809	1792

Badania genetyczne. Diagnostyka molekularna opiera się na analizie krwi lub próbek włosów. Do laboratorium diagnostycznego należy dostarczyć 3-7 ml krwi pobranej do próbkówki z K₂EDTA. Włosy (minimum dwadzieścia z grzywy lub ogona) należy wyrwać wraz z nieuszkodzonymi cebulkami i umieścić w szczelnie zamykanej kopercie lub woreczku foliowym. Zarówno krew, jak i włosy należy oznaczyć danymi konia i właściciela [15].

Analiza bioinformatyczna genu *GYS1* – badania własne

W Katedrze Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW przeprowadzono analizę bioinformatyczną sekwencji genu *GYS1*, którego mutacje są odpowiedzialne za wystąpienie PSSM u konia domowego. W analizie zastosowano program BLAST [2], Primer 3 V 0.4.0 [13] oraz NEBCutter V 2.0 [21].

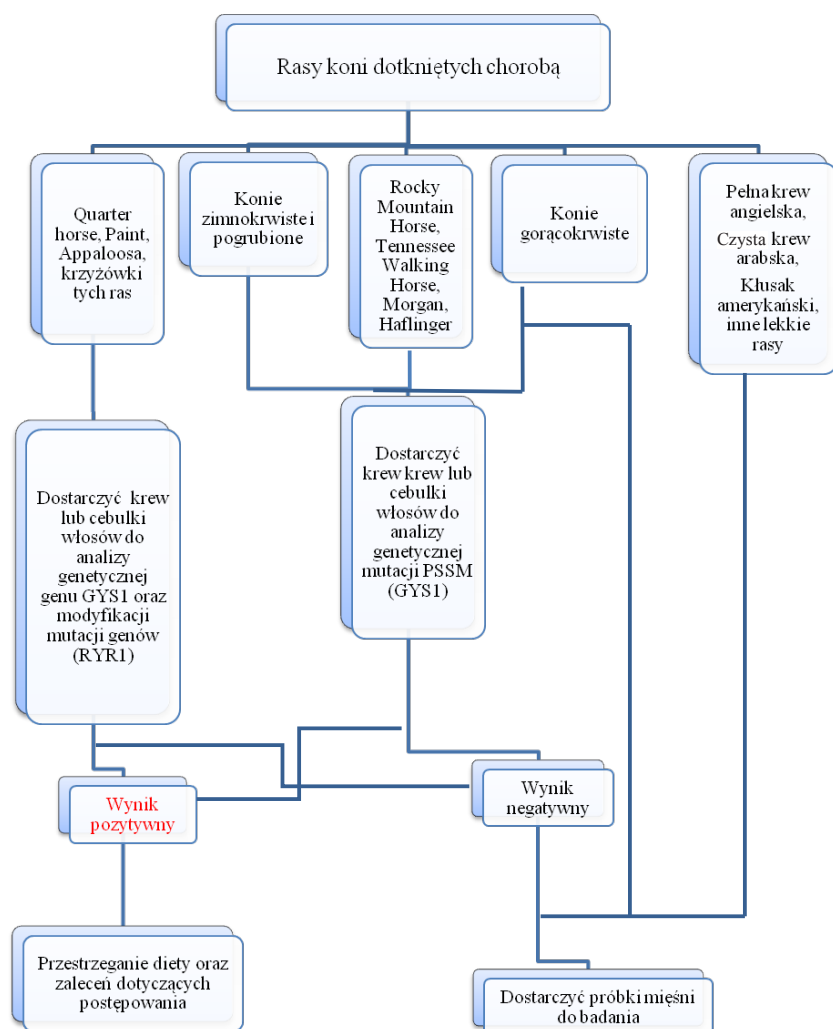
Celem było zaprojektowanie odpowiedniego enzymu restrykcyjnego, który rozpozna miejsce mutacji badanego genu.

Gen *GYS1* zlokalizowany jest w chromosomie 10 konia domowego, a w banku genów sekwencję zdeponowano pod numerem EU373802.1. Porównanie sekwencji nukleotydowych osobnika zdrowego i chorego wykazało różnice pod względem nukleotydu 926. Mutacja odpowiedzialna za PSSM polega na substytucji G926 vs A926.

