

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állattenyésztési, Takarmányozástani
és Laborállat-tudományi Intézet

**Egyes genetikai faktorok szerepe a lovak terheléses
rhabdomyolízisének kialakulásában Erdély egy bizonyos régiójában**

*Genetic factors of equine exertional rhabdomyolysis in a region of
Transylvania*

Készítette:

Szalai Sarolta

V. évfolyam Állatorvostan-hallgató

Témavezető:

Dr. Korbacska-Kutasi Orsolya

egyetemi adjunktus

Állattenyésztési, Takarmányozástani
és Laborállat-tudományi Intézet

Budapest

2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1 A rhabdomiolízis	3
2.1.1 Előzmény.....	3
2.1.2 A bántalom kialakulásának háttere.....	3
2.1.3 A betegség tünetei.....	4
2.1.4 Kórjelzés.....	4
2.2 Rhabdomiolízisek besorolása	5
2.3 Genetikai hátterű rhabdomiolízisek	6
2.3.1 Poliszacharid tárolási miopátia – PSSM.....	6
2.3.2 PSSM-re hajlamos lófajták.....	8
2.3.3 Malignus hyperthermia.....	9
2.3.4 Glikogén összekapcsoló enzimhiány – GBED.....	11
2.4 Rhabdomiolízis terhelésre jelentkező egyéb formái	11
2.4.1 Időszakosan jelentkező rhabdomiolízis.....	11
2.4.2 Visszatérő terheléses rhabdomiolízis.....	12
2.5 Egyéb előzetes terhelés nélkül jelentkező miopátiák	13
2.5.1 Takarmányozási tényezők.....	13
3. CÉLKITŰZÉSEK	14
4. ANYAG és MÓDSZER	15
4.1 A kutatás helye.....	15
4.2 A lovak kiválasztásának módja, kiválasztott egyedek jellemzői.....	15
4.3 Az adatgyűjtés módszerei.....	17
4.3.1 Mintavétel a lovak sörényéből.....	17
4.3.2 Mintavétel izombiopszia által.....	18
5. EREDMÉNYEK	21
5.1 A genetikai teszt eredményei.....	21
5.2 A szövettani vizsgálatok eredményei.....	22
5.2.1 A PAS-festés eredményei.....	22
5.2.2 Azan-festés eredményei.....	24
5.3 Eredmények összegzése.....	25
6. MEGBESZÉLÉS	26
6.1 A genetikai vizsgálatok eredményeinek értékelése.....	26
6.2 A szövettani vizsgálatok eredményeinek értékelése.....	28
6.3 A betegség kialakulásában közrejátszó egyéb lehetséges tényezők.....	28
6.4 A kísérlet hiányosságai.....	29
6.5 Javaslatok a tulajdonosoknak.....	30
7. ÖSSZEFOGLALÁS	31
8. SUMMARY	32
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33
10. IRODALOMJEGYZÉK	34

1. BEVEZETÉS

A különféle izombetegségek régóta észlelt és kutatott problémák lovak esetében. Izmok fájdalmaságával, merevségével és izomfestékvizeléssel járó miopátiák főleg versenylovak és munkalovak esetében jelentenek nagy problémát, ugyanis itt nem csak az állat számára kellemetlenek, de a tulajdonosoknak anyagi kárt is okoznak.

Erdély Hargita megyéjében, egy jól körülírt területen endémiásan jelen van a mioglobínuriával járó, megterhelő munka után jelentkező pünkösdi betegség. A betegség előfordulása 800 méter felett helyezkedő két településen, Szentegyházán és Kápolnásfalun 17-13%, míg az alacsonyabban (800 méter alatt) fekvő Homoródfürdő és Lövétén nem haladja meg a 2%-ot és a betegség megjelenése is általában enyhébb.

Mivel ezen a területen a lovakat főleg mezőgazdasági munkákra és erdőkitermelésre használják, komoly gazdasági kárt, vagy akár megélhetési nehézséget okoz a tulajdonosoknak amennyiben lovuk megbetegszik.

A vizsgálathoz 2 csoportot alkottunk, az egyikben a 800 m feletti településekről voltak lovak, a másikban az alacsonyabb fekvésű falvakból. Ezekről az állatoktól sörénymintákat vettünk és elküldtük egy nemzetközi akkreditált laboratóriumba genotipizálásra, két mioglobínurias izombetegségért felelőssé tehető genetikai mutáció jelenlétének ellenőrzésére. Ez a két betegség a szénhidrát-tárolási izombetegség, és a malignus hyperthermia. Az kutatásban résztvevő lovak egy részétől izombiopsziákat is vehettünk, melyeket szövettani analízisnek vetettünk alá.

Kutatásunk célja kideríteni, hogy egyéb tényezők figyelembe vétele mellett genetikai háttér részben vagy teljesen felelőssé tehető-e a régióban nagy arányban előforduló megbetegedésekért.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A Rhabdomyolízis

2.1.1 Előzmény

Egyes szerzők szerint lovasok és állatorvosok már a 19. században is írtak le megterhelésre jelentkező rhabdomyolízises tüneteket igavonó lovaknál, azoturiának nevezve a jelenséget. Akkori leírások szerint a tünetek közé izzadás, remegés, izomgörcsök és fájdalmas mozgás tartoztak. Megfigyelték hogy ezek leggyakrabban nagy megterheléssel járó munkát követő pihenési időszakban jelentkeznek, ezért elnevezték „Monday morning disease”-nek, vagyis „hétfő reggeli bántalom”-nak. A 19. és 20. század körüli feljegyzések szerint ezen esetekben a mortalitás csaknem 50%-os volt. Itt még az ok nem volt tisztázott, azonban idővel felfedezték hogy az említett tünetegyüttes mioglobinuriával jár, és további kutatásokba kezdtek (VALBERG, 2013).

2.1.2 A bántalom kialakulásának háttere

Mint minden egyéb állat, a lovak is energiaforrásként glikogént raktároznak a májukban illetve izmaikban, hogy szükség esetén glükózzá tudják bonatni és energia előállításához hasznosítani (WUNDERLICH, SZARKA,2014). A lovak testtömegének 44-53%-ka izomtömeg. Az izmok nagy mennyiségű glikogént tartalmaznak, amelynek felhalmozódását kiváltképp elősegítheti a szénhidrátokban gazdag takarmányok etetése (BAKOS, 2012). Hosszabb pihenő időszakot követő megerőltető munka során átmenet nélküli megterhelésről hatására, az izombeli kapillárisok lassan nyílnak meg, ezzel helyi oxigénhiányt okozva. Egy elmélet szerint a felhalmozódott glikogén az izomösszehúzódások hatására anaerob glükolízisnek indul, emiatt az izomrostok közt nagy mennyiségű tejsav képződik, melynek hatására azok megduzzadnak, elnyomják a bomlástermékeket elszállító hajszálereket, így a káros anyagok az izmokban felhalmozódnak, s ennek hatására izomrostok elhalnak, és izomfesték (mioglobin) oldódik ki és a vérpályába, majd a vizeletbe kerül (mioglobinuria) (GYÖRGY, 2013). Azonban újabb kísérletek alapján, melyek nehéz munkát követően hasonlítottak össze rhabdomyolízises és tünetmentes lovakat, kimondható hogy a tejsav önmagában nem tehető felelőssé az izomfestékvizelésért, mert mindkét csoportban hasonló tejsav szinteket mértek, melyek nem voltak összefüggésben a kreatinin-kináz aktivitás mértékével (MACLEAY, 1999).

2.1.3. A betegség tünetei

A terheléses rhabdomyolízis tipikus tünetei közé tartoznak a merev, kényszeredett mozgás, kemény, feszült farizmok és hátizmok, izzadás, megemelkedett légzésszám, izomfestékvizelés. A tünetek súlyossága függ a bánatalom kialakulásának okától, egyéni hajlamosságoktól is. Tipikusan pihenő utáni megterhelésre jelentkeznek, azonban előfordul, hogy verseny miatti izgalom hatására, vagy szállítás után tapasztalják őket (OGLESBY, 2012). Fizikai vizsgálat közben kiváltképp a gluteális régió fájdalmas tapintatú, esetenként olyan mértékű fájdalommal járhat, hogy kólikás tünetekkel is összetéveszthető. Szcintigráfiai vizsgálatok során a legnagyobb károsodás szimmetrikusan a m.gluteus, m.semitendinosus és m.semimembranosus izmokban detektálható. A fájdalom általában órákig tart, súlyos esetben tachycardiával, hyperthermiával járó állapot keringésösszeomlással is járhat, míg az izomfestékvizelés vesetubulushámkárosodást okozhat. (VALBERG, 2015).

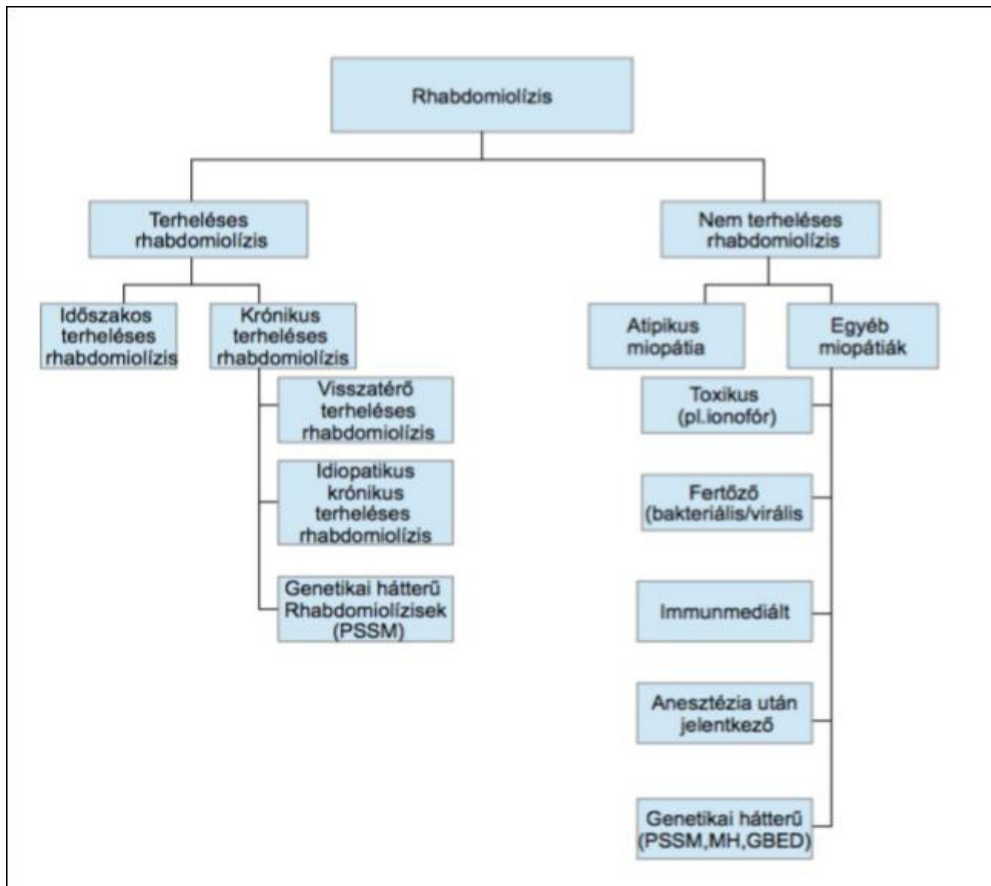
2.1.4 Kórjelzés

Izomfestékvizelés, izomfájdalmak és merevség esetén fontos első lépésként fontos a kórelőzmény áttekintése, fordultak-e már elő hasonló tünetek máskor. Szintén jelentősége van a ló származásának, aktuális takarmányozásának, tartási körülményeinek, illetve milyen mértékben van munkára használva és milyen gyakran. Ezt követően tanácsos fizikai vizsgálatot végezni, vizeletmintát gyűjteni (M.REED és mtsai, 2010). Vizelet tesztcsíki is használható, azonban csak más vérvizsgálati eredményekkel együtt értékelhető, mert nem tesz különbséget a mioglobinn és hemoglobinnal szemben (MCUE M és mtsai, 2008).

