



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Beata Justyna Giercuskiewicz-Hecold

# **Znaczenie suplementacji astaksantyną u koni wyczynowych**

The role of astaxanthin supplementation  
in performance horses

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem:

Prof. dr hab. Anny Cywińskiej

Instytut Medycyny Weterynaryjnej,

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Prof. dr hab. Krzysztofa Marycza

International Institute of Translation Medicine (MIMT), Malin

Warszawa 2026



**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej  
przygotowanej przez doktoranta Szkoły Doktorskiej SGGW**

Oświadczam, że **rozprawa doktorska autorstwa Beaty Giercuskiewicz-Hecold została przygotowana pod moim kierunkiem na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 30.09.2026

Czytelny podpis promotora





**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej  
przygotowanej przez doktoranta Szkoły Doktorskiej SGGW**

Oświadczam, że **rozprawa doktorska autorstwa Beaty Giercuskiewicz-Hecold została przygotowana pod moim kierunkiem na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 28.01.2026 Czytelny podpis promotora .....



**Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej  
będącego doktorantem Szkoły Doktorskiej SGGW**

Świadoma odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że **niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data ..05.03.2026.....

*Beata Górska-Nowak*  
Czytelny podpis autora rozprawy *Nowak*



*Szczególne podziękowania składam*

*prof. dr hab. Annie Cywińskiej oraz prof. dr hab. Krzysztofowi Maryczowi  
za opiekę naukową, umożliwienie rozwoju, wiarę w moje możliwości oraz okazaną  
dobroć i życzliwość*

*prof. dr hab. Ewie Szarskiej, prof. dr hab. Antoniemu Schollenbergerowi,  
prof. dr hab. Włodzimierzowi Klucińskiemu oraz prof. dr hab. Michałowi Czopowiczowi  
za życzliwość, poświęcony czas i cenne uwagi merytoryczne*

*Współautorom publikacji  
za wniesiony wkład, pomoc na każdym z etapów powstawania artykułów oraz cenne wskazówki*

*Trenerowi Maciejowi Kacprzykowi  
za współpracę i zaufanie*

*dr hab. Justynie Franc-Dąbrowskiej, prof. SGGW oraz wszystkim pracownikom  
Biura Szkoły Doktorskiej SGGW, za życzliwość*

*Moim Koleżankom i Kolegom ze studiów doktoranckich – nauka z Wami to czysta przyjemność.*

*Wszystkim moim bliskim, którzy byli przy mnie i wspierali mnie w chwilach zwątpienia*

*Pracę dedykuję moim Rodzicom i Cioci Krysi,*

*Moje osiągnięcia są owocem Waszej wiary we mnie i miłości,  
która towarzyszyła mi na każdym szczeblu edukacji.*



## Spis treści

Oświadczenia promotorów rozprawy doktorskiej .....	3
Streszczenie .....	13
Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi:.....	17
Objaśnienia zastosowanych skrótów .....	19
1. Wprowadzenie .....	21
1.1 Astaksantyna – pochodzenie, właściwości, zastosowanie .....	21
1.2 Znaczenie stresu oksydacyjnego w adaptacji mięśni do treningu .....	23
1.3 Wprowadzenie do treningu wyścigowego młodych koni arabskich przy zapewnieniu optymalnego dobrostanu .....	26
1.4 Metody oceny efektywności treningu koni wyścigowych .....	28
1.5 Stosowanie specjalistycznych dodatków paszowych u koni wyścigowych.....	31
1.6 Omówienie składu dysertacji .....	32
2. Hipotezy badawcze, cele i zakres pracy doktorskiej .....	34
2.1 Hipotezy badawcze.....	34
2.2 Cele pracy.....	34
3. Materiały i metody .....	36
3.1 Dobór koni do grupy badanej i kontrolnej .....	36
3.2 Charakterystyka doustnego preparatu zawierającego astaksantynę .....	37
3.3 Pobieranie próbek krwi .....	37
3.4 Analiza hematologiczna .....	39
3.5 Materiały i metody zastosowane w doświadczeniu <i>in vitro</i> .....	40
3.7 Metody oznaczania stężenia wybranych cytokin związanych z zapaleniem i prostaglandyny E.....	42
3.8 Metody zastosowane w celu oceny wpływu suplementacji astaksantyną na wyniki osiągnięte w gonitwach przez konie arabskie w pierwszym roku startów .....	42
4. Wyniki .....	43
4.1 Analiza hematologiczna i zmiany stężenia kwasu mlekowego.....	43
4.2 Ocena wpływu astaksantyny na komórki jednojądrzaste krwi obwodowej koni w warunkach <i>in vitro</i> .....	43

4.2.1 Ocena wpływu astaksantyny na komórki jednojądrzaste krwi obwodowej koni w warunkach stresu indukowanego H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	43
4.2.2 Ocena wpływu astaksantyny na ekspresję wybranych genów związanych z czynnością mitochondriów w PBMC.....	44
4.3 Ocena wpływu astaksantyny na zmiany w statusie antyoksydacyjnym u koni w grupach badanej i kontrolnej .....	45
5.3.1 Ocena wpływu trzymiesięcznej suplementacji astaksantyną na zmiany w statusie oksydacyjnym młodych koni wyścigowych czystej krwi arabskiej.....	45
5.3.2 Ocena zmian w statusie oksydacyjnym pod wpływem suplementacji astaksantyną podczas pojedynczej sesji treningowej w punkcie czasowym T1 .....	46
4.4 Ocena wpływu suplementacji astaksantyną na zmiany w profilu cytokin u koni w grupach badanej i kontrolnej .....	47
4.5 Ocena wpływu suplementacji astaksantyną na wyniki osiągnięte w gonitwach przez konie arabskie w pierwszym roku startów.....	47
5. Dyskusja.....	48
6. Podsumowanie i wnioski.....	61
7. Piśmiennictwo .....	62
8. Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu oraz oświadczenia współautorów.....	79

## Streszczenie

Astaksantyna (ATX) to naturalna substancja zaliczana do karotenoidów o działaniu silnie przeciwutleniającym i potencjalnie przeciwzapalnym. Celem badań przedstawionych w pracy była ocena wpływu doustnej suplementacji ATX na zmiany w statusie antyoksydacyjnym i profilu cytokin prozapalnych w modelu *in vitro* i *in vivo* u 3-letnich wyścigowych koni czystej krwi arabskiej. Badanie obejmowało 14 koni. W grupie badanej konie otrzymywały doustnie 250 mg ATX raz dziennie przez 15 tygodni. Krew do analiz pobierano podczas rutynowych prób wysiłkowych co 5 tyg., w czterech punktach czasowych T0–T3 oraz trzykrotnie podczas sesji treningowej w punkcie T1. W komórkach jednojądrzastych krwi (PBMC) izolowanych od koni oceniano wpływ astaksantyny na produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), zmiany ekspresji genów enzymów antyoksydacyjnych, wydzielanie cytokin prozapalnych i funkcje mitochondriów, w tym mitofagię. Wpływ suplementacji astaksantyną *in vivo* oceniono na podstawie zmian parametrów statusu antyoksydacyjnego i stężeń cytokin prozapalnych we krwi podczas długotrwałej obserwacji oraz pojedynczej sesji treningowej. Wzięto pod uwagę również wyniki koni w gonitwach.

W warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego *in vitro* w PBMC, ATX zmniejszyła produkcję ROS i zwiększyła ekspresję genów *NRF1*, *SOD2*, *GPx*, a także obniżyła stężenia wydzielanych  $INF\gamma$  i  $TNF\alpha$ . W wyniku doustnej suplementacji astaksantyną wzrosła ekspresja genów związanych z wybranymi funkcjami mitochondriów, w tym mitofagię. Wpływ suplementacji ATX na zmiany statusu antyoksydacyjnego stwierdzono szczególnie w punkcie czasowym T1-0. Wyniki badań *in vitro* potwierdziły rolę ATX w ochronie przed stresem oksydacyjnym, hamowaniu odpowiedzi zapalnej i jej znaczenie w zachowaniu prawidłowych funkcji mitochondriów i pobudzeniu mitofagii. W badaniu *in vivo* potwierdzono wpływ suplementacji ATX na poprawę wydolności systemu antyoksydacyjnego, szczególnie w pierwszym miesiącu intensywnego treningu. Nie można jednoznacznie ocenić przeciwzapalnego wpływu astaksantyny w warunkach *in vivo*. Nie potwierdzono wpływu astaksantyny na wyniki wyścigowe koni.

Słowa kluczowe: astaksantyna, konie wyścigowe czystej krwi arabskiej, trening, stres oksydacyjny, status antyoksydacyjny, cytokiny zapalne, mitofagia



## Summary

Astaxanthin (ATX) is a natural carotenoid with strong antioxidant and anti-inflammatory properties. This thesis assessed the effects of oral ATX supplementation on changes in antioxidant status and pro-inflammatory cytokine profiles both *in vitro* and *in vivo* models in 3-year-old Arabian racehorses. The study included 14 horses. Horses in the experimental group were supplemented orally with 250 mg of astaxanthin once daily for 15 weeks. Blood samples were collected during routine exercise tests every 5 weeks at four time points (T0–T3) and three times during training sessions at T1. In equine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), the effects of ATX on ROS production, the expression of antioxidant enzyme genes, secretion of pro-inflammatory cytokines, and mitochondrial functions including mitophagy were evaluated. The *in vivo* impact of ATX supplementation was assessed based on the changes in antioxidant status parameters and pro-inflammatory cytokine concentrations in blood during the long-term observation and within a single training session. Results were compared with the horses' racing results.

Under oxidative stress conditions, ATX reduced ROS production and increased the expression of *NRF1*, *SOD2*, and *GPx* genes, while lowering  $\text{INF}\gamma$  and  $\text{TNF}\alpha$  concentrations. Oral ATX supplementation increased the expression of genes related to specific mitochondrial functions, including mitophagy. The effect of ATX supplementation on changes in antioxidant status was particularly observed at time point T1-0. *In vitro* findings confirmed ATX's role in protecting against oxidative stress, reducing inflammatory responses, and supporting mitochondrial function and mitophagy. The *in vivo* study confirmed the effect of ATX supplementation on improving the efficiency of the antioxidant system, especially after the first month of intensive training. The anti-inflammatory effect of ATX *in vivo* cannot be clearly determined. No effect of ATX on the race results of the horses was observed.

