



Autoreferat

dr n. wet. Sylwester Kowalik

**Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie**

1. Imię i nazwisko

Sylwester Kowalik

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania

- Lekarz weterynarii – tytuł zawodowy nadany przez Akademię Rolniczą w Lublinie (nr dyplomu 27479 z dnia 04 maja 1999 roku).
- Doktor nauk weterynaryjnych - stopień nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w dniu 20 maja 2004 roku na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Wpływ alfa-ketoglutaranu (AKG) podawanego *per os* na rozwój i mineralizację układu kostno-szkieletowego u prosiąt w okresie 70 dni życia postnatalnego badanego na modelu kości udowej” wykonanej pod opieką Prof. dr hab. Tadeusza Studzińskiego.
- Specjalista chorób psów i kotów – tytuł nadany przez Komisję ds. Specjalizacji Lekarzy Weterynarii w Puławach (nr dyplomu 4/818 z 07 grudnia 2013 roku).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

Od 01 października 1999 roku do dnia dzisiejszego – Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (poprzednia nazwa Akademia Rolnicza w Lublinie) na stanowiskach:

- a) Asystenta - od 01.10.1999 do 30.09.2004 w Katedrze Fizjologii Zwierząt Akademii Rolniczej w Lublinie.
- b) Adiunkta – od 01.10.2014 do dnia dzisiejszego w Katedrze Fizjologii Zwierząt (w latach 2006 – 2014 w Katedrze Biochemii i Fizjologii Zwierząt) Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

4. Wskazane osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

Jednotematyczny cykl publikacji:**Badania nad możliwością wykorzystania oznaczeń biologicznie aktywnych białek w osoczu krwi oraz kortyzolu w ślinie w testach wysiłkowych u koni wyścigowych****4.1. W skład osiągnięcia wchodzi następujące publikacje:**

1. Kędzierski W., **Kowalik S.**: Leptin and ghrelin and the indices of lipid metabolism as related to sex steroid hormones in trotters. *Journal of Equine Veterinary Sciences* 2009, vol. 29 (1), 17-23 DOI: 10.1016/j.jevs.2008.11.005 (punkty MNiSW₂₀₀₉ = **15**, IF₂₀₀₉ = **0,472**), liczba cytowań 8
Mój wkład w autorstwo: 40% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i zorganizowanie przebiegu doświadczenia, zebranie materiału doświadczonego, współudział w analizach laboratoryjnych, opracowanie wyników oraz przygotowanie tekstu maszynopisu.
2. **Kowalik S.**, Kędzierski W.: The effect of interval versus continuous exercise on plasma leptin and ghrelin concentration in young trotters. *Polish Journal of Animal Sciences* 2011, vol. 14 (3), 373-378 DOI: 10.2478/v10181-011-0056-1 (punkty MNiSW₂₀₁₁ = **20**, IF₂₀₁₁ = **0,565**), liczba cytowań 6
Mój wkład w autorstwo: 80% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i zorganizowanie przebiegu badań, zebranie materiału biologicznego, współudział w wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowanie statystyczne wyników badań, opracowanie tekstu maszynopisu.
3. Kędzierski W., Strzelec K., Cywińska A., **Kowalik S.**: Salivary cortisol concentration in exercised Thoroughbred horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013, vol. 33 (12), 1106-1109 DOI: 10.1016/j.jevs.2013.04.011 (punkty MNiSW₂₀₁₃ = **20**, IF₂₀₁₃ = **0,892**), liczba cytowań 7
Mój wkład w autorstwo: 50% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i zorganizowanie przebiegu badań, zebranie materiału biologicznego, współudział w opracowaniu tekstu maszynopisu.
4. Kędzierski W., Cywińska A., Strzelec K., **Kowalik S.**: Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Animal Science Journal* 2014, vol. 85 (3), 313-317 DOI: 10.1111/asj.12146 (punkty MNiSW₂₀₁₄ = **25**, IF₂₀₁₄ = **0,96**), liczba cytowań 11

Mój wkład w autorstwo: 50% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i zorganizowanie przebiegu badań, zebranie materiału biologicznego, krytyczne zrecenzowanie manuskryptu pod kątem zawartości merytorycznej oraz przygotowanie ostatecznej wersji maszynopisu do druku.

- 5. Kowalik S., Kędzierski W., Janczarek I., Wilk I.:** Plasma adropin in exercised horses: a pilot study. *Pferdeheilkunde* 2017, vol. 33 (6), 585-590 DOI: 10.21836/PEM20170606 (punkty MNiSW₂₀₁₇ = **15**, IF₂₀₁₇ = **0,232**)

Mój wkład w autorstwo: 70% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i zorganizowanie przebiegu badań, zebranie materiału biologicznego, współudział w wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowanie statystyczne wyników badań, opracowanie tekstu maszynopisu.

- 6. Kędzierski W., Janczarek I., Wilk I., Staniszewska M., Kowalik S.:** Plasma visfatin response to the intensity of exercise and training in race-horses. *Pferdeheilkunde* 2018, vol. 34 (6), 525-530 DOI: 10.21836/PEM20180603 (punkty MNiSW₂₀₁₈ = **15**, IF₂₀₁₇ = **0,232**)

Mój wkład w autorstwo: 50% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i zorganizowanie przebiegu badań, zebranie materiału biologicznego, analiza statystyczna wyników, przygotowanie ostatecznej wersji maszynopisu do druku.

- 7. Kowalik S., Tomaszewska E.:** Does routine exercise induce stress and in consequence serum amyloid A (SAA) response in purebred Arabian racehorses? *Pferdeheilkunde* 2018, vol. 34 (2), 121-125 DOI: 10.21836/PEM20180203 (punkty MNiSW₂₀₁₈ = **15**, IF₂₀₁₇ = **0,232**)

Mój wkład w autorstwo: 90% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i zorganizowanie przebiegu badań, zebranie materiału biologicznego, współudział w wykonaniu analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja wyników, opracowanie maszynopisu do druku.

Łączna punktacja siedmiu prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi

punkty Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (<i>wg listy czasopism punktowanych MNiSW</i>)	125
sumaryczny Impact Factor (<i>wg listy Journal Citation Reports</i>):	3,585
łączna liczba cytowań:	32

Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstaniu pracy znajdują się w załączeniu (załącznik nr 3 i 4).

4.2. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wartość współczesnego konia uzależniona jest w dużej mierze od osiągniętych wyników w próbach dzielności. Aby osiągnąć te najlepsze wyniki, konie w zależności od rasy i użytkowania, rozpoczynają pierwsze treningi nawet przed ukończeniem 1 roku życia (Kędzierski 2009). Celem takiego treningu jest prowadzenie regularnych i systematycznych ćwiczeń mających wykształcić pewne właściwości organizmu, pozwalające na bardziej efektywną pracę, umożliwiającą osiągnięcie możliwie najlepszych wyników w próbach dzielności. W przypadku treningu wyścigowego założenia te opierają się o osiągnięcie przez konie jak najlepszych wyników na torze. Realizowane jest to przez stopniowe przyzwyczajaniu młodego organizmu do pewnych obciążeń treningowych, aby ostatecznie wykształcić w nim swoisty stan maksymalnej adaptacji wysiłkowej. Adaptacja ta musi odbywać się pod ścisłą kontrolą ze względu na bardzo wąską granicę jaka występuje między stanem optymalnego wytrenowania, a mogącym się wytworzyć zespołem przetrenowania. Wystąpienie takiego zespołu powodowane m.in. niewłaściwą kontrolą treningu, nieznaną charakterystyką psychosomatycznej zwierzęcia czy jego możliwości wysiłkowych, może spowodować nieplanowane pogorszenie lub stagnację wydolności. W konsekwencji u koni doprowadzić to może do wydatnego spadku ich dzielności wyścigowej. Aby uniknąć takich błędów oraz ustalić, gdzie leży granica wydolności organizmu, należy na każdym etapie treningu prowadzić monitoring parametrów uznanych w sporcie hippicznym za wskaźniki stopnia wytrenowania (Linder 2000). Badania nad możliwością stosowania takich wskaźników trwają od lat i istnieją już pewne standardowe oznaczenia powszechnie uznane i stosowane w celu określenia statusu treningowego koni wyczynowych. Opierają się one głównie o badania fizykalne, badania parametrów morfologicznych oraz biochemicznych krwi trenujących koni, a wyniki oznaczeń tych wskaźników mogą świadczyć o pozytywnym lub negatywnym wpływie treningu. Do takich oznaczeń należy m. in. określenie częstości tętna, wskaźnika hematokrytowego, stężenia kwasu mlekowego, białka całkowitego, glukozy, glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), kwasu moczowego, kortyzolu, aktywności kinazy kreatynowej, dehydrogenazy mleczanowej i innych. Jednakże, wraz ze wzrostem zainteresowania zagadnieniami związanymi z fizjologią wysiłkową, pojawia się potrzeba poszukiwania nowych, specyficznych dla gatunku markerów, które mogłyby znaleźć praktyczne zastosowanie w monitoringu oceny stopnia przygotowania konia do obciążeń treningowych. Hormony tkankowe wydają się odgrywać tu istotną rolę, ponieważ umiejętnie prowadzony trening powoduje pobudzenie rozwoju poszczególnych tkanek (i narządów) w kierunku wykształcenia cech odpowiadających rasie i użytkowości zwierząt. Stąd, poziom tych

czynników może stanowić wykładnię stopnia wytrenowania. Szczególnie jest to istotne, jeśli potwierdzony jest udział takich czynników białkowych w regulacji przebiegu procesów przemian energetycznych u innych gatunków. Niestety, odrębność gatunkowa powoduje, iż nie można bezwarunkowo przenieść informacji dotyczących funkcji i zastosowania tych markerów bezpośrednio z badań medycznych do praktyki hippicznej bez szczegółowych badań w odniesieniu do koni. Markerami o wymienionych właściwościach, na które zwrócono uwagę w fizjologii człowieka są adipokiny. W ostatnich latach, odkąd potwierdzono, iż tkanka tłuszczowa jest aktywnym narządem endokrynnym, znacznie wzrosło zainteresowanie tymi licznie występującymi związkami o potwierdzonych właściwościach hormonalnych. Różnorodność adipokin zarówno pod względem budowy strukturalnej jak i pełnionych funkcji jest znaczna, jednakże do badań u koni wybrałem te, których funkcje wiążą się z homeostazą energetyczną organizmu czyli leptynę i wisfatynę. Innym czynnikiem, którego wpływ na gospodarkę energetyczną ustroju został szeroko opisany u ludzi jest grelina. Hormon ten stanowi obecnie obiekt częstych badań u zwierząt ze względu na jego potwierdzone uczestnictwo w wielu procesach biologicznych. Opisany jest m.in. wpływ greliny na czynność przewodu pokarmowego, układu endokrynologicznego, immunologicznego czy na procesy wzrostu i rozwoju organizmu. Jednakże, nie określono do tej pory efektów jej oddziaływania na przemiany energetyczne zachodzące u koni podczas treningu. Podobnie, doniesienia ostatnich lat wskazują na potencjalny udział adropiny, hormonu związanego z metabolizmem tłuszczów i węglowodanów ważnego regulatora procesów energetycznej homeostazy organizmu (Aydin 2014). Obciążenia wysiłkowe stosowane podczas codziennych sesji treningowych wywołują, szczególnie u młodych koni, nie tylko zmiany metaboliczne, ale również napięcia emocjonalne, których negatywne skutki mogą objawiać się poważnymi zaburzeniami homeostazy organizmu. Powszechnie stosowaną metodą oznaczania poziomu stresu u koni wyścigowych jest pomiar stężenia kortyzolu w surowicy krwi. Badania te wiążą się jednak z koniecznością zaangażowania wykwalifikowanego personelu, a samo pobranie próbki krwi żyłnej obarcza zwierzę dodatkowym, niepotrzebnym stresem (Cordero 2012, Ono 2017). Innowacyjnością prowadzonych przez mnie badań było wprowadzenie nowej metody oznaczania kortyzolu, polegającej na wykorzystaniu pobierania próbek śliny do oznaczeń poziomu tego hormonu u koni wyścigowych. Podkreślić należy, iż metoda ta nie wyzwala stresu u badanych koni i jest możliwa do przeprowadzenia w każdych warunkach. Dodatkowo, zaproponowałem, aby włączyć oznaczanie surowiczego amyloidu A (SAA) jako nowego standardu określania poziomu stresu energetycznego w trakcie przebiegu treningu u koni wyścigowych.

Badania przeprowadzone w latach 2009-2018 polegały na określeniu wpływu wysiłku o różnej intensywności na wydzielanie aktywnych czynników białkowych oraz hormonów w celu określenia ich przydatności jako markerów wydolności wysiłkowej koni.

Pierwsza praca z przedstawionego cyklu publikacji (**poz. 4.1.1**) dotyczy określenia wpływu wysiłku fizycznego oraz płci koni na poziom leptyny i greliny jako hormonów o potencjalnym znaczeniu w regulacji procesów przemian energetycznych u kłusaków. Badania te są szczególnie ciekawe, ponieważ konie rasy Standardbred rozpoczynają proces treningowy w wieku ok. 15 miesięcy, czyli na długo przed zakończeniem rozwoju osobniczego (Leleu 2004). Wiek koni przeznaczonych do treningu nie jest przypadkowy. Stwierdzono bowiem, iż w tym czasie zwierzęta osiągają największą zdolność do nauki wymaganej koordynacji ruchów w charakterystycznym, szybkim kłusie (tzw. *flying trot*), a przemiany metaboliczne tak młodych organizmów szybko pokrywają straty energetyczne związane z intensywnym treningiem. Powszechną praktyką jest wystawianie już dwuletnich kłusaków w oficjalnych gonitwach (Fortier 2014). Utrzymanie właściwego balansu między wytwarzaniem energii a jej wydatkowaniem jest szczególnie istotne, ponieważ prowadzona selekcja hodowlana opiera się na kształtowaniu zdolności do długotrwałego wysiłku fizycznego i zachowania podwyższonej odporności na zmęczenie. Zaburzenia tej równowagi mogą być skutkiem upośledzenia pewnego rodzaju wzorca kontroli endokrynej związanej z apetytem i przyjmowaniem pokarmu. W tej kontroli istotną rolę odgrywają leptyna i grelina, które poprzez wpływ na spożycie paszy, metabolizm kwasów tłuszczowych lub regulację poziomu glukozy i insuliny dostarczają organizmowi informacji o aktualnym stanie bilansu energetycznego (Havel 2001, Gale 2004). Leptynę pierwotnie zaliczono do adipokin związanych z układem anoreksygenicznym, ponieważ potwierdzono jej hamujący wpływ na pobieranie pokarmu (Tang-Christensen 1999). Główną jej funkcją jest przekazywanie informacji z tkanki tłuszczowej do ośrodkowego układu nerwowego o statusie energetycznym organizmu i hamowanie podwzgórzowych szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za odczuwanie głodu oraz stymulację szlaków związanych z odczuciem sytości. Jej poziom jest też ściśle skorelowany ze stopniem odtuszczenia organizmu. Badania prowadzone u koni potwierdziły, iż poziom leptyny wzrasta proporcjonalnie do ilości tkanki tłuszczowej, a zmniejsza się znacznie w czasie braku dostępu do pokarmu dostosowując metabolizm organizmu do zasobów zgromadzonej tkanki tłuszczowej (McManus 2000). Jej funkcja nie ogranicza się wyłącznie do regulacji łaknienia, hormon ten posiada znacznie szersze spektrum oddziaływania ogólnoustrojowego. Pełni ona bowiem istotną rolę czynnika stymulującego dojrzewanie płciowe organizmu, hematopoezę, angiogenezę, wpływa na metabolizm glukozy, tłuszczów, a także na procesy kościotworzenia i odpornościowe (Vogel

1996, Reidy 2000, Nonogaki 2000, Matarese 2000, Anagnostoulis 2008). Jej wytwarzanie i uwalnianie, przypisywane pierwotnie białej tkance tłuszczowej, jest możliwe również w łożysku, żołądku, mózgu, trzustce czy tkance mięśniowej (Mouio 2002). Z punktu widzenia fizjologii wysiłkowej istotna wydaje się rola leptyny, jaką odgrywa w procesach związanych z wydatkowaniem energii podczas wykonywania ćwiczeń. Regulacja mechanizmów wydatkowania energii odbywa się przez zwiększenie oksydacji wolnych kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej, pobudzanie lipolizy oraz hamowanie lipogenezy w tkance tłuszczowej oraz wzrost intensywności utleniania kwasów tłuszczowych w wątrobie (Stanley 2005). Leptyna powoduje również zwiększenie wychwytu i utleniania glukozy oraz syntezy glikogenu w mięśniach szkieletowych, a także powoduje zwiększenie insulinowrażliwości komórek (Kahn 2000). Najważniejszymi aktywatorami uwalniania leptyny są kortykosteroidy, insulina oraz estrogeny, natomiast katecholaminy czy testosteron pełnią funkcję inhibitorów tego procesu. Wszystkie te czynniki zaangażowane są w regulację wielu innych ustrojowych procesów energetycznych. Można więc zakładać, iż jeśli dojdzie do zmian ilościowych w procesach wydatkowania energii, a wysiłek fizyczny u trenujących koni na pewno do tego prowadzi, to wpłynie to na poziom leptyny.