Vérvétel után szérumban kreatinin-kináz (CK), aszpartám-transzamináz (AST) és laktáz (LDH) aktivitás mérése illetve az állat elektrolit-egyensúlyának vizsgálata is segíti a diagnózis felállítását. Az enzimek koncentrációja a vérben függ az izomkárosodás súlyosságától, illetve a mintavétel idejétől a tünetek megjelenéséhez képest (HUNT LM és mtsai, 2008). Emelkedett enzimszintek a károsodást követő 4. órától nagyjából az azt követő 24. óráig felfedezhetőek a szérumban, majd a szérumból először a CK, majd a LDH és legutoljára az AST ürül (MCUE M és mtsai, 2008).

Végül ajánlott izombiopsziát venni a m.gluteus medius, m.semimembranosus vagy egyéb érintett izomból a károsodás mértékének vizsgálatára (M.REED és mtsai). További vizsgálatok közé tartoznak az elektromiográfia, ultrasonográfia és terheléses tesztek melyek további információt adnak az izmok állapotáról (VALBERG, 2009).

A különféle izombetegségek egy lehetséges felosztását az **1.Ábra** mutatja.



1. **Ábra** : Rhabdomyolízisek besorolása felnőtt lovakban (KEEN, 2011).

2.2 Rhabdomyolízisek besorolása

Az izomfajulással járó betegségeket több tényező is okozhatja. Elkülönítjük a terhelésre, és nem terhelésre jelentkező formákat. A terhelésre jelentkező bántalmak közül elkülöníthető az időszakos, illetve krónikus rhabdomyolízis. Az időszakos formát általában rendszertelen edzés, túlhajtás, hőstressz és felborult elektrolitháztartási egyensúly okozhatja. A krónikus betegség háttérében lehet visszatérő terheléses vagy idiopátiás izomfajulás, Poliszacharid-tárolási miopátia, takarmányozási tényezők. A nem terhelésre létrejövő izomfestékvizelés okozója lehet : szelén- és E-vitamin hiány, genetikai faktor mint a PSSM, glikogén összekapcsoló enzim hiány, altatás hatására jelentkező malignus hyperthermia, toxikus hatások, baktériumok vagy vírusok okozta fertőzések (ALEMAN, 2008).

2.3 Genetikai háttérű rhabdomiolízisek

2.3.1 Poliszacharid tárolási miopátia – PSSM

A poliszacharid tárolási miopátiát legelőször Stephanie J. Valberg kutatta Quarterhorse fajtájú lovaknál, 1992-ben. A betegség lényege, hogy abnormális mennyiségű komplex poliszacharid képződik a vázizmok közt, melynek hatására zavarok lépnek fel a glikogén szintézisében, a glikolízisben valamint a glikogenolízisben. (VALBERG és mtsai, 2005).

A tudomány jelenlegi állása szerint a betegségnek két típusa van, a PSSM 1-es típusnál genetikai faktorok állnak a háttérben, a PSSM 2-es típusánál a tünetek kialakulásának háttere még nem tisztázott, diagnózisa csak izombiopsziát követő kórszöveti vizsgálattal igazolható (KÓSA és mtsai, 2015).

A PSSM-el rendelkező lovaknál előfordulhat egyszeri, vagy visszatérő rhabdomiolízis mely terhelésre, vagy anélkül is jelentkezhet. További tünetek lehetnek: gyengeség, merevség, izomgörcsök, fájdalmak, hát fájdalom, tömeges izmok atrófiája. A szérumban előfordulhat megterhelés hatására jelentkező emelkedett kreatinin-kináz enzimszint, mely időnként pihenő időszakban is a normálnál magasabban maradhat. Rendszeres mozgás, és munka előtti hosszú pihenő periódusok hajlamosítanak a klinikai tünetek megjelenésére. Előfordul azonban az is, hogy a miopátiával rendelkező egyedek tünetmentesek maradnak (FIRSHMAN és mtsai, 2003).

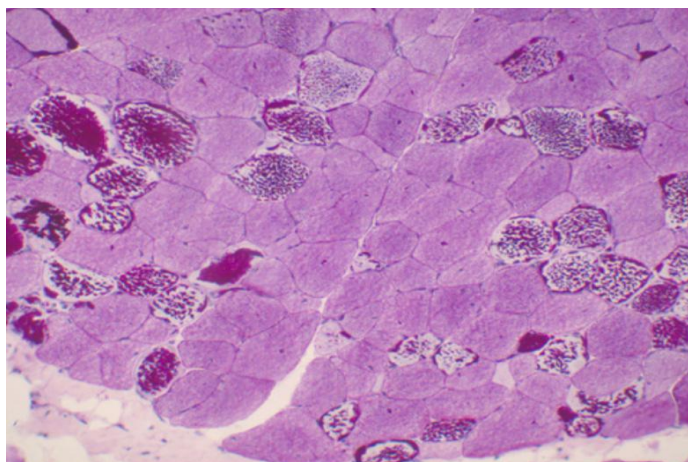
Egy több mint 50 fajtájú lovat vizsgáló kutatás szerint a PSSM 1 gyakorlatilag bármilyen típusú lóban előfordulhat, gyakoribbak azonban a Quarterhorse, Painthorse, Appaloosa fajtáknál, illetve igavonó és azokkal keresztezett „sodrott” típusú lovaknál (MCUE és mtsai, 2006). Quarter lovaknál a fajta képviselőinek nagyjából 6-12 %-ánál fordul elő (MCUE és mtsai, 2007), míg Belga hidegvérű lovak esetében a PSSM előfordulása 36%-ra tehető (FIRSHMAN és mtsai, 2005).

Az elmúlt időszak kutatásai szerint genetikai mutáció tehető felelőssé a PSSM I-es típusának kialakulásáért. Pontosabban, a vázizom glikogén szintáz (GYS1) gén pontmutációjáról van szó, melynek során egy arginin aminosav helyére hisztidin kerül ami emelkedett alap glikogén szintáz aktivitást eredményez (MCUE és mtsai 2008). Ennek a genetikai hibának felfedezése megerősítette, hogy a PSSM 1-es autoszomális domináns tulajdonságként öröklődik Quarter és egyéb fajtájú lovakban (HERSZBERG és mtsai, 2009).

A PSSM diagnózisa DNS vizsgálattal, illetve izombiopszia szövettani analízisével lehetséges.

A DNS analízis elvégzéséhez EDTA-val alvadásban gátolt vér, szőr vagy vázizomszövet minta szükséges, általában semimembranosus vagy semitendinosus izomból. A mintákat genetikával foglalkozó diagnosztikai laborba kell küldeni, ahol elvégzik a genotipizálást. A GYS1 génmutáció keresése esetén három lehetséges eredmény létezik: homozigóta a normál allélra (R/R), heterozigóta a mutációra (H/R) vagy homozigóta a mutációra (H/H) (MCUE és mtsai, 2008).

A PSSM mindkét típusa megállapítható izombiopsziából való szövettani metszet készítésével, és PAS festés alkalmazásával. A PSSM-es mintákban PAS-al pozitív színreakciót adó részletek vannak, melyek kevésbé elágazó béta-glükogén molekula tömbök az izomrostok közé ékelve. Ezek a tömbök rezisztensek az amilázzal való emésztésre, és gyakran perifascicularisan lokalizálódnak (ANNANDALE és mtsai, 2004). Jelenlegi állás szerint a PAS-pozitív amiláz rezisztens poliszacharid tömbök jelenléte a mintában a PSSM egyértelmű diagnózisát jelenti. Egyes szerzők szerint azonban jelen lehetnek subsarcolemmálisan amiláz-szenzitív glikogén aggregátumok, illetve amiláz-szenzitív centrális testek a citoplazmában melyekben glikogén van, és emellett nem okvetlenül törvényszerű hogy amiláz rezisztens komplexumokat is találunk melyek PAS festéssel kimutathatóak (VALENTINE, COOPER, 2005). Egy másik korlátozó faktor, hogy a komplexumok nem biztosan láthatóak a szövettani metszeteken 15 hónapos korig (DE LA CORTE és mtsai, 2002).



2. **Ábra:** PSSM-okozta PAS-pozitív poliszacharid zárványok a myoplasmában. (ALEMAN, 2008)

2.3.2 PSSM-re hajlamos lófajták

Kutatások szerint, a lovaknál előforduló PSSM 1 nagyobb gyakorisággal fordul elő Quarter, és hidegvérű illetve azokkal keresztezett lovakban. A betegség genetikailag bizonyított vagy nagy valószínűséggel feltételezhető szinte az összes tipikus igavonó fajtánál, úgymint Belga igás ló, Percheron, Shire, Clydesdale, Haflingi, Fríz, Norvég Fjord ló, az ezekkel keresztezett „sodrott” jellegű lovaknál illetve igavonó öszvéreknél is.

Ugyan a betegség más lovaknál is megtalálható, különösen gyakorinak és súlyosnak tűnik a hidegvérű fajták esetében. A sűrűbb előfordulást bizonyítja, hogy izombiopsziák alapján az összes igavonó fajta csaknem kétharmadánál bizonyítható poliszacharid komplexumok jelenléte a vázizmokban, melyek a PSSM 1-es vagy 2-es fajtájára utalnak (VALENTINE, 1998).

Ezeknél a lovaknál a tünetek olyan súlyosak is lehetnek, hogy könnyen összetéveszthetőek kólikával vagy akár vemhességi komplikációkkal. A PSSM okozta rhabdomiolízis ilyen jellegű manifesztációja valószínűleg azzal magyarázható, hogy a hidegvérű lovak sokkal nagyobb és masszívabb izomtömeggel rendelkeznek mint könnyebb háttas társaik, ennél fogva több energiára is van szükségük ezen vázizmok mozgatásához. A PSSM miatt felhalmozódott rendellenes poliszacharid tömbök nem képesek fiziológiásan kellő mennyiségű glükózzá bomlani, így nagy mértékű energiahány alakul ki, mely bomlástermékek és toxinok felhalmozódása miatt súlyos, nagy kiterjedésű izomkárosodást okoz a tömeges vázizmokban (VALENTINE, 1998).