Na rysunku 2. przedstawiono porównanie sekwencji aminokwasowych osobnika zdrowego i chorego. Obie sekwencje wykazują różnice w kodonie 309 – u osobnika zdrowego w sekwencji aminokwasowej syntetyzowana jest arginina (Arg309), a u osobnika chorego histydyna (Hist309) – rysunek 3.

W celu amplifikowania sekwencji badanego genu programem Primer 3 V.0.4.0. zaprojektowano startery do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy – lewy starter: TCTCTGCCATGCATGAGTTC, prawy starter: ATGATGAA-GAAGGCGACCAC. Przewidywana amplifikowana sekwencja powinna mieć długość 244 pz, a bez starterów 210 pz; do jej przecięcia użyto enzymu *Cvi*All, a fragmenty restrykcyjne rozdzielono *in silico* w 2% żelu agarowym. W wyniku przeprowadzenia analizy restrykcyjnej *in silico* otrzymano fragment długości 35 pz i 175 pz.

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna różniła się od wykonanej przez McCue i wsp. [11]. Cytowani autorzy wykorzystali sekwencję o długości 230 pz, która posiadała miejsca restrykcyjne dla enzymu *Hpy*CH4V, fragmenty restryk-



Rys. 1. Postępowanie w przypadku badań diagnostycznych, rekomendowane przez laboratorium diagnostyczne przy University of Minnesota (<https://cvm.msu.edu/research/faculty-research/valberg-laboratory/type-1-polysaccharide-storage-myopathy#11.-how-do-i-know-if-i-should-do-the-genetic-test-or-the-muscle-biopsy?>)

zdrowy (...) 901 AAGGCCCGAATCCAGGAGTTTGTGCGTGGCCATTTTTATGGGCACCTGGACTTCAACTTG 960
 ||||||||||||||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 chory 901 AAGGCCCGAATCCAGGAGTTTGTGCATGGCCATTTTTATGGGCACCTGGACTTCAACTTG 960 (...)

Rys. 2. Porównanie sekwencji nukleotydowej EU373802.1 osobnika zdrowego i chorego (wykonano programem BLAST [2])

zdrowy (...) 301 KARIQEFVHGAFYGHLDNFNLDKTLTYFFIAGRYEFSNKGADVFLAALARLNYLLRVNGSEQ 360
 KARIQEFVHG FYGHLDNFNLDKTLTYFFIAGRYEFSNKGADVFLAALARLNYLLRVNGSEQ
 chory 301 KARIQEFVHGHFYGHLDNFNLDKTLTYFFIAGRYEFSNKGADVFLAALARLNYLLRVNGSEQ 360 (...)

Rys. 3. Porównanie fragmentu sekwencji aminokwasowej osobnika zdrowego i chorego (wykonano programem BLAST [2])

cyjnie rozdzielono w 3% żelu agarowym, używając starterów – lewy starter: TGAAACATGGGACCTTCTCC, prawy starter: AGCTGTCCCCTCCCTTAGAC. Dzięki tym różnicom wykazano większe możliwości diagnostyki molekularnej mutacji genu *GYS1*, odpowiedzialnej za wystąpienie PSSM u konia domowego.

Badania histologiczne. Inną metodą diagnostyczną jest wykonanie biopsji mięśni. Stosowana jest ona w przypadkach, gdy nie stwierdzono mutacji *GYS1* (PSSM2), a występują objawy chorobowe oraz gdy mamy do czynienia z przedstawicielem rasy, u której nie stwierdzono do tej pory występowania tej mutacji [3].

Próbka pobierana jest z mięśnia półbłoniastego lub półścięgienistego. Najlepsze miejsce do pobrania bioptatu znajduje się w połowie odległości pomiędzy guzem kulszowym a początkiem ścięgna Achillesa, na wysokości warg sromowych – nacięcie (o wymiarach: 5 cm długości, 1,5 cm wysokości i 1,5 cm szerokości) wykonuje się równoległe do włókien mięśniowych. Zwierzę poddaje się sedacji i znieczuleniu miejscowemu [20]. Świeża próbka powinna być owinięta gazą zamoczoną w soli i umieszczona w twardym, wodoszczelnym pojemniku, obłożona lodem i dostarczona w ciągu nocy. Próbkę można również utrwalić w formalinie [15].