Keywords: astaxanthin, Arabian racehorses, training, oxidative stress, antioxidant levels, inflammatory cytokines, mitophagy



Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi:

Publikacja 1

Giercuskiewicz-Hecold, B., Pajuelo, D., Steczkiewicz, Z., Cywińska, A., & Marycz, K\*. (2025). Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy. *Scientific Reports*, 15, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-93661-7>

IF=3,9

140 pkt MEiN

Udział własny: 70%

Publikacja 2

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. *Scientific Reports*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

IF=3,9

140 pkt MNiE

Udział własny: 75%

Publikacja 3

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, 13, Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

IF=6,6

100 pkt MNiE

Udział własny: 75%

Łączny IF publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi IF=14,4 i 380 pkt. wg punktacji Ministra Nauki. Punktacja jest zgodna z aktualnym wykazem Journal Citation Reports oraz komunikatem Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

\* autor korespondencyjny

## Objaśnienia zastosowanych skrótów

- AP-1** (ang. activator protein 1) – białko aktywatora 1  
**ATP** (ang. adenosine triphosphate) – adenylotryfosforan  
**ATX** (ang. astaxanthin) – astaksantyna  
**BAS** (ang. basophils) – bazofile  
**CAT** (ang. catalase) – katalaza  
**CK** (ang. creatine kinase) – kinaza kreatynowa  
**DNA** (ang. deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy  
**EDTA** (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) – kwas wersenowy  
**ELISA** (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymatyczny  
**EOS** (ang. eosinophils) – eozynofile  
**FBS** (ang. fetal bovine serum) - płodowa surowica bydlęca  
**GCSF** (ang. granulocyte colony-stimulating factor) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów  
**GPx** (ang. glutathione peroxidase) – peroksydaza glutationowa  
**GR** (ang. glutathione reductase) – reduktaza glutationowa  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – nadtlenek wodoru  
**HCT** (ang. hematocrit) – hematokryt  
**HGB** (ang. hemoglobin concentration) – stężenie hemoglobiny  
**IFN- $\gamma$**  (ang. interferon - gamma) – interferon-gamma  
**IL-1 $\beta$**  (ang. interleukin -1 beta) – interleukina pierwsza beta  
**IL-6** (ang. interleukin -6) – interleukina szósta  
**IL-10** (ang. Interleukin - 10) – interleukina dziesiąta  
**LA** (ang. lactic acid) – kwas mlekowy  
**LDH-5** (ang. lactate dehydrogenase isoenzyme 5) – izoenzym-5 dehydrogenazy mleczanowej  
**LYM** (ang. lymphocytes) – limfocyty  
**MCP-1** (ang. monocyte chemoattractant protein-1) - białko chemotaktyczne monocytów 1  
**MCHC** (ang. mean corpuscular hemoglobin concentration) – średnie stężenie hemoglobiny w erytrocycie  
**MCV** (ang. mean corpuscular volume) – średnia objętość krwinki czerwonej  
**MIEF1** (ang. mitochondrial elongation factor 1) – czynnik elongacji mitochondrialnej 1  
**MON** (ang. monocytes) – monocyty  
**MRPL24** (ang. mitochondrial ribosomal protein L24) – mitochondrialne białko rybosomalne L24  
**mtDNA** (ang. mitochondrial deoxyribonucleic acid) – mitochondrialny DNA  
**NDUFA9** (ang. NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A9) – podjednostka A9 oksydoreduktazy NADH:ubichinon  
**NEU** (ang. neutrophils) – neutrofile  
**NF- $\kappa$ B** (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) - czynnik jądrowy kappa B  
**NO $\cdot$**  - nadtlenek azotu

**NRF1** (ang. nuclear respiratory factor 1) – czynnik jądrowy oddechowy 1

**NRF2** (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) - czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - anionorodnik ponadtlenkowy

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** – tlen singletowy

**OXA1L** (ang. mitochondrial inner membrane protein OXA1L) – białko OXA1L

**OS** (ang. oxidative stress) - stres oksydacyjny

**PARKIN** (ang. parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase) - ligaza ubikwityny E3

**PBMC** (ang. peripheral blood mononuclear cells) - jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

**PIGBOS** (ang. PIGB opposite strand protein)

**PLT** (ang. platelets) – płytki krwi

**PGE** (ang. prostaglandin E) – prostaglandyna E

**PINK1** (ang. PTEN-induced kinase 1) – kinaza indukowana przez PTEN 1

**PPAR** (ang. peroxisome proliferator-activated receptor) - receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów

**PPARGC1A** (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) - koaktywator 1-alfa receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma

**PPARGC1B** (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta) - koaktywator 1-beta receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma

**PUSL1** (ang. pseudouridylate synthase-like 1) syntaza pseudourydylanowa typu 1

**PZHKA** – Polski Związek Hodowców Koni Arabskich

**RT-qPCR** (ang. reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

**RBC** (ang. red blood cells) – erytrocyty

**ROS** (ang. reactive oxygen species) – reaktywne formy tlenu

**SOD** (ang. superoxide dismutase) – dysmutaza ponadtlenkowa

**SOD1** (ang. superoxide dismutase 1) – dysmutaza ponadtlenkowa 1

**SOD2** (ang. superoxide dismutase 2) – dysmutaza ponadtlenkowa 2

**TAC** (ang. total antioxidant capacity) – całkowita pojemność antyoksydacyjna

**TAS** (ang. total antioxidant status) – całkowity status antyoksydacyjny

**TBARS** (ang. thiobarbituric acid reactive substances) – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym

**TFAM** (ang. transcription factor A, mitochondrial) – mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A

**TNF $\alpha$**  (ang. tumor necrosis factor alpha) – czynnik martwicy nowotworów alfa

**UQCRC2** (ang. ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2) - białko rdzeniowe 2 reduktazy ubichinolowo-cytochromowej c.

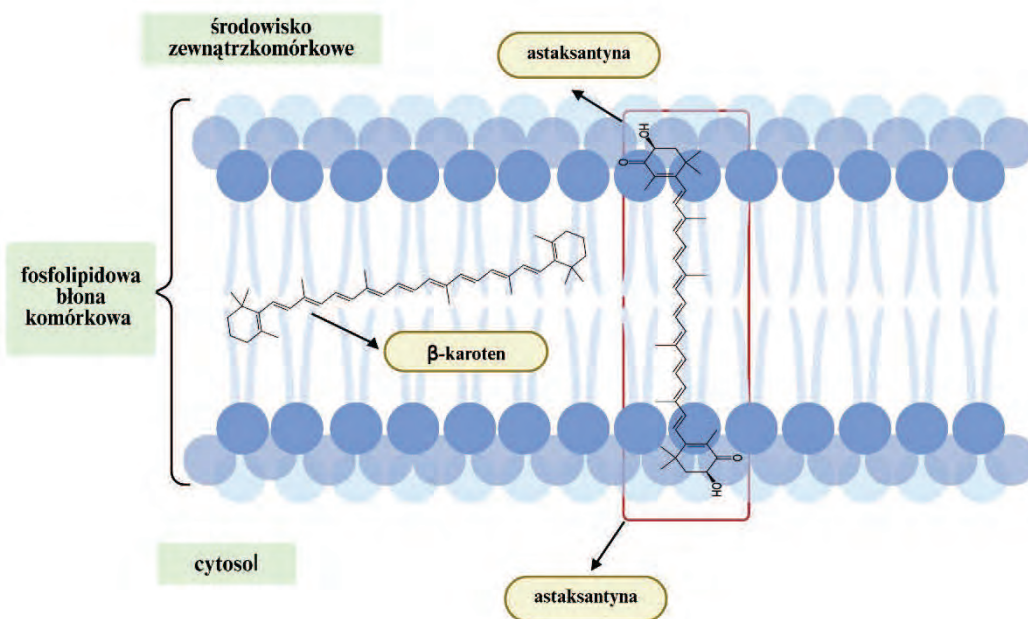
**WBC** (ang. white blood cells) – leukocyty

## 1. Wprowadzenie

### 1.1 Astaksantyna – pochodzenie, właściwości, zastosowanie

Astaksantyna (ang. astaxanthin, ATX) jest naturalnie występującym karotenoidem o silnych właściwościach przeciwutleniających. Ten czerwony barwnik, produkowany przez mikroorganizmy takie jak drożdże *Phaffia rhodosyma* i algi morskie *Haematococcus pluvialis*, posiada unikalną strukturę chemiczną (Mularczyk et al., 2020). Jest to ksantofil o wzorze chemicznym  $C_{40}H_{52}O_4$  (3,3'-dihydroksy- $\beta$ -karoten-4,4'-dion), posiadający 13 sprzężonych wiązań podwójnych, zawierający atomy tlenu w łańcuchu tetraterpenowym oraz szkielet będący nienasyconym łańcuchem węglowodorowym. Struktura ta nadaje cząsteczce właściwości amfipatyczne, polarne i silnie antyoksydacyjne, co na poziomie komórkowym pozwala wiązać się z błonami fosfolipidowymi (Brotosudarmo et al., 2020). W porównaniu z innymi karotenoidami ATX wykazuje wysoką biodostępność. Astaksantyna potrafi neutralizować reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), takie jak nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), anion ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), tlen singletowy ( $^1O_2$ ) i inne wolne rodniki, zarówno od strony wewnętrznej, jak i zewnętrznej błony komórkowej (Ryc. 1). Jest to najsilniejszy dotąd poznany antyoksydant, o działaniu dziesięciokrotnie silniejszym niż  $\beta$ -karoten i stukrotnie silniejszym niż  $\alpha$ -tokoferol.

Wysoki potencjał bioaktywny ATX jest od niedawna tematem intensywnych badań, które koncentrują się na jego zdolności antyoksydacyjnych w zapobieganiu i redukcji ryzyka uszkodzeń komórek i tkanek wywołanych stresem oksydacyjnym. Dotychczas ATX była głównie wykorzystywana w przemyśle paszowym. Dzięki swojej intensywnej pomarańczowej barwie wiele zwierząt takich jak kryle, krewetki, ryby czy ptaki, np. flamingi, które odżywiają się algami i organizmami bogatymi w astaksantynę, uzyskuje pomarańczowe zabarwienie pancerzy, mięśni i piór (Maoka, 2011). Ze względu na poprawę właściwości sensorycznych produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi, żółtek jaj, mięsa krewetek i ryb łososiowatych, algi bogate w ATX są stosowane jako dodatek paszowy od wielu lat. Obecnie, podobnie jak w przypadku większości barwników spożywczych i dodatków do pasz, odpowiednie instytucje opracowują regulacje ustalające limity stosowania ATX w przemyśle spożywczym.



Ryc. 1 Miejsca aktywności biologicznej karotenoidów w szkielecie błony komórkowej. Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com

Jednak to nie dzięki barwie, a właściwościom biologicznym ATX zyskała popularność w przemyśle farmaceutycznym. Na terenie Unii Europejskiej oraz w Stanach Zjednoczonych ATX jest uznawana za suplement diety dla ludzi i nazywana „super składnikiem odżywczym”. Liczne badania opisują działania prozdrowotne astaksantyny u ludzi, takie jak właściwości: przeciwzapalne (Chang & Xiong, 2020), przeciwnowotworowe (Zhang & Wang, 2015), przeciwcukrzycowe (Gowd et al., 2021), oraz hamujące procesy starzenia i apoptozy. Te ostatnie znalazły zastosowanie na rynku kosmetycznym w kremach dla cery dojrzałej typu „anti-aging” (Eren et al., 2019). Bezpośrednie działanie w zwalczaniu wolnych rodników i hamowaniu stresu nitrozacyjnego wywołanego aktywnością nadtlenu azotu ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) skupia uwagę najbardziej dochodowej gałęzi przemysłu farmaceutycznego – producentów leków na potencję. W tym przypadku badania wskazują na pozytywny wpływ tego przeciwutleniacza na uzyskanie erekcji u mężczyzn z zaburzeniami tej funkcji (Ramasamy et al., 2024). Badania nad właściwościami astaksantyny (Ambati et al., 2014) potwierdzają szerokie spektrum działania przeciwutleniającego, obejmujące ochronę lipidów, białek i kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. deoxyribonucleic acid, DNA)

przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Znane są mechanizmy działania przeciwzapalnego ATX, począwszy od poziomu molekularnego, co wykazano na podstawie analizy zmian genomu i transkryptomu, przez zmiany biochemiczne na poziomie komórkowym np. wzrost stężeń markerów zapalenia, po rzeczywisty wpływ na tkanki, narządy i cały organizm. Badania w medycynie człowieka nad właściwościami przeciwzapalnymi ATX obejmują nie tylko pacjentów w tzw. grupach klinicznych, ale także osoby z grup narażonych na wiele czynników środowiskowych (Brown et al., 2018), np. aktywnych sportowców (Baralic et al., 2015). Wykorzystanie potencjału antyoksydacyjnego ATX u ludzi jest szeroko dyskutowane w piśmiennictwie, jednak w przypadku zwierząt wciąż pozostaje wiele pytań odnośnie do możliwości jej zastosowania. Badania nad działaniem ATX prowadzone są głównie na modelach gryzoni (Liu et al., 2025; Wu et al., 2025; Xu et al., 2017), psów (Murai et al., 2019; Park et al., 2010), a rzadziej na koniach (Mularczyk et al., 2022). Większość z wymienionych badań dotyczy metod ograniczania negatywnych skutków stresu oksydacyjnego, jednak niewiele z nich dotyczy stresu oksydacyjnego związanego z wysiłkiem fizycznym. Przykładowo, wskazuje się na korzystny wpływ ATX na modulowanie odpowiedzi immunologicznej u psów (Chew et al., 2011), a doświadczenia na modelu gryzoni pokazują, że ATX może łagodzić stres oksydacyjny u myszy i szczurów żywionych dietą wysokotłuszczową (Wu et al., 2020). Większość badań nad możliwościami biologicznymi astaksantyny przeprowadza się na zwierzętach laboratoryjnych.