Egy 1998-ban végzett kísérlet is alátámasztja a quarter és hidegvérű lovak fokozott hajlamát a PSSM okozta terheléses rhabdomiolízisre. A kutatásban Quarter és Percheron fajtákkal keresztezett angol telivérek akották az egyik, tisztavérű angol telivérek pedig a másik csoportot. A két csoport lovainál összehasonlították a terheléses rhabdomiolízis előfordulásának gyakoriságát illetve genetikai hátterét. Az eredmények bizonyították, hogy ugyan a tisztavérű angol telivéreknél is előfordult terhelésre jelentkező rhabdomiolízis illetve PSSM 1, de sokkal nagyobb arányban fordul elő a betegség illetve a genetikai PSSM 1 pozitivitás is a Percheron és Quarter befolyással rendelkező egyedeknél (SPRAYBERRY és mtsai, 1998). Összegezve tehát a PSSM 1-es típusa inkább hidegvérű fajtákra és Quarter befolyással rendelkező vérvonalakra jellemző (BAIRD és mtsai, 2010), míg a PSSM 2-es típusa arab- és angol telivéreknél, és félvéreknél fordul elő gyakrabban (WILBERGER és mtsai, 2015). Ezutóbbi esetében genetikai háttér hiányában csak invazív izombiopsziával lehetséges a kórjelzés (KÓSA és mtsai, 2015).

2.3.3 Malignus hyperthermia - (MH)

A malignus hyperthermia egy ritka örökletes rendellenesség, mely bizonyos indukáló faktorok hatására a vázizmok anyagcsere zavarát, és károsodását okozhatja, súlyos esetben halálos kimenetelű is lehet. Kiváltó tényezők lehetnek bizonyos gyógyszerek, mint például halogénezett inhalációs anesztetikumok (pl. halothan), depolarizáló neuromoszkuláris blokkolók (pl. szukcinilkolin), vagy nagyobb erőfeszítést igénylő munkavégzés és stressz (MCARTHY, 2004). A probléma okozója a RYR1 locuson található génmutáció, mely a myofibrillumokat körülvevő sarcoplasmicus reticulumon található ryanodin-1 receptor abnormális funkcionálását okozza. Több mint 300 változatról tudunk a RYR1-es mutációnak, és az European Malignant Hypothermia csoport kutatási eredményei szerint ezek közül 31-ről bizonyított, hogy malignus hypothermiát okoznak. A mutáció eredménye, hogy a receptor kalcium-felszabadító csatornaként kezd működni, és masszív kalcium koncentráció emelkedést okoz a myofibrillumok cytoplazmájában. A hirtelen megnövekvő Ca^{2+} ion koncentráció azonnal erőteljes, kiterjedő vázizom összehúzódást okoz, s ez felfokozott anyagcsere állapotot eredményez melyet intenzív hőtermelés, acidózis és hypercapnia jellemez és akár halálos kimenetelű is lehet (HUICHU, 2015).

Lovaknál legelőször az 1960-as években írtak le eseteket, melyekben a halothannal való inhalációs anesztézia megkezdése után, vagy röviddel az altatás befejezését követően megjelentek a tipikus tünetek (KLEIN, 1975). A malignus hyperthermia klinikai tünetei közé tartoznak az extrém magas testhőmérséklet, mely akár 43 Celsius fölé is emelkedhet, tachycardia, arrythmiák, szapora légzés, izzadás, izomgörcsök, rhabdomiolízis, emelkedett kreatinin-kináz enzimszint, myoglobinuria majd végül halál, gyorsan bekövetkező hullamerevséggel. A génmutációval rendelkező egyedeknél a fenti tünetek halogénezett anesztetikumok belélegeztetése mellett kiválthatóak szukcinilkolin, koffein beadásával, vagy sztrezzhelyzet előidézésével (pl. szállítás, verseny, kiállítás) illetve megerőltető fizikai munkával. Emellett a malignus hyperthermia kapcsolódhat egyes PSSM típusokhoz is (ALEMAN és mrsai, 2005). Az érintett állatok izmaiból vett minták jellemző szövettani elváltozásokat nem mutatnak (ALEMAN és mtsai, 2004).

A RYR1 mutációk közül nem mindegyik okoz az összes érzékenyítő faktor hatására ugyanolyan mértékű klinikai manifesztációt. Például a RYR1-es gén C7360 nukleotidján bekövetkező mutáció következményeit Quarter lovakon kutatták. A vizsgálat oka az volt, hogy megfigyelések szerint a mutáció inhalációs anesztézia során gyakran

okozott malignus hyperthermiát, azonban stressz faktorok, vagy fizikai megterhelés hatására nem tapasztaltak tüneteket az érintett lovaknál. 11, olyan lovat használtak, melyeknél tipikus tünetek léptek fel, és rhabdomyolízis után órákkal elhullottak. Vérmintákat és izomszövet mintákat vettek tőlük, illetve feltérképezték az állatok kórelőzményét és összehasonlították a pedigrijüket is. A kutatás eredménye az lett, hogy mind a gyógyszerek hatására megbetegedő, mind pedig a stressz és munkafaktorok hatására tüneteket produkáló lovak esetében megtalálható volt a RYR1-es gén C7360-as mutációja, azonban klinikai manifesztáció gyakrabban fordult elő inhalációs anesztézia , vagy depolarizáló neuromuscularis blokk hatására mint stressz vagy munkafaktorokra (ALEMAN és mtsai, 2009).

A malignus hyperthermia diagnosztikája lovak esetében különösen nehéz feladat, ugyanis ellentétben az embereknél és sertéseknél anesztézia során előforduló hirtelen kialakuló tünetekkel, lovaknál gyakran lassan fejlődnek ki, és csak órákkal az altatás vagy megerőltető fizikai aktivitás után kezdenek megjelenni. Szintén könnyű betegséget összetéveszteni egy másik genetikai mutáció által okozott tünetegyüttesel, a hyperkalaemiás időszakos bénulással, melyet a nátrium-csatornák megváltozott működése idéz elő. Hogyha az altatás alatt vagy után már megjelennek a malignus hyperthermiára utaló tipikus tünetek, akkor a prognózis meglehetősen rossz, mert a súlyos keringési és hőháztartási zavarok mellett a görcsös izomrángások izomgyulladás és töréseket is okozhatnak (HUICHU, 2015).

A betegségről előzetes diagnózis felállítása csak DNS-teszttel, vagy IVCT – in vitro contractilitás teszttel lehetséges. A teszt lényege, hogy izombiopsziát követően a minta izomrostjait halothannal, koffeinnel vagy más érzékenyítő faktorról kezelik, és megfigyelik az izomsejtek reakcióját. A probléma az IVCT teszttel az, hogy meglehetősen drága, és gyakran produkálhat fals pozitív vagy fals negatív eredményeket. Másik alternatívaként a malignus hyperthermia DNS-teszttel is diagnosztizálható, ehhez vérvétel szükséges melyet RYR1-mutációra specifikus DNS-analízisre kell küldeni. Ezesetben a diagnózis akkor megbízható, hogyha a 31 malignus hyperthermiát okozó RYR1 mutáció közül az egyik kimutatható a minta DNSéből. Amennyiben olyan RYR1 mutáció található a DNSben melyről még nem bizonyított, hogy okozhat-e malignus hyperthermiát, akkor indokolt IVCT teszt elvégzése is, és az eredmények összevetése a lehető legpontosabb diagnózis megalkotása érdekében (HUICHU, 2015). Eleinte nem írtak le nem, kor vagy fajta prediszpozíciót a betegségre.

2.3.4 Glikogén összekapcsoló enzim hiány – GBED

Örökletes metabolikus tényező a Quarter és Painthorse fajtájú lovaknál előforduló glikogén összekapcsoló enzim hiánya, mely komoly myodegenerációt okoz már magzati korban. A betegség okozója egy autoszomális, recesszíven öröklődő génmutáció, melynek következtében a szervezetben a glikogén összekapcsoló protein szinte teljes hiánya lép fel, így az érintett csikók képtelenek a glikogén raktározására és mobilizálására, s így a normál glükóz metabolizmus fenntartására. A glikogén kapcsoló enzim hiányára utaló klinikai tünetek magzati korban koraszülés vagy vetélés, újszülött korban pedig súlyos izomgyengeség, elfekvés, hypoglicaemia, hypothermia, görcsök, légzési elégtelenség és végül elhullás, a betegségre kezelési mód egyelőre nem létezik (VALBERG és mtsai, 2001).

2.4 Rhabdomyolízis terhelésre jelentkező egyéb formái

2.4.1 Időszakosan jelentkező rhabdomyolízis

Időszakonként előforduló tünetek esetén hajlamosító faktornak számítanak a rendszeres mozgás és munkavégzés hiánya, illetve a hosszú, munkavégzés nélkül eltöltött pihenőidők. Ennek oka, hogy olyan nagy mennyiségű glikogén halmozódik az izmokban, hogy hirtelen jelentkező megterhelés hatására a nagy mennyiségű tejsav képződés mellett megemelkedik a kreatinin-kináz aktivitás is, és ez az izomrostok elhalását okozza. Hasonlóképp történik ez, amikor akár rendszeres könnyű tréningben lévő ló hirtelen nagyon megerőltető feladatot kap, például versenyzik (FIRSHMAN és mtsai, 2003).

Az időszakosan jelentkező bántalom hátterében szintén lehet az elektrolit egyensúly felborulása, főleg kalcium és nátrium ionok háztartás zavarai (MCGOWAN, 2008). Egy kutatás szerint a nátriumban szegény diéta, vagy alacsony kalcium-foszfor arány szerepet játszhatnak a rhabdomyolízis kialakulásában.

2.4.2 Visszatérő terheléses rhabdomyolízis – (RER, Recurrent Exertional Rhabdomyolysis)

Az izomfestékvizeléssel járó betegségek ezen formája leggyakrabban versenyző angol telivér és ügető lovaknál fordul elő. Versenyszezonban hozzátétőlegesen az angol telivérek 5-10 %-kánál alakul ki megterheléses rhabdomyolízis, ezen lovak nagyjából 17%-ánál pedig vissza is tér. Kutatások szerint a RER okozója intracelluláris calcium regulációs zavar, és nincs összefüggésben a megerőltetés hatására létrejövő tejsavas acidózissal (MCGOWAN és mtsai, 2002). A rendellenesség autoszomálikusan dominánsan öröklődik, változóan expresszálódik (DRANCHAK és mtsai, 2005), és kutatások szerint nincs összefüggésben más mioplazmális calcium egyensúlyt érintő mutációkkal mint pl a ryanodin-1 receptor, sarcoplazmikus retikulum calcium ATPáz vagy dihidropirimidin feszültség-receptort affektáló elváltozásokkal (DRANCHAK és mtsai, 2006).

A betegség visszatérő formája leginkább olyankor szokott jelentkezni, mikor a versenylovakat megerőltető edzéssel versenykondícióba hozzák, majd később visszaváltak kevesebb terheléssel járó könnyebb munkára (MCGOWAN és mtsai, 2002). Előfordulhat szintén, hogy galopp verseny után, lovas polo közben, military terepverseny száma közben jelentkeznek a tünetek. A RER-re hajlamosító tényezőként állapították meg az egy napnál hosszabb pihenőt megerőltető munka előtt, a fiatal kort, napi 4,5 kg-nál több szemes takarmánnyal való etetést. Szintén, nagyobb számú a nőtény állat a megbetegedett egyedek közt. A visszatérő rhabdomyolízis klinikai tünetei: izommerevség és görcs, sántaság, izzadás, szapora légzés, kólikához hasonló tünetek, elfekvés (MCLAY és mtsai, 1999).