Grelina jest zaangażowana w regulację homeostazy energetycznej organizmu poprzez wywieranie pobudzającego wpływu na układ oreksygeniczny, w wyniku czego dochodzi do zwiększenia łaknienia. Jest hormonem o najsilniejszym działaniu stymulującym apetyt i fizjologicznym antagonistą leptyny (Shintani 2001, Klok 2007). Produkowana jest głównie przez komórki endokryne (*X/A-like cells*) zlokalizowane w gruczołach żołądkowych właściwych, w mniejszym stopniu w syntezie greliny biorą udział neurony jądra łukowatego podwzgórza i komórki przysadki, nerek, trzustki, łożyska, serca czy komórek układu immunologicznego (Sato 2012). Ośrodkowo jest silnym stymulatorem uwalniania hormonu wzrostu z przysadki mózgowej oraz neuropeptydu Y w jądrze łukowatym podwzgórza (Wren 2000, Takaya 2000). Analizując jej działanie na poziomie obwodowym wykazano istnienie zależności między stężeniem greliny, a występowaniem stresu. Mianowicie, wzrost stężenia tego hormonu wywołuje u zwierząt doświadczalnych wyrzut ACTH i kortyzolu, co objawia się wystąpieniem reakcji stresowej, a sam stres z kolei zwiększa wtórnie uwalnianie greliny. Krótkofalowym efektem takiego sprzężenia jest zwiększenie apetytu, a długofalowym wzrost masy ciała (Cummings 2006, De Vriese 2007). Wysiłek fizyczny jest u koni trenujących wystarczającym czynnikiem stresogennym, więc w założeniach pracy przyjęto, iż może wpłynąć na zwiększenie poziomu greliny we krwi koni doświadczalnych.

Celem omawianych badań było określenie wpływu wysiłku fizycznego oraz płci koni na poziom leptyny i greliny jako wskaźników metabolizmu energetycznego u młodych kłusaków. Do badań zakwalifikowano 34 klinicznie zdrowe kłusaki rasy Standardbred. W skład tej grupy weszło 11 ogierów w wieku 2-3 lat, 16 klaczy w wieku 2-3 lat, oraz 7 wałachów w wieku 3-4 lat. Wszystkie konie biorące udział w doświadczeniu pochodziły z jednego centrum treningowego, w którym realizowały jednolity program treningowy. Badania przeprowadzono w czasie dwóch następujących po sobie dni w podobnych warunkach pogodowych. Rodzaj zastosowanego wysiłku, jego czas trwania oraz intensywność był zgodny z założeniami zaleconymi przez trenera i nie był przez nas modyfikowany. Każdy z koni odbywał 45-minutową sesję treningową na piaszczystym torze, podczas której pokonywał ok. 9 kilometrowy dystans ze średnią prędkością 4-6,2 m/s. Materiał do badań stanowiła krew żylna pobierana przez nakłucie żyły szyjnej zewnętrznej w spoczynku oraz tuż po zakończeniu sesji treningowej. W świeżej krwi oznaczano poziom kwasu mlekowego (LA) jako wskaźnika intensywności wysiłku. Pozostałą krew wirowano a uzyskane osocze zamrażano do czasu przeprowadzania oznaczeń laboratoryjnych. Poziomy badanych hormonów określono metodą radioimmunologiczną. Dodatkowo, w osoczu przeprowadzono analizy stężenia produktów przemian lipidowych, glicerolu, WKT i trójglicerydów (TG) wykorzystując metody kolorymetryczne. Analiza wyników została przeprowadzona z uwzględnieniem płci badanych koni. Uzyskane wyniki świadczą, iż stosowany w doświadczeniu wysiłek fizyczny nie był dla koni obciążający o czym świadczył niski nie przekraczający 1,2 mmol/L powysiłkowy poziom LA. Stwierdzono natomiast zmiany stężenia badanych hormonów wśród wszystkich podgrup badanych kłusaków. Najniższe, zarówno spoczynkowe jak i powysiłkowe stężenia leptyny stwierdzono u wałachów, a najwyższe u klaczy. Istnienie dymorfizmu płciowego w układzie hormonalnym zaangażowanym w utrzymanie homeostazy energetycznej organizmu było już wcześniej sygnalizowane (Saad 1997). Wyniki uzyskane w naszych badaniach są zgodne z tezą, iż estrogeny przyczyniają się do zwiększenia stężenie tej adipokiny, natomiast testosteron wpływa na zmniejszenie jej wydzielania. Odwrotnie do poziomu leptyny, spoczynkowe stężenie greliny było najwyższe u wałachów, a najniższe u klaczy. Jednakże, po wysiłku stężenie tego hormonu u wałachów nie ulegało zmianie, co jest zgodne z badaniami przeprowadzonymi u ludzi (Kraemer 2004, Ghanbari-Niaki 2006). Natomiast u niekastrowanych osobników obserwowano wzrost stężenia greliny w osoczu krwi. Wpływ wysiłku fizycznego na poziom osoczowej greliny opisał też Erdman (2007). Stwierdzony wzrost wydzielania greliny podczas wysiłku sugeruje jej udział w procesach stabilizacji bilansu energetycznego organizmu przez zmniejszenie oksydacji tłuszczów w wątrobie, a zwiększenie w pracujących mięśniach (Barazzoni 2005), co znajduje potwierdzenie

w omawianych badaniach, gdzie wzrost stężenia greliny był powiązany z niższym stężeniem WKT.

Zatem udowodniono, iż leptyna i grelina mogą być stosowane w fizjologii wysiłkowej koni jako markery przemian energetycznych. Jednakże pojawiło się pytanie, czy wielkość zmian stężeń tych hormonów może być determinowana stopniem intensywności treningu. Aby na nie odpowiedzieć zostało przeprowadzone doświadczenie, które przedstawiono w kolejnej pracy składającej się na prezentowany cykl publikacji (**poz. 4.1.2**). Celem badań było określenie wpływu wysiłku o charakterze ciągłym oraz interwałowym na poziom leptyny i greliny w surowicy krwi młodych kłusaków. W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji na temat wykorzystania tych hormonów w monitorowaniu przebiegu wysiłku o różnej intensywności. Wiadomo jednak, że kierunek i zakres zmian wartości poszczególnych wskaźników krwi jest związany z intensywnością i czasem trwania pracy (Piccione 2010, Kędzierski 2014). Próby o charakterze wytrzymałościowym wywołują odmienną reakcję organizmu konia niż próby szybkościowe (Kędzierski 2002). Badaniami objętych zostało 27 kłusaków w wieku 2-3 lat, podzielonych na dwie grupy doświadczalne, zależne od rodzaju zastosowanego wysiłku. Grupę pierwszą stanowiło 10 koni, które realizowały sesję treningową o charakterze ciągłym, natomiast grupę drugą 17 koni realizujących wysiłki o charakterze interwałowym. Czas trwania sesji treningowych był taki sam dla obydwu grup koni i wynosił 45 minut. Trening interwałowy składał się z trzech, kolejno po sobie następujących etapów. Pierwszy etap to 15-minutowa rozgrzewka, podczas której konie biegły swobodnym kłusem. W drugim etapie przez kolejne 15 minut stopniowo zwiększano prędkość poruszania się koni. W ostatnim etapie, co każde 500 metrów biegu następowało zwiększenie prędkości kłusa, aż do osiągnięcia szybkości 9,2 m/s. Konie realizujące trening ciągły przebiegały w czasie 45-minutowej sesji dystans 11 tys. metrów ze stałą średnią prędkością wynoszącą 5,1 m/s. Każdy trening zakończony był 10-minutowym swobodnym kłusem. Materiał do badań stanowiła krew żylna pobierana od trenowanych koni w spoczynku, tuż po zakończeniu sesji treningowej oraz po kolejnych 30 minutach odpoczynku. Porównując wyniki uzyskane w doświadczeniu wykazano, iż rodzaj prowadzonego treningu ma wpływ na poziom leptyny i greliny u koni kłusaków. W przypadku leptyny stwierdzono wzrost jej wartości po wysiłku u koni realizujących wysiłki o charakterze ciągłym. Po 30-minutowym odpoczynku zaobserwowano tendencję do powrotu wartości tego hormonu do poziomu spoczynkowego. Podobnie, wysiłek o charakterze ciągłym przyczynił się do istotnego zwiększenia stężenia greliny w surowicy krwi badanych koni, a po 30-minutowym odpoczynku jej poziom również się zmniejszał. Ten obserwowany trend do zwiększania stężenia leptyny i greliny podczas wysiłku i następczego, dość szybkiego obniżania ich wartości może świadczyć,

iz zmiany poziomu tych hormonów powodowane wysiłkiem o charakterze ciągłym są krótkotrwałe. Interesującym jest też fakt, iż średnie stężenie kwasu mlekowego w tej grupie koni po zakończeniu treningu wynosiło 0,91 mmol/l. Czyli wysiłek o niewielkiej intensywności jest w stanie wpłynąć na zwiększenie stężenia tych hormonów. Z kolei wiadomo, iż następstwem wzrostu poziomu leptyny jest przyspieszenie oksydacji WKT w wątrobie, co usprawnia ich metabolizm (Dotsch 2003). Obserwowany wzrost stężenia greliny w osoczu krwi kłusaków realizujących ciągły rodzaj wysiłku wg dostępnej literatury może być wynikiem stresu wysiłkowego (Rouach 2007) lub gorszego przygotowania kondycyjnego koni, o czym mogą również świadczyć niższe jej wartości spoczynkowe (Gordon 2007).

Analizując dane pochodzące od koni, które realizowały wysiłek interwałowy stwierdzono, że jego wpływ na poziom leptyny i greliny nie jest już tak oczywisty. Nie wykazano bowiem, aby ten typ wysiłku wpłynął na poziom leptyny u badanych koni mimo tego, iż średnie stężenie kwasu mlekowego po zakończeniu treningu wzrastało do 2,36 mmol/l. Jednakże, wysiłek ten wpłynął istotnie na zmniejszenie stężenia greliny we krwi badanych koni. Z punktu widzenia fizjologii wysiłkowej spadek ten można tłumaczyć jako odpowiedź organizmu na wysiłkowy wzrost stężenia glukozy we krwi. Ten wysoki poziom glukozy związany jest z kolei z nasiloną glikogenolizą (Gordon 2006). Dodatkowo stwierdzono, iż niskie stężenie greliny może wpływać na procesy oksydacji tłuszczów i przez to sprzyjać ich wykorzystaniu w procesach wydatkowania energii oraz jednocześnie do ekonomicznego wykorzystania glukozy. Zatem stosowany wysiłek o charakterze interwałowym zaliczany do szybkościowo-wytrzymałościowego wydaje się w lepszym stopniu przygotowywać kondycyjnie trenujące kłusaki. Tezę tę potwierdzają również wyniki oznaczeń stężenia kwasu mlekowego, którego średnie wartości w tej grupie koni wynosiły 2,36 mmol/l i nie przekraczały one poziomu tzw. progu mleczanowego. Jest to zgodne z założeniami prowadzenia tego typu treningu polegającego na naprzemiennym wykonywaniu pracy o dużym nasileniu i stosowaniu odpoczynku w ruchu, co ma na celu wydłużenie czasu pracy w warunkach tlenowych i opóźnia wystąpienie objawów zmęczenia (Gordon 2007). Z drugiej strony, spadek stężenia greliny po wysiłku może powodować zmniejszenie łaknienia i w ten sposób utrudniać odbudowę zasobów energetycznych u trenowanych koni.

Utrzymanie homeostazy energetycznej jest wysoce złożonym mechanizmem, który wymaga zaangażowania wielu czynników regulacyjnych, do których zaliczane są m.in. leptyna i grelina (Aydin 2013). W poprzednich pracach dowiedziono, iż wysiłek fizyczny jest czynnikiem wpływającym na poziom tych hormonów u koni wyścigowych. Potwierdzono również, że w dużej mierze poziom ten zależy od rodzaju prowadzonego treningu czyli od jego czasu trwania

oraz intensywności. Adropina jest stosunkowo niedawno odkrytym peptydem kodowanym przez gen *Enho* głównie w wątrobie i mózgu, choć badania potwierdzają ekspresję tego genu również w tkance mięśniowej oraz w mięśniu sercowym (Kumar 2008). Jej obecność w mięśniach szkieletowych spowodowała, iż cytokinę tę zalicza się do grupy miokin, których produkcję stymuluje praca mięśniowa (Sanchis-Gomar 2015). Opisano jej udział w procesach metabolicznych jako czynnika zwiększającego łaknienie oraz ilość tkanki tłuszczowej, co odbywa się na drodze hamowania utleniania tłuszczów, przez co uważana jest za czynnik istotnie wpływający na homeostazę energetyczną organizmu (Kumar 2012, Aydin 2014,). W mięśniach szkieletowych adropina stymuluje wykorzystywanie glukozy jako substratu w procesach oksydacyjnych przez promowanie wychwytu glukozy do miocytów (Gao 2014, Gao 2015). Efekt działania adropiny prawdopodobnie zależy od aktywacji dehydrogenazy pirogronianowej, co skutkuje wzrostem utleniania glukozy i jej wykorzystaniem przez mięśnie szkieletowe. W przypadku obniżonego stężenia adropiny następuje zmniejszenie utleniania kwasów tłuszczowych w mięśniach przez hamowanie palmitoilotransferazy karnitynowej, enzymu odgrywającego kluczową rolę w transporcie kwasów tłuszczowych do mitochondriów komórek mięśniowych, gdzie odbywa się ich β -oksydacja (Gao 2014). Zmniejszenie stężenia adropiny wywołuje zmiany w poziomie utleniania substratów podobne do głodzenia. W stanie głodzenia kwasy tłuszczowe są głównym źródłem w metabolizmie oksydacyjnym, podczas gdy utlenianie glukozy jest hamowane. Odwrotnie jest po posiłku, kiedy glukoza stanowi główne źródło energii dla metabolizmu oksydacyjnego (deLange 2007). Na podstawie wstępnych badań przypuszcza się obecnie, iż adropina pełni funkcję białka regulacyjnego, pośredniczącego między mięśniami szkieletowymi a innymi insulinowrażliwymi tkankami. Dodać należy, iż do tej pory wszystkie wnioski o kierunkach i efektach działania adropiny opierają się o badania prowadzone na zwierzętach laboratoryjnych oraz wśród ludzi. Nie wykazano w nich również jednoznacznie, czy wysiłek fizyczny powoduje zmiany jej surowiczego stężenia. Co więcej, nie prowadzono dotychczas takich badań na zwierzętach domowych a w szczególności u koni, które ze względu na użytkowość najczęściej poddawane są regularnemu wysiłkowi fizycznemu związanemu z pracą lub treningiem sportowym. Stąd wyniki badań przedstawione w kolejnej pracy prezentowanego cyklu (**poz. 4.1.5**) są jak dotąd unikalne.