## **1.2 Znaczenie stresu oksydacyjnego w adaptacji mięśni do treningu**

Stres oksydacyjny (ang. oxidative stress, OS) jest definiowany jako brak równowagi pomiędzy zwiększonym wytwarzaniem ROS, powstających w komórkach jako uboczny efekt przemian tlenowych, a zdolnościami neutralizowania ich poprzez mechanizmy antyoksydacyjne. Zaburzenie równowagi redoks wskutek nagromadzenia dużej ilości wolnych rodników doprowadza do uszkodzenia białek i lipidów, co potencjalnie może skutkować uszkodzeniem komórek, a w konsekwencji pobudzeniem odpowiedzi zapalnej (Powers & Hogan, 2016). Jednak to właśnie wolne rodniki aktywują szlaki sygnałowe, wpływając na odpowiedź zwrotną ze strony komórkowego układu antyoksydacyjnego. Tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana, charakteryzująca się dużym zapotrzebowaniem energetycznym i bardzo szybkim metabolizmem, produkuje szczególnie dużą ilość ROS. Proces ten ma miejsce niezależnie

od sposobu pozyskiwania energii niezbędnej do skurczu mięśni i dotyczy zarówno przemian tlenowych, jak i beztlenowych (Poole, 2004). W warunkach fizjologicznych wszystkie komórki dążą do utrzymania homeostazy redoks. Zwiększona aktywność fizyczna i treningi skutkują zaburzeniami tego balansu, w konsekwencji prowadząc do szeregu zmian adaptacyjnych.

Komórkowy układ antyoksydacyjny opiera się na dwóch mechanizmach: enzymatycznym i nieenzymatycznym. Pierwszy z nich polega na działaniu enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego w skład, którego wchodzi swoiste dla określonych ROS enzymy, wśród których wyróżnia się: dysmutazy – głównie dysmutazę ponadtlenkową, (ang. superoxide dismutase, SOD), katalazy (ang. catalase, CAT), peroksydazy –głównie peroksydazę glutationową (ang. glutathione peroxidase, GPx) i reduktazy – reduktazę glutationową (ang. glutathione reductase, GR). Enzymy te neutralizują ROS do postaci nieszkodliwych dla komórki. Drugi dotychczas poznany mechanizm antyoksydacyjny polega na bezpośrednim wychwycie i wiązaniu ROS przez określone substancje biologicznie czynne, takie jak: zredukowany glutation (ang. reduced glutathione, GSH), bilirubinę, kwas moczowy i niektóre witaminy, w szczególności witaminę A, E i C (Wiecek et al., 2015). Ten mechanizm może być wspomagany przez egzogenne wprowadzenie do organizmu substancji przeciwutleniających, mogących mieć realny wpływ na utrzymanie równowagi redoks (Bartosz, 2010). Obydwa przedstawione mechanizmy antyoksydacyjne działają jako złożona sieć regulacyjna kontrolująca poziom ROS.

*Organelum* odgrywającym kluczową rolę w procesach metabolicznych jest mitochondrium. Komórki mięśniowe ze względu na wysokie zapotrzebowanie energetyczne są bogate w mitochondria. Liczba mitochondriów i efektywność funkcji mitochondrialnych mięśni szkieletowych dodatnio korelują z wydolnością wysiłkową (Porter et al., 2015). Zaburzeniom czynności mitochondriów i uszkodzeniu błony mitochondrialnej towarzyszy uwolnienie dużej ilości wolnych rodników do cytozolu. Może to doprowadzić do uszkodzenia komórki i aktywacji mechanizmów prozapalnych. Zjawisko mitofagii, czyli selektywnej degradacji uszkodzonych mitochondriów przez autofagię z udziałem lizosomów, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu jakości mitochondriów i zdrowia komórek (Onishi et al., 2021; Wang et al., 2019). Jest to bardzo złożony proces związany z aktywacją wielu szlaków sygnałowych. Mitofagia ma kluczowe znaczenie w ograniczaniu komórkowego OS (Kong et al., 2024; Siasos et al., 2018).

W sytuacjach nadmiernej produkcji wolnych rodników, kiedy układ antyoksydacyjny jest niewydolny może dojść do uszkodzenia komórek. Pod wpływem OS dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, m. in., czynnika jądrowego kappa B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B) i białka aktywatora 1 (ang. activator protein, AP-1), odgrywających główną rolę w regulacji ekspresji genów cytokin prozapalnych. Skutkuje to zwiększoną produkcją i uwalnianiem cytokin, takich jak interleukina 1- $\beta$  (ang. interleukin 1 beta, IL-1 $\beta$ ) interleukina-6 (ang. interleukin 6, IL-6), czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. tumor necrosis factor alfa, TNF- $\alpha$ ) i interferon-gamma (ang. interferon-gamma, IFN- $\gamma$ ), czego efektem jest pobudzenie zapalenia.

Głównym celem treningu jest optymalna adaptacja organizmu do wzrastającego wysiłku. Podstawą fizjologii sportu, jest zapewnienie takich warunków, w których OS wystąpi, ale równocześnie organizm będzie mieć zapewnioną możliwość regeneracji i adaptacji. Umiarkowana produkcja ROS podczas wysiłku sprzyja adaptacji mięśni szkieletowych (Powers et al., 2020), a każda z tych adaptacji poprzedzona jest ekspresją specyficznych genów, czasem na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego (Lee et al., 2020). Trening wpływa zarówno na zwiększenie poziomu OS, jak i na całkowity status antyoksydacyjny (ang. total antioxidant status, TAS). Umiarkowana aktywność fizyczna nie wydaje się powodować w mięśniach stresu mogącego doprowadzić do istotnego klinicznie uszkodzenia komórek mięśniowych (Chiaradia et al., 1998). Jednak intensywny trening prowadzony w nieodpowiedni sposób, niedostosowany indywidualnie do możliwości organizmu, może doprowadzić do obniżenia wyników sportowych i nasilić ryzyko kontuzji układu mięśniowo-szkieletowego (Crawford et al., 2021; Wong et al., 2023). W konsekwencji istnieje większe prawdopodobieństwo wystąpienia poważnych zaburzeń układowych, co może danego osobnika wykluczyć na stałe z aktywności sportowej (Valberg & McKenzie, 2025).

U koni, podobnie jak u ludzi, można wyróżnić dwa podstawowe typy włókien mięśniowych szkieletowych: włókna wolnokurczliwe (typ I) tzw. „czerwone”, z większą zawartością mioglobiny i przystosowane do metabolizmu tlenowego oraz włókna szybko kurczliwe (typ II) tzw. białe, o metabolizmie beztlenowym (López-Rivero et al., 1989). Struktura tkanki mięśniowej koni czystej krwi arabskiej różni się od innych ras, gdyż charakteryzuje się przewagą włókien typu I, a mniejszym udziałem włókien typu II, dokładnie odwrotnie niż w przypadku koni pełniej krwi angielskiej (Kawai et al., 2009). Dzięki temu konie te doskonale nadają się do wysiłków wytrzymałościowych

i pokonywania dłuższych dystansów. Taka proporcja składu włókien mięśniowych w przypadku koni arabskich, we wczesnym etapie treningu nie wpływa na sposób ich użytkowania. Konie arabskie poddawane próbom dzielności w wyścigach płaskich rozpoczynają trening wyścigowy na dystansach krótkich, z wiekiem wydłużając pokonywaną trasę, a proces adaptacji włókien mięśniowych do długich dystansów (startów w konkurencji sportowych rajdów konnych) wymaga czasu, zmiany procesu treningowego oraz sposobu żywienia (Ropka-Molik et.al., 2017). W przypadku wysiłku anaerobowego niezbędna do skurczu mięśni energia pochodzi głównie z przemian beztlenowych, jednak udowodniono, że zużycie tlenu przez konia podczas tego typu wysiłku wzrasta nawet 60-krotnie (Hanák et al., 2001). Stres oksydacyjny i odpowiedź antyoksydacyjna pojawiają się już po pojedynczym treningu zarówno w przypadku koni rajdowych poddawanych wysiłkowi tlenowemu, jak i koni wyścigowych poddawanych wysiłkowi beztlenowemu (Gondim et al., 2009). W przypadku koni czystej krwi arabskiej dane literaturowe dotyczące występowania OS odnoszą się do użytkowania długodystansowego, czyli sportowych rajdów konnych.

### **1.3 Wprowadzenie do treningu wyścigowego młodych koni arabskich przy zapewnieniu optymalnego dobrostanu**

W przypadku koni arabskich, najmłodsze dopuszczane do udziału w gonitwach zwierzęta muszą mieć ukończone 3 lata i być odpowiednio zidentyfikowane względem swojego pochodzenia. Dokumentacja pochodzenia jest kluczowa w kontekście zachowania czystości rasy, a co za tym idzie daje pewność, że rywalizacja zwierząt podczas danej gonitwy obejmuje osobniki tej samej rasy i może stanowić próbę porównawczą. Nie ma jednak żadnej formalnej procedury kwalifikującej konia do rozpoczęcia treningu wyścigowego. W głównej mierze osobami decydującymi o wprowadzeniu młodego konia w trening wyścigowy są hodowca, właściciel i trener. Decyzja o wyborze takiego, a nie innego sposobu użytkowania konia warunkowana jest rasą, kwestiami ekonomicznymi, społecznymi oraz hodowlanymi (Klecel et al., 2021).

Polski Związek Hodowców Koni Arabskich (PZHKA) w swoim programie hodowlanym jako jedno z kryteriów oceny wartości użytkowej konia wymienia próbę dzielności. Ocena ta odbywa się na podstawie dotychczasowej kariery pokazowej, wyścigowej lub rajdowej. W tym drugim przypadku wyścigi są traktowane przede wszystkim jako test zdrowotny, mający za zadanie sprawdzenie odporności fizycznej

i psychicznej poszczególnych osobników. Wyścigowa próba dzielności dla koni czystej krwi arabskiej obejmuje konie między 3 a 4 rokiem życia, z uwzględnieniem, że pierwszy start koni 3-letnich może się odbyć dopiero po 1 maja. Mając na uwadze dobrostan zwierząt, określono również minimalne i maksymalne dystanse, na jakich mogą odbywać się gonitwy dla koni 3- i 4-letnich. Takie założenia planu hodowlanego dążą do możliwie najbardziej obiektywnej oceny wartości użytkowej konia w danym roczniku i pozwalają porównać konie między sobą. Plan startów rozłożony w czasie zapewnia zwierzętom należyty czas na regenerację i adaptację do bardziej intensywnego wysiłku w następnych latach.