Do przeprowadzenia badania histologicznego stosuje się barwienie PAS, które ma na celu określenie ilości cukru zmagazynowanego w mięśniach w postaci glikogenu [4]. Wynik barwienia próbek PSSM-pozytywnych wykazuje obecność wakuoli pod sarkolemmą, intensywnie fioletowo zabarwiony glikogen mięśniowy oraz amylazooporne PAS-dodatnie nieprawidłowe ciała wtrętowe we włóknach mięśniowych typu 2 – szybko kurczących się. Często zauważalne jest także zróżnicowanie wielkości włókien mięśniowych, jąderka, a także martwica komórek mięśniowych [15, 16].

Uważa się, że zmiany patologiczne nasilają się u koni wraz z wiekiem. Aby zminimalizować ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych, próbki pobiera się od koni, które skończyły drugi rok życia. U młodych osobników, u których nie rozwinęły się jeszcze polisacharydy amylazooporne, jako kryterium oceny bioptatu można przyjąć obecność amylazowrażliwego glikogenu. Przy stosowaniu tej metody, na 1400 biopsji mięśniowych koni z chorobami nerwo-mięśniowymi liczba zdiagnozowanych miopatii ze spichrzaniem polisacharydów wzrosła z 22 do 40% [11].

Postępowanie kliniczne

Leczenie miopatii ze spichrzaniem polisacharydów polega na wprowadzeniu właściwej diety w połączeniu z aktywnością fizyczną. Najlepsza jest dieta o wysokiej zawartości tłuszczu

i małej zawartości skrobi, która pomaga ustabilizować poziom cukru we krwi oraz stężenie insuliny [14]. Regularny, odpowiednio dobrany wysiłek fizyczny ma na celu zwiększenie zdolności oksydacyjnych mięśni szkieletowych [3].

Zdaniem Soderqvist i wsp. [15] oraz Harris i Rivero [5] poziom tłuszczu i skrobi w diecie powinien

wynosić: $\geq 13\%$ energii strawnej (ES) tłuszczu i $< 10\%$ ES skrobi [15] lub $> 13\%$ ES tłuszczu i $< 15\%$ ES skrobi, jednak lepsze efekty terapii osiągnąć się przy wartościach $> 15\%$ ES tłuszczu i $< 10\%$ ES skrobi [5]. Ribeiro i wsp. [14] stwierdzili, że najlepsze efekty daje dieta o zawartości tłuszczu 13% i skrobi 4% energii strawnej. Według Davis [3] poziom tłuszczu powinien oscylować w granicach 20-25% całkowitej wartości kalorycznej, tj. 2-3-krotnie więcej niż w przypadku paszy podawanej zdrowym koniom, a zawartość skrobi nie powinna przekraczać 15% dziennej dawki kalorii. Autorka ta uważa, że pasza powinna zawierać 12-17% białka, co ma wspomagać odbudowę mięśni. Ponadto zaleca suplementację witaminy E (1000 IU/dzień) oraz seleniu (1-2 mg/dzień). W tabeli 4. podano zalecane wartości dawki pokarmowej dla konia o masie ciała 500 kg chorego na PSSM.

Tabela 4

Zalecana wartość dawki pokarmowej dla konia o masie ciała 500 kg przy różnej intensywności wysiłku [18]

Wartość odżywcza i energetyczna	Niepracujące	Wysiłek		
		lekki	umiarkowany	intensywny
Energia strawna – ES (Mcal/dzień)	16,4	20,5	24,6	32,8
Węglowodany niestrukturalne (% ES)	<10	<10	<10	<10
Tłuszcz (% ES)	20	20	15-20	15-20
Pasza (% masy ciała)	1,5-2,0	1,5-2,0	1,5-2,0	1,5-2,0
Białko (g/dzień)	697	767	836	906
Wapń (g)	30	33	36	39
Fosfor (g)	20	22	24	26
Sód (g)	22,5	33,5	33,8	41,3
Chlor (g)	33,8	50,3	50,6	62
Potas (g)	52,5	78,3	78,8	96,4
Selen (mg)	1,88	2,2	2,81	3,13
Witamina E (IU)	375	700	900	1000

Dla koni dotkniętych miopatią ze spichrzaniem polisacharydów najistotniejsze są pierwsze 4 miesiące od rozpoczęcia terapii. Jeśli po tym czasie nie odnotowana zostanie poprawa, konieczne może być wprowadzenie bardziej „agresywnych” metod. Aby ocenić skuteczność leczenia, zalecane jest wykonanie powtórnych badań krwi, w celu określenia aktywności CK i AST [20].