Doświadczenie zostało przeprowadzone celem potwierdzenia hipotezy, iż wysiłek fizyczny o różnym natężeniu może wpływać na surowicze stężenie adropiny u koni. Badania przeprowadzono w dwóch grupach koni o różnej użytkowości. Pierwszą grupę stanowiło 20 koni czystej krwi arabskiej będących w treningu wyścigowym, a grupę drugą 8 koni rasy konik polski użytkowanych w lokalnym ośrodku jeździeckim. Konie realizujące trening wyścigowy podzielono

dotatkowo na 2 podgrupy zależnie od stopnia obciążenia treningowego. Sesja treningowa w podgrupie pierwszej składał się z 15-minutowej rozgrzewki, po której konie pokonywały dystans 1200 m galopem ze średnią prędkością 6-7 m/s. Natomiast konie wyścigowe z podgrupy drugiej, po rozgrzewce pokonywały ten sam dystans ze średnią prędkością 10-12 m/s. Koniki polskie realizowały swoje zwykłe codzienne zadania polegające na lekkiej pracy w zaprzęgu lub pracy pod siodłem, stępem lub kłusem ze średnią prędkością 1,6m/s. Materiał do badań stanowiła krew pobierana czterokrotnie z żyły szyjnej zewnętrznej tj.: w spoczynku, tuż po wysiłku, po 30-minutowym odpoczynku oraz po 6 godzinach od zakończenia wysiłku. Doświadczenie przeprowadzono dwukrotnie w ciągu roku, na wiosnę na początku sezonu treningowego oraz jesienią w połowie sezonu treningowego koni wyścigowych. Miało to na celu sprawdzenie czy poziom surowiczej adropiny zależy od stopnia wytrenowania koni (czyli od długości okresu treningowego). Uzyskane wyniki nie potwierdziły, aby długość okresu treningowego wpływał na poziom adropiny, ponieważ nie było istotnych różnic między wartościami uzyskanymi na początku oraz w połowie sezonu treningowego. Nie stwierdzono również istotnych różnic w stężeniu tej miokiny u koników polskich oraz u koni arabskich realizujących trening o umiarkowanym obciążeniu. Obciążenia pracą lub treningowe były monitorowane przez badanie stężenia kwasu mlekowego, którego poziom po wysiłku u koników polskich wynosił 1,34 mmol/l, a u koni arabskich z podgrupy pierwszej 1,14 mmol/l. W podgrupie drugiej koni arabskich realizujących trening o dużym obciążeniu stężenie kwasu mlekowego we krwi przekraczało znacznie poziom beztlenowy i osiągało 10,4 mmol/l. W tej grupie koni stwierdzono powysiłkowy, istotny spadek stężenia adropiny w porównaniu do wartości spoczynkowych. Wykazano też istnienie ujemnej korelacji między stężeniem adropiny i LA. Wiadomo, iż stężenia niektórych hormonów zaangażowanych w procesy metaboliczno-energetyczne organizmu wykazują pewne wahania powodowane cyklem dobowym lub nawet przyjmowaniem pokarmu. Aby upewnić się, że zaobserwowany spadek stężenia adropiny w naszych badaniach nie podlegał takim wpływom, wykonano dodatkowe oznaczenia poziomu tej miokiny u koni w dniu, w którym nie pracowały lub nie trenowały. Uzyskane wyniki nie wykazały dobowych wahań stężenia adropiny. Na tej podstawie można wnioskować, iż krótkotrwały, intensywny wysiłek fizyczny o charakterze anaerobowym jest czynnikiem wyzwalającym spadek stężenia adropiny w surowicy trenujących koni.

Jak wspomniano wcześniej, funkcje nowo odkrywanych czynników tkankowych o charakterze hormonalnym nie są w pełni poznane, stąd stanowią interesujący obiekt badań naukowych. Tak też jest z kolejną adipokiną odkrytą i opisaną stosunkowo niedawno jako czynnik wzrostu dla wczesnych komórek B (ang. *PBEF1 – pre-B-cell colony-enhancing factor*) (Pilz

2007). Dla podkreślenia źródła pochodzenia jakim jest tkanka tłuszczowa został on nazwany wisfatyną. Rola tej adipokiny w procesach metabolicznych nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Wiadomo, iż posiada szerokie spektrum oddziaływania ogólnoustrojowego biorąc udział w procesie angiogenezy i neowaskulogenezy, w reakcjach immunologicznych, opisano jej właściwości antyapoptotyczne czy enzymatyczne m.in. jako czynnik uczestniczący w syntezie dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) biorącego udział w metabolizmie węglowodanów i lipidów (Goody 2018). Ograniczenie dostępności NAD skutkuje z kolei zaburzeniami metabolizmu energetycznego mięśni szkieletowych, a ich sprawność metaboliczna dla pracujących koni jest najistotniejsza (Canto 2015). Wykazano też, że wisfatyna wykazuje synergistyczne działanie z insuliną, czego wyrazem jest zwiększony wychwyt glukozy przez tkanki tłuszczową i mięśniową oraz hamowanie uwalniania glukozy wątrobowej (Fukuhara 2005). Adipokina ta wpływa również na przemiany lipidowe poprzez stymulację syntezy trójglicerydów i zwiększone ich odkładanie w preadipocytach (Malamitsi 2007). Na jej surowicy poziom ma wpływ szereg czynników takich jak pora dnia, dieta, stan otłuszczenia oraz aktywność fizyczna (Ando 2005, Bilski 2016). Jednakże, czynnikiem, co do którego pojawiły się sprzeczne dane dotyczące jego wpływu na stężenie wisfatyny, jest wysiłek fizyczny. Część badań prowadzonych wśród ludzi wykazała, iż realizacja długoterminowego programu treningowego istotnie wpływa na obniżenie poziomu tej adipokiny (Choi 2007). Odwrotnie, krótkotrwały intensywny wysiłek zwiększa stężenie wisfatyny w osoczu u sprinterów (Ghanbari-Niaki 2010). Badania nad wisfatyną i jej rolą w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu były dotychczas prowadzone jedynie wśród ludzi i zwierząt laboratoryjnych. Nie prowadzono takich badań w odniesieniu do koni. Stąd, przeprowadziłem doświadczenie mające dać odpowiedź na pytanie, czy poziom wisfatyny może zmieniać się pod wpływem wysiłku fizycznego i jakie może to mieć zastosowanie w monitorowaniu przebiegu treningu (**poz. 4.1.6**).

Badaniami objęto 22 konie czystej krwi arabskiej w wieku 3 do 4 lat pozostające w centrum treningowym i realizujące standardowy program treningowy dla koni wyścigowych. Wszystkie zwierzęta regularnie brały udział w wyścigach zgodnie z rocznym harmonogramem startów. Losowo spośród koni wyodrębniono dwie grupy, które w doświadczeniu poddawane były wysiłkowi o różnym stopniu intensywności. Grupę pierwszą stanowiło 12 koni realizujących intensywny program treningowy przez 6 dni w tygodniu. Dzienna sesja trwała ok. 1 godziny i składała się z 10-minutowej rozgrzewki, po której konie pokonywały galopem dystans od 600 do 1200 m po piaszczystym torze ze średnią prędkością 6-12 m/s. Grupę drugą stanowiło 10 koni, którym zmodyfikowano trening poprzez wprowadzenie naprzemiennie intensywnych oraz nieintensywnych sesji treningowych. Sesja o charakterze intensywnym przebiegała identycznie

jak w grupie pierwszej. Sesja o charakterze nieintensywnym trwała ok. 1,5 godziny w trakcie której konie poddawane były 10-minutowej rozgrzewce, po której następowała zmiana chodu do kłusa lub galopu z prędkością nie przekraczającą 6 m/s. Ostatnie 10 minut treningu konie odpoczywały w stępie. Badania wykonywano trzykrotnie w ciągu całego sezonu wyścigowego mianowicie w maju, lipcu i wrześniu. Było to świadome założenie, którego celem było określenie wpływu stopnia wytrenowania koni na poziom surowiczej wisfatyny. Sesje treningowe obydwu grup koni odbywały się wczesnym rankiem, zawsze o tej samej porze celem uniknięcia błędu wynikającego z ewentualnych dobowych wahań wisfatyny. Materiał do badań stanowiła krew pobierana z żyły szyjnej zewnętrznej w spoczynku, tuż po zakończeniu sesji treningowej oraz po 30-minutowym odpoczynku. Dla wszystkich 22 badanych koni określono także handicap oraz tzw. wskaźnik kondycji ciała. Uzyskane wyniki nie potwierdziły, aby krótkotrwały wysiłek, jakiemu poddawane były konie podczas sesji treningowej wpłynął na surowicze stężenie wisfatyny zarówno w grupie pierwszej jak i drugiej. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych autorów (Roupas 2013). Istnieją jednak dane literaturowe dowodzące, iż krótkotrwały, ale intensywny wysiłek był czynnikiem zwiększającym stężenie tej adipokiny w osoczu sportowców (Ghanbari-Niaki 2010). Przyczynami różniących się wyników wydają się być stosowane odmienne typy wysiłków jakim poddawani byli sportowcy, różny stopień obciążeń fizycznych, czy też różna długość sesji treningowej. Sprawia to, iż nie zawsze obserwuje się jednakowy wpływ wysiłku na wydzielanie białkowych czynników tkankowych podczas pojedynczej sesji treningowej. Podobne zależności opisano m.in. dla leptyny, stąd w doświadczeniach tego typu powinno się modyfikować programy treningowe badanych koni i porównywać uzyskane wyniki. W przeprowadzonym doświadczeniu, mimo braku różnic w stężeniu wisfatyny badanych tuż po wysiłku, stwierdzono ciekawą zależność między jej poziomem, a stopniem wytrenowania koni. Wykazano bowiem, że u koni z grupy pierwszej jej poziom był istotnie niższy w próbkach krwi pobranych we wrześniu pod koniec sezonu wyścigowego, w porównaniu do wartości stwierdzonych na początku sezonu tj. w maju. U koni z grupy drugiej nie zanotowano takich wahań stężenia wisfatyny w ciągu całego doświadczenia. Dodatkowo, konie z tej grupy osiągały lepsze wyniki w gonitwach w porównaniu ze zwierzętami z grupy pierwszej. Może to świadczyć, iż u koni które były poddawane intensywnemu treningowi wystąpiły objawy przetrenowania. W takim przypadku, wprowadzenie do standardowego panelu badań biochemicznych koni wyścigowych nowego markera wydolności wysiłkowej – wisfatyny może być szczególnie przydatne we wczesnym diagnozowaniu syndromu przetrenowania.

Kolejna praca oryginalna wchodząca w skład prezentowanego cyklu (**poz. 4.1.3**) przedstawia wyniki badań nad nowymi możliwościami oznaczania poziomu kortyzolu u koni

wyścigowych. W badaniach wpływu treningu na homeostazę metaboliczną koni trzeba zawsze brać pod uwagę fakt, iż wysiłek fizyczny jest czynnikiem silnie stresogennym. Znajomość wpływu stosowanego planu treningowego w stosunku do poszczególnych koni pozwala na indywidualny dobór obciążeń tak, by zmieścić się w wąskim zakresie optymalnej wydolności wysiłkowej znajdującej się pomiędzy stanem niedostatecznego wytrenowania a przetrenowaniem. Stąd u koni przeznaczonych do startów w różnych dyscyplinach hippicznych stosuje się treningi o odmiennym charakterze. Wysiłek jakiemu poddawane są konie wyścigowe podczas codziennych treningów i zawodów ma charakter krótkotrwały lecz bardzo intensywny (Mills 1996). Odpowiedzią na taki silny bodziec stresowy jest nadnerczowy wyrzut kortykosteroidów, które inicjują i nasilają procesy kataboliczne pobudzając rozkład glikogenu i stymulując rozpad białek mięśniowych. Dodatkowo nasilają się procesy glukoneogenezy z jednoczesnym hamowaniem odkładania glukozy w postaci glikogenu (Ralston 2002). Takie krótkotrwałe zmiany nie grożą poważnymi konsekwencjami, jednakże jeśli zmieniają charakter na przewlekły mogą nieść za sobą istotne implikacje fizjologiczne. Organizm próbując dostosować się do zachodzących zmian zaczyna modyfikować procesy związane z wydatkowaniem energii. Dochodzi wówczas do zaburzeń w obrocie białek mięśniowych z przewagą procesów katabolicznych oraz do wzmożonej produkcji glukozy, co z kolei może zwrócić doprowadzić do wystąpienia insulinooporności tkankowej. Skutkiem tego będzie zmniejszenie wydolności wysiłkowej trenowanych koni, a tym samym pogorszenie ich wyników osiągniętych na torze. Aby temu zapobiec konieczne jest prowadzenie stałego monitoringu tzw. markerów stresu. Dlatego też, w ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudziło oznaczanie kortyzolu, ze względu na potwierdzoną istotną zależność między jego stężeniem, a wielkością odpowiedzi stresowej (Matsorakos 2005). Odpowiedź ta nie jest jednak patognomoniczna dla wysiłku fizycznego, dowiedziono bowiem, iż wzrost stężenia tego hormonu w surowicy koni jest związany z szeregiem innych czynników takich jak: zmiana miejsca pobytu, transport czy pobudzenie płciowe (Colborn 1991, Fazzio 2008). Przyjęty standard oznaczania tego hormonu we krwi jest powszechnie stosowany, jednak metoda ta wymaga zaangażowania wykwalifikowanych osób do poskromienia zwierzęcia oraz pobrania próbki krwi przez nakłucie dostępnej żyły. Istnieje również ryzyko, iż procedura ta sama będąc czynnikiem stresogennym może wpłynąć na poziom kortyzolu u badanych zwierząt (Hopster 1999). Stąd, wprowadzenie nieinwazyjnych metod oznaczania tego hormonu wydaje się szczególnie istotne. Dane literaturowe wskazują, iż istnieje dodatnia korelacja między surowiczym poziomem kortyzolu a jego zawartością w ślinie (Greenwood 1992, Dorn 2007, Helhammer 2009). Jednakże ze względu na to, iż kortyzol surowiczy jest w ok. 85-98% związany z białkami transportującymi, w ślinie znajduje się jedynie jego czynna biologicznie wolna frakcja (Perogamvros 2010). Z jednej

strony należy się więc spodziewać w ślinie jego znacznie niższych stężeń z drugiej zaś, stężenie frakcji wolnej hormonu jest właściwie odpowiedzialne za wywoływanie efektów biologicznych na poziomie komórkowym (Peeters 2011). Wg mojej ówczesnej wiedzy, nie prowadzono wcześniej badań mających na celu określenie możliwości zastosowania metody oznaczania kortyzolu w ślinie u koni wyścigowych poddawanych krótkiemu, ale bardzo intensywnemu treningowi anaerobowemu. Badania te są szczególnie istotne, ponieważ wcześniejsze doniesienia dowodziły, iż na wysiłkowy wyrzut kortyzolu większy wpływ ma czas trwania treningu, niż jego intensywność (Desmetch 1996, Nagata 1999). Stad, celem pracy było określenie korelacji między stężeniem kortyzolu w ślinie i surowicy krwi, a poziomem kwasu mlekowego u koni wyścigowych.