Konie przyjęte w trening wyścigowy prócz bezwzględniego warunku identyfikacji rasy i pochodzenia, powinny wykazywać się zdrowiem klinicznym i dobrym stopniem odżywienia, ponadto powinny być poddawane naturalnemu treningowi adaptacyjnemu do biegów jakim jest wolny wychów pastwiskowy. Wielu naukowców w swoich badaniach nad treningiem młodych koni zaznacza, że kwestia zbilansowanej diety i odpowiedniej ilości ruchu w okresie źrebięcym jest kluczowa w kontekście przygotowania do treningu właściwego, ponieważ poprawia zdolności adaptacyjne tkanki kostnej, mięśniowej, pozwala odpowiednio rozwijać układy oddechowy i krążeniowy (Firth & Rogers, 2005; Rogers et al., 2012; Smith & Goodship, 2008; Stephens, 2004). Są to istotne czynniki, mające wpływ na ryzyko wystąpienia kontuzji w trakcie treningu (Bailey i in., 1999).

Młody koń pod opiekę trenerską trafia najczęściej późną jesienią w roku kalendarzowym poprzedzającym planowany sezon startowy. Zwierzęta wdrażane są do treningu stopniowo. Obserwacje własne autora i rozmowy z trenerami wyścigowymi potwierdzają, że okres przygotowawczy można podzielić na cztery etapy, trwających średnio kilka tygodni, gdyż ich długość dostosowana jest indywidualnie do możliwości i rozwoju konia. Etapem początkowym jest przyzwyczajenie konia do siodła, ciężaru na grzbiecie, a następnie do jeźdźca. Koń, który przyjął jeźdźca może przejść do kolejnego etapu, a mianowicie pracy ujeżdżeniowej, nauki poruszania się w trzech podstawowych chodach i prostych ćwiczeń gimnastycznych, których celem jest uzyskanie odpowiedniego balansu. Osobniki posiadające już dobrą równowagę i płynnie poruszające się w stępie, klusie i galopie, rozpoczynają przygotowanie wyścigowe mające na celu dalszy rozwój mięśni szkieletowych. Końcowym etapem treningu przygotowawczego jest intensyfikacja pracy wpływająca na uzyskanie odpowiedniej wydolności wysiłkowej, umożliwiającej rozpoczęcie startów w gonitwach płaskich. Podobny schemat postępowania treningowego opisuje Kędzierski (2010) i dodatkowo

podaje szczegółowe informacje odnoszące się do obciążeń na poszczególnych etapach (Kędzierski, 2010). Równoległe do treningu koni, następuje modyfikacja dawki pokarmowej, tak aby zwierzęta otrzymywały dietę zbilansowaną pod względem składników odżywczych i energii.

Niektóre środowiska zwracają uwagę na młody wiek koni biorących udział w wyścigowej próbie dzielności, zwłaszcza w kontekście dobrostanu zwierząt. Stan obecnej wiedzy pozwala stwierdzić, że poddawanie młodych koni wysiłkowi, a następnie stopniowe zwiększanie jego intensywności i kontrolowanie odpowiedzi organizmu na zadawany trening jest bezpieczniejsze, niż w przypadku doprowadzenia koni starszych do podobnego stopnia wytrenowania (Logan & Nielsen, 2021).

#### **1.4 Metody oceny efektywności treningu koni wyścigowych**

Z punktu widzenia trenera koni wyścigowych najlepszym dowodem na efektywność treningu są wyniki gonitw. W przypadku zwierząt młodych, które jeszcze nie startowały, widocznym efektem wczesnego treningu jest rozbudowa masy mięśniowej (Ryc. 2). Sylwetka konia staje się smukła i atletyczna. Następuje poprawa jakości i efektywności ruchu, zwłaszcza w galopie.

Efektywność treningu można oceniać na podstawie badań spoczynkowych lub wysiłkowych. Opierają się one na analizie zmian wartości wybranych parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi oraz ocenie zmian wartości tętna (Evans & Rose, 1988; Janicki i in., 2012; Ohmura i in., 2013; Szarska, 2003; Thomas i in., 1983).

Ocena wartości parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi, pobranej od zwierząt w spoczynku pozwala określić ogólny stan zdrowia konia. Badanie spoczynkowe wykonuje się w stajni, w godzinach porannych przed treningiem. Krew od koni wyścigowych powinno pobierać się cyklicznie, średnio co 7 tygodni, a wyniki archiwizować. Wyniki pierwszego badania powinny mieścić się w zakresie wartości referencyjnych dla rasy, wieku i płci. Wyniki kolejnych badań poszczególnych koni powinny być odnoszone do poprzednich wyników tych samych koni. Taka analiza pozwala ocenić, czy trening przebiega prawidłowo. Posiadanie wyników kilku badań dla konkretnego konia umożliwia stworzenie jego indywidualnego profilu metabolicznego. Wartości parametrów w tym profilu będą służyły trenerowi jako punkt odniesienia w dalszych działaniach treningowych.

Trening wpływa na zmiany w wartościach parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi, zarówno w trakcie jednorazowej sesji treningowej,

jak i na przestrzeni całego sezonu wyścigowego. Wzrost wartości spoczynkowych hematokrytu (ang. hematocrit, HCT) i stężenia hemoglobiny (ang. hemoglobin concentration, HGB) we krwi u sportowca w trakcie okresu treningowego jest prawidłową odpowiedzią organizmu i świadczy o zwiększającej się pojemności tlenowej krwi (Mairbäurl, 2013). W przypadku koni taki wzrost ma miejsce po około trzech miesiącach treningu.

Analiza zmian wartości tętna u koni jest ważną metodą oceny efektywności treningu (Janczarek i in., 2017), ponadto nie jest w żaden sposób inwazyjna dla konia i może być przeprowadzana bez udziału lekarza weterynarii. Zmiany wartości tętna spoczynkowego są szczególnie istotne dla koni rozpoczynających trening. Obserwuje się, że spadek wartości spoczynkowego tętna u młodych wyścigowych koni, występuje już w pierwszym sezonie treningowym. Z kolei podwyższone wartości tętna spoczynkowego, z klinicznego punktu widzenia są objawem patologicznym i wraz ze zmianami w zachowaniu konia stanowią jeden z wczesnych sygnałów świadczących o chorobie (Hennes et al., 2024).

Badania wysiłkowe polegają na trzech pobraniach krwi: rano w spoczynku, zaraz po wysiłku oraz po 30 minutach regeneracji. Badania mogą być wykonywane podczas gonitwy, choć wymaga to zgody osób i instytucji odpowiedzialnych za konie i organizację gonitw lub podczas testu wysiłkowego na treningu. W Polsce popularny jest test 800 m polegający na pomiarze czasu w jakim koń pokonuje ten odcinek toru wyścigowego w galopie (Kędzierski, 2009). Dla wielu trenerów koni wyścigowych jest on podstawową metodą oceny postępów treningu. Istotnym parametrem krwi badanym u koni wyścigowych jest stężenie kwasu mlekowego. Zmiany w stężeniu mleczanu są szczególnie ważnym elementem w ocenie wydolności koni (Kobayashi, 2007). Prędkość z jaką porusza się koń, przy której stężenie kwasu mlekowego osiąga wartość 4 mmol/l określa się jako próg mleczanowy  $V_4$ . Wartość progowa 4 mmol/l [LA] wyznacza granicę „przejścia” z metabolizmu tlenowego na beztlenowy podczas treningu. Wyznacza również poziom intensywności, przy którym mleczan zaczyna gromadzić się we krwi szybciej, niż może być z niej eliminowany (Kędzierski et al., 2009; Lindner et al., 2009; Littiere et al., 2025).

W badaniach wysiłkowych koni bardzo dobrze sprawdzają się monitory pracy serca. Podstawowe ich zalety to nieinwazyjność metody, a także brak konieczności zatrudniania dodatkowych osób niezbędnych do pobrania krwi i wykonania oznaczeń badanych parametrów. Powtarzalność stosowanych testów opierających się o monitoring pracy serca daje możliwość porównania uzyskanych wyników w poszczególnych sesjach

treningowych na przestrzeni całego sezonu, a prawidłowa interpretacja pozyskanych danych pozwala trenerowi zarówno na ocenę postępów treningu, jak również na wprowadzenie modyfikacji, aby stale dostosowywać wysiłek do indywidualnych możliwości konia.



2a



2b

Ryc. 2 Wpływ wczesnego treningu wyścigowego na rozwój cech fizycznych świadczących o adaptacji wysiłkowej u młodych koni arabskich. 2a - młoda klacz arabska w wieku 2 lat i 9 miesięcy rozpoczynająca I etap treningu wyścigowego (Służewiec, listopad 2021). 2b – ta sama klacz w wieku 3 lat i 3 miesięcy przed startem w pierwszej gonitwie (Służewiec, maj 2022). Źródło – fotografie udostępnione za zgodą Moniki Metza

## 1.5 Stosowanie specjalistycznych dodatków paszowych u koni wyścigowych

Żywnienie koni stanowi jeden z głównych elementów mających wpływ na postępy w treningu. Adaptacja układu mięśniowo-szkieletowego, wymaga dostarczenia energii w sposób zgodny z profilem metabolicznym. Ewentualne niedobory żywieniowe należy określać zgodnie z wynikami badań krwi i uzupełniać przede wszystkim poprzez odpowiednią dietę. W tym celu stosuje się specjalistyczne dodatki paszowe. Odpowiednia dieta pomaga organizmowi chronić się przed negatywnymi skutkami intensywnych treningów i stresu związanego z udziałem konia w wyścigach. (Bartolomé et. al., 2016). Nie każda substancja o właściwościach leczniczych może być używana u koni jako dodatek żywieniowy. Przepisy antydopingowe jasno warunkują rodzaj substancji i maksymalne wartości progowe ich stężeń lub/i pozostałości oraz metabolitów we krwi lub/i w moczu zwierząt uczestniczących w gonitwach. Od producentów dodatków paszowych dla koni wyścigowych oczekuje się transparentności składu danego preparatu i wysokich standardów technologii produkcji, aby zminimalizować ryzyko ewentualnych zanieczyszczeń, których efektem może być dodatni wynik testu antydopingowego. Według badań, prowadzonych w Stanach Zjednoczonych najczęściej wybieranymi dodatkami paszowymi dla koni wyścigowych są preparaty elektrolitowe, lizawki solne, substancje o działaniu chondroprotektynowym, wzmacniającym kopyta i sierść, probiotyki, preparaty mające chronić błonę śluzową żołądka przed zwiększoną produkcją kwasów, dodatki tłuszczowe i witaminowe (Burk & Williams, 2008). Obecnie zakres badań i wiedza na temat suplementów diety i nutraceutyków dla potrzeb sportowca w odniesieniu do ludzi jest bardzo zaawansowana. Ze względu na różnice fizjologiczne pomiędzy sportowcami ludzkimi a końmi, wyniki takich badań nie mogą być bezpośrednio ekstrapolowane na konie. Wysilek fizyczny nasila OS z jednej strony warunkując możliwości adaptacyjne mięśni, z drugiej mogąc doprowadzić do pogorszenia wyników sportowych. Przeciwdziałanie negatywnym skutkom OS i możliwości wspomaganie endogennych mechanizmów ochrony komórek przed uszkodzeniami wolnorodnikowymi zwiększyły zastosowanie antyoksydantów w suplementach. Wyższe stężenie nieenzymatycznych przeciwutleniaczy w organizmie może osłabić negatywne skutki uwalniania dużej ilości ROS i potencjalnie opóźnić zmęczenie mięśni (Dadalt & Stefani, 2024). Badania dotyczące antyoksydantów takich jak witamina A, E i C nie dostarczają jednoznacznych odpowiedzi, czy intensywna i długotrwała suplementacja doustna tymi substancjami wpływa pozytywnie

na osiągnięcia sportowe w przypadku ludzi, a wskazują jedynie nieznaczny ich wpływ w ograniczeniu negatywnych skutków OS (Dutra et al., 2018; Gomez-Cabrera et al., 2012; Higgins et al., 2020). W przypadku koni wyścigowych przeciwutleniacze znajdują zastosowanie jako dodatki paszowe mające na celu hamowanie rozwoju stanu zapalnego w układzie mięśniowo-szkieletowym (Horohov et al., 2012) i układzie oddechowym (Stucchi et al., 2022).