A RER leginkább a klinikai tünetek alapján hajlamosító tényezők figyelembe vételével diagnosztizálható. Munka után nagyjából 4-6 órával emelkedett kreatinin-kináz szint mérhető a szérumból, illetve izombiopszia mintavétel esetén miopátiás elváltozások találhatók a szövettani metszeteken. Mikroszkóp alatt jól láthatóak centrálisan elhelyezkedő sejtmagok, emelkedett mennyiségű szubsarkolemmális glikogén, illetve változó mértékű elhalás és regeneráció a rostok közt (LENTZ és mtsai, 1999).

A terheléses rhabdomyolízis kialakulásának esélyét lehet csökkenteni takarmányozási, edzésbeni változtatásokkal, kezelni pedig fájdalomcsillapítókkal, illetve elektrolitvesztés pótlás céljából infúzióval lehet. Pihentetés ajánlott a tünetek teljes megszűnéséig (MCKENZIE és mtsai, 2002).

2.5 Egyéb előzetes terhelés nélkül jelentkező myopathiák

2.5.1 Takarmányozási tényezők

Dietetikai faktorok által okozott miodegenerációkért leggyakrabban a kombinált szelén és E-vitamin hiány felelősek. Mindkét elem eszenciális antioxidáns a szervezet számára, fontos szerepet töltenek be a reaktív szabadgyökmentesítésben, míg a szelén fontos redukáló szerepet is betölt (HIGUCHI és mtsai, 1989). Ezen elemek hiánya klinikai kórképet általában növekvésben lévő csikókban okoz, előfordultak azonban esetek melyek kifejlett egyedeket érintettek. Az érintett csikókra általános gyengeség, elfekvés, dysphagia, izomgörcsök, remegés, merev izmok és gyenge szopási reflex jellemző (LOFSEDT, 1997). Az említett tünetegyüttes szervezeten belül hyponatraemiával, hypochloraemiával, hyperkalaemiával, hyperproteinaemiával, acidózissal, azotaemiával és myoglobinuriával jár (PERKINS és mtsai, 1998). Az elváltozott izmok színe sápadt, sávozott a szabadgyökfelhamozódás következtében létrejövő toxikus anyagok okozta nekrozis miatt (LOFSEDT, 1997).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk, hogy megismerjük a Hargita megyében a legmagasabban fekvő két településen, gyakorlatilag endémiásan előforduló megbetegedések okait.

Feltételezésünk szerint a betegség nagyarányú előfordulásában metabolikus - glikogéntárolási - zavarok is szerepet játszanak.

Ennek kiderítése érdekében célszerű összehasonlítani a magasabban és alacsonyabban fekvő területekről megbetegedett és tüneteket nem mutató lovak között a PSSM előfordulását, illetve annak esetleges genetikai hátterét.

Összefoglalva a vizsgálat célja tehát kideríteni, hogy van-e a megbetegedett lovak között PSSM 1-el vagy az ismeretlen genetikai hátterű PSSM 2-vel rendelkező állat, vagy pedig a megbetegedések hátterében nem metabolikus zavarok állnak.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 A kutatás helye

Vizsgálatainkra Székelyföldön, Hargita megyében került sor 2014-2015 között. Szentegyháza és Kápolnásfalu az a kutatásunkban vizsgált két település, melyeknél a betegség előfordulási aránya 17-23 %. Szentegyháza a Hargita hegy lábánál fekszik, 860 méter magasan a tengerszint felett, míg hozzá képest Kápolnásfalu 875 méteren helyezkedik 2 km-re északnyugatra. Két alacsonyabban fekvő településen, Homoródfürdőn mely 720 méteren 6 km-re fekszik Szentegyházától nyugatra és Lövétén mely 610 méteres magasságban 10 km-re délre kerül el, a betegség nem- vagy nagyon kis arányban és enyhe lefolyással jelenik meg.



3. **Ábra** : Az érintett régió Hargita megyében.(MÁL, 2015)

4.2 A lovak kiválasztásának módja, kiválasztott egyedek jellemzői

A fenti jelenség genetikai hátterének vizsgálatához 2 csoportot alkottunk. Az „A” csoportba kiválasztottunk 14 olyan lovat, melyek az érintett magasabban fekvő települések valamelyikén élnek, a kontroll „B” csoportba pedig 9 olyan ló került, melyeket az alacsonyabban fekvő két faluban tartanak. A lovak kortól és nemtől függetlenül, esetlegesen lettek kiválasztva.

Az **1.táblázat** foglalja össze a kiválasztott egyedek származási helyét, születési évét, nemét és hogy volt-e nála rhabdomiolízis.

Származási hely	Születési év	Nem	Hányszor volt beteg	Csoport
Kápolnásfalu	1994	mén	1x	A
	2004	mén	2x	
	2009	kanca	1x	
	2008	kanca	2x	
	1999	kanca	1x	
	2006	kanca	1x	
	2004	mén	nem volt beteg	
	2008	herélt	nem volt beteg	
	2005	kanca	nem volt beteg	
Szentegyháza	2010	mén	2x	A
	2010	mén	nem volt beteg	
	2009	mén	nem volt beteg	
	2009	mén	nem volt beteg	
Homoródfürdő	1996	kanca	nem volt beteg	B
Lövéte	2002	kanca	nem volt beteg	
	2000	mén	nem volt beteg	
	1994	kanca	nem volt beteg	
	2009	mén	nem volt beteg	
	1996	kanca	nem volt beteg	
	1999	kanca	nem volt beteg	
	2009	herélt	nem volt beteg	
	2014	mén	nem volt beteg	
2011	kanca	2x		

1. táblázat A vizsgálathoz felhasznált lovak adatai.

A vizsgált állatok tartási céljai, körülményei és takarmányozásuk nagyban hasonlóak. A régióban élők leginkább mezőgazdasági munkálatokra és erdőkitermelésre használják lovaikat. Lekötött, állásos tartás a jellemző, legeltetés vagy karámozás nélkül. Takarmányuk főleg helyi széna, időnként kis mennyiségű szemestakarmány, mely zab, árpa vagy búzadara. A tulajdonosok közül sokan abrakot csak munka előtt, illetve a munkával töltött napokon adnak, időnként kristálycukorral keverve.

A kutatáshoz kiválasztott állatok különböző vérvonalak keresztezéséből alakultak ki, nem fajtatizták, köznyelven „erdélyi félvérek” melyekre hidegvérű és melegvérű befolyás egyaránt jellemző. Fenotípusuk azonban nagyjából egységes, jellemzően széles mellkasuk, barázdált faruk és jól izmolt erős testalkatuk van.



4. **ábra:** egy a vizsgált lovak közül, láthatóan jól izmolt test, széles mellkas, barázdált far.

4.3 Az adatgyűjtés módszerei

Mind az „A” és „B” csoportban két módszert alkalmaztunk vizsgálatunkhoz. Először is sörénymintát küldtünk minden állattól az Egyesült Királyságbeli Animal Genetics laborba genetikai vizsgálatra, másodsor pedig izombiopsziát vettünk szövettani elemzés érdekében azokról a lovakról melyeknek tulajdonosa beleegyezett.

4.3.1 Mintavétel a lovak sörényéből

Az érintett területről származó 14 , és a kontroll 9 lótól sörénymintát vettünk. Ez azt jelenti hogy olló segítségével minden állat sörényéből levágtunk egy nagyjából fél ujjnyi vastag, 2-3 cm hosszú sörénycsomót. Ezután egyenként mintavételi zacskóba, majd borítékba helyeztük, és elküldtük az Animal Genetics laborába, az Egyesült Királyságban. Ott a beküldött sörényminta DNS-e alapján genotipizálást végeznek, melyből kiderül, hogy milyen allélokot örökölt az egyed a felmenőitől.

A GYS1 genotipizálásához DNS szakasz izolációra volt szükség a sörényszálakból, melyhez a Dneasy Tissue Extraction Kit-et (Qiagen) használták a gyártó utasításai szerint. Az egyes lovak GYS1 genotípusa PCR segítségével lett megállapítva.

A GYS1 génmutáció genotípusra három lehetséges eredmény létezik: homozigóta a normál allélra (n/n), heterozigóta a mutációra (n/P1) vagy homozigóta a mutációra (P1/P1). A malignus hyperthermiáért felelő mutáció jelenlétét RT-PCR segítségével genotipizálják, itt is a GYS1-nél felsorolt 3 eredmény lehetséges.

A cél hogy megtudjuk, szerepel-e a lovaknál a PSSM 1-es típusáért felelőssé tehető GYS1, vagy malignus hyperthermiáért felelő RYR1 génmutáció heterozigóta vagy homozigóta formában.

4.3.2 Mintavétel izombiopszia által

Biopsziás mintavételt sajnálatos módon a 23 vizsgált egyed közül csak 13 ló gazdája engedélyezett.

Az izomszövetből történő mintavételhez biztonsági okokból először is be kellett bódítanunk a lovakat. A bódítás detomidin-hidroklorid 0,2 ml/100 ttkg (Domosedan 10 mg/ml, Orion Corporation) és butorphanol 0,25 ml/100 ttkg (Morphasol 10 mg/ml, aniMedica GmbH) hatóanyagtartalmú injekció intravénás beadásával történt. Ezután a semimembranosus vagy semitendinosus izmon szikével bemetszést ejtettünk, és egy 1 köbcentiméteres szövetmintát kimetszettünk. A mintákat formalinba helyeztük, és utána rögtön a Kolozsvári Állatorvosi Egyetem Kórbonctani Tanszékére, és a Budapest Állatorvostudományi Egyetem Kórbonctani Tanszékére küldtük metszetkészítés, festés és elemzés céljából.

A szabályos mintavételt és fixálást követően 4-5 mikronos metszetek készültek, majd a metszeteket Hematoxillin-Eozinnal, PAS-festéssel és Azan festéssel színezték meg.

PAS festésre azért van szükség, mert a PSSM mindkét típusára jellemző szénhidrát-felhalmozódások az izmokban a segítségével láthatóak.

PAS festés menete : Deparaffinálás és rehidrálás, minta öblítése káliumperjodáttal, majd mosás csapvízzel és desztillált vízzel. Ezután Shiff-reagens hozzáadása, kénsavas, csapvizes és desztillált vizes öblítés következik. Végül 96%-os etanol hozzáadása, majd víztelenítés és lefedés. Így a szénhidrátok élénkpirosan festődnek.

Azan-festést annak érdekében végeztettünk, hogy kiderítsük volt-e az izmokban korábban gyulladás, trauma vagy idült regresszív elváltozás, ugyanis a festék az ezekre a folyamatokra jellemző kollagénben gazdag kötőszövetet festi és teszi láthatóvá. Az Azan egy trikróm festés melyben az anilinkék a kollagénes kötőszöveti elemeket kékre festi, az Orange-G festék, vagy azokármin pedig a magokat narancsszínűre vagy vörösre.

Származási hely	Születési év	Nem	Hányszor volt beteg	Csoport
Szentegyháza	2009	mén	nem volt beteg	A
	2009	mén	nem volt beteg	
Kápolnásfalu	2008	kanca	2x	
	1994	mén	1x	
	2004	mén	2x	
	1999	kanca	1x	
	2006	kanca	1x	
	2004	mén	nem volt beteg	
Homoródfürdő	1996	kanca	nem volt beteg	
Lövéte	2009	mén	nem volt beteg	
	2009	herélt	nem volt beteg	
	2014	mén	nem volt beteg	
	2011	kanca	2x	

2. táblázat a biopsziázott 13 ló adatai.