Badania przeprowadzono w grupie 12 koni rasy pełnej krwi angielskiej w wieku 2-3 lat, składającej się z równej liczby klaczy i ogierów. Konie pozostawały stale w treningu wyścigowym i regularnie brały udział w gonitwach. W dniu badania konie realizowały standardowy trening, który rozpoczynały 10-minutową rozgrzewką w klusie, a następnie galopem pokonywały dystans 1200 m ze średnią prędkością 14,4 – 15,3 m/s. Ślinę oraz krew do badań pobierano trzykrotnie, mianowicie w spoczynku, tuż po zakończeniu sesji treningowej oraz po kolejnych 30 minutach odpoczynku. Uzyskane wyniki badań powysiłkowych wykazały istotny wzrost stężenia kwasu mlekowego we krwi badanych koni do wartości średnich 13,4 mmol/l. Podobnie, oznaczając poziom kortyzolu w surowicy krwi koni pobranej tuż po zakończeniu sesji treningowej stwierdzono istotny ponad 34 % wzrost jego stężenia. Po dalszych 30 minutach zaobserwowano następczy spadek jego poziomu do wartości zbliżonych do spoczynkowych. Inaczej kształtowało się stężenie kortyzolu w pobranych próbkach śliny. Oznaczenia wykonane tuż po zakończeniu treningu wykazały powysiłkowy wzrost jego stężenia, które po kolejnych 30 minutach odpoczynku jeszcze wzrosło, nie osiągając jednak istotnie wyższych wartości w porównaniu z wartościami spoczynkowymi. Jednakże analizy statystyczne wykazały, iż mimo tych niższych wartości istnieją dodatnie korelacje między uzyskanymi wynikami. I tak, wartości powysiłkowego stężenia kwasu mlekowego skorelowane były z wartościami kortyzolu oznaczonego w próbkach zarówno surowicy, jak i śliny pobranych od koni po 30-minutowym odpoczynku. Co więcej, wykazano istnienie dodatniej korelacji między wartościami stężeń kortyzolu surowiczego i ślinowego w próbkach pobranych po 30 minutach od zakończenia treningu. Z punktu widzenia fizjologii wysiłkowej korelacje te mają większą wartość poznawczą niż wartości bezwzględne pomiarów stężeń hormonu stresu. Wyniki bezwzględne mogą być bowiem obarczone pewnym błędem wynikającym z interakcji szeregu czynników zarówno związanych, jak i niezwiązanych z wysiłkiem fizycznym, jakie w czasie treningu oddziałują na organizm konia (Lassourd 1996).

Niemniej, stwierdzony w doświadczeniu powysiłkowy wzrost tych wartości potwierdził, że krótkotrwały ale bardzo intensywny wysiłek fizyczny jest czynnikiem wyzwalającym nadnerczowy wyrzut kortyzolu. Obwodowe zwiększenie jego stężenia notowane jest w pierwszej kolejności w surowicy, natomiast w ślinie ten wzrost pojawia się z pewnym opóźnieniem. Reasumując, niezależnie od wartości bezwzględnych, wykazanie istotnych korelacji między poziomem surowiczym oraz ślinowym kortyzolu, szczególnie po 30 minutach od zakończenia treningu, dowodzi, iż ślina na równi z surowicą krwi może być użytecznym materiałem do oceny poziomu tego hormonu. Dlatego, należy rekomendować wprowadzenie oznaczania powysiłkowego stężenia kortyzolu w ślinie po 30 minutach od zakończenia wysiłku, jako nowej metody oceny stresu indukowanego wysiłkiem u koni wyścigowych pełnej krwi angielskiej.

Posiadając już wiedzę na temat wpływu wysiłku fizycznego na kształtowanie się zmian stężenia kortyzolu w osoczu i ślinie koni pełnej krwi angielskiej należało wyjaśnić czy podobne zmiany wystąpią u drugiej z najczęściej wykorzystywanych ras wyścigowych, mianowicie u koni czystej krwi arabskiej. Doniesienia literaturowe dowodzą bowiem, iż przebieg procesów związanych z gospodarką energetyczną organizmów koni czystej krwi arabskiej i pełnej krwi angielskiej jest odmienny (Kędziński 2006, Podolak 2006). Autorzy wykazali, że konie pełnej krwi angielskiej cechują się mniejszą podatnością na obciążenia treningowe. Tym samym ich odpowiedź metaboliczna na stres wysiłkowy jest mniejsza. Stąd też wynikają różnice w stosowanych programach treningowych koni wyścigowych tych dwóch ras. Konie pełnej krwi angielskiej podczas standardowych sesji treningowych poddawane są wysiłkowi o większej intensywności w porównaniu do trenujących tę dyscyplinę koni arabskich, bez obawy o wystąpienie syndromu przetrenowania. Zatem nasuwa się pytanie czy standardowy trening koni arabskich będzie dostatecznym czynnikiem indukującym nadnerczowy wyrzut kortyzolu do poziomu wystarczającego, by można go oznaczyć w ślinie. Celem więc kolejnych badań **(poz. 4.1.4)** było określenie możliwości zastosowania metody oznaczania poziomu kortyzolu w ślinie, jako markera stresu energetycznego u koni czystej krwi arabskiej.

Badaniami objęto grupę 12 koni czystej krwi arabskiej w wieku 3-5 lat, składającej się z równej liczby klaczy i ogierów, stale przebywających i trenujących w jednym ośrodku treningowym. Doświadczenie przeprowadzono w połowie sezonu wyścigowego, kiedy konie miały za sobą już starty w regularnych gonitwach. W dniu badania konie realizowały standardowy program treningowy składający się z 10-minutowej rozgrzewki w kłusie oraz następczego galopu na dystansie 800 m ze średnią prędkością 12,8 m/s. Tak jak w poprzednich badaniach ślinę oraz krew pobierano od koni trzykrotnie tj.: w spoczynku, tuż po zakończeniu

sesji treningowej oraz po 30 minutowym odpoczynku. Uzyskane wyniki oznaczeń stężenia kwasu mlekowego były niższe niż u koni pełnej krwi angielskiej i kształtowały się na średnim poziomie 4,64 mmol/l. Potwierdza to wcześniejsze informacje, iż stopień obciążenia wysiłkowego stosowany w treningu koni arabskich jest niższy niż u koni pełnej krwi angielskiej. Mimo tego, przekroczenie progu anaerobowego świadczy, iż taki krótkotrwały, ale intensywny trening jest wystarczającym czynnikiem do przestawienia metabolizmu energetycznego tych koni na poziom beztlenowy. Jest również silnym czynnikiem wyzwalającym wzrost powysiłkowego stężenia kortyzolu. Stwierdzono bowiem, statystycznie istotnie wyższe stężenia tego hormonu zarówno w ślinie jak i w surowicy krwi w porównaniu z wartościami spoczynkowymi. Po 30-minutowym odpoczynku stężenie kortyzolu nieznacznie spadało, jednak wciąż utrzymywało się na istotnie wyższym poziomie zarówno w ślinie jak i w osoczu. Co więcej, analizy statystyczne potwierdziły istnienie dodatniej korelacji między stężeniem kortyzolu surowiczego i ślinowego w próbkach materiału biologicznego pobranego od koni 30 minut po zakończeniu treningu. Wyniki te dowodzą, iż proponowana metoda oznaczania stężenia kortyzolu w ślinie koni czystej krwi arabskiej, jako markera wydolności wysiłkowej, może być stosowana zamiennie z metodą oznaczania tego hormonu w surowicy krwi. Podobnie do wyników uzyskanych w grupie koni pełnej krwi angielskiej, szczególnie polecanym materiałem do badań jest ślina pobrana 30 minut po zakończeniu treningu.

Reasumując, wyniki badań dotyczących możliwości zastosowania nowej metody oznaczania kortyzolu w ślinie koni wyścigowych ras pełnej krwi angielskiej i czystej krwi arabskiej, jako markera obciążeń treningowych, a tym samym homeostazy energetycznej organizmu dowiodły jej przydatności. Ewaluacja indywidualnych predyspozycji do pokonywania maksymalnych obciążeń treningowych u koni wyścigowych, których kariera zależy od osiągniętych wyników na torze jest obecnie podstawą każdego procesu treningowego. Proponowana metoda wpisuje się więc w pełni w ten proces również ze względów czysto praktycznych. Jej nieskomplikowana procedura powoduje, iż może być z powodzeniem stosowana w warunkach terenowych, pod warunkiem istnienia odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego.

Innowacyjnością badań przedstawionych w kolejnej pracy prezentowanego cyklu (**poz. 4.1.7**) było wykazanie przydatności oznaczania jednego z białek ostrej fazy, mianowicie surowiczego czynnika amyloidu A (SAA) jako markera wydolności wysiłkowej koni wyścigowych. W poprzednich badaniach wykazano, iż wydolność wysiłkowa zależy od racjonalnie prowadzonego treningu polegającego na optymalnym dostosowywaniu obciążeń fizycznych do indywidualnych możliwości koni z uwzględnieniem ich wieku i rasy. Wielkość odpowiedzi metabolicznej organizmu zależy z kolei od intensywności oraz czasu trwania treningu (Fazio

2013). Wiadomo również, iż wysiłek fizyczny jakiemu poddawane są konie podczas treningu lub wyścigu jest aktywatorem osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (PPN) odrywającej istotną rolę w procesach adaptacyjnych organizmu do warunków stresowych (Fazio 2013, Duclos 2016). Oś ta bowiem koordynuje i kontroluje wydzielanie hormonów steroidowych z kory nadnerczy do krwi. W wyniku aktywacji osi PPN wzrasta stężenie przysadkowego ACTH, a następnie nadnerczowych hormonów kortyzolu i kortykosteronu. W następstwie tego rozwija się stan zwany stresem wysiłkowym. Mechanizm jego wyzwania związany jest z tzw. odpowiedzią ostrej fazy, w wyniku której następuje wyzwolenie do układu krążenia lub tkanek szeregu aktywnych czynników białkowych o charakterze neurotransmiterów, cytokin czy hormonów (Dhabhar 2009, Cywińska 2012). Ta wczesna reakcja rozpoczyna się natychmiast po zadziałaniu czynnika uszkodzającego i trwa u koni do 24 godzin (Kostro 2003). W jej wczesnej fazie najważniejszą rolę odgrywają cytokiny zapalne takie jak: IL-1, IL-6 i TNF- α , pod wpływem których w hepatocytach dochodzi do zwiększonej biosyntezy białek ostrej fazy, co przyczynia się do wzrostu ich stężenia we krwi. Dodatkowo, proces ten jest nasilany przez kortyzol, którego poziom w tym czasie wzrasta w wyniku aktywacji osi PPN. Dzięki temu synergistycznemu działaniu dwóch mechanizmów poziom SAA w reakcjach ostrej fazy rośnie najszybciej w porównaniu z innymi białkami takimi jak haptoglobina, białko C-reaktywne czy fibrynogen, osiągając zarazem wartości do 1000 razy wyższe od spoczynkowych (Jacobsen 2007). Dzięki tym właściwościom, pierwotne badania nad SAA skupiły się na możliwości jego wykorzystania w diagnostyce szeregu schorzeń koni o ostrym przebiegu takich jak: urazy, oparzenia, infekcje wirusowe lub bakteryjne czy zabiegi chirurgiczne (Hultén 1999, Jacobsen 2005). Kilka lat później prowadząc badania wśród koni sportowych, trenowanych do różnych dyscyplin hipicznych zwrócono uwagę, iż w pewnych okolicznościach stosowane obciążenia wysiłkowe mogą aktywować odpowiedź ze strony białek ostrej fazy (Valle 2015, Turło 2016). Jednakże, badania te nie wskazują jednoznacznie czy wynika to z odpowiedzi organizmu na stres wysiłkowy, czy też wzrost ten może być powodowany subklinicznymi urazami, powstałymi podczas intensywnych treningów lub startów w zawodach (Turło 2015). Stąd, postanowiłem przeprowadzić doświadczenie, którego celem było określenie wpływu wysiłku fizycznego jako czynnika wywołującego złożoną odpowiedź metaboliczną na aktywację osi PPN jak i poziom surowiczego SAA. Do badań wybrałem konie wyścigowe czystej krwi arabskiej ze względu na to, iż ich standardowe sesje treningowe charakteryzują się mniejszą intensywnością niż koni angielskich. Tym samym ograniczono ryzyko powstania subklinicznych urazów, których wystąpienie mogłoby wpłynąć na poziom surowiczego SAA. Kolejną przyczyną wyboru rasy koni były prezentowane w poprzednich pracach wyniki badań dowodzących, iż konie arabskie są z punktu widzenia wydatkowania energetycznego gorzej przystosowane do obciążeń treningowych w porównaniu

z końmi pełnej krwi angielskiej. Zatem istnieje większe ryzyko wystąpienia u nich przewlekłego stresu powodowanego ciągłą aktywnością osi PPN. A to w konsekwencji, z jednej strony zwiększy biosyntezę SAA, a z drugiej doprowadzi do stanu chronicznego przetrenowania i znacznego obniżenia dzielności wyścigowej koni.

Badaniami objęto grupę 11 koni w wieku od 3 do 5 lat, przebywających i trenujących w jednym ośrodku treningowym. W dniu badania konie realizowały sesję treningową składającą się z 10-minutowej rozgrzewki, naprzemiennie w kłusie i galopie, następnie galopem pokonywały dystans 1200 m ze średnią szybkością 6,0 m/s. Finiszując na dystansie ostatnich 800 m galopowały ze średnią szybkością 12,8 m/s. Krew do badań pobierano czterokrotnie tj.: w spoczynku, tuż po zakończeniu sesji treningowej, po 30-minutowym odpoczynku oraz po kolejnych 24 godzinach od pierwszego pobrania. Stopień obciążenia treningowego został określony na podstawie pomiarów powysiłkowego stężenia kwasu mlekowego, które wynosiło średnio 4,64 mmol/l. Wynik ten, podobnie jak w poprzednich badaniach, świadczy o nieznacznym przekroczeniu progu anaerobowego i jest typowy dla dobrze wytrenowanych wyścigowych koni arabskich. Stosowane obciążenia były również wystarczająco silnym bodźcem do pobudzenia osi PPN, co stwierdzono na podstawie pomiarów stężeń ACTH oraz kortyzolu w surowicy krwi koni. Wykazano, iż wzrost ten następuje bardzo szybko po zadziałaniu czynnika stresowego, bowiem najwyższe wartości stężeń hormonów osi PPN obserwowane są tuż po wysiłku i utrzymują się przez kolejne 30 minut od jego zakończenia. Jednakże, ten wzrost nie ma charakteru przewlekłego i poziom hormonów osi PPN powraca do wartości spoczynkowych w przeciągu kolejnych 24 godzin. Pojawiające się doniesienia o powysiłkowym wzroście stężenia SAA u koni biorących udział w wyścigach związane są najprawdopodobniej z czynnikami uszkodzającymi, powodującymi miejscowe stany zapalne o subklinicznym przebiegu (Turło 2015). Aby określić w naszych badaniach możliwość wpływu uszkodzeń tkankowych powstałych podczas treningu na poziom surowiczego SAA, u koni doświadczalnych oznaczono aktywność dehydrogenazy mleczanowej enzymu specyficznego w diagnozowaniu subklinicznych miopatii powysiłkowych (Kędzierski 2002). Przebieg zmian stężenia SAA w doświadczeniu był podobny do przebiegu zmian poziomów ACTH i kortyzolu, gdzie również zanotowano tendencję do jego powysiłkowego przejściowego wzrostu. Niemniej, stwierdzone zmiany nie miały cech istotności statystycznej. W tym przypadku może to świadczyć o tym, iż wysiłek stosowany w rutynowym treningu wyścigowym nie wyzwała reakcji ostrej fazy. Z drugiej strony, uzyskane wyniki mogą informować o doskonałym przygotowaniu kondycyjnym koni arabskich realizowanym przez właściwe dostosowanie obciążeń treningowych do ich predyspozycji rasowych. Stąd, oznaczanie SAA jako wskaźnika wydolności wysiłkowej jest w pełni uzasadnione.