Badania nad skutecznością stosowania ATX w ludzi uprawiających sport wyczynowy (Brown et al., 2018), jak również potwierdzenie jej ochronnej roli przed uszkodzeniami tkanki mięśniowej wywołanych wysiłkiem u myszy (Aoi et al., 2003) zachęcają do włączenia astaksantyny na stałe jako dodatku do zbilansowanej diety u koni wyścigowych. Wyniki prezentowane przez zespół Liu (2025), w badaniu dotyczącym wpływu ATX na chroniczne zmęczenie wysiłkowe u szczurów potwierdzają, że ATX redukuje zmęczenie i przyspiesza regenerację mięśni (Liu & Dađ'ová, 2025). Ocena wpływu ATX na stres oksydacyjny mięśni szkieletowych u koni polo w różnych etapach cyklu treningowego wskazuje, że to przede wszystkim trening, a nie suplementacja astaksantyną, poprawia stan oksydacyjny mięśni (Kawaida et al., 2025). Jednak te same badania (Kawaida et al., 2025) dowodzą, że ATX zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych we krwi. Wpływ suplementacji ATX u koni wyścigowych na stres oksydacyjny związany z wysiłkiem wymieniony jest w literaturze tylko raz w połączeniu z L-karnityną, w oparciu o aktywność kinazy kreatynowej (ang. creatine kinase, CK) i izoenzymu-5 dehydrogenazy mleczanowej (ang. lactate dehydrogenase isoenzyme 5, LDH-5) we krwi (Sato et al., 2015). Brak jest doniesień o znaczeniu suplementacji ATX dla koni będących w treningu wyścigowym i wpływie tej substancji na zmiany w statusie oksydacyjnym, profilu cytokin prozapalnych. Nie wiadomo też, czy astaksantyna ma wpływ na wyniki wyścigowe.

## **1.6 Omówienie składu dysertacji**

W skład dysertacji wchodzi trzy artykuły (Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 3) przedstawiające wyniki badań przeprowadzonych na grupie 3-letnich koni czystej krwi arabskiej będących w treningu wyścigowym na Torze Wyścigów Konnych Służewiec w Warszawie.

Publikacja pierwsza opisuje doświadczenie *in vitro* przeprowadzone w hodowli jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells,

PBMC) izolowanych od koni biorących udział w badaniach i analizę zmian ekspresji genów związanych z wybranymi funkcjami mitochondriów. Pierwsza część badania obejmowała ocenę zmian w PBMC, w których indukowano OS, a następnie wprowadzono do hodowli komórkowej ATX w różnych stężeniach i dotyczyła produkcji ROS i RNS, ekspresji enzymów antyoksydacyjnych oraz zmian w stężeniu cytokin prozapalnych. Analiza ekspresji genów w PBMC izolowanych z krwi koni grupy kontrolnej i badanej, w trakcie 10 tyg. suplementacji ATX opisuje zmiany dotyczące wybranych funkcji mitochondriów, ze szczególnym uwzględnieniem mitofagii.

Kolejna publikacja, odnosi się do wpływu doustnej suplementacji astaksantyną na wybrane parametry statusu antyoksydacyjnego u koni wyścigowych zarówno podczas pojedynczej sesji treningowej, jak i w trakcie długotrwałej obserwacji.

Publikacja trzecia dotyczy oceny wpływu doustnej suplementacji astaksantyną na zmiany w profilu cytokin zapalnych u arabskich koni wyścigowych.

Wyniki badań przedstawiono szczegółowo w spójnym tematycznie zbiorze artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, stanowiących integralną część manuskryptu.

1. Giercuskiewicz-Hecold, B., Pajuelo, D., Steczkiewicz, Z., Cywinska, A., & Marycz, K. (2025). Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy. *Scientific Reports*, *15*(1), 14633. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-93661-7>

2. Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. *Scientific Reports*, *14*, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

3. Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, *13*, Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

## 2. Hipotezy badawcze, cele i zakres pracy doktorskiej

### 2.1 Hipotezy badawcze

- I. Suplementacja astaksantyną u młodych koni czystej krwi arabskiej podczas treningu wyścigowego wpływa na status oksydacyjny i zmiany w profilu cytokin zapalnych oraz może przyczynić się do poprawienia wyników sportowych osiąganych przez konie.
- II. Suplementacja astaksantyną w przypadku młodych koni wyścigowych czystej krwi arabskiej łagodzi stres oksydacyjny poprzez modulacje procesów mitofagii na poziomie genetycznym.

### 2.2 Cele pracy

Celem pracy było zbadanie *in vitro* i *in vivo* przeciwutleniającego i przeciwzapalnego wpływu astaksantyny podawanej *per os* koniom arabskim rozpoczynającym intensywny trening wyścigowy.

Cele szczegółowe:

1. Ocena *in vitro* wpływu astaksantyny na wartości parametrów charakteryzujących stres oksydacyjny, wydzielanie cytokin prozapalnych i stan mitochondriów w PBMC izolowanych od koni arabskich rozpoczynających trening do wyścigów płaskich.
2. Ocena wpływu podawania astaksantyny na parametry charakteryzujące status oksydacyjny u koni arabskich rozpoczynających trening do wyścigów płaskich.
  - a. Ocena wpływu podawania astaksantyny na zmiany parametrów statusu oksydacyjnego po sesji treningowej o wysokiej intensywności.
  - b. Ocena wpływu podawania astaksantyny na parametry statusu oksydacyjnego podczas pierwszych miesięcy treningu.
3. Ocena zmian w profilu cytokin zapalnych związanych z treningiem u młodych koni wyścigowych czystej krwi arabskiej w trakcie suplementacji astaksantyną podczas pierwszych miesięcy treningu.
4. Ocena znaczenia suplementacji astaksantyną dla wyników osiąganych w gonitwach przez konie arabskie w pierwszym roku startów.

## 2.3 Zakres pracy

1. Pobranie krwi do badań *in vitro* i pozostałych analiz laboratoryjnych w trakcie rutynowych comiesięcznych prób wysiłkowych od 14 koni czystej krwi arabskiej w pierwszych miesiącach intensywnego treningu wyścigowego i początkowym okresie startów w gonitwach płaskich.
2. Pomiar stężenia mleczanu we krwi pełnej pobranej od koni w trakcie próby wysiłkowej.
3. Ocena hematologiczna wszystkich próbek krwi pobranych od koni w trakcie prób wysiłkowych.
4. Izolacja i hodowla PBMC pochodzących od koni biorących udział w badaniach, w celu indukcji stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego *in vitro* oraz oceny ochronnego działania astaksantyny na komórki.
  - a. Ocena akumulacji ROS i reaktywnych form azotu (ang. reactive nitrogen species, RNS) w komórkach kontrolnych, w których indukowano OS, a następnie traktowano astaksantyną w odpowiednim stężeniu.
  - b. Analiza ekspresji genów wybranych markerów OS: dysmutazy ponadtlenkowej 1 (ang. superoxide dismutase, *SOD1*), jądrowego czynnika oddechowego 1 (ang. nuclear respiratory factor 1, *NRF1*), dysmutazy ponadtlenkowej 2 (ang. superoxide dismutase 2, *SOD2*), *CAT*, *NRF2* (ang. nuclear factor erythroid 2-related) i *GPx* w PBMC, w których indukowano OS, a następnie, traktowano astaksantyną w odpowiednim stężeniu.
  - c. Określenie stężenia wybranych cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  i INF $\gamma$  w supernatancie z hodowli PBMC, w których indukowano OS, a następnie traktowano astaksantyną w odpowiednim stężeniu.
  - d. Ocena ekspresji genów związanych z procesami mitofagii *PINK1* (ang. PTEN-induced kinase 1) i *PARKIN* (ang. parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase), dynamiką mitochondriów *MIEF1* (ang. mitochondrial elongation factor 1) i *PIGBOS* (ang. PIGB opposite strand protein), metabolizmem *PPARGC1A* (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), *PPARGC1B* (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta), *NDUFA9* (ang. NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A9) oraz innych specyficznych dla mitochondriów genów w PBMC.

5. Pomiar wybranych parametrów określających status oksydacyjny: TAS, GR, CAT w osoczu i GPx, SOD w pełnej krwi w trakcie pierwszych miesięcy treningu wyścigowego 3-letnich koni czystej krwi arabskiej.
6. Określenie stężenia wybranych cytokin zapalnych (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-6) i interleukiny 10 (ang. interleukin 10, IL-10) oraz prostaglandyny E (ang. prostaglandin E, PGE) w surowicy krwi koni w kolejnych miesiącach treningu.
7. Analiza zgromadzonych danych dotyczących wyników osiągniętych przez konie biorące udział w badaniu w pierwszym roku startów w wyścigach płaskich.

### **3. Materiały i metody**

#### **3.1 Dobór koni do grupy badanej i kontrolnej**

Pierwszym etapem pracy było wyłonienie grupy koni czystej krwi arabskiej użytkowanych wyścigowo, od których pochodził materiał do dalszych badań i analiz szczegółowych. Do badania zakwalifikowano 14 trzyletnich koni czystej krwi arabskiej (9 ogierów i 5 klaczy), rozpoczynających pierwszy sezon wyścigowy. Wszystkie konie znajdowały się na terenie Toru Wyścigów Konnych Służewiec w Warszawie i były trenowane przez tego samego trenera. Zwierzęta wybrane do eksperymentu, charakteryzowały się podobnym poziomem wytrenowania i były klinicznie zdrowe. Wszystkie konie zostały odrobaczone i zaszczepione zgodnie z rutynowym harmonogramem, nie później niż 3 tygodnie przed rozpoczęciem badania. Podczas całego okresu badania zwierzęta utrzymywano w tym samym środowisku, obsługiwano przez ten sam zespół pracowników stajni, a ich dieta była zgodna z zaleceniami dla młodych koni wyścigowych. Podstawą diety były siano, owies i specjalistyczny koncentrat paszowy dla koni wyścigowych, w ilości dostosowanej indywidualnie do każdego zwierzęcia, w zależności od masy ciała, postępów treningowych i obciążenia. Posiłki z paszy treściwej podawano trzy razy dziennie, a dostęp do wody i soli był nieograniczony.

Konie na początku kwietnia przydzielono losowo (randomizacja prosta) do grupy kontrolnej (5 ogierów i 3 klacze) i badanej (4 ogiery i 2 klacze). Zwierzęta w grupie badanej dodatkowo otrzymywały codziennie preparat zawierający micelną formę ATX

w ilości 250 mg na konia, co odpowiadało dawce 0,52 – 0,58 mg/kg masy ciała. Grupa kontrolna nie otrzymywała żadnej suplementacji. Suplementacja ATX trwała łącznie przez 6 kolejnych miesięcy, a więc przez cały sezon wyścigowy.

Podczas treningów na Torze Wyścigów Konnych Służewiec w Warszawie ogiery i klacze pracowały razem, z taką samą intensywnością, zgodnie z planem treningowym obejmującym dwie intensywne sesje treningowe tygodniowo. Intensywna sesja treningowa składała się z rozgrzewki w stępie i kłusie pod jeźdźcem trwającej ok. 15 min, następnie konie wprowadzano w wolny galop z końcowym przyspieszeniem na odcinku 800 m do prędkości 45-50 km/h. Ostatni etap sesji stanowił swobodny stęp w maszynie treningowej przez 40 min.