Dieta

Pasza chorego konia powinna zawierać komponenty o obniżonej zawartości skrobi i wysokiej ilości tłuszczu. Podstawę powinna stanowić zielonka bądź kisonka pastwiskowa [18]. Ponadto zwierzęciu należy zapewnić dobrej jakości sia-

no, w ilości równej 2% jego masy ciała [3]. Osobnikom z nadwagą należy ograniczyć dostęp do zielonki pastwiskowej, a ilość siana obniżyć do wartości równej 1% masy ciała [15]. Do polecanych składników, które charakteryzują się dużą zawartością tłuszczu należą: śruta ryżowa, olej kukurydziany lub inny olej roślinny, a także spraye zawierające wysuszone dodatki tłuszczowe [3]. Do surowców paszowych, które nie są polecane dla obciążonych wadliwym genem osobników należą owies [20] oraz kukurydza, która zawiera 71% węglowodanów niestrukturalnych [3].

Wysiłek fizyczny

Po zapewnieniu odpowiedniego czasu adaptacji do diety, chorego osobnika można ponownie wdrażać do pracy. Należy jednak stosować się do poniższych zaleceń. Do 48 h po wystąpieniu objawów należy ograniczyć zwierzęciu ruch, a następnie stopniowo wydłużać czas spędzany na pastwisku [18]. Po wdrożeniu konia do pracy należy zapewnić regularność wysiłku, ponieważ pozostawienie konia w boksie ponad 12 h/dzień zwiększa prawdopodobieństwo rozpadu mięśni prążkowanych [3]. Ponowne wprowadzanie konia do ruchu należy rozpocząć od pracy na lonży bądź round-penie, co pozwoli osiągnąć wydłużenie linii grzbietu, opuszczenie głowy, a także ograniczyć ganaszowanie, a pracę z ziemią powinno się zaczynać od czterech minut składających się z dwuminutowych interwałów stęp – klus. Okres ten należy codziennie wydłużać o 2 minuty, aż do 30 minut w trzecim tygodniu. Dopiero po tym czasie można wprowadzać pracę pod siodłem [18].

Stosowanie odpowiednich składników paszowych i przestrzeganie zaleceń dotyczących wprowadzenia konia do ponownego treningu wpływają na polepszenie kondycji fizycznej konia i jego ogólnej budowy ciała.

Literatura: 1. Aleman M., 2008 – A review of equine muscle disorders. *Neuromuscular Disorders* 18, 277-280. 2. Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome). 3. Davis E.G., 2015 – Przyczyny rozpadu mięśni szkieletowych u dorosłych koni. Cz. I. Choroby najczęściej występujące po wysiłku. *Magazyn Wet.* 217, 438-441. 4. Finno C.J., Spier S.J., Valberg S.J., 2009 – Equine diseases caused by known genetic mutations. *Vet. J.* 179, 336-347. 5. Harris P.A., Rivero J.L., 2013 – Exercise-associated muscle disorders. *Equine*