Podsumowując, należy pokreślić, że dotychczas nie wykorzystywano wyżej omawianych aktywnych czynników białkowych do oceny wydolności wysiłkowej koni wyścigowych. Dostępna aktualnie literatura skupia się na możliwościach ich zastosowania w innych obszarach nauk medyczno-weterynaryjnych. Stąd, uzyskane w przedstawionych pracach doświadczalnych wyniki uważam za prekursorowe i w pełni odpowiadające warunkowi innowacyjności prowadzonych badań. Mam też nadzieję, iż w niedalekiej przyszłości znajdą szerokie zastosowanie w ewaluacji procesów treningowych koni wyścigowych.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań przedstawionych w prezentowanym cyklu prac można sformułować następujące wnioski:

1. Z pośród analizowanych aktywnych czynników białkowych wysoką zmienność w testach wysiłkowych wykazały grelina i adropina, dlatego mogą być wykorzystane w ocenie stopnia wytrenowania lub określania względnej intensywności wysiłku u koni wyścigowych.
2. Stężenie wisfatyny w osoczu krwi odzwierciedlające stopień otłuszczenia organizmu może być wykorzystane jako marker w procesie ewaluacji obciążeń treningowych.
3. Oznaczanie kortyzolu w ślinie może być w pełni użyteczną metodą określania poziomu krótkotrwałego stresu wysiłkowego u koni wyścigowych.
4. SAA jako marker subklinicznych uszkodzeń tkanek układu mięśniowo-szkieletowego może być wykorzystany w ocenie prawidłowości przebiegu treningu koni wyścigowych.

Piśmiennictwo

- Anagnostoulis S., Karayiannakis A.J., Lambropoulou M., Efthimiadou A., Polychronidis A., *et al.*: Human leptin induces angiogenesis in vivo. *Cytokine* 2008, vol. 42 (3), 353–357.
- Ando H., Yanagihara H., Hayashi Y., Obi Y., Tsuruoka S., *et al.*: Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology* 2005, vol. 126 (12), 5631-5636.
- Aydin S.: Presence of adropin, nesfatin-1, apelin-12, ghrelins and salusin peptides in the milk, cheese whey and plasma of dairy cows. *Peptides* 2013, vol. 43, 83-87.
- Aydin S.: Three new players in energy regulation: Preptin, adropin and irisin. *Peptides* 2014, vol. 56, 94-110.
- Barazzoni R., Bosutti A., Stabel M., Cattin M.R., Roder E., *et al.*: ghrelin regulates mitochondrial-lipidmetabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2005 vol. 228 (1), E228-E235.
- Bilski J., Jaworek J., Pokorski J., Nitecki J., Nitecka E., *et al.*: Effect of time of day and the Wingate test on appetite perceptions, food intake and plasma levels of adipokines. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2016, vol. 67 (5), 667-676.
- Cantó C., Menzies K., Auwerx J.: NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis - a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metabolism* 2015, vol. 22 (1), 31-53.
- Choi K.M., Kim J.H., Cho G.J., Baik S.H., Park H.S., *et al.*: Effect of exercise training on plasma visfatin and eotaxin levels. *Journal of Endocrinology* 2007, vol. 157 (4), 437-442.
- Colborn D.R., Thompson D.L. Jr, Roth T.L., Capehart J.S., White K.L.: Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *Journal of Animal Sciences* 1991, vol. 69 (6), 2556-2562.
- Cordero M., Brorsen B.W., McFarlane D.: Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and α -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domestic Animal Endocrinology* 2012, vol. 43 (4), 317-324.
- Cummings D.E.: Ghrelin and the short-time- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology and Behavior* 2006, vol. 89 (1), 71-84.
- Cywińska A., Szarska E., Górecka R., Witkowski L., Hecold M., *et al.*: Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance ride in horses. *Research in Veterinary Sciences* 2012, vol. 93 (3), 1402-1406.
- De Vriese C., Delporte C.: Influence of ghrelin on food intake and energy homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2007, vol. 10 (5), 615–619.
- deLange P., Moreno M., Silvestri E., Lombardi A., Goglia F., Lanni A.: Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signalling pathways and regulatory mechanisms. *FASEB Journal* 2007, 21 (13), 3431-3441.
- Desmetch D., Linden A., Amory H., Art T., Lekeux P.: Relationship of plasma lactate production to cortisol release following completion of different types of sporting events in horses. *Veterinary Research Communications* 1996, vol. 20 (4), 371-379.
- Dhabhar F.S.: Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 2009, vol. 16 (5), 300-317.
- Dorn L.D., Lucke J.F., Loucks T.L., Berga S.L.: Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Annals of Clinical Biochemistry* 2007, vol. 44 (3), 281-284.
- Dotsch J., Meissner U., Rascher W.: Leptin-induced weight loss is not solely mediated by anorexia. *European Journal of Endocrinology* 2003, vol. 148 (1), 11-12.
- Duclos M., Tabarin A.: Exercise and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Sports Endocrinology* 2016, vol. 47, 12-26
- Erdmann J., Tahbaz R., Lippl F., Wagenpfeil S., Schusdziarra V.: Plasma ghrelin levels during exercise — Effects of intensity and duration. *Regulatory Peptides* 2007, vol. 143 (1-3), 127-135.
- Fazio B., Medica P., Aronica V., Grasso L., Ferlazzo A.: Circulating β -endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol level of stallions before and after short road transport: stress effect of different distances. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2008, vol. 50 (1), 50-56.
- Fazio B., Medica P., Cravana C., Ferlazzo A.: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to therapeutic riding program: Effect of different riders. *Physiology and Behavior* 2013, vol. 118, 138-143.

- Fortier J., Julliand V., Harris P., Goachet G.: Training management of Standardbred trotters: a field survey in France. *Comparative Exercise Physiology* 2014, vol. 10 (1), 63-71.
- Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M., Segawa K., Tanaka M., *et al.*: Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effect of insulin. *Science* 2005, vol. 307 (5708), 426-430.
- Gale S.M., Castracane V.D., Mantzoros C.S.: Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *Journal of Nutrition* 2004, vol. 134 (2), 295-298.
- Gao S., McMillan R.P., Jacas J., Zhu Q., Li X., Kumar G.K., Casals N., Hegardt F.G., Robbins P.D., Lopaschuk G.D., Hulver M.W., Butler A.A.: Regulation of substrate oxidation preferences in muscle by the peptide hormone adropin. *Diabetes* 2014, vol. 63 (10), 3242-3252.
- Gao S., McMillan R.P., Zhu Q., Lopaschuk G.D., Hulver M.W., Butler A.A.: Therapeutic effects of adropin on glucose tolerance and substrate utilization in diet-induced obese mice with insulin resistance. *Molecular Metabolism*, 2015; vol. 4 (4), 310-324.
- Ghanbari-Niaki A., Saghebjo M., Soltani R., Kirwan J.P.: Plasma visfatin is increased after high-intensity exercise. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2010, vol. 57 (1), 3-8.
- Ghanbari-Niaki A.: Ghrelin and glucoregulatory hormone responses to a single circuit resistance exercise in male college students. *Clinical Biochemistry* 2006, vol. 39 (10), 966-970.
- Goody M.F., Henry C.A.: A need for NAD⁺ in muscle development, homeostasis, and aging. *Skeletal Muscle* 2018, vol. 8, 9-23.
- Gordon M.E., McKeever K., H.: Oral and intravenous carbohydrate challenges decrease active ghrelin concentrations and alter hormones related to control energy metabolism in horses. *Journal of Animal Science* 2006, vol. 84 (7), 1682-1690.
- Gordon M.E., McKeever K.H., Betros C.L., Manso Filho H.C.: Plasma leptin, ghrelin and adiponectin concentrations in young fit racehorses versus mature unfit standardbreds *The Veterinary Journal* 2007, vol. 173 (1), 91-100.
- Greenwood P.L., Shutt D.A.: Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Australian Veterinary Journal* 1992, vol. 69 (7), 161-163.
- Havel P.J.: Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 2001, vol. 226 (11), 963-977.
- Hellhammer D.H., Wüst S., Kudielka B.M.: Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009, vol. 34 (2), 163-171.
- Hopster H., van der Werf J.T., Erkens J.H., Blokhuis H.J.: Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *Journal of Animal Science* 1999, vol. 77 (3), 708-714.
- Hultén C., Sandgren B., Skiöldebrand E., Klingeborn B., Marhaug G., Forsberg M.: The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1999, vol. 44 (4), 323-333.
- Jacobsen S., Andresen P.H.: The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education* 2007, vol. 19 (1), 38-46.
- Jacobsen S., Jensen C., Frei S., Jensen A.L., Thoenfer M.B.: Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Veterinary Journal* 2005, vol. 37 (6), 552-556.
- Kahn B.B., Flier J.S.: Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 2000, vol. 106 (4), 473-481.
- Kędzierski W., Bergero D.: Comparison of plasma biochemical parameters in Thoroughbred and Purebred Arabian horses during the same-intensity exercise. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2006, vol. 9 (4), 233-238.
- Kędzierski W., Janczarek I.: Sex-related effect of early training on stress in young trotters as expressed by heart rate. *Animal Science Papers and Reports* 2009, vol. 27 (1), 23-32.
- Kędzierski W., Podolak M.: Wpływ treningu koni rasy arabskiej na poziom parametrów biochemicznych związanych z gospodarką węglowodanowo-lipidową. *Medycyna Weterynaryjna* 2002, vol. 58 (10), 788-791.
- Kędzierski W., Cywińska A.: The effect of different physical exercise on plasma leptin, cortisol, and some energetic parameters concentrations in Purebred Arabian horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 2014, vol. 34 (9), 1059-1063.

- Klok M.D., Jakobsdottir S., Drent M.L.: The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews* 2007, vol. 8 (1), 21-34.
- Kostro K., Krakowski L., Gliński Z., Nozdryn-Plotnicki Z., Pliszczyczyński M.: Possible uses of acute phase proteins in monitoring diseases in horses. *Medycyna Weterynaryjna* 2003, vol. 59 (3), 486-473.
- Kraemer R.R., Durand R.J., Acevedo E.O., Johnson L.G., Kraemer G.R., *et al.*: Rigorous running increases growth hormone and insulin-like growth factor-I without altering ghrelin. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 2004, vol. 229 (3), 240-246.
- Kumar K.G., Trevaskis J.L., Lam D.D., Sutton G.M., Koza R.A. *et al.*: Identification of Adropin as a Secreted Factor Linking Dietary Macronutrient Intake with Energy Homeostasis and Lipid Metabolism. *Cell Metabolism* 2008, vol. 8 (6), 468-481.
- Kumar K.G., Zhang J., Gao S., Rossi J., McGuinness O.P., *et al.*: Adropin deficiency is associated with increased adiposity and insulin resistance. *Obesity* 2012, vol. 20 (3), 1394-1402.
- Lassourd V., Gayraud V., Laroute V., Alvineire M., Bernard P., *et al.*: Cortisol disposition and production rate in horses during rest and exercise. *American Journal of Physiology* 1996, vol. 271 (1 Pt 2), R25-33.
- Leleu C., Cotrel C., Barrey E.: Effect of age on locomotion of Standardbred trotters in training. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 2004, vol. 1 (2), 107-117.
- Linder A.: Use of blood biochemistry for positive performance diagnosis of sport horses in practice. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2000, vol. 151 (7), 611-618.
- Malamitsi-Puchner A., Briana D.D., Gourgiotis D., Boutsikou M., Baka S, Hassiakos D.: Blood visfatin concentrations in normal full-term pregnancies. *Acta Paediatrica* 2007, vol. 96 (4), 526-529.
- Matarese G.: Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response. *European Cytokine Network* 2000, vol. 11 (1), 7-14.
- Matsorakos G., Pavlatou M., Diamanti-Kandarakis E., Chrousos G.P.: Exercise and the stress system. *Hormones* 2005, vol. 4 (2), 73-89.
- McManus C.J., Fitzgerald B.P: Effects of a single day of feed restriction on changes in serum leptin, gonadotropins, prolactin, and metabolites in aged and young mares. *Domestic Animal Endocrinology* 2000, vol. 19, (1), 1-13.
- Mills P.C., Smith N.C., Casas I., Harris P., Harris R.C. *at al.*: Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *European Journal of Applied Physiology* 1996, vol. 74 (1-2), 60-66.
- Muoio D.M., Lynis D.G.: Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002, vol. 16 (4), 653-666.
- Nagata S, Takeda F., Kurosawa M., Mima K., Hiraga A., *et al.*: Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines response to various exercise. *Equine Veterinary Journal Suppl* 1999, vol. 30, 570-574.
- Nonogaki K.: New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 2000, vol. 43(5), 533-549
- Ono A, Matsuura A., Yamazaki Y., Sakai W., Watanabe K., *et al.*: Influence of riders' skill on plasma cortisol levels of horses walking on forest and field trekking courses. *Animal Science Journal* 2017, vol. 88 (10), 1629-1635.
- Peeters M., Sulon J., Beckers J.F., Ledoux D., Valdeheede M.: Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Veterinary Journal* 2011, vol. 43 (4), 487-493.
- Perogamvros I., Keevil B.G., Ray D.W., Trainer P.J.: Salivary cortisone is a potential biomarker for serum free cortisol. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010, vol. 95 (11), 4951-4958.
- Piccione G., Casella S., Giannetto C., Messina V., Monteverde V., *et al.*: Haematological and haematochemical responses to training and competition in Standardbred horses. *Comparative Clinical Pathology* 2010, vol. 19 (1), 95-101.
- Pilz S., Mangge H., Obermayer-Pietsch B., März W.: Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor: a protein with various suggested functions. *Journal of Endocrinological Investigation* 2007, vol. 30, 138-144.
- Podolak M., Kędzierski W., Bergero D.: Comparison of the blood plasma catecholamines level in Thoroughbred and Arabian horses during the same intensity exercise. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2006, vol. 9 (1), 71-73.
- Ralston S.L.: Insulin and glucose regulation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2002, vol. 18 (2), 295-304.