### **3.2 Charakterystyka doustnego preparatu zawierającego astaksantynę**

Konie suplementowano doustnie emulsją zawierającą ATX ekstrahowaną z biomasy drożdży szczep *Phaffia rhodozyma* NCYC 874 (National Yeast Culture Collection, Wielka Brytania) w postaci miceli (średnio 0,1520 µg/mg). Preparat został przebadany przez producenta pod kątem rzeczywistego stężenia ATX oraz stabilności. Stabilność emulsji oceniono wizualnie przy użyciu ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) po miesiącu przechowywania. Producent deklarował następujący skład preparatu: 83,4% astaksantyna, 16,6%, olej rzepakowy (Kruszwica; Polska), wodny roztwór słoju buraczanego 10%. Szczegółowe dane dotyczące użytej w badaniach mieszaniny zawarte są w publikacji “The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study”, w podrozdziale „Methods” w akapicie „Yeast biomass cultivation, astaxanthin extraction and micellization” na stronie 12.

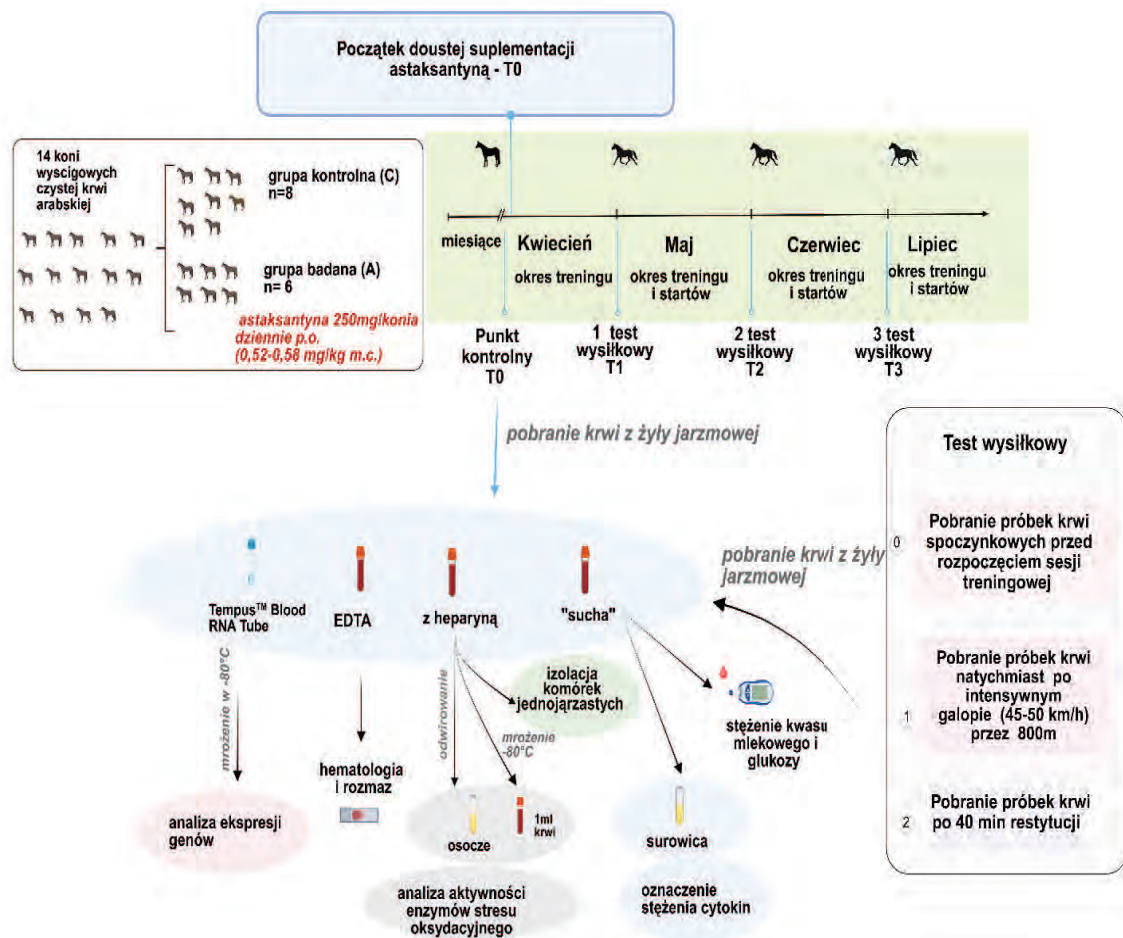
### **3.3 Pobieranie próbek krwi**

Wszystkie procedury pobierania krwi od koni wykonywano podczas rutynowych badań weterynaryjnych, a zatem zgodnie z dyrektywą europejską EU/2010/63 i polskimi przepisami dotyczącymi doświadczeń na zwierzętach zgoda Komisji Etycznej na opisane procedury nie była wymagana, gdyż kwalifikowały się one jako nieeksperymentalne kliniczne praktyki weterynaryjne i były wyłączone z dyrektywy. Trener jako osoba odpowiedzialna za zwierzęta, wyraził pisemną zgodę na wykorzystanie

krwi do analiz naukowych. Aby zminimalizować stres u koni, procedura pobierania próbek krwi miała miejsce w obecności jeźdźców i pracowników obsługi stajni znanych zwierzętom. Próbki krwi pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej, przy użyciu igły systemowej BD Vacutainer 21G 0,8 do próżniowego pobierania krwi. Próbki pobierano do następujących probówek BD Vacutainer (Becton Dickinson, Reading, Wielka Brytania): z kwasem wersenowym (ang. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) do analizy hematologicznej; suchych probówek - do pozyskania surowicy, do analizy cytokin i PGE; z heparyną - aby pozyskać osocze do analizy aktywności enzymów oksydacyjnych i izolacji PBMC do badań *in vitro*. Dodatkowo krew pobrano do probówek Tempus™ Blood RNA Tubes (Thermo Fisher Scientific, Warszawa, Polska) do analiz genetycznych. Pobieranie próbek krwi miało miejsce w stałych punktach czasowych (T0, T1, T2, T3) w okresie od kwietnia do lipca, w odstępach 5 tygodniowych (+/-3dni).

Punkt czasowy T0 wyznaczał próbę zerową pobraną w spoczynku, przed rozpoczęciem okresu intensywnych treningów, co pokrywało się z rozpoczęciem suplementacji ATX koni w grupie badanej. Z kolei, punkty czasowe T1, T2 i T3 stanowiły kolejno wyznaczone terminy odbycia sesji treningowych, podczas których wykonywano próby wysiłkowe. Badanie krwi podczas próby wysiłkowej wykonywano trzykrotnie: w spoczynku - przed sesją treningową, bezpośrednio po intensywnym galopie i po 40 min odpoczynku w stępie w maszynie treningowej (Ryc. 3). Pomiar stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi miał miejsce niezwłocznie po pobraniu próbki i polegał na naniesieniu kropli krwi z probówki suchej zawierającej krew pełną na pasek diagnostyczny i analizie z wykorzystaniem przenośnych analizatorów paskowych (Accusport Roche, Accu-Check Performa Roche).

Wszystkie próbki po pobraniu oznaczono imieniem konia i numerem kolejnej próby (0 – spoczynkowa, 1 – bezpośrednio po wysiłku, 2- po 40 min restytucji). Próbki do momentu przewiezienia do laboratorium utrzymywano w warunkach chłodniczych, tj. temperaturze 4°C, zaś probówki z EDTA przeznaczone do badań hematologicznych analizowano w ciągu 6h od pobrania.



Ryc. 3 Ogólny schemat doświadczenia. Symbolami T0, T1, T2 i T3 oznaczono kolejne punkty czasowe, w których pobrano próbki krwi do badań. Kolejne pobrania wiążące się z testem wysiugowym opisano cyframi 0 – próba spoczynkowa, 1 – próba pobrana bezpośrednio po wysiugu, 2 – próba pobrana po 40 min restytucji. Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com

### 3.4 Analiza hematologiczna

Parametry hematologiczne: RBC, HGB, HCT, WBC, liczba neutrofilii (ang. neutrophils, NEU), liczba limfocytów (ang. lymphocytes, LYM), liczba monocytów (ang. monocytes, MON), liczba eozynofili (ang. eosinophils, EOS), liczba bazofili (ang. basophils, BAS) i liczba płytek krwi (ang. platelets, PLT) mierzono za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego (Sysmex XN-10, Lincolnshire, IL, USA). Obraz różnicowy leukocytów i morfologię komórek krwi oceniano na wysokiej jakości rozmazach krwi obwodowej barwionych odczynnikami May-Grünwald-Giemsa przy

użyciu mikroskopu świetlnego (Primo Star, Zeiss, Jena, Niemcy) pod powiększeniem 1000×.

### 3.5 Materiały i metody zastosowane w doświadczeniu *in vitro*

Materiałem, z którego izolowano PBMC była krew pełna pobrana do probówek z heparyną, pochodząca od 12 koni z puli zwierząt zakwalifikowanych do badań i opisanych w rozdziale 3.1 niniejszej rozprawy. Komórki jednojądrzaste izolowano przez wirowanie w gradiencie gęstości przez 30 minut przy 400 g, w temperaturze pokojowej (MPW-352R, MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska), przy użyciu Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich / Merck, Poznań, Polska). PBMC zebrano z warstwy buforowej i przemyto trzykrotnie buforowanym roztworem soli fizjologicznej Dulbecco (DPBS, Merck, Poznań, Polska). Komórki hodowano w butelkach o średnicy 25 cm<sup>2</sup> w pożywce RPMI 1640 (Sigma-Aldrich/Merck, Poznań, Polska) uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą (ang. fetal bovine serum, FBS) (Sigma-Aldrich/Merck, Poznań, Polska) i 1% antybiotykiem penicylina-streptomycyna (PS, Biowest). Komórki inkubowano w temperaturze 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, do uzyskania odpowiedniej konfluencji (między 48 a 72h). Pozyskane w ten sposób komórki poddano działaniu nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) w stężeniu 100 μM/ml w pożywce hodowlanej bez FBS, aby wywołać komórkowy stres oksydacyjny i nitrozację, a następnie działaniu astaksantyny w stężeniu 10 μg/ml lub 20 μg/ml przez 24 godziny. Tak przygotowany materiał, aby ocenić akumulację ROS i RNS w PBMC, badano metodą cytometrii przepływowej zgodnie z procedurą opisaną w publikacji „Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy”.

Analizy stężeń białek Il-1β, Il-6, INFγ i TNFα w supernatancie komórkowym dokonano przy użyciu testów immunoenzymatycznych (ang. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

Ocenę wpływu doustnej suplementacji astaksantyną u młodych koni wyścigowych na ekspresję genów związanych z aktywnością mitochondriów w izolowanych PBMC, wykonano metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR). Izolowane PBMC pochodziły z krwi koni grupy kontrolnej i badanej, pobranej w kolejnych punktach czasowych T0, T1-0 i T2-0.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania GraphPad Prism 9 (La Jolla, CA, USA). Szczegółowy opis zastosowanych procedur, technik, odczynników i wykorzystanego sprzętu jest zawarty w rozdziale „Materials and methods” artykułu „Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy”.