5. **ábra** izombiopszia mintavétel a m.semitendinosus-ból.

5. EREDMÉNYEK

5.1 A genetikai teszt eredményei

Az Animal Genetics labortól visszakapott eredmények a következők. A vizsgált „A” csoportból a 14 ló közül 7 egyednél fellelhető a GYS1 mutáció heterozigóta formája (n/P1), 7 egyed pedig negatív lett. A pozitív lovak közül 5 állatnál korábban kialakult rhabdomyolízis, 2 viszont tünetmentes volt. Az „A” csoport másik felét alkotó maradék 7 ló géntesztje negatív lett, ennek ellenére közülük 2 esetében tünetek jelen voltak.

A „B” csoportban a 9 közül 8 eredmény negatív lett, és egy pozitív. Az egy pozitív eredménnyel rendelkező lónál klinikai megjelenése is volt a betegségnek.

A malignus hyperthermiaért felelős RYR1-mutációra az összes vizsgált egyed negatív lett.

A 3. táblázat összefoglalja a 23 vizsgált egyed genetikai teszteredményeit.

Származási hely	Csoport	Születési év	Nem	Hányszor volt beteg	GYS1 mutáció	RYR1 mutáció
Kápolnásfalu	A	1994	mén	1x	n/P1	n/n
		2004	mén	2x	n/P1	n/n
		2009	kanca	1x	n/P1	n/n
		2008	kanca	2x	n/P1	n/n
		1999	kanca	1x	n/n	n/n
		2006	kanca	1x	n/n	n/n
		2004	mén	nem volt beteg	n/n	n/n
		2008	herélt	nem volt beteg	n/n	n/n
		2005	kanca	nem volt beteg	n/n	n/n
Szentegyháza	A	2010	mén	2x	n/P1	n/n
		2010	mén	nem volt beteg	n/P1	n/n
		2009	mén	nem volt beteg	n/P1	n/n
		2009	mén	nem volt beteg	n/n	n/n
Homoródfürdő		1996	kanca	nem volt beteg	n/n	n/n
Lövete	B	2002	kanca	nem volt beteg	n/n	n/n
		2000	mén	nem volt beteg	n/n	n/n
		1994	kanca	nem volt beteg	n/n	n/n
		2009	mén	nem volt beteg	n/n	n/n
		1996	kanca	nem volt beteg	n/n	n/n
		1999	kanca	nem volt beteg	n/n	n/n
		2009	herélt	nem volt beteg	n/n	n/n
		2014	mén	nem volt beteg	n/n	n/n
		2011	kanca	2x	n/P1	n/n

3. táblázat: A 23 vizsgált ló genetikai tesztjeinek eredményei.

Magyarázat: n/P1 = heterozigóta a mutációra (pozitív)

n/n = homozigóta a normál allélra (negatív)

Kék szín: tünet volt, GYS1 is pozitív lett

Sárga szín: tünet nem volt, de GYS1 pozitív lett

5.2 A szövettani vizsgálatok eredményei

5.2.1 PAS-festés eredményei

Azoknál a lovaknál, melyeknél rhabdomiolízis jelentkezett klinikai tünetek megnyilvánulásával, illetve genetikailag pozitívak voltak (esetünkben 6-nál a 13-ból), PAS-festett szövettani mintákon nagyobb mennyiségű szénhidrát látható élénken pirosra festődve, mint a betegség által nem érintett társaik esetében.

Származási hely	Születési év	Nem	Hányszor volt beteg	PAS festés eredménye*	Csoport
Szentegyháza	2009	mén	nem volt beteg	negatív	A
	2009	mén	nem volt beteg	negatív	
Kápolnásfalu	2008	kanca	2x	pozitív	
	1994	mén	1x	pozitív	
	2004	mén	2x	pozitív	
	1999	kanca	1x	pozitív	
	2006	kanca	1x	pozitív	
	2004	mén	nem volt beteg	negatív	
Homoródfürdő	1996	kanca	nem volt beteg	negatív	
Lövete	2009	mén	nem volt beteg	negatív	
	2009	herélt	nem volt beteg	negatív	
	2014	mén	nem volt beteg	negatív	
	2011	kanca	2x	pozitív	

4. **táblázat** : az biopsziázott lovak adatai és PAS-festés

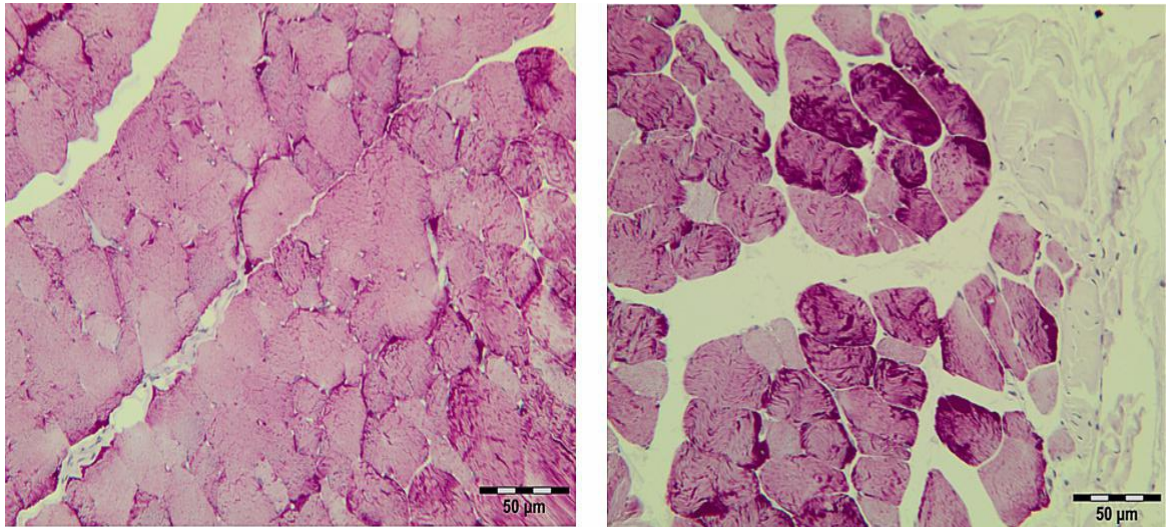
eredményei. Magyarázat: *PAS eredmény:

pozitív : nagy mennyiségű élénkpirosan festődő szénhidrát.

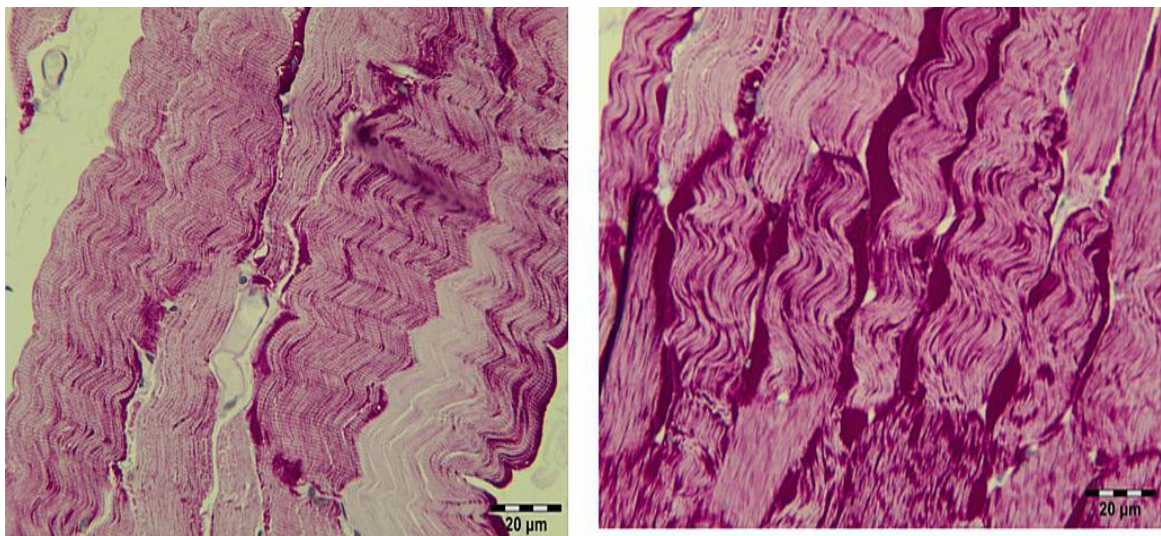
negatív: élettani mennyiségű élénkpirosan festődő szénhidrát.

Narancs szín : azok az egyedek melyek voltak betegek, és PAS pozitívak.

A **6. ábra** és **7.ábra** két metszetet hasonlít össze, az egyik egészséges, meg nem betegedett lóból származik (bal oldalon), a másik pedig rhabdomiolízisen átesett egyed izmából készült (jobb oldalon). Szemmel látható a pirosan festődő szénhidrát mennyisége és eloszlása közötti különbség a két állat mintái között.



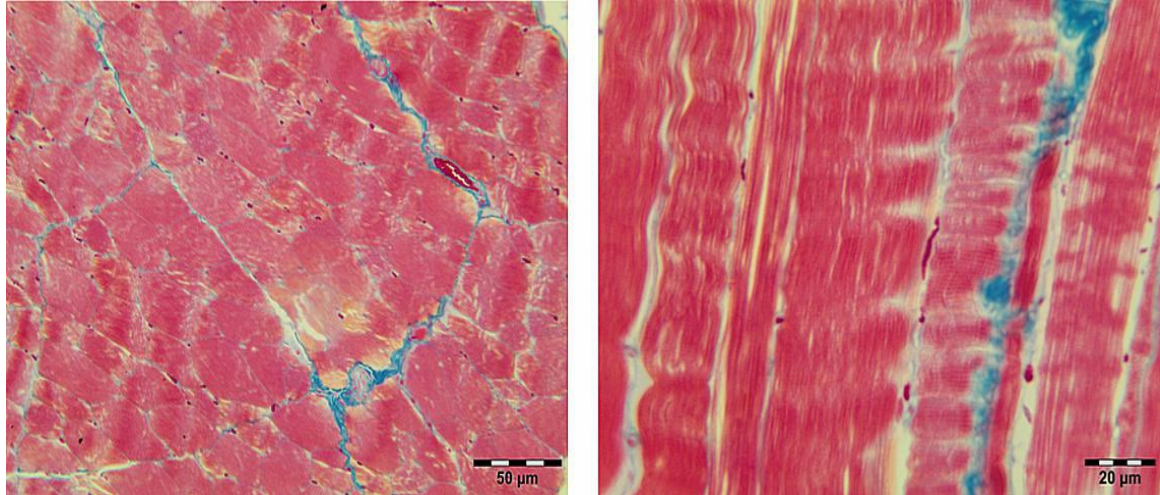
6. ábra: 20x nagyítással készült fénymikroszkópos felvételek két PAS-festett izomszövet haránt metszetről. A bal oldali képen élettani, míg jobb oldalon kóros mennyiségű élénkpirosan festődő szénhidrát látható.



7. ábra: 40x nagyítással készült fénymikroszkópos felvételek két PAS-festett izomszövet hosszanti metszetről. Itt is jobb oldalon kórosan nagy, bal oldalon élettani mennyiségű szénhidrát látható a festés alapján.