- Reidy S.P., Weber J-M.: Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2000, vol. 125, 285–297.
- Rouach V., Bloch M., Rosenberg N., Gilad S., Limor R., Stern N., Greenman Y. The acute ghrelin response to a psychological stress challenge does not predict the poststress urge to eat. *Psychoneuroendocrinology* 2007, vol. 33 (6) 693–702.
- Roupas N.D., Mamali I., Maragkos S., Leonidou L. Armeni A.K., *et al.*: The effect of prolonged aerobic exercise on serum adipokine levels during an ultra-marathon endurance race. *Hormones (Athens)* 2013, vol. 12 (2), 275-282.
- Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el-Tawil K, Rude RK, Kamdar V: Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997;82:579–584.
- Sanchis-Gomar F., Alis R., Rampinini E., Bosio A., Ferioli D., *et al.*: Adropin and apelin fluctuations throughout a season in professional soccer players: Are they related with performance? *Peptides* 2015, vol. 70, 32-36.
- Sato T., Nakamura Y., Shiimura Y., Ohgusu H., Kangawa K., Kojima M.: Structure, regulation and function of ghrelin. *The Journal of Biochemistry* 2012, vol.151 (2), 119-128.
- Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., *et al.*: Ghrelin, an Endogenous Growth Hormone Secretagogue, Is a Novel Orexigenic Peptide That Antagonizes Leptin Action Through the Activation of Hypothalamic Neuropeptide Y/Y1 Receptor Pathway. *Diabetes* 2001, vol. 50 (20), 227-232.
- Stanley S., Wynne K., McGowan B., Bloom S.: Hormonal regulation of food intake. *Physiological Reviews* 2005, vol. 85 (4), 1131-1158.
- Takaya K., Ariyasu H., Kanamoto N., Iwakura H., Yoshimoto A., *et al.*: Ghrelin Strongly Stimulates Growth Hormone Release in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000, vol. 85 (12), 4908-4911.
- Tang-Christensen M., Havel P.J., Jacobs R.R., Larsen P.J., Cameron J.L.: Central Administration of Leptin Inhibits Food Intake and Activates the Sympathetic Nervous System in Rhesus Macaques. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999, vol. 84 (2), 711-717.
- Turło A., Cywińska A., Czopowicz M., Witkowski L., Jaśkiewicz A., *et al.*: Racing induced changes in the blood concentration of serum amyloid A in Thoroughbred racehorses. *Journal of Veterinary Sciences* 2016, vol. 36, 15-18.
- Turło A., Cywińska A., Czopowicz M., Witkowski L., Szarska E., *et al.*: Post-exercise dynamics of serum amyloid A blood concentration in thoroughbred horses classified as injured and non-injured after the race. *Research in Veterinary Science* 2015, vol. 100, 223-225.
- Valle E., Zanatta R., Odetti P., Traverso N., Furfado A., *et al.*: Effects of competition on acute phase protein and lymphocyte subpopulations – oxidative stress markers in eventing horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2015, vol. 99 (5), 856-863.
- Vogel G.: Leptin: A Trigger for Puberty? *Science* 1996, Vol. 274 (5292), 1466-1467.
- Wren A.M., Small C.J., Ward H.L., Murphy K.G., Dakin C.L., *et al.*: The Novel Hypothalamic Peptide Ghrelin Stimulates Food Intake and Growth Hormone Secretion. *Endocrinology* 2000, vol. 141 (11), 4325-4328.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Po ukończeniu studiów zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze Fizjologii Zwierząt macierzystego Wydziału, gdzie aktywnie włączyłem się do pracy dydaktycznej i badawczej. Badania prowadzone w tym czasie w Katedrze dotyczyły wpływu glutaminy, alfa-ketoglutaranu (AKG) oraz ornityno alfa-ketoglutaranu (OKG) na układ kostno-szkieletowy świń. W ramach tych badań brałem udział w projekcie grantowym KBN NR 5 P06 D 029 19 pt.: „Wpływ alanyloglutaminy, α -ketoglutaranu oraz ornityno α -ketoglutaranu na wzrost, rozwój i mineralizację układu kostno-szkieletowego w okresie życia postnatalnego prosiąt”, realizowanego we współpracy z Katedrą Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu w Lund (Szwecja). Współpraca ta zaowocowała uzyskaniem zaproszenie na staż naukowy w Uniwersytecie w Lund gdzie zapoznałem się z metodyką badań nad układem pokarmowym i kostno-szkieletowym u świń. Doświadczenia te istotnie przyczyniły się do mojego dalszego rozwoju naukowego oraz powstania prac oryginalnych oraz doniesień kongresowych:

- Pawłowska M., **Kowalik S.**, Smyk M., Dec A., Szymańczyk S.E., Valverde Piedra J.L., Studziński T. Wpływ L-alanylo-L-glutaminy na cechy wytrzymałościowe kości kończyn prosiąt w okresie postnatalnym (The influence of L-alanyl-L-glutamine on bone strenght parameters in piglets during postnatal life). Przegląd Hodowlany 2001, nr 2, 38-40.
- **Kowalik S.**, Sawa-Wojtanowicz B., Pierzynowski S.G., Studziński T. The influence of alpha-ketoglutarate (AKG) on development and mineralization of the skeletal system during the postnatal life in the pig investigated on the femur and ribs model. Bone 2003 (32 suppl), S202
- Sawa-Wojtanowicz B., Sliwa E., **Kowalik S.**, Valverde-Piedra J.L., Zabielski R., Studziński T.: The influence of leptin on the development of skeletal system investigated on the model of ribs during the first week of neonatal life in the pig. Calcified Tissue International 2003, vol. 72 (4), 436.
- **Kowalik S.**, Sawa-Wojtanowicz B., Valverde-Piedra J.L., Pierzynowski S.G., Studziński T. The influence of oral administration of AKG on development and mineralization of the skeletal system during the postnatal life in the pig investigated on the femur anf ribs. 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, 14-17 May 2003, Banff, Alberta, Canada.
- Sawa Wojtanowicz B., Pawłowska M., Niedźwiedź M., **Kowalik S.** Prenatal and postnatal development of histological, mechanical and geometric properties of femur and humerus on the pig. Animal and Human Growth and Development, French-Polish Symposium, 25-26 Sept. 2001, Paris, France.

Badania te dotyczyły możliwości wykorzystania leptyny oraz AKG jako potencjalnie aktywnych czynników oddziałujących na tkankę kostną u prosiąt. Wykazano, że leptyna podawana doustnie prosiętom wpływa istotnie na zwiększenie parametrów zarówno geometrycznych jak i mechanicznych kości. Podobne wyniki badań uzyskano przy doustnym podawaniu prosiętom AKG. Dodatkowo stwierdzono, iż u prosiąt które otrzymywały alfa-ketoglutaran zwiększało się osoczowe stężenie proliny, aminokwasu niezbędnego do syntezy kolagenu, głównie typu I, stanowiącego o wytrzymałości kości. Stwierdzony wzrost parametrów geometrycznych i mechanicznych kości był pozytywnie skorelowany ze wzrostem ich gęstości mineralnej oraz osoczym stężeniem osteokalcyny. Te ciekawe wyniki skłoniły mnie do zainteresowania się bliżej alfa-ketoglutaranem jako związkem o potencjalnych właściwościach modulatora metabolizmu tkanki kostnej dlatego podjąłem decyzję, iż badania nad mechanizmami jego oddziaływania staną się tematem mojej pracy doktorskiej. Podkreślić należy, iż przez cały okres badań nad AKG ściśle współpracowałem z prof. Stefanem G. Pierzynowskim z Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu w Lund nad metodyką badań oraz analizą merytoryczną uzyskanych wyników. Jednocześnie nawiązałem kontakt naukowy z prof. Jorgenem Svendsenem ze Szwedzkiego Uniwersytetu Nauk Rolniczych w Alnarp (Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden), specjalistą z zakresu dobrostanu zwierząt, co zaowocowało po powrocie do Polski zorganizowaniem własnej hodowli prosiąt, wykorzystywanych w doświadczeniach nie tylko mojej pracy doktorskiej, ale przez pozostałych pracowników Katedry. W 2004 roku ostatecznie sfinalizowałem pracę doktorską pod tytułem „Wpływ alfa-ketoglutaranu (AKG) podawanego *per os* na rozwój i mineralizację układu kostno-szkieletowego u prosiąt w okresie 70 dni życia postnatalnego badanego na modelu kości udowej”, której promotorem był prof. dr hab. Tadeusz Studziński. Najważniejsze wnioski z pracy wskazują, że AKG wywiera pozytywny wpływ na przyrosty masy ciała prosiąt oraz wzrost, mineralizację i wytrzymałość kości poprzez zwiększenie wartości ich parametrów geometrycznych i mechanicznych. We wnioskach zasugerowano również istnienie osi jelitowo-kostnej, jako jednego z prawdopodobnych mechanizmów oddziaływania substancji przyjmowanych *per os* na tkankę kostną.

5.2. Dorobek naukowy po uzyskaniu tytułu doktora nauk weterynaryjnych

Wyniki prowadzonych przeze mnie w tym czasie badań zostały opublikowane jako prace oryginalne lub przedstawione jako doniesienia kongresowe:

- **Kowalik S.**, Filip R., Śliwa E., Tataro M., Pierzynowski S.G., Studziński T. Influence of alpha-ketoglutarate on bone mineral density of the femur in piglets. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, vol. 49 (3), 343-348.
- **Kowalik S.**, Śliwa E., Tataro M., Krupski W., Majcher P., Studziński T. Influence of alpha-ketoglutarate (AKG) on mineral density and geometrical and mechanical parameters of femora during postnatal life in piglets. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, vol. 49 (1), 107-111.
- Śliwa E., **Kowalik S.**, Tataro M., Krupski W., Majcher P., Łuszczewska-Sierakowska I., Pierzynowski S.G., Studziński T. Effect of alpha-ketoglutarate (AKG) given to pregnant sows on the development of the humerus and femur in newborns. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, vol. 49 (1), 117-120.
- **Kowalik S.**, Wawrzyniak-Gacek A., Piersiak T., Pierzynowski S.G. Relation between growth and bone collagen content in young pigs; effects of dietary α -ketoglutarate supplementation. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2011, vol. 55 (2), 287-292.
- **Kowalik S.**, Tataro M.R., Śliwa E., Sawa-Wojtanowicz B., Krupski W., Majcher P., Pierzynowski S.G., Studziński T. Effect of alpha-ketoglutarate administration on skeletal development in piglets investigated on femur model. 5th Polish-French Symposium „Animal growth and development: regulatory mechanisms” 22-23 September 2014, Paris, France.
- Sawa-Wojtanowicz B., Tataro M.R., **Kowalik S.**, Śliwa E., Krupski W., Majcher P., Pierzynowski S.G., Studziński T. The effect of alpha-ketoglutarate on growth and mineralization of the skeletal system in pigs during 70 days of postnatal life investigated on the rib model. 5th Polish-French Symposium „Animal growth and development: regulatory mechanisms” 22-23 September 2014, Paris, France.

We wszystkich tych pracach po raz pierwszy został szeroko opisany wpływ alfa-ketoglutaranu na tkankę kostną zwierząt. Aby określić ten wpływ szczególną uwagę zwrócono na metodykę badań. Zastosowano m.in. metodę trójpunktowego testu ugięcia (three-point bending test), pozwalającego na dokładną, komputerową ocenę wytrzymałości kości na złamanie; metodę oceny mineralizacji tkanki kostnej za pomocą densytometrii (DXA) oraz ilościową tomografię komputerową (qCT). Metodami histologicznymi z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej, pozwalającej na tworzenie trójwymiarowych obrazów utkania beleczkowatej kości, dokładnie oceniano strukturę kolagenu w badanej tkance kostnej. Warto podkreślić, że metodykę tę przygotowano w ścisłej współpracy z lubelskimi ośrodkami naukowymi tj. Instytutem Medycyny Wsi, Uniwersytetem Medycznym oraz Uniwersytetem im.

Marii Curie-Skłodowskiej. Ta wielośrodkowa współpraca przyczyniła się do integracji środowiska naukowego, która trwa do czasów obecnych.

Zainteresowania własne oraz przychylne recenzje środowiska naukowego publikowanych wyników badań skłoniły mnie do zaangażowania się w kolejne prace. Doświadczenia prowadzone były w wielodyscyplinarnym zespole badawczym, który w tym czasie utworzył się pod kierownictwem prof. T. Studzińskiego, a ich wyniki zostały opublikowane jako prace oryginalne:

- **Kowalik S.**, Drobek-Gilowska A., Tataro M.R., Sawa-Wojtanowicz B., Wałkuska G. Parametry mechaniczne i geometryczne kości kończyn kaczek krzyżówek i łyszek (Mechanical and geometrical properties of wing and leg bone parameters in Mallards and Coots). *Medycyna Weterynaryjna* 2004, vol. 60 (4), 428-431.
- Śliwa E., **Kowalik S.**, Tataro M.R., Studziński T. Effect of maternal administration of dexamethasone during last week of pregnancy on foetal skeletal system in pigs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2004, vol. 48 (4), 449-452.
- Tataro M.R., Sierant-Romźmiej N., Krupski W., Majcher P., Śliwa E., **Kowalik S.**, Studziński T. Zastosowanie ilościowej tomografii komputerowej w ocenie mineralizacji kości udowej i piszczelowej indyka (Quantitative computed tomography for the assessment of mineralization of the femur and tibia in turkeys). *Medycyna Weterynaryjna* 2005, vol. 61 (10), 1145-1148.
- Śliwa E., Tataro M.R., **Kowalik S.**, Krupski W., Majcher P., Piersiak T., Studziński T. Wpływ dexametazonu na wzrost i mineralizację układu kostnego w okresie prenatalnym u świń (Influence of dexamethasone on the growth and mineralization of the skeletal system on pig during prenatal life). *Medycyna Weterynaryjna* 2005, vol.61 (10), 1145-1148.
- Śliwa E, Wawrzyniak-Gacek A., Tataro M.R., **Kowalik S.**, Łuszczewska-Sierakowska I., Krupski W., Majcher P., Pierzynowski S.G., Studziński T. Wpływ dexametazonu i alfa-ketoglutaranu na wzrost i rozwój układu kostnego u świń (Influence of dexamethasone and alpha-ketogutarate on growth and development of the skeletal system of pig). *Medycyna Weterynaryjna* 2005, vol. 62 (5), 526-531.

W trakcie prowadzonych badań nad potencjalnymi możliwościami wykorzystania AKG w sterowaniu metabolizmem tkanki kostnej, pojawiły się bardzo interesujące wyniki dotyczące jego wpływu na mechanizmy odporności humoralnej u prosiąt. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy oryginalnej:

- Śliwa E., Tataro M., Dudek K., Siwicki A.K., **Kowalik S.**, Pierzynowski S.G., Studziński T. Influence of alpha-ketoglutarate administered to pregnant sows on nonspecific humoral defence mechanism in newborn piglets and during two weeks of neonatal life. Polish Journal of Environmental Studies 2005, vol. 14 (suppl.II), 356-359

Od 2003 roku Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie była jednym z wykonawców grantu zamawianego Nr PBZ-KBN-093/P06/2003 pt.: „Sterowanie rozwojem przewodu pokarmowego u noworodków zwierząt w celu zwiększenia ich przeżywalności i poprawy stanu zdrowotnego”. Grant był realizowany wspólnie z m.in. Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytutem Fizjologii i Żywienia PAN w Jabłonnej, Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, Collegium Medicum UJ w Krakowie oraz Akademią Medyczną w Bydgoszczy. W projekcie tym prowadziłem badania nad wpływem stosowania wyciągów z czosnku na rozwój układu pokarmowego prosiąt. Wykazano w nich, iż doustne podawanie ekstraktu z czosnku (AGE) i allicyny wywiera istotny wpływ na masę urodzeniową oraz przyrosty dobowe prosiąt. Analizy morfometryczne wykazały u prosiąt doświadczalnych istotnie wyższe masy narządów wewnętrznych oraz większą długość jelita cienkiego. Przeprowadzone analizy histomorfometryczne błony śluzowej poszczególnych odcinków jelita cienkiego objęły swoim zasięgiem takie parametry jak grubość błony śluzowej jelita, wysokość i szerokość kosmków jelitowych, pole ich przekroju poprzecznego i głębokość krypt jelitowych. Wyniki konfokalnych pomiarów wykazały, iż zarówno u prosiąt nowo narodzonych oraz w okresie ich 56 dni życia postnatalnego, wielkości badanych parametrów były istotnie wyższe, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Wyniki tych badań zostały opublikowane jako prace oryginalne:

- Tataro M.R., Śliwa E., Dudek K., Siwicki A.K., **Kowalik S.**, Łuszczewska-Sierakowska I., Krupski W., Zipser J., Studziński T. Influence of perinatal administration of aged garlic extract (AGE) and allicin to sows on some defence mechanisms in their piglets during postnatal life. Polish Journal of Environmental Studies 2005, vol.14 (suppl. II), 378–381.
- Tataro M., Śliwa E., Dudek K., **Kowalik S.**, Gawron A., Piersiak T., Dobrowolski P., Studziński T. Effect of aged garlic extract and allicin administered to sows during pregnancy and lactation on body weight gain and gastrointestinal tract development of piglets: morphological properties of the small intestine. Part II. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, vol. 49 (4), 455-464.