### **3.6 Metody oceny statusu oksydacyjnego**

Efekt długotrwałej suplementacji astaksantyną na OS oceniono we krwi koni badanej w czterech punktach czasowych, każdorazowo wykorzystując materiał pochodzący z próby spoczynkowej tj. krwi pozyskanej od zwierząt przed rozpoczęciem intensywnej sesji treningowej (T0, T1-0, T2-0, T3-0). Z kolei, aby ocenić wpływ suplementacji astaksantyną na status oksydacyjny podczas pojedynczej sesji treningowej, analizom poddano krew pochodzącą z kolejnych pobrań podczas testu wysiłkowego wykonanego w maju (punkt czasowy T1), a więc w tym przypadku była to krew pochodząca odpowiednio z prób: T1-1 (bezpośrednio po intensywnym galopie) oraz T1-2 (po okresie 40 minutowej restytucji podczas stępu w maszynie). Oceny statusu oksydacyjnego dokonano w oparciu o analizę aktywności enzymów antyoksydacyjnych i stężenia TAS. Aktywność GPx i SOD oznaczono ilościowo w pełnej krwi, zaś w przypadku GR i CAT oraz stężenia TAS w próbkach osocza. Oznaczenia wykonano przy użyciu dedykowanych zestawów komercyjnych, metodami kolorymetrycznymi lub UV, zgodnie z protokołami producenta. Do oznaczeń ilościowych substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (ang. thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) zastosowano protokół opisany w literaturze Ohkawa (Ohkawa et al., 1979). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu oprogramowania TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA) i IBM SPSS Statistica 29 (IBM Corp., Armonk, NY). Szczegółowy opis zastosowanych metod i procedur znajduje się w rozdziale „Methods” artykułu „The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses - preliminary study”.

### **3.7 Metody oznaczania stężenia wybranych cytokin związanych z zapaleniem i prostaglandyny E**

Wpływ długoterminowej suplementacji astaksantyną na markery stanu zapalnego badano w czterech kolejnych punktach czasowych T0, T1-0, T2-0, T3-0. Stężenia cytokin TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-6, IL-10 i PGE w surowicy oznaczano za pomocą komercyjnych testów immunoenzymatycznych przeznaczonych dla koni zgodnie z protokołami producenta. Analizę statystyczną pozyskanych danych przeprowadzono za pomocą programu TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Szczegółowy opis zastosowanych metod i procedur znajduje się w rozdziale „2. Material and methods” artykułu “Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses”.

### **3.8 Metody zastosowane w celu oceny wpływu suplementacji astaksantyną na wyniki osiągnięte w gonitwach przez konie arabskie w pierwszym roku startów**

Dane dotyczące wyników osiągniętych przez konie podczas wyścigów znajdują się na stronie internetowej Polskiego Toru Wyścigów Konnych (źródło: internet 1) i są ogólnie dostępne. Wszystkie konie biorące udział w badaniach w okresie od kwietnia do lipca brały udział w gonitwach. Biorąc pod uwagę liczbę startów i zwycięstw koni pochodzących z obydwu grup, określono istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami.

## 4. Wyniki

Wszystkie wyniki opublikowano w formie artykułów w czasopismach wymienionych w Journal Citation Reports i stanowią one część dysertacji.

### 4.1 Analiza hematologiczna i zmiany stężenia kwasu mlekowego

Wartości podstawowych parametrów hematologicznych (WBC, RBC, HCT i HGB) w kolejnych punktach czasowych T0, T1-0, T2-0, T3-0 mieściły się w przedziałach referencyjnych i nie różniły się istotnie pomiędzy grupami (Publikacja 3; Tab. 2). W rozmazach krwi poddanych ocenie mikroskopowej nie stwierdzono nieprawidłowości.

W obydwu grupach parametry czerwonych krwinek (RBC, HCT i HGB) i liczba krwinek białych (WBC) wzrosły istotnie po sesji treningowej (odpowiednio  $p \leq 0,001$  i  $p = 0,013$ ) i powróciły do wartości wyjściowej po 40-minutowej restytucji (Publikacja 2; Tab. 2). Wzrost stężenia kwasu mlekowego (LA) we krwi po sesjach treningowych był istotny ( $p = 0,001$ ) i podobny w obydwu grupach ( $p = 0,210$ ).

### 4.2 Ocena wpływu astaksantyny na komórki jednojądrzaste krwi obwodowej koni w warunkach *in vitro*

#### 4.2.1 Ocena wpływu astaksantyny na komórki jednojądrzaste krwi obwodowej koni w warunkach stresu indukowanego $H_2O_2$

1. Indukcja OS za pomocą  $H_2O_2$  wywołała zwiększoną produkcję ROS w PBMC poddanych działaniu utleniacza w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodanie ATX do hodowli w stężeniach 10  $\mu\text{g/ml}$  i 20  $\mu\text{g/ml}$  częściowo przywróciło fenotyp kontrolny. ATX ograniczyła produkcję ROS, choć te zmiany nie były istotne statystycznie. (Publikacja 1; Fig. 1).
2. Analiza ilościowa RNS wskazała, że w pochodzących od koni PBMC nie zwiększyła się produkcja RNS w odpowiedzi na OS wywołany przez  $H_2O_2$ . Dodanie ATX w dawce 20  $\mu\text{M}$  spowodowało wzrost liczby komórek

RNS-dodatnich. W badanych warunkach astaksantyna zwiększa stres nitrozacyjny (Publikacja 1; Fig 2).

3. Ocena ekspresji genów związanych z enzymatycznym układem antyoksydacyjnym wykazała, iż ekspresja żadnego z badanych genów (*SOD1*, *NRF1*, *SOD2*, *CAT*, *NRF2*, *GPx*) nie wzrosła w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ekspresja genów *NRF1*, *SOD2* i *GPx* zwiększyła się pod wpływem astaksantyny (Publikacja 1; Fig. 3).
4. Inkubacja PBMC koni z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zwiększyła stężenie cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) w supernatancie z hodowli komórek. Po dodaniu do hodowli astaksantyny w stężeniu 10  $\mu$ g/ml zaobserwowano obniżenie stężenia INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  w supernatancie (Publikacja 1; Fig.4).

#### **4.2.2 Ocena wpływu astaksantyny na ekspresję wybranych genów związanych z czynnością mitochondriów w PBMC**

1. Doustna suplementacja ATX zwiększyła ekspresję genów *PINK1* i *PARKIN* zaangażowanych w procesy mitofagii (Publikacja 1; Fig. 5 i Fig. 6).
2. Ekspresja genów *MIEF1* i *PIGBOS* związanych z dynamiką błony mitochondrialnej i procesami oddychania mitochondrialnego po suplementacji ATX wzrosła w grupie badanej w kolejnych punktach czasowych (Publikacja 1; Fig.7 i Fig. 8).
3. W PBMC pochodzących od koni z grupy badanej w punkcie czasowym T1-0 nastąpił wzrost ekspresji *NDUFA9* i *PPARGC1B*. Nie obserwowano wzrostu w grupie kontrolnej (Publikacja 1, Fig. 10 i Fig. 11).
4. Ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm mitochondrialnego DNA (ang. mitochondrial deoxyribonucleic acid, mtDNA) takich jak *MRPL24* (ang. mitochondrial ribosomal protein L24), *PUSL1* (ang. pseudouridylate synthase-like 1), *TFAM* (ang. transcription factor A, mitochondrial), *OXA1L* (ang. mitochondrial inner membrane protein OXA1L), *UQCRC2* (ang. ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2) została pobudzona po suplementacji ATX (Publikacja 1, Fig 13, Fig 13, Fig 14, Fig 15, Fig. 16, Fig.17).

### **4.3 Ocena wpływu astaksantyny na zmiany w statusie antyoksydacyjnym u koni w grupach badanej i kontrolnej**

#### **4.3.1 Ocena wpływu trzymiesięcznej suplementacji astaksantyną na zmiany w statusie oksydacyjnym młodych koni wyścigowych czystej krwi arabskiej**

Oznaczenia wykonano w kolejnych punktach czasowych T0, T1, T2 i T3 (Publikacja 2; Fig. 3).

1. Wyjściowe pomiary statusu oksydacyjnego w punkcie czasowym T0 nie różniły się istotnie pomiędzy grupami badaną, a kontrolną.
2. Długoterminowa suplementacja astaksantyną powodowała wzrost stężenia TAS oraz istotny spadek aktywności GR i stężenia TBARS w próbkach krwi pobranych w spoczynku.
3. W grupie badanej TAS w punkcie czasowym T1 wzrósł i był istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ).
4. Aktywność GR nie uległa zmianie w grupie kontrolnej przez cały okres badania, prócz nieistotnego spadku w punkcie czasowym T2. W grupie badanej spadła istotnie ( $p < 0,001$ ) już w punkcie czasowym T1 utrzymując niskie wartości do końca obserwacji.
5. Aktywność GPx w grupie kontrolnej pozostała niezmienną, natomiast w przypadku grupy badanej zmniejszyła się pomiędzy punktem T0, a T1. Różnice te nie były istotne statystycznie. Stwierdzono znaczne różnice pomiędzy osobnikami w obrębie tej samej grupy.
6. Aktywność SOD w grupie kontrolnej pozostała niezmienną, aż do punktu czasowego T3 kiedy to istotnie wzrosła ( $p < 0,001$ ). Wzrostu nie stwierdzono w grupie badanej.
7. Stężenie TBARS w grupie kontrolnej pozostało niezmienną i stwierdzono duże różnice między osobnikami. W grupie badanej stężenie TBARS zmniejszyło się istotnie w punkcie czasowym T1 ( $p < 0,001$ ) i pozostawało niższe do ostatniego oznaczenia.
8. Na aktywność CAT nie miał wpływu ani czas, ani suplementacja astaksantyną (brak istotnych różnic pomiędzy grupami badaną,

a kontrolną). Wartości CAT różniły się znacznie między osobnikami już w punkcie T0.

#### **4.3.2 Ocena zmian w statusie oksydacyjnym pod wpływem suplementacji astaksantyną podczas pojedynczej sesji treningowej w punkcie czasowym T1**

Oznaczenia wykonano w kolejnych punktach T1-0, T1-1 oraz T1-2 (Publikacja 2; Fig. 4).

1. W punkcie T1-0 wartość TAS była istotnie wyższa w grupie badanej ( $p=0,024$ ), następnie wzrosła istotnie w punkcie T1-1 w obydwu grupach ( $p<0,001$ ), po czym w punkcie T1-3 spadła, wciąż pozostając istotnie wyższa w grupie badanej ( $p<0,001$ ).
2. Aktywność GR była istotnie niższa w grupie badanej ( $p<0,001$ ) w punkcie czasowym T1-0. W punkcie T1-1 nastąpił jej wzrost w obydwu grupach, ale pozostawała wciąż istotnie niższa w grupie badanej ( $p=0,002$ ). W punkcie T1-2 aktywność ta spadła do podobnych wartości w obydwu grupach.
3. Aktywność GPx była podobna w obydwu grupach w punkcie T1-0. Istotny jej wzrost stwierdzono w grupie kontrolnej ( $p<0,001$ ) w punkcie czasowym T1-1. W punkcie T1-3 aktywność ta spadła w obydwu grupach do podobnych wartości.
4. Aktywność SOD pozostała niezmienna pod wpływem wysiłku. W punkcie czasowym T1-2 zmniejszyła się istotnie w grupie badanej ( $p=0,007$ ) będąc również istotnie niższa w grupie kontrolnej ( $p<0,001$ ).
5. Stężenie TBARS pozostało niezmiennie w punktach T1-0, T1-1 oraz T1-2 i było istotnie niższe w grupie badanej we wszystkich punktach.
6. Aktywność CAT nie uległa zmianie podczas pojedynczej sesji treningowej oraz była podobna w obydwu grupach.