applied and clinical nutrition. Health, welfare and performance. Wyd. Saunders Elsevier. ISBN 978-0-7020-3422-0; pp. 521-535. 6. Larcher T., Herszberg B., Molon-Noblot S., Guigand L., Chaffaux S., Guerin G., Chereil Y., 2008 – Polysaccharide Storage Myopathy in Cob Normand Draft Horses. *Vet. Pathology* 45 (2), 154-158. 7. López J.R., Linares L., Cordovez G., Terzig A., 1995 – Elevated myoplasmic calcium in exercise-induced equine rhabdomyolysis. *Pflügers Archiv* 430, 293-295. 8. MacLeay J.M., Valberg S.J., Pagan J.D., De La Corte F., Roberts J., Billstorm J., McGinnity J., Kaese H., 1999 – Effect of diet Thoroughbred horses with recurrent exertional rhabdomyolysis performing a standardised exercise test. *Equine Vet. J.* 30, 458-462. 9. McCue M.E., Ribeiro W.P., Valberg S.J., 2006 – Prevalence of polysaccharide storage myopathy in horses with neuromuscular disorders. *Equine Vet. J.* 36, 340-344. 10. McCue M.E., Valberg S.J., Jackson M., Borgia L., Lucio M., Mickelson J.R., 2009 – Polysaccharide storage myopathy phenotype in quarter horse-related breeds is modified by presence of an *RYR1* mutation. *Neuromuscular Disorders J.* 19 (1), 37-43. 11. McCue M.E., Valberg S.J., Lucio M., Mickelson J.R., 2008 – Glycogen Synthase 1 (*GYS1*) Mutation in Diverse Breeds with Polysaccharide Storage Myopathy. *J. Vet. Internal Med.* 22, 1228-1233. 12. McCue M.E., Valberg S.J., Miller M.B., Wade C., DiMauro S., Akman H.O., Mickelson J.R., 2008 – Glycogen synthase (*GYS1*) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. *Genomics* 91 (5), 458-466. 13. Primer 3 V 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>). 14. Ribeiro W.P., Valberg S.J., Pagan J.D., Essen Gustavsson B., 2004 – The effect of varying dietary starch and fat content on serum creatine kinase activity and substrate availability in equine polysaccharide storage myopathy. *J. Vet. Internal Med.* 18, 887-894. 15. Soderqvist E., Svanholm C., Nautrup Olsen S., Leifsson P.S., 2013 – Equine polysaccharide storage myopathy. A necropsy study of 60 danish horses. *Dansk Veterinærtidsskrift* 2, 26-31. 16. Valberg S.J., Cardient G.H. III, Carlson G.P., DiMauro S., 1992 – Polysaccharide storage myopathy associated with recurrent exertional rhabdomyolysis in horses. *Neuromuscular Disorders* 2 (5-6), 351-359. 17. Valberg S.J., Macleay J.M., Billstrom J.A., Hower-Moritz M.A., Mickelson J.R., 1999 – Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with 'tying-up' due to polysaccharide storage myopathy. *Equine Vet. J.* 31, 43-47. 18. Valberg S.J., 2006 – Polysaccharide Storage Myopathy. *American Association of Equine Practitioners Proceedings* 52, 373-380. 19. Valentine B.A., Cooper B.J., 2005 – Incidence of Polysaccharide Storage Myopathy: Necropsy Study of 225 Horses. *Vet. Pathology* 42, 823-827. 20. Valentine B.A., 2005 – Diagnosis and Treatment of Equine Polysaccharide Storage Myopathy. *J. Equine Vet. Sci.* 25, 52-61. 21. Vincze T., Posfai J., Roberts R.J., 2003 – NEBcutter: cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31, 3688-3691.

Polysaccharide storage myopathy (PSSM) in the domestic horse

Summary

Polysaccharide storage myopathy is a hereditary disease occurring in horses of various breeds and ages. It is characterized by abnormal accumulation of glycogen and polysaccharide derivatives in the skeletal muscles. The most common symptoms of the disease are exercise intolerance, muscle stiffness, progressive lameness of the rear limbs, increased breathing rate, sweating, and muscle pain. Proper diagnostics can identify individuals carrying the mutant gene and eliminate them from breeding, so that the population with the mutant allele of the *GYS1* gene remains under control. The aim of the analyses was to design a suitable restriction enzyme that will recognize the mutation site of the gene *GYS1*, mutations of which are responsible for the occurrence of PSSM in the domestic horse. A bioinformatic analysis of sequence of the gene was performed. The use of the newly designed primers should result in an amplified sequence 244 bp in length (210 bp without primers). The enzyme *CviAI* enzyme was used to cut it in silico to obtain fragments of 35 bp and 175 bp. Owing to these differences, greater potential for molecular diagnostics of the *GYS1* gene mutation responsible for PSSM in the domestic horse was demonstrated. The disease is not treated pharmacologically. Analgesics are administered to reduce pain, but they do not alleviate the disease symptoms. The only treatment is a diet low in starch and rich in fat in combination with regular, gradually increasing exercise.

KEY WORDS: Polysaccharide storage myopathy (PSSM), *GYS1* gene, domestic horse