Równolegle rozwijała się moja współpraca naukowa z Uniwersytetem w Lund. Zdobyte doświadczenie w pracy z prosiętami jako zwierzętami modelowymi wykorzystywanymi do badań nad fizjologią układu pokarmowego spowodowały, iż otrzymałem 6-miesięczne stypendium naukowe sponsorowane przez firmę biotechnologiczną Biovitrum AB z siedzibą w Sztokholmie. Pracę badawczą realizowałem w Katedrze Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu w Lund. Celem prowadzonych przeze mnie badań było poznanie mechanizmów regulujących procesy wydzielnicze trzustki w warunkach stymulacji dietą zawierającą eksperymentalną nieaktywną (nA) oraz aktywną (A) formułą enzymów trzustkowych egzogennym sokiem trzustkowym i żółcią na enzymatyczną wydzielniczość trzustki. Wlewy z odpowiednio przygotowanych preparatów wykonywano przez operacyjnie zaimplantowane katetery do dwunastnicy i jelita biodrowego. Wyniki prac wykazały, iż dodwunastnicze wlewy egzogenego soku trzustkowego powodują spadek aktywności trypsyny w soku trzustkowym badanych prosiąt. Istotny wzrost ilości całkowitej soku trzustkowego oraz aktywności trypsyny stwierdzono w przypadku wlewów diet zawierających formułą nA oraz A, natomiast nie wykazano zmian aktywności tego enzymu przy stosowaniu wlewów zawierających żółć lub kwasy żółciowe. Dodatkowo, analizy stężenia cholecystokininy w surowicy krwi prosiąt doświadczalnych wykazały, iż jedynie dodwunastnicze wlewy egzogenego soku trzustkowego wpłynęły istotnie na obniżenie poziomu tego hormonu. Ostatecznie wykazano, iż możliwe jest zwiększenie aktywności wydzielniczej trzustki poprzez przygotowanie odpowiednich formułą egzogennych enzymów, co w przyszłości może mieć istotne znaczenie aplikacyjne. W kolejnych doświadczeniach badano możliwości stosowania enzymatycznej terapii zastępczej w schorzeniach zewnątrzwydzielniczych trzustki. Badania prowadzone były na modelu prosiąt, u których wywoływano stan niewydolności wydzielniczej poprzez podwiązanie i chirurgiczne przecięcie przewodu trzustkowego wyprowadzającego. Po upływie 7 tygodni, u tak przygotowanych prosiąt, rozpoczęto podawanie diety wysokotłuszczowej z jednoczesną suplementacją odpowiednio przygotowanych, mikrokapsułkowanych enzymów trzustkowych (ang. PEP - Pancreatic Enzyme Preparation). Uzyskane wyniki wykazały, iż suplementacja PEP istotnie wpływała na dzienne przyrosty masy ciała prosiąt. Stąd wnioskowano, iż stosowanie PEP i diety wysokotłuszczowej u prosiąt ze sztucznie wywołaną niewydolnością trzustki może znacznie poprawiać strawność oraz przyswajalność pokarmu. Wyniki badań opublikowano w pracach:

- Pierzynowski S.G., Sileikiene V, Valverde-Piedra J.L., Szymańczyk-Kwapik S.E., Gregory P.C., Kruszewska D., Mosenthin R., Rząsa A., **Kowalik S.**, Zabielski R., Westrom B. Real exposure to pig pancreatic juice and bile inhibit exocrine pancreatic secretion in pigs. *Livestock Science* 2007, vol. 108 (1-3), 53-56.

- Donaldson J., Fedkiv O., Pawłowska M., **Kowalik S.**, Erlwanger K.H., Westrom B., Kruszewska D., Pierzynowski S.G. The effectiveness of enzymatic replacement therapy measured by turbidimetry and the lipemic index in exorcine pancreatic insufficient young, growing pigs, fed a high-fat diet. *Advances in Medical Sciences* 2009, vol. 54 (1), 7-13.

Po powrocie na macierzystą Uczelnię włączyłem się aktywnie w pracę nad szeroko pojętą fizjologią wysiłku koni sportowych. Powstała pierwsza praca przeglądowa dotycząca przyczyn i diagnozowania obniżonej wydolności wysiłkowej koni:

Kowalik S., Drobek-Gilowska A., Studziński T.: Obniżona wydolność wysiłkowa koni – przyczyny i diagnozowanie (Poor performance in horses – causes and doagnosis). *Medycyna Weterynaryjna* 2002, vol. 58 (2), 103-107.

Do podjęcia badań w kierunku fizjologii wysiłku skłoniły mnie obserwacje wzrostu zainteresowania hodowlą koni wykorzystywanych w sportach hippicznych. Pojawiły się m.in. spektakularne sukcesy polskich koni arabskich na torach wyścigowych całego świata. Z tego powodu postanowiono stworzyć zespół badawczy, który byłby w stanie podjąć się badań nad szeroko pojętą fizjologią wysiłku koni sportowych. W skład zespołu weszli pracownicy Katedry Fizjologii Zwierząt i Katedry Biochemii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Katedry Hodowli i Użytkowania Koni Wydziału Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki Uniwersytetu Przyrodniczego w Lubinie oraz Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Nawiązano ścisłą współpracę z stadninami koni m.in. Stadem Ogierów w Białce i Stadniną Koni Arabskich w Janowie Podlaskim oraz Torami Wyścigów Konnych na Służewcu. W efekcie tej współpracy rozpoczęto badania, których celem było określenie wpływu rutynowego treningu wyścigowego na aktywność fagocytarną neutrofilii i monocytów u koni pełnej krwi angielskiej i czystej krwi arabskiej. Badania zostały podjęte po ukazaniu się doniesień o negatywnym wpływie intensywnego wysiłku na procesy odpornościowe u trenujących ludzi i zwierząt. Zaproponowano nawet teorię tzw. „otwartego okna”, wg której istnieje podwyższone ryzyko rozwoju schorzeń zakaźnych głównie ze strony układu oddechowego, które mogą rozwijać się w czasie od 3 do 72 godzin od zakończenia treningu. Jednak badania takie nie były prowadzone u koni wyścigowych. Wyniki naszych badań nie potwierdziły negatywnego wpływu prowadzonego treningu wyścigowego na procesy odpornościowe, zarówno u koni pełnej krwi angielskiej jak i czystej krwi arabskiej. Zostały one opublikowane w pracy oryginalnej:

- Cywińska A., Szarska E., Degórski A., Guzera M., Górecka R., Strzelec K., **Kowalik S.**, Schollenberger A., Winnicka A. Blood phagocyte activity after race training sessions in Thoroughbred and Arabian horses. *Research in Veterinary Science* 2013, vol. 95 (2), 459-464.

Tematyką kolejnych badań podjętych przeze mnie we współpracy z Katedrą Hodowli i Użytkowania Koni UP w Lublinie stanowiły zagadnienia dotyczące stanu psychofizycznego koni sportowych, poddawanych rutynowemu treningowi dostosowanemu do rasy oraz dyscypliny sportowej. Dotychczasowe badania fizjologii wysiłku u koni opierały się głównie na określaniu pewnych parametrów morfologicznych lub biochemicznych krwi, dostrzegłem jednak możliwość wykorzystania metod oceniających stan psychofizyczny zwierzęcia wyrażonego przez natężenie reakcji emocjonalnych oraz ich związku z poszczególnymi etapami szkolenia lub intensywnością treningu. Konie jako gatunek doświadczalny idealnie nadają się do tego typu badań, ponieważ ich reakcje emocjonalne na nagłe zmiany zachodzące w otoczeniu są bardzo mocno wyrażane przez znaczne przyspieszenia częstości uderzeń serca. Obecne możliwości technologiczne pozwalają na montaż na ciele konia niewielkiego nadajnika telemetrycznego, przekazującego dane do odbiornika i na ich podstawie możliwa jest dalsza dokładna analiza pracy serca. Tak prowadzony monitoring pozwala na ocenę stanu emocjonalnego koni na każdym etapie doświadczenia. Pierwsze takie badania mające na celu określenie parametrów mogących służyć do oceny wydolności wysiłkowej oraz stanu emocjonalnego trenowanych koni wykonano u kłusaków francuskich. Warto podkreślić, iż trening do pracy w sulkach rozpoczyna się bardzo wcześnie bo już od 15 miesiąca życia, stąd poznanie wpływu przebiegu procesu treningowego na organizm tak młodych koni wydaje się niezwykle ważny. Ze względu na to, iż kłusaki rozpoczynają treningi jeszcze przed osiągnięciem dojrzałości psychosomatycznej pojawiła się również potrzeba określenia w jakim stopniu tak wczesne wdrażanie kłusaków do treningu wpływa na stan emocjonalny tych zwierząt. W badaniach brano pod uwagę również rodzaj stosowanego treningu. Po przeanalizowaniu zebranych danych stwierdzono, iż organizmy młodych koni w wieku poniżej dwóch lat, nie są w pełni przygotowane do obciążeń jakim są poddawane w czasie treningu, szczególnie o charakterze wytrzymałościowym. Wyniki badań zostały opublikowane w pracach:

- Kędzierski W., **Kowalik S.**, Janczarek I. Wybrane wskaźniki biochemiczne i hematologiczne oraz częstotliwość skurczów serca u koni rasy kłusak francuski w kolejnych etapach treningu. *Acta Scientiarum Polonorum – Medicina Veterinaria* 2007, vol. 6 (2), 15-24.
- Kędzierski W., **Kowalik S.**, Janczarek I. Wpływ treningu interwałowego i wytrzymałościowego na wielkość wybranych wskaźników krwi i częstość skurczów serca kłusaków (Influence of

interval and endurance training on the level of chosen blood parameters and heart rates in trotters). *Medycyna Weterynaryjna* 2007, vol. 63 (10), 1258-1261.

Kolejne doświadczenia powstały w oparciu o analizę częstości uderzeń serca na minutę oraz zmienności tego parametru jako wyznacznika stopnia pobudzenia emocjonalnego. W badaniach tych zaproponowano różne metody relaksacji oraz ich wpływu na status emocjonalny koni wyścigowych. Podkreślić należy, iż planując tego typu badania starano się wyeliminować przypadkowość uzyskanych wyników, stąd w doświadczeniach zorganizowano grupy koni o dużej liczebności, a czas trwania wszystkich zaplanowanych badań wynosił dwa lata. Sprawne prowadzenie tego typu badań wymagało stworzenia zespołu badawczego w skład którego weszli pracownicy Katedry Fizjologii Zwierząt, Katedry Biochemii oraz Katedry Hodowli i Użytkowania Koni UP w Lublinie. Udowodniono, iż stosowanie masażu powierzchniowego wybranych okolic ciała miało pozytywny wpływ na stan emocjonalny koni, co z kolei przyniosło wymierne korzyści w postaci lepszych osiągnięć na torach. Zaproponowana w kolejnych badaniach nowatorska forma modyfikacji treningu wyścigowego koni arabskich przez wprowadzanie dodatkowych elementów treningowych w postaci przejażdżek terenowych wpłynęła pozytywnie zarówno na stan emocjonalny, jak i na behavior zwierząt. Wyniki tych doświadczeń zostały przedstawione na międzynarodowej konferencji naukowej oraz później opublikowane w pracach oryginalnych:

- Janczarek I., Kędzierski W., Stachurska A., **Kowalik S.**, Wilk I. Introducing rides in the field as a method of softening emotional arousal in race Purebred Arabian horses. International conference „Biotechnology and Welfare in Animal Husbandry”, Krakow, June 15-16, 2015.
- Janczarek I., Wilk I., Kędzierski W., Stachurska A., **Kowalik S.** Offtrack training ameliorates emotional excitability in purebred Arabian racehorses. *Canadian Journal of Animal Science* 2017, vol. 97 (1), 42-50.
- **Kowalik S.**, Janczarek I., Kędzierski W., Stachurska A., Wilk I. The effect of relaxing massage on heart rate and heart rate variability in Purebred Arabian racehorses. *Animal Science Journal* 2017, vol. 88 (4), 669-677.

Zdobyta wiedza i doświadczenie w pracy z końmi spowodowało poszerzenie moich zainteresowań badawczych. We współpracy z Katedrą i Kliniką Rozrodu Zwierząt oraz Katedrą Biochemii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie powstały prace w których podjąłem się określenia wpływu przebiegu porodu na wybrane parametry hormonalne u klaczy zimnokrwistych oraz u ich potomstwa. W XXI wieku, mimo wysokiego stopnia zmechanizowania rolnictwa zainteresowanie końmi zimnokrwistymi w Polsce stale rośnie. Prowadzona praca

hodowlana corocznie zwiększa pogłowie koni tych ras, u których doceniono możliwości ich wszechstronnego użytkowania m.in. w coraz bardziej promowanym rolnictwie ekologicznym, rekreacji, jeździectwie, agroturystyce, hipoterapii czy nawet w sporcie. Sprzyja temu łagodny charakter tych koni, zrównoważony temperament oraz znakomita zdolność do współpracy z człowiekiem. Wszystkie te czynniki składają się na wzrost liczby lokalnych ośrodków hodowli koni ras zimnokrwistych, w których każdego sezonu przychodzi na świat liczne potomstwo. Będąc aktywnym zawodowo lekarzem weterynarii i współpracując z hodowcami koni coraz częściej obserwowałem pojawiający się u klaczy zimnokrwistych syndrom nadmiernego odtuszczenia. Dodatkowo, to odtuszczenie było często skorelowane dodatnio z wystąpieniem u takich klaczy problemów związanych z zaburzeniami występującymi w okresie okołoporodowym. Klacze odtuszczone, częściej niż inne wymagały sztucznej indukcji porodu, bezpośredniej pomocy lekarskiej podczas porodu lub pomocy przy wydaleniu łożyska. Stąd, celem kolejnych prac było poznanie mechanizmów regulujących procesy metaboliczne klaczy matek oraz ich wpływu na status zdrowotny nowo narodzonych źrebiąt. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że klacze u których podczas ciąży zaobserwowano nadmierne odtuszczenie miały istotnie wyższe stężenie trójglicerydów w surowicy krwi, co świadczy o rozwiniętej hiperlipidemii. Wystąpieniu tego zaburzenia metabolicznego sprzyjają zaistniałe okoliczności czyli długotrwały okres ciąży, brak ruchu czy też stres związany z okresem okołoporodowym. Obserwowany w tym czasie u klaczy istotnie wyższy poziom leptyny potwierdza tezę, iż jej wysokie stężenie nie musi być wystarczającym sygnałem hamującym łąknienie. Dodatkowo, poporodowy spadek jej stężenia może być jednym z mechanizmów zabezpieczających organizm matki przed wystąpieniem ujemnego bilansu energetycznego powodowanego laktacją. Stwierdzona u klaczy matek hiperlipidemia i hiperleptinemia nie wpływała jednak na status lipidowy oraz na stężenie leptyny w surowicy nowo narodzonych źrebiąt. Dowodzi to istnienia odrębnych, niezależnych mechanizmów regulujących gospodarkę tłuszczową u klaczy-matek i ich potomstwa. Stwierdzono również, iż u klaczy zimnokrwistych, u których poród wymagał interwencji lekarskiej poziom IGF-I był istotnie wyższy w porównaniu z klaczami rodzącymi siłami natury. Poziom surowiczego IGF-I u źrebiąt był proporcjonalny do stężenia tego czynnika w surowicy krwi matek czyli źrebięta urodzone wskutek niefizjologicznego porodu posiadały wyższe stężenie tego czynnika. Interesujące okazały się również wyniki codziennego monitoringu stężenia IGF-I. Zaobserwowano bowiem, iż początkowo istotnie różne poziomy surowiczego IGF-I w dwóch grupach doświadczalnych koni w okolicach 3-4 dnia po porodzie wykazują tendencję do wyrównywania swoich wartości. Postawiono zatem tezę, iż zarówno status metaboliczny klaczy-matek jak i przebieg samego

porodu nie wywierają negatywnego wpływu na poziom IGF-I u nowonarodzonych źrebiąt. Wyniki badań zostały opublikowane jako prace oryginalne:

- **Kowalik S.**, Kędzierski W., Kusy R. Stężenie insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 w osoczu klaczy i źrebiąt zimnokrwistych w dniu porodu. Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Od nauki do praktyki”, Olsztyn 18-20 września 2008.
- Kędzierski W., Kusy R., **Kowalik S.** Plasma leptin level in hyperlipidemic mares and their foals. *Reproduction in Domestic Animals* 2011, vol. 46 (2), 275-280.
- **Kowalik S.**, Kędzierski W., Kusy R. Wpływ przebiegu porodu na stężenie IGF-I w surowicy zimnokrwistych klaczy i ich nowonarodzonych źrebiąt (The effect of the type of parturition on IGF-I concentration in blood serum of cold-blooded mares and their foals. *Medycyna Weterynaryjna* 2015, vol. 71 (7), 448-452.