5.2.2 Azán-festés eredményei

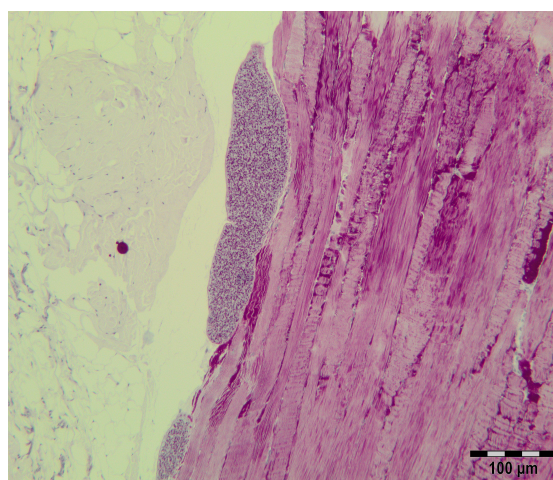
Az összes minta meg lett festve Azán festéssel. Hegesedésre, gyulladásra vagy idült regresszív folyamatra utaló magas kollagéntartalmú nagy mennyiségű reparációs szövet egyik metszeten sem látszott. Csak élettani mennyiségű kötőszövet festődött a preparátumokon.



8.ábra : Bal oldalon 20x nagyítással készült fénymikroszkópos felvétel izomszövet haránt metszetéről, élettani mennyiségű kéken festődő kollagénnel. Jobb oldalon ugyanazon minta hosszanti metszetéről készült felvétel 40x nagyítással.

5.2.3 Egyéb észrevételek

A minták festése során, mind a PAS- és Azán-festés után felfedeztünk sarcocystis tömlőket az izomrostok közt 7 egyednél. A sarcosporidiosis előfordulása azonban független volt a genetikai háttértől, klinikai megjelenéstől, vagy a földrajzi elhelyezkedéstől, ezért nagyobb jelentőséget nem tulajdonítottunk neki.



9.ábra: sarcocystis tömlő egy hosszanti vázizom metszeten, 10x nagyítással nézve.

5.3 Eredmények összegzése

Összegezve, a genotipizálás eredményei: a 23 vizsgált egyed közül az „A” csoportból (n=14) 7 heterozigóta lett a GYS1 mutációra mely a PSSM 1-es típusának kialakulásáért felelős, tehát pozitív, és közülük 5 lónak voltak tünetei is, 2-nek pedig nem. A „B” csoportból (n=9) 8 ló negatív lett, 1 pedig pozitív, melynek voltak tünetei is.

Annak érdekében, hogy megtudjuk van-e bizonyítható összefüggés a GYS1 mutáció jelenléte és a megbetegedések közt, statisztikai próbát hajtottunk végre. A függetlenség ellenőrzésére khi-négyzet próbát végeztünk, melynek eredménye az lett hogy 98,75 %-os valószínűséggel mondhatjuk, hogy a mutáció jelenléte és a betegség megjelenése összefüggnek. Azonban a statisztika eredménye nem mondható teljességében hitelesnek, ugyanis kevés adat állt csak a rendelkezésünkre.

RYR1 mutációra mely a malignus hyperthermiáért felel, az összes vizsgált egyed negatív lett.

Szövetteni vizsgálatot a 23-ból 13 lónál csinálhattunk, s PAS-festés után a kiértékelés eredménye az lett, hogy amelyik lónál volt klinikai megjelenése a betegségnek (függetlenül attól hogy PSSM 1-re pozitív vagy negatív lett), annál a szövettani metszeteken látható volt rendellenes szénhidrát-felhalmozódás. Azán-festés pedig azt bizonyította, hogy gyulladás, trauma, vagy idült regresszív folyamat nem volt a vizsgált izomszövet mintákban.

Mellékesen a metszetek vizsgálata közben 7 lónál sarcocystis cisztákra is bukkantunk, de jelenlétük független volt a genetikai háttértől, klinikai megjelenéstől, vagy a földrajzi elhelyezkedéstől, ezért nagyobb jelentőséget nem tulajdonítottunk nekik.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1 Genetikai vizsgálatok eredményeinek értékelése

A PSSM 1-et okozó GYS1 génmutációra a 23 ló közül az „A” csoportból (n=14) 7 egyed pozitív eredményt mutatott. A „B” csoportban (n=9) csak egy lónak lett pozitív eredménye.

Ez azt jelenti, hogy a pozitív eredményt produkált egyedeknél jelen van a PSSM 1-es típusa (MCUE és mtsai 2008).

Az „A” csoport egyedei a betegség által endémiásan érintett településekről származnak, főleg Szentegyházáról és Kápolnásfaluról, egy Homoródfürdői kivétellel. Az eredmények alapján látható, hogy az erről a környékről vizsgált 14 ló 50%-ánál PSSM 1-re genetikai pozitívitas mutatkozott. A 7 pozitív ló közül 5-nél voltak rhabdomiolízissel járó klinikai tünetek. Az említett 5 egyednél a mutáció jelenléte valószínűleg szerepet játszik a betegség kialakulásában. A maradék 2 pozitív egyed eddig nem betegedett meg, ami alapján az feltételezhető, hogy a mutáció heterozigóta formában való jelenléte nem törvényszerűsíti a pünkösdi betegség kialakulását, azonban annak esélyét növelheti egyéb olyan tényezők jelenléte mellett mint a tartási körülmények és a takarmányozás.

Az „A” csoport másik 7 egyede negatív lett, tehát náluk nincs jelen a PSSM 1-es típusa, azonban 2-en közülük megbetegedtek, s ennek GYS1 mutációtól független háttérét más tényezőkben kell keresni. Ennek a 2 lónak a szövettani metszetei PAS-pozitívak lettek, ami a PSSM 2-es típusának jelenlétét engedi feltételezni.

A „B” csoport egyedei Lövétéről származnak, az endémiásan már nem érintett alacsonyabban fekvő településről. A 9 vizsgált állat közül 8 negatív lett GYS1-re, és tüneteket sem mutattak, egy lónál azonban jelen van a PSSM 1, és kétszer is előfordult nála izommerevséggel és duzzanattal együtt izomfestékvizelés.

Az eredmények alapján tehát összefüggésbe hozható a vizsgált lovaknál PSSM 1 jelenléte és a rhabdomiolízis kialakulása. A vizsgált példányok közül összesen 8 állatnál genetikailag bizonyítható a rendellenes szénhidrát tárolás jelenléte (az „A” csoportból 7, a „B” csoportból 1 egyednél), és ezek közül 6 lónál meg is jelent a pünkösdi betegség.

A GYS1-re negatívan tesztelt, betegségen mégis átesett 2 példány esetében az egyik lehetséges ok a PSSM 2-es típusa. A PSSM 1-el ellentétben a 2-es típusnál nem ismeretes genetikai háttér, csak szövettani analízissel lehet megállapítani a jelenlétét (KÓSA és mtsai, 2015).

A szövettan alapján PSSM 2 pozitívitas megállapítása PAS-festett mintákon

lehetséges. PAS megfesti az izmokban található szénhidrátokat élénkpirosra, így mind az élettani, mind a kóros szénhidrát látható lesz, és elrendeződésbeni és lokalizációs különbségek alapján lehet PSSM-re következtetni. Ez a megítélési forma azonban szubjektív, ugyanis a glikogén élettani része is az izomsejtnek, és könnyű összetéveszteni a kórosan felhalmozódott poliszachariddal. Ezért tanácsos a PAS-festett mintát amilázos emésztésnek is alávetni, mert az enzim képes lesz kiemészteni a festéket az élettani glikogénből, a kórosból azonban nem és így egyértelműbben különbséget lehet tenni. Fals pozitív diagnózis lehetséges hogyha biopsziázás közben a mintát csipesszel túl erősen összenyomják, mert festéskor abnormális glikogénnek fog látszani az élettani is. Fals negatív akkor lehet az eredmény, ha a mintákat nem hűtik vagy nem juttatják elég gyorsan a vizsgáló laborba, így a glikogén lebomlik mire a metszet festésre kerül. Az abnormális glikogén mennyiség alapján 3 kategóriába sorolható a PSSM 2 : enyhe, közepes és súlyos. A rendellenesség súlyossága azonban nem mindig van összefüggésben a tünetek megjelenésével vagy súlyosságával (MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 2014).

A mi kutatásunk esetében azért valószínűsíthető a PSSM 2 a genetikailag negatív, de tüneteket mutató lovaknál, mert a szövettani analízis során találtunk nem élettani szénhidrát-felhalmozódásokat. Természetesen a fent említett hibahetőségeket is számba kell venni, ezért biztosra nem tudjunk állítani.

A GYS1 génmutáció megjelenése a régióban visszavezethető a vizsgált lovak őseinek eredetére. Az itt élő lovakat kifejezetten hegyi munkára és erdőkitermelésre tenyésztették, Hucul, Arab telivér és Lipicai fajtákat a szívóosságuk és Semigreu-hidegvérűeket az erősségük miatt használva. A Semigreu fajtát Lipicai és Ardenni vérvonalak keresztezésével hozták létre (BANYAI, 2016). A fajtatiszta Ardenni hidegvérű lovaknál a GYS1 mutáció előfordulása közel 40%-os (BAIRD és mtsai, 2010), ezért valószínű hogy az erdélyi Semigreu-lovak kitenyésztéséhez behozott néhány Ardenni mén szórta szét a mutációt. Kifejezetten Semigreu-hidegvérűekre kiterjedő kutatás alapján az mondható el, hogy a normál allél előfordulása jóval gyakoribb, mint a mutáns allélé, de mindkettő jelen van (BANYAI, 2016).

A PSSM 2-es típusának megjelenése valószínűleg az arab vérvonal jelenlétének köszönhető a régióban. Kutatások szerint versenyző arab telivér, arab félvér, angol telivér és ügető lovaknál gyakran előforduló rhabdomiolízisek mögött gyakran nincs ismert genetikai tényező. Az érintett lovak izmaiban viszont ugyanúgy rendellenesen felhalmozódott szénhidrátok találhatóak, tünetek megjelenése PSSM 1 tüneteivel hasonló (WILBERGER és mtsai, 2015). Mivel az arab fajta részt vett a kutatásban szereplő lovak

fajtájának a kitenyésztésében, valószínű hogy a PSSM 2- es típusa (bár genetikailag nem bizonyítható) tőlük származik.

Az a tény, hogy egymás mellett fekvő települések közül némelyekben ennyire gyakori a genetikai háttér és a klinikai tünet a másik településeken pedig nem, esetlegesen visszavezethető arra, hogy a magasabban fekvő falvakba véletlenszerűen több genetikailag érintett egyed került, majd azokat továbbtenyésztve a PSSM 1-el érintett lovak száma lassan felszaporodott. Az is lehetséges, hogy a magasabban fekvő településeken az emberek szívesebben választanak zömökebb, szívósabb lovat és így a preferált fenotípussal a hibás genotípust választják. Ettől függően a területre jellemző egyéb hajlamosító tényezőket is meg kell vizsgálni.

A Malignus hyperthermiát okozó RYR1 génmutációra mind a 23 vizsgálatban részt vett ló eredménye negatív lett. Ez alapján állítható, hogy a vizsgált lovak esetében a malignus hyperthermia nem volt jelen hajlamosító tényezőként a megbetegedésre.