Badania dotyczące problemów zdrowotnych ciężarnych klaczy i ich nowo narodzonego potomstwa są zawsze pożądane w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Młody organizm wymaga specjalnego traktowania, stąd zagadnienia dotyczące opieki nad noworodkiem czy zapobiegania i leczenia chorób źrebiąt są częstymi tematami konferencji naukowych. W kolejnej pracy pragnęliśmy jednak zwrócić uwagę na konie starsze, które ze względu na swój wiek narażone są na częstsze występowanie szeregu schorzeń powodujących upośledzenie ogólnej homeostazy organizmu. Warto wspomnieć, iż u koni geriatrycznych pojawiają się częściej niż u młodych zaburzenia funkcji immunologicznych przez co stają się bardziej podatne na infekcje. Śledząc doniesienia medyczne dotyczące wpływu pyłku pszczelego na układ immunologiczny człowieka, postanowiono sprawdzić czy będzie w stanie wywrzeć podobny skutek u koni. Badaniami objęto konie w wieku 15-26 lat, którym podawano pyłek pszczeli jako suplement paszy. Doświadczenie zaplanowano w okresie przesilenia jesiennego, kiedy to zgodnie z cyklem rocznym pojawiają się u koni spadki wartości parametrów hematologicznych i biochemicznych krwi oraz odpornościowych. Uzyskane wyniki dowiodły, iż codzienne stosowanie suplementacji diety pyłkiem pszczelim przyniosło pozytywny efekt, gdyż zapobiegło spadkom wartości wybranych parametrów krwi u badanych koni geriatrycznych. Na ich podstawie przygotowano doniesienie kongresowe:

- Kędzierski W., Janczarek I., **Kowalik S.**, Franczyk M., Chrobak Ł., Borsuk G. Suplementacja pyłkiem pszczelim wpływa na wybrane wskaźniki krwi koni geriatrycznych (Bee pollen supplementation to geriatric horses seem to improve some blood parameters). LXXXIII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego in. Michała Oczapowskiego. Wyzwania

zootechniki w warunkach rolnictwa zrównoważonego. Streszczenie w „Sekcja Chowu i Hodowli Koni”, Lublin 2018.

Pojawiające się w ostatnich latach doniesienia o występowaniu w wielu państwach członkowskich Unii Europejskiej endemicznych ognisk gorączki Q wśród bydła, skłoniły mnie do podjęcia badań nad epidemiologią *Coxiella burnetti* w populacji koni w Polsce. Istnieją bowiem przypuszczenia, iż konie mogą stanowić nierozpoznany jeszcze rezerwuuar gorączki Q. Problem wydaje się istotny, gdyż choroba ta jest uznana za zoonozę o wysokim odsetku śmiertelności. W celu realizacji zaplanowanych badań nawiązano współpracę ze specjalistami Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, gdzie przeprowadzono badania serologiczne w pobranym materiale. W czasie 6 miesięcy zgromadzono próbki krwi od koni różnych ras oraz użytkowości pochodzących z terenów południowo-wschodniej Polski. Wyniki nie ujawniły obecności seropozytywnych osobników wśród badanej populacji zwierząt. Nie znaczy to jednak, iż nie powinien być prowadzony monitoring stad koni w kierunku zakażeń *Coxiella burnetti*. Badania będą więc kontynuowane a pierwsze wyniki zostały opublikowane jako praca oryginalna:

- Szymańska-Czerwińska M., Jodełko A, Pluta M., **Kowalik S.**, Niemczuk K. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* among domestic ruminants and horses in Poland. Acta Virologica 2017, vol. 61 (3), 369-371.

Do podjęcia kolejnych badań skłoniły mnie informacje pochodzące z rynku drobiarskiego. W 2017 roku produkcja drobiu w Polsce wyniosła ok. 3 mln ton a w 2018 prognozowano jej zwiększenie o ok. 5%. Ponad 1 mln ton mięsa drobiowego pochodzącego od polskich producentów trafia na rynki zagraniczne. Przy tak dużym zapotrzebowaniu na produkty drobiarskie obserwuje się wzrost zainteresowania chowem drobiu. Intensyfikacja produkcji wymaga zaś poszukiwania naturalnych dodatków żywieniowych, których zadaniem jest zwiększenie wydajności produkcji oraz zmniejszenie liczby upadków w stadach. Dodatkowo o takich właściwościach wydają się być drożdże szczepu *Saccharomyces cerevisie*. W projekt badawczy zaangażowano interdyscyplinarny zespół pracowników Uniwersytetu Przyrodniczego oraz Uniwersytetu Marii Skłodowskiej-Curie w Lublinie. Badania przeprowadzono na przepiórkach japońskich, którym podawano dietę z odpowiednio przygotowanych drożdży. Suplementacja ta wywarła pozytywny wpływ na strukturę morfologiczną błony śluzowej jelita cienkiego, stwierdzono mianowicie wzrost grubości błony mięśniowej, podśluzowej oraz śluzowej jelita cienkiego, a także zwiększoną długość kosmków jelitowych. Zaobserwowane zmiany dają podstawy do wysunięcia wniosku, iż dodatek drożdży szczepu *S. cerevisie* do diety

drobiu może przyczyniać się do lepszego wykorzystania paszy poprzez zwiększenie powierzchni chłonnej jelita cienkiego. Kontynuując prace nad wpływem substancji poprawiających równowagę bakteryjną przewodu pokarmowego drobiu wykonano doświadczenie, w którym indyckom podawano probiotyk, w skład którego wchodziły mikroorganizmy pochodzące od drobiu złożonego z izolatów szczepów bakteryjnych *Lactococcus lactis*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus plantarum* oraz pochodzących również z przewodu pokarmowego ptaków drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Wykorzystując metody histologiczne, potwierdzono pozytywny wpływ stosowanego probiotyku na parametry morfologiczne jelita cienkiego. Wyniki badań zostały przedstawione w pracach:

- Tomaszewska E., Dobrowolski P., Muszyński S., Kwiecień M., Kasperek K., Knaga S., Tomczyk-Warunek A., **Kowalik S.**, Jeżewska-Witkowska G., Grela E.R. Intestinal mucosa develops in a sex-dependent manner in japanese quail (*Coturnix japonica*) fed *Saccharomyces cerevisiae*. *British Poultry Science* 2018, vol. 59 (6), 689-697.
- Dobrowolski P., Tomaszewska E., Kwiecień M., Klebaniuk R., **Kowalik S.**, Winiarska-Mieczan A., Olcha M., Gawron A., Grela E.R. Struktura histologiczna jelita cienkiego indyckek żywionych dietą z dodatkiem probiotyku (Histological structure of small intestine in female turkeys supplemented with dietary probiotic). XLV Sesja Naukowa Sekcji Żywienia Zwierząt Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn, Polska, 21-22 czerwiec 2016.

W kolejnym doświadczeniu przeprowadzonym na kurczętach brojlerach zaproponowano zastosowanie nasion bobu o niskiej zawartości taniny jako substytutu ziarna sojowego standardowej paszy. Uzyskane wyniki poddano wnikliwej analizie pamiętając, że ziarna bobu bogate są w czynniki antyżywniowe takie jak np. fityniany ograniczające biodostępność mikroelementów, inhibitory enzymów proteolitycznych powodujących upośledzenie trawienia białek, a także saponiny hamujące przyswajalność witamin i składników mineralnych oraz upośledzające mechanizmy enzymatycznego i nieenzymatycznego transportu cukrów prostych przez błonę enterocytów. Oceniono parametry hematologiczne i biochemiczne krwi, parametry morfometryczne jelita cienkiego oraz parametry geometryczne i mechaniczne kości długich. Uzyskane wyniki wykazały, że zaproponowany w doświadczeniu dodatek ziaren bobu nie wpłynął negatywnie na dzienne przyrosty masy ciała kurcząt. Trzeba jednak zaznaczyć, iż równocześnie pojawiły się wyniki świadczące o negatywnym jego wpływie na szereg parametrów zarówno metabolicznych jak i morfologicznych jelita cienkiego oraz kości. Wyniki opublikowano w pracy oryginalnej:

- Tomaszewska E., Dobrowolski P., Klebaniuk R., Kwiecień M., Tomczyk-Warunek A., Szymańczyk S., **Kowalik S.**, Milczarek A., Blicharski T., Muszyński S. Gut-bone axis response to dietary replacement of soyabean meal with raw low-tannin faba bean seeds in broiler chicken. Plos ONE 2018, vol. 13 (3), 1-22.

Podobne badania o charakterze żywieniowym są obecnie prowadzone a ich wstępne wyniki posłużyły do przygotowania doniesień kongresowych:

- Tomczyk-Warunek A., Woźniak K., Kras K., Muszyński S., Tomaszewska E., Dobrowolski P., Świątkiewicz S., Arczewska-Włosek A., Schwarz T., Valverde Piedra J.L., Szymańczyk S., Arciszewski M., Zacharko-Siembida A., **Kowalik S.**: Wpływ ksyłazyny na homeostazę tkanki kostnej u kurcząt żywionych dodatkiem żyta. X Konferencja Adeptów Fizjologii: Homeostaza-Mikrobiom-Ksenobiotyki. Lublin, 14 września 2018 /książka streszczeń s. 62/.
- Tomczyk-Warunek A., Kras K., Woźniak K., Tomaszewska E., Muszyński S., Dobrowolski P., Szymańczyk S., Valverde Piedra J.L., Arciszewski M., Zacharko-Siembida A., **Kowalik S.**, Schwarz T.: Zmiany struktury histologicznej jelita cienkiego u tuczników żywionych mieszankami paszowymi z maksymalnym udziałem kukurydzy i pszenżyta. X Konferencja Adeptów Fizjologii: Homeostaza-Mikrobiom-Ksenobiotyki. Lublin, 14 września 2018 /książka streszczeń s. 101/.

Równolegle prowadzę prace badawcze dotyczące szeroko pojętej fizjologii żywienia zwierząt gospodarskich. Obecnie biorę udział w projekcie grantowym BIOSTRATEG 2/297910/12/NCBR/2016 pt.: „Strategia zapewnienia i ewaluacji bazy tanich, efektywnych i bezpiecznych paszowych surowców energetycznych do produkcji zwierzęcej w oparciu o zasoby krajowe ze szczególnym uwzględnieniem nowoczesnych odmian żyta”. Celem zapewnienia możliwości realizacji tak dużego projektu utworzono wielośrodkowe konsorcjum naukowe ENERGYFEED skupiające przedstawicieli świata nauki oraz przemysłu, w skład którego weszły m.in. Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowy Instytut Badawczy z siedzibą w Radzikowie, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Polski Związek Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej „Polsus” z siedzibą w Warszawie czy Przedsiębiorstwo Blattin Polska sp. z o.o. z siedzibą w Siedlcu. Prowadzone przeze mnie badania dotyczą określenia wpływu stosowania w paszy dodatków wybranych zbóż na parametry morfologiczne i biochemiczne krwi oraz status immunologiczny zwierząt doświadczalnych. Wstępne wyniki przeprowadzonych analiz zostały zaprezentowane na konferencjach,

a w niedalekiej przyszłości planuję je opublikować w zagranicznych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku IF.

- **Kowalik S.**, Książarczyk M., Leśniak P., Valverde-Piedra J.L., Schwarz T.: Czy żywienie paszą zawierająca nasiona żyta ma wpływ na poziom cytokin w krwi tuczników? (Does feeding rye seeds influence cytokine concentration in the blood serum of fattened pigs?) Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Problemy Higieny i Epidemiologii w XXI wieku”, Lublin, 11 grudnia 2018.
- Valverde Piedra J.L., **Kowalik S.**, Chałabis-Mazurek A., Leśniak P., Tomaszewska E., Szymańczyk S.E., Arciszewski M., Zacharko A., Muszyński S., Dobrowolski P., Schwarz T. Wpływ żywienia paszą zawierającą zróżnicowany udział zbóż na poziom cytokin w krwi tuczników (The influence of feeding a mixture containing varied proportions of cereals on cytokine concentration in the blood serum of fattened pigs). V Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Innowacje w medycynie i farmakoterapii cz. II” Arłamów, 8-10 listopada 2018.

5.3 Udział w projektach badawczych

1. Grant KBN 5 P06 D 029 19, tytuł: „Wpływ alanyloglutaminy, α -ketoglutaranu oraz ornityno α -ketoglutaranu na wzrost, rozwój i mineralizację układu kostno-szkieletowego w okresie życia postnatalnego prosiąt” – wykonawca zadania badawczego realizowanego w latach 2000-2002.
2. Grant zamawiany nr: PBZ-KBN-093/P06/2003, tytuł: „Sterowanie rozwojem przewodu pokarmowego u noworodków zwierząt w celu zwiększenia ich przeżywalności i poprawy stanu zdrowotnego” – wykonawca zadania badawczego realizowanego w latach 2003-2005.
3. Biostrateg 2/297910/12/NCBR/2016, tytuł: „Strategia zapewnienia i ewaluacji bazy tanich, efektywnych i bezpiecznych paszowych surowców energetycznych do produkcji zwierzęcej w oparciu o zasoby krajowe ze szczególnym uwzględnieniem nowoczesnych odmian żyta” – wykonawca zadania badawczego – obecnie.

5.4 Stypendia zagraniczne

W okresie od 31.03.2016 do 17.02.2017 przebywałem na długoterminowym stażu zagranicznym w obecnej Katedrze Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu w Lund. Wyjazd stażowy możliwy był dzięki uzyskaniu stypendium naukowego sponsorowanego przez koncern biofarmaceutyczny Biovitrum AB i Uniwersytet w Lund.

6. Sumaryczna ocena dorobku naukowego

łącznie (wg bazy Web of Science)	
Liczba publikacji indeksowanych	29
Liczba cytowań prac	162
Liczba cytowań bez autocytowań	149
Index Hirsha	8
łącznie (wg bazy Scopus)	
Liczba publikacji indeksowanych	30
Liczba cytowań prac	180
Liczba cytowań bez autocytowań	165
Index Hirsha	8
Impact Factor	20,035
Liczba punktów MNiSW	577