6.2 Szövetteni vizsgálatok eredményeinek értékelése

A 13 ló közül, melyektől vehettünk izombiopsziát, a már PAS-festett mintákon azon 6 ló esetében láttunk rendellenes poliszacharid felhalmozódást, melyeknél a betegség meg is jelent korábban egyszer vagy többször. A 6 ló közül 4 pozitív eredményt mutatott PSSM 1-re a genetikai vizsgálaton, 2 pedig negatívát. Tehát a 4 GYS1 pozitív lovak esetében a szövettani minták megerősítik a PSSM 1 jelenlétét, a 2 negatív esetben pedig a feljebb kifejtett PSSM 2-es típusa feltételezhető. Összefoglalva az összes lónál melynél voltak tünetek, látható volt a metszeten is PSSM valamelyik típusára utaló szénhidrát-felhalmozódás.

A metszetek Azan-festéssel is színezve lettek, melyből kiderült hogy korábbi idült regresszív folyamat, gyulladás vagy trauma nem volt az adott izomban. Ez azért volt fontos a kutatás szempontjából, hogy ki tudjuk zárni annak az eshetőségét hogy ezen tényezők valamelyike okozza az izomfestékvizelést.

Mindkét festés után láttunk a metszeten sarcocystis tömlőket, ezeknek azonban azért nem tulajdonítunk jelentőséget, mert a parazita nem okoz izomsejt feloldódást és ezzel izomfestékvizelést, ugyanis az izomrostok közé ékelődve fejlődik, kiszabadulásakor pedig csak tachyzoitái kerülnek a véráramba. Tömlők körülötti izmok sorvadása és gyulladása előfordulhat, mioglobulinuria azonban nem jellemző.

6.3 A betegség kialakulásában közrejátszó egyéb lehetséges tényezők

A régióban endémiásan előforduló izomfestékvizeléssel járó pünkösdi betegség hátterében a PSSM 1-es és 2-es típusán kívül takarmányozási tényezők is lehetnek. A környéken jellemzően gyenge minőségű szénát és abrakot etetnek.

Érdeemes lehet megvizsgálni a takarmányok szelén és E-vitamin szintjeit, ezek ugyanis nélkülözhetetlen antioxidánsok a szervezet számára, és esetleges hiányuk közrejátszhat az izombetegségek kialakulásában.

Szintén, a lovak elektrolit-háztartásának kiegyensúlyozottsága is fontos lehet, célszerű lenne erre irányuló vizsgálatokat is folytatni.

Fontos szerepe lehet annak is, hogy a vizsgált lovak étrendje alapvetően szénhidrátokban szegény, abrakot csak munka előtt kapnak esetenként cukor kiegészítéssel. Ez hirtelen sok glikogén felhalmozódását okozhatja az izmokban, és a rövid időn belül bekövetkező munka hatására megjelenik az izommerevség, fájdalom és izomfestékvizelés. Az adott populációban a fent említett takarmányozási tényezők elősegíthetik a genetikai eredetű betegség nagymértékű klinikai tünetekben is megnyilvánuló megjelenését. Másik tényező, hogy a lovak nagy része lekötéses istállózott tartásban van, és legelésre nem nyílik lehetőségük, ami miatt több fontos vitaminhoz és ásványanyaghoz korlátozott a hozzáférésük.

6.4 A kísérlet hiányosságai

Sajnos lehetőségeink több szempontból is korlátozottak voltak. Először is, a kísérlet hitelesebb lett volna amennyiben lehetőség nyílt volna több lovat megvizsgálni.

Szintén hátráltatta a vizsgálat eredményességét, hogy nem tudtunk minden genetikailag tesztelt lóból izombiopsziát venni, így maradtak olyan egyedek melyeknél volt tünet, de szövetmintát nem tudtunk vizsgálni, és emiatt nem tudjuk egyértelműen kijelenteni hogy az összes vizsgált tünetet produkáló egyednél poliszacharid tárolási rendellenesség is van-e.

Egyéb hiányosság, hogy ideális esetben a biopsziával vett izomszövet mintákat azonnal fagyasztva lett volna célszerű tárolni és szállítani, azonban korlátozott szállítási lehetőségek miatt helyette formalint kellett használnunk. Ennek hátránya az, hogy előfordulhatott, hogy a minta belsejében lévő glikogén bomlásnak indulhatott mielőtt a formalin odáig penetrált és így nem látszódott a PAS-festett metszeten.

A szövettani mintákon időbeli és anyagi korlátok miatt nem lett diasztázos (amiláz)

emésztés végezve. Bár a mintákról nagy valószínűséggel megállapítható kóros szénhidrát jelenléte csupán PAS-festés mellett is, egyértelműbben eldönthető eredményt adna a diasztázos emésztés utáni elemzés.

Mind a diasztázos emésztés elvégzése, mind a fent említett hiányosságok egy részének korrigálása a jövőbeli terveink közt szerepel.

6.5 Javaslato

A jövőbeli izom problémák elkerülése érdekében lovaiknál a tulajdonosoknak a következőket ajánljuk. Abrakot ne csak időszakosan etessenek, hanem inkább kis mennyiségben folyamatosan. Ez elősegíti a szénhidrát-bontás és raktározás folyamatainak kiegyensúlyozását.

A megerőltető munka előtti cukoretetés tilos, amennyiben szükséges, energia bevitelére zsír javasolt (BAKOS, 2012). Ez például kis mennyiségű napraforgóolaj takarmányhoz adagolásával megoldható.

Széna etetés mellett előnyös lenne legeltetni is a lovakat, így a széna tápanyag hiányosságait a friss fűből némelyest tudnák ellensúlyozni. A legeltetés és karámozás abban is segítene, hogy a munkával töltött periódusok közötti időszakokban a lovak nem csak állnának, hanem végeznének némi testmozgást is ami kevésbé hajlamosítaná őket nagy mennyiségű glikogén felhalmozására. Vitamin és ásványi anyag kiegészítés gyanánt ajánlott erre a célra gyártott nyalósókat is biztosítani a lovak számára.

Mindemellett rendszeres genetikai teszteléssel, és az alapján az állomány kiválogatásával csökkenthető lenne a betegség előfordulása.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A lovak terheléses miopátiái régóta kutatott problémák. A miopátiák tünetei általában az izmok merevsége, duzzanata, fájdalmassága és az ezek mellett jelentkező izomfestékvizelés. Erdély Hargita megyéjében, a környéken 800 m felett fekvő településeken a pünkösdi betegség előfordulása 17-23%, míg a szomszédos, 800 m alatt fekvőkön ez az arány kevesebb mint 2%. Kutatásunkban a fentebb leírt jelenség genetikai hátterét vizsgáltuk.

A vizsgálathoz 2 csoportot alkottunk. Az "A" csoportban 14 ló volt melyek 800 m feletti területeken élnek, a "B" csoportban pedig 9 véletlenszerűen kiválasztott egyed a betegség által nem érintett alacsonyabban fekvő falvakból. A genetikai analízis elvégzéséhez sörénymintákat vettünk és elküldtük az Animal Genetics (UK) laborba, ahol genotipizálást kértünk a PSSM 1-ért felelő GYS1 és malignus hyperthermiáért felelő RYR1 génmutáció jelenlétének felkutatására.

A genetikai vizsgálat eredményei a következők voltak: Az "A" csoportból GYS1 génmutációra 7 ló lett pozitív (heterozigóta), míg a maradék 7 ló negatív lett. A "B" csoportban egy pozitív heterozigóta, 8 negatív eredmény született GYS1 mutációra. Az "A" csoportban a 7 PSSM 1-re pozitív egyed közül 5 volt beteg, 2-nek nem voltak tünetei, a 7 negatív közül viszont 2-nél volt megbetegedés. RYR1 mutációra az összes ló negatív lett.

A 23 közül 13 lótól vehettünk izombiopsziát szövettani vizsgálat céljából. A mintákból metszetek készültek PAS- és Azán-festéssel lettek megfestve, majd kiértékelve. Az izomszövet minták vizsgálatának eredménye az lett, hogy minden tünetet mutató lónál (6 ló a 13-ból) látható volt rendellenes szénhidrát-felhalmozódás.

Az eredmények és statisztikai elemzésük alapján elmondható, hogy a PSSM 1-re való pozitívítás és rhabdomiolízises megbetegedések között van összefüggés, tehát a GYS1 mutációval rendelkező lovaknál valószínűleg ez döntő tényező volt. Azoknál az egyedeknél ahol PSSM1-re negatívan teszteltek, de mégis voltak tünetek feltételezhető hogy PSSM 2-es típusával van dolgunk. Ezt alátámasztja a lovak fatjátörténetében szereplő arab lovak PSSM 2-re való hajlama, illetve a szövettani vizsgálatok eredményei.

Összegezve, a környéken endémiásan előforduló betegség hátterében több dolog feltételezhető. Ezek a PSSM 1-es és 2-es típusai, illetve egyéb tartási és takarmányozástani tényezők.

8. SUMMARY

The exertional myopathies of horses are being researched for a long time now. The symptoms of these myopathies are muscle stiffness, swelling, pain and myoglobinuria. In Hargita region of Transylvania in two settlements located higher than 800 m above sea level the prevalence of the muscle disease is 17-23 %, while at two other villages located below 800 m this ratio remains below 2%. In our research we have been looking at the genetic background of this phenomenon.

For the research we created two groups. In group “A” there were 14 horses from the regions located higher than 800 m, while in group “B” 9 randomly selected horses from the villages located below 800 m. In order to perform genetical analysis we collected hair samples from the horses, and sent it to the Animal Genetics Laboratory (UK), where genotyping of the samples was performed for GYS1 mutation responsible for PSSM type 1, and RYR1 mutation responsible for malignant hyperthermia.

The results of the genetic test were the following: in group “A” 7 horses turned out to be positive (heterozygotes) for GYS1 mutation, while the other 7 horses were negative. In group “B” there was 1 positive heterozygote, the others tested negative. In group “A” from the 7 PSSM 1-positive individuals 5 showed clinical signs, the other 2 did not, while from the 7 negative tested horses 2 still had clinical manifestation of the disease. For RYR1 mutation all of the horses tested negative.

From 13 out of 23 horses we were allowed to collect muscle biopsies for histological examination. Histological sections were created, then painted by PAS- and Azan-technique, and evaluated. The result of the histological examination was that all of the researched horses that showed clinical signs (6 out of 13) had abnormal polysaccharide accumulations in their muscles.

Based on the results we can say that there is a correlation between the positive testing for PSSM 1 and the myopathies in the region. So in case of GYS1-positive horses the mutation could have been an important factor. In case of the individuals that tested negative for PSSM 1, but still showed clinical signs we assume the presence of PSSM 2. This theory is supported by the fact that there is a presence of arabian bloodline liable for PSSM 2 in the horses bred in the location.

Summarizing, in the background of the endemic appearance of the muscle disease in the region there are multiple factors, that include PSSM type 1 and 2 , other nutritional factors and housing conditions.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a téma felajánlását, a kutatásban és dolgozat írásban nyújtott sok segítséget, és kérdéseimre adott készséges válaszokat **Dr. Korbacska-Kutasi Orsolyának**, a vizsgálatokban nyújtott segítségéért **Dr. Kósa Csaba** erdélyi állatorvosnak, illetve **Prof. Szenci Ottónak** akinek kutatócsoportja anyagilag támogatta kutatásunkat. Szintén köszönettel tartozom **Dr. Baska Ferencnek**, az Állatorvostudományi Egyetem Kórbonctani Tanszék vezetőjének, a tudományos diákköri munkámhoz szükséges metszetek elkészítéséért, megfestéséért és kiértékelésükhöz nyújtott értékes segítségéért, valamint **Dr. Gáspárdy Andrásnak** az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi tanszék vezetőjének, hogy engedélyével hozzájárult a tanszékükön készült TDK munkámhoz. Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom a **KutKar** és az **NKB** pályázatokon nyert támogatásért. Hála támogatóinknak, eredményeinket részben már közölni tudtuk a nemzetközi European Workshop of equine Nutrition konferencián Dijonban.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. ALEMAN M., 2008: A review of equine muscle disorders. *Neuromuscular disorders*. 18, p.277-287.
2. ALEMAN M., BROSNAN R., WILLIAMS D., et al., 2005: Malignant hyperthermia in a horse anesthetized with halothane. *J. Vet. Intern. Med.* 19, p.363–7.
3. ALEMAN M., NIETO J., MAGDESIAN K., 2009: Malignant hyperthermia associated with ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *J. Vet. Intern. Med.* 23, p. 329-34.
4. ALEMAN M., RIEHL J., ALDRIDGE B., et al., 2004: Association of a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. *Muscle Nerve*. 30, p.356–65.
5. ANNANDALE J., VALBERG S., MICKELSON J., et al., 2004: Insulin sensitivity and skeletal muscle glucose transport in horses with equine polysaccharide storage myopathy. *Neuromuscular Disorders*. 14, p.666–74.
6. BAIRD J., VALBERG S., ANDERSON S., et al., 2010: Presence of the glycogen synthase 1 (GYS1) mutation causing type 1 polysaccharide storage myopathy in continental European draught horse breeds. *Vet. Rec.* 167, p.781- 4.
7. BAKOS Z., 2014: Újabb ismeretek a lovak gyakoribb vázizombetegségeiről. URL: <http://docplayer.hu/5003660-Bevezetes-ujabb-ismeretek-a-lovak-gyakoribb-vazizombetegsegeirol-izomrosttipusok-diagnosztika-diagnosztika-diagnosztika.html> Megtekintve: 2016.10.10.
8. BANYAI F., 2008: Evaluation of the G/A mutation frequency of the 6th exon from glycogen synthase (GYS1) gene in three indigenous horse breeds. PhD thesis. Universitas de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara. URL: <http://www.usamvcluj.ro/en/files/teze/en/2016/banyai.pdf> Megtekintve: 2016.10.06.
9. DE LA CORTE F., VALBERG S., MACLEAY J., et al., 2002: Developmental onset of polysaccharide storage myopathy in 4 Quarter Horse foals. *J. Vet. Intern. Med.* 16, p.581–7.
10. DRANCHAK P., VALBERG S., ONAN G., et al., 2005: Inheritance of recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, p.762–7.
11. FIRSHMAN A., BAIRD J., VALBERG S., 2005: Prevalences and clinical signs of polysaccharide storage myopathy and shivers in Belgian draft horses. *J. Am. Vet. Med.* 227, p.1958–64.

12. FIRSHMAN A., VALBERG S., BENDER J., et al., 2003: Epidemiologic characteristics and management of polysaccharide storage myopathy in Quarter Horses. *Am. J. Vet. Res.* 64, p.1319–27.
13. FRITZ K., MCCUE M., VALBERG S., et al., 2012: Genetic mapping of recurrent exertional rhabdomyolysis in a population of North American Thoroughbreds. *Animal Genetics*, 43, 730–738.
14. GYÖRGY A.: A lovak izomzatának terheléses megbetegedései. URL: <http://erdelyilovas.ro/a-lovak-izomzatanak-terheleses-megbetegedesei/> Megtekintve: 2016.09.26.
15. HERSZBERG B., McCue M., Larcher T., et al., 2009: A GYS1 gene mutation is highly associated with polysaccharide storage myopathy in Cob Normand draught horses. *Anim. Genet.* 40, p. 94-96.
16. HIGUCHI T., ICHIJO S., OSAME S., et al., 1989: Studies on serum selenium and tocopherol in white muscle disease of foal. *Nippon Juigaku Zasshi.* 51, p.52–9.
17. HUICHU L.: Overview of malignant hyperthermia. URL: http://www.merckvetmanual.com/mvm/metabolic_disorders/malignant_hyperthermia/overview_of_malignant_hyperthermia.html Megtekintve: 2016.09.30.
18. HUNT L., VALBERG S., STEFFENHAGEN K., et al., 2008: An epidemiological study of myopathies in Warmblood horses. *Equine Vet Journal.* 40, p.171-177.
19. KEEN J., 2011: Diagnosis and management of equine rhabdomyolysis. URL: <http://inpractice.bmj.com/content/33/2/68.abstract> Megtekintve: 2016.10.11.
20. KLEIN L., 1975: A hot horse. *Vet. Anesth.* 2, p.41–2.
21. KÓSA Cs., KUTASI O., SZENCI O., 2015: A lovak izombetegségeinek osztályozása, terhelésre jelentkező izombetegségek leírása, különös tekintettel a székelyföldi jellegzetességekre. *Magyar Állatorvosok Lapja.* 137, p.451-462.
22. KÓSA Cs., KUTASI O., SZENCI O.: A lovak izombetegségeinek osztályozása, a terhelésre jelentkező izombetegségek leírása. URL: <http://docplayer.hu/15776343-A-lovak-izombetegsegeinek-osztalyozasa-a-terhelesre-jelentkezo-izombetegsegek-leirasa.html> Megtekintve: 2016.09.30.
23. LARSON E., 2013: Exertional rhabdomyolysis – Not just tying up anymore. URL: <http://www.thehorse.com/articles/31322/exertional-rhabdomyolysis-not-just-tying-up-anymore> Megtekintve: 2016.09.26.

24. LENTZ L., VALBERG S., BALOG E., et al., 1999: Abnormal regulation of muscle contraction in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Am. J. Vet. Res.* 60, p.992–9.
25. LOFSEDT J., 1997: White muscle disease of foals. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 13, p.169–85.
26. M. REED S., M. BAYLY W., SELTON D., 2010 : Equine Internal Medicine. 3rd ed. St Louis, Saunders.
27. MACLEAY J., SORUM S., VALBERG S., et al., 1999: Epidemiologic analysis of factors influencing exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *Am. J. Vet. Res.* 60, p.1562–6.
28. MACLEAY J., VALBERG S., PAGAN J. 1999: Effect of diet in Thoroughbred horses with recurrent exertional rhabdomyolysis performing a standardized exercise test. *Eq Vet J Suppl*, 30, p. 458.
29. MCCARTHY E., 2004: Malignant hyperthermia: pathophysiology, clinical presentation, and treatment. *AACN Clin. Issues.* 15, p.231–7.
30. MCCUE M., RIBEIRO W., VALBERG S., 2006: Prevalence of polysaccharide storage myopathy in horses with neuromuscular disorders. *Equine Vet. J.* 36, p.340–4.
31. MCCUE M., VALBERG S., 2007: Estimated prevalence of polysaccharide storage myopathy among overtly healthy Quarter Horses in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231, p.746–50.
32. MCCUE M., VALBERG S., LUCIO M., MICKELSON J., 2008: Glycogen synthase 1 (GYS1) mutation in diverse breeds with polysaccharide storage myopathy. *J. vet. intern. Med.* 22, p.1228-1233.
33. MCGOWAN C., 2008: Clinical Pathology in the Racing Horse: The Role of Clinical Pathology in Assessing Fitness and Performance in the Racehorse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.* 24, p.405-21.
34. MCGOWAN C., FORDHAM T., CHRISTLAY R., 2002: Incidence and risk factors for exertional rhabdomyolysis in Thoroughbred racehorses in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 151, p.623–6.
35. MCKENZIE E., VALBERG S., GODDEN S., et al., 2002: Plasma and urine electrolyte and mineral concentrations in Thoroughbred horses with recurrent exertional rhabdomyolysis after consumption of diets varying in cation–anion balance. *Am. J. Vet. Res.* 63, p.1053–60.

36. MICHIGAN STATE UNIVERSITY: Exertional Rhabdomyolysis (ER). URL: <https://cvm.msu.edu/research/faculty-research/valberg-laboratory/exertional-rhabdomyolysis> Megtekintve: 2016.10.11.
37. OGLESBY R.: Tying up: rhabdomyolysis in horses. URL: <http://www.horsetalk.co.nz/2012/10/09/tying-up-rhabdomyolysis-in-horses/#axzz4M6KJzcra> Megtekintve: 2016.09.17.
38. PERKINS G., Valberg S., Madigan J., et al., 1998: Electrolyte disturbances in foals with severe rhabdomyolysis. *J. Vet. Intern. Med.* 12, p.173–7.
39. VALBERG S., 2009: Approach the horse with a suspected myopathy. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association.* 24-27 September 2009, Guarujá, SP, Brazil.
40. VALBERG S., 2015: Exertional rhabdomyolysis in the horse. URL: <https://ker.com/wp-content/uploads/2015/03/EXERTIONAL-RHABDOMYOLYSIS-IN-THE-HORSE-161.pdf> Megtekintve: 2016.09.25.
41. VALBERG S., WARD T., RUSH B., et al., 2001: Glycogen branching enzyme deficiency in Quarter Horse foals. *J. Vet. Intern. Med.* 15, p.572–80.
42. VALENTINE B., Cooper B., 2005: Incidence of polysaccharide storage myopathy: necropsy study of 225 horses. *Vet. Pathol.* 42, p.823–7.
43. VALENTINE B.: EPSM – Muscle disease in draft horses. URL: https://www.ruralheritage.com/vet_clinic/epsm.htm Megtekintve: 2016.10.01.
44. WILBERGER M., MCKENZIE E., PAYTONM., et al., 2015: Prevalence of exertional rhabdomyolysis in endurance horses in the Pacific Northwestern United States. *Equine Vet. Journal.* 47, p.165–170.
46. WUNDERLICH E., SZARKA A., 2014: A biokémia alapjai. Typotex kiadó. p.120.

4. melléklet

Alulírott *Futasi Orsolya* igazolom, hogy

..... *Szalai Szabolcs* (a hallgató neve)

..... *Egyes genetikai folyamatok szerepe az emberiség evolúciójának kialakulásában*
..... *Emelyleg egy bizonyos szempontban*
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. március 20.

..... *[Handwritten Signature]*

a témavezető neve és aláírása

..... *Állományfejlesztés, Takarmányhasznosítás és*

..... *Élelmiszer-tudományok Intézet*

tanszék

5. melléklet

NYILATKOZAT

Alulírott Szalai Szabolcs nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe Égési genetikai faktorok szerepe a leukoeritropoiesis
rehabilitációs kimenetelében Érdely egy kórházi régiójában
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2016
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2017. nov. 20

SZALAI SZABOLCS S.S. Sz

a hallgató neve és aláírása

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: SZALAI SÁROZKA
Elérhetőség (e-mail cím): szalai.saroka@qmail.hu
A feltöltendő mű címe: Egyetemen belülről történő hozzáférések korlátozásának kiegészítéséről
A mű megjelenési adatai: 704. oldal
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül), a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel).

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2017 év hó nap



aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.