#### **4.4 Ocena wpływu suplementacji astaksantyną na zmiany w profilu cytokin u koni w grupach badanej i kontrolnej**

1. Stężenia TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10 i PGE nie różniły się istotnie pomiędzy grupami badaną, a kontrolną, a w odniesieniu do TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$  istotny był efekt czasowy (Publikacja 3; Tab. 3).
2. Stężenie TNF $\alpha$  było najwyższe w punkcie czasowym T0, następnie istotnie spadło w punkcie T1 ( $p=0,009$ ) i pozostało istotnie niższe w kolejnych punktach czasowych (Publikacja 3; Fig. 2).
3. Zaobserwowano spadek stężenia IFN $\gamma$ , w kolejnych punktach czasowych, istotnie niższą wartość stwierdzono w punkcie czasowym T3 ( $p=0,006$ ) (Publikacja 3; Fig 2).
4. Zaobserwowano istotne dodatnie korelacje pomiędzy stężeniami TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$  w punkcie czasowym T0, ( $R_{(s)}=0,83$ ,  $p<0,001$ ) i punkcie czasowym T2, ( $R_{(s)}=0,62$ ,  $p=0,018$ ) oraz między stężeniami IL-6 i IL-10 w punkcie czasowym T1 ( $R_{(s)}=0,78$ ,  $p=0,001$ ) i T3 ( $R_{(s)}=0,68$ ,  $p=0,008$ ) (Publikacja 3, Fig. 3).

#### **4.5 Ocena wpływu suplementacji astaksantyną na wyniki osiągnięte w gonitwach przez konie arabskie w pierwszym roku startów**

Wszystkie konie uczestniczące w badaniu brały udział w oficjalnych gonitwach na Torze Wyścigów Konnych Służewiec. Efekt suplementacji ATX na wyniki sportowe koni oceniono na podstawie porównania liczby ukończonych wyścigów i zwycięstw w obu grupach. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą badaną, a kontrolną (Tab. 1) pod względem liczby ukończonych wyścigów i zwycięstw w poszczególnych gonitwach (odpowiednio  $p=0,662$  i  $p=0,855$ ).

Tabela 1. Liczba wyścigów i zwycięstw w grupie koni otrzymujących astaksantynę w grupie badanej oraz grupie kontrolnej w okresie startowym od kwietnia do października

	Grupa badana (n= 6)	Grupa kontrolna (n= 8)	Wartość p
Liczba ukończonych wyścigów			0.662
0	1	2	
1	0	1	
2	1	1	
3	2	1	
4	0	1	
5	0	0	
6	2	2	
Liczba wygranych wyścigów			0.852
0	3	4	
1	2	4	
2	1	0	

## 5. Dyskusja

W niniejszej pracy potwierdzono działanie antyoksydacyjne ATX, stosowanej jako dodatek paszowy u koni arabskich w początkowych miesiącach intensywnego treningu wyścigowego. Działanie przeciwutleniające ATX u koni opisywano wcześniej w literaturze, zarówno w kontekście badań *in vitro* (Mularczyk et al., 2022) jak i *in vivo* (Kawaida et al., 2025; Sato et al., 2015), ale tylko badania Sato et al. (2015) dotyczyły jej zastosowania u koni wyścigowych. Zalecane dawkowanie dostępnych na rynku dodatków paszowych bogatych w ATX, dedykowanych koniom jest bardzo różne. W badaniach Kawaida et al. (2025) i Sato et al. (2015) podawano badanej grupie koni 75 mg astaksantyny dziennie na zwierzę, jednak konie różniły się masą ciała. W badaniach Kawaida et al. (2025) średnia masa ciała koni ( $488,3 \pm 10,6$  kg) była wyższa, niż u koni pełnej krwi badanych przez zespół Sato ( $452,1 \pm 23,8$  kg). Niektórzy producenci dodatków paszowych dla koni zalecają podawanie 12mg ATX na każde 100 kg masy ciała, co dla konia o masie 450 kg odpowiada 54 mg ATX (źródło: internet 2), przy czym w okresie intensywnego wysiłku producent zaleca dwie porcje tego produktu dziennie. Na rynku można również znaleźć preparaty złożone, takie jak FullBucket Medical Muscle Performance Horse (nazwa własna preparatu dla koni) (źródło: internet 3). Preparat ten zawiera wysoką dawkę astaksantyny 833 mg, L-karnitynę 3000mg i 600 IU witaminy E w jednej porcji produktu, ze wskazaniem do podawania jednej porcji dwa

razy dziennie. Tak duża rozbieżność w dawkowaniu zapewne wynika z rezultatów badań prowadzonych na zwierzętach doświadczalnych. W badaniach przeprowadzonych na szczurach potwierdzono, że dawki w przedziale 50 a 200 mg ATX na kilogram masy ciała były dla tego gatunku bezpieczne (Hussein et al., 2007; Shatoor & Al Humayed, 2021). Podawanie astaksantyny szczurom w dawce 1240mg/kg/dzień w czasie 90 dni nie powodowało żadnych efektów niepożądanych, czy też wskazujących na jej toksyczność (Abdelazim et al., 2023). W przypadku doświadczeń przeprowadzanych na psach rasy beagle i kotach, dawkowanie ustalono w przedziale 3-4mg/kg m.c., co odpowiadało średnio 40 mg ATX na psa i 10 mg na kota (Park et al., 2010). Z kolei w badaniu trwającym 6 tygodniu w przypadku psów rasy beagle zastosowano dawkę 0,3mg/kg m.c. (Murai et al., 2019). Do tej pory nie prowadzono żadnych badań związanych z ustaleniem zależnych od dawki działań niepożądanych, czy też toksycznych w przypadku koni. W niniejszym badaniu zdecydowano się na długoterminową suplementację koni preparatem zawierającym ATX w dawce 0,52-0,58 mg/kg m.c., co odpowiada 250 mg astaksantyny na konia. Dawkę wybrano tak, aby zapewnić bezpieczeństwo zwierząt i umożliwić ocenę efektów suplementacji.

Planując model doświadczenia i dobierając konie do badań, kierowano się przede wszystkim maksymalną homogennością grupy. Wybrano zatem zwierzęta tej samej rasy, w tym samym wieku, o maksymalnie zbliżonym poziomie wytrenowania oraz żywione w określony sposób tymi samymi paszami. Plan treningowy był możliwie ujednolicony. Te warunki udało się zachować jedynie w przypadku, kiedy wszystkie objęte badaniem konie znajdowały się pod opieką tego samego trenera. Wszystkie zwierzęta biorące udział w projekcie były klinicznie zdrowe. Na podstawie zmian w obrazie hematologicznym i wzrostów w stężeniach LA we krwi potwierdzono, że każda sesja treningowa podczas której pobierano próby do badań, stanowiła dla zwierząt wymagany do postępu treningowego wysiłek. Spadki wartości LA po 40 minutowym okresie restytucji potwierdzały, że sesja treningowa nie przekraczała możliwości wysiłkowych koni.

Ocena wpływu ATX na stres oksydacyjny w PBMC potwierdziła jej potencjał ochronny i przeciwzapalny. Wywołanie stresu oksydacyjnego w PBMC w warunkach *in vitro* poprzez zastosowanie roztworu nadtlenu wodoru, znacząco zwiększyło liczbę komórek ROS-dodatnich, a dodanie ATX w kolejnych rosnących stężeniach pozwoliło częściowo przywrócić pierwotny fenotyp, zwiększając liczbę komórek ROS-ujemnych.

Chociaż zmiany te nie były istotne statystycznie to wykazano tendencję do antyoksydacyjnego działania ATX, co jest zbieżne z wcześniejszymi badaniami dotyczącymi jej zdolności do zmiatania wolnych rodników i zmniejszania uszkodzeń oksydacyjnych w różnych typach komórek (Ambati et al., 2014; Bourebaba et al., 2023).

Wyniki badania dotyczącego wpływu astaksantyny na ochronę przed stresem nitrozacyjnym zachodzącym w PBMC były ciekawe i nieoczywiste. W warunkach przeprowadzonego doświadczenia ATX zwiększyła poziom komórkowych RNS. Wskazuje to na złożoną interakcję pomiędzy ATX, a szlakami stresu nitrozacyjnego, co może wiązać się z mechanizmami sprzężenia zwrotnego pomiędzy łagodzeniem OS, a modulacją stresu nitrozacyjnego (Peng et al., 2019) i wymaga dalszych badań.

Wyniki sugerują, że astaksantyna pobudza wzrost ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, takie jak SOD2 i GPx, oraz genów regulujących czynność mitochondriów, na przykład *NRF1*. Oznacza to, że odgrywa ona rolę w przygotowaniu komórek na stres oksydacyjny na poziomie genetycznym. Potwierdzają to inne badania, w których zaobserwowano zwiększenie ekspresji genów i aktywności enzymów antyoksydacyjnych po doustnym podaniu astaksantyny u myszy (Li et al., 2025; Ni et al., 2018). Eksperymenty *in vitro* wykazały przeciwzapalny potencjał ATX w warunkach stresu oksydacyjnego. W hodowli PBMC po dodaniu nadtlenu wodoru, zaobserwowano wzrost wydzielania cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$ . Zauważono również, że stężenie tych cytokin w supernatancie zmniejsza się w zależności od dawki ATX. Stres oksydacyjny aktywuje szlaki zapalne, co jest dobrze znanym zjawiskiem, natomiast działanie przeciwzapalne astaksantyny opiera się na przerwaniu sprzężeń zwrotnych między stresem oksydacyjnym a reakcją zapalną (Chang & Xiong, 2020; Kohandel et al., 2022; Pereira et al., 2020). W wyżej wymienionych publikacjach pokazano, że głównym mechanizmem działania astaksantyny jest tłumienie szlaków NF- $\kappa$ B. Fakt ten, jak i jej rola w ochronie komórek nabłonka siatkówki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i reakcjami zapalnymi zostały potwierdzone przez zespół badawczy Kim & Kim (2018), co jednocześnie wskazuje na potencjał terapeutyczny astaksantyny w stanach zapalnych siatkówki (Kim & Kim, 2018).

Wpływ doustnej suplementacji ATX na PBMC pochodzące od koni z grupy kontrolnej i badanej oceniono poprzez analizę ekspresji genów związanych z mitofagią i regulacją czynności mitochondriów.

Potwierdzono zwiększoną ekspresję genów *PINK1* i *PARKIN* zaangażowanych w procesy mitofagii w przypadku PBMC pochodzących od koni suplementowanych astaksantyną. Wskazuje to na wzmocnione mechanizmy kontroli jakości mitochondriów, ponieważ mitofagia będąca selektywną degradacją uszkodzonych mitochondriów przez autofagię, ma kluczowe znaczenia dla zachowania homeostazy komórkowej. Badania nad mitofagią mogą opierać się na analizie ekspresji genów, co zapewnia wgląd w mechanizmy regulujące ten proces (Tian et al., 2025; Z. Wang et al., 2023) lub/i na ocenie wizualnej za pomocą technik transmisyjnej mikroskopii elektronowej (Kiessling et al., 2025). Mitofagia jest szczególnie istotna w kontekście adaptacji do wysiłku (Drake et al., 2016; Quadrilatero et al., 2025), gdyż pomaga utrzymać optymalne funkcje miocytów i produkcję energii przy wysokich wymaganiach metabolicznych związanych z intensywną aktywnością fizyczną. Przekłada się to na postępy w procesie treningowym, a więc poprawę wydolności i wytrzymałości wysiłkowej. Promowanie mitofagii poprzez wzrost ekspresji genów *PINK1* i *PARKIN* opisano już wcześniej, chociażby w badaniach nad negatywnymi skutkami OS w tkance mięśniowej gładkiej w przypadku nadciśnienia tętniczego u szczurów (Chen et al., 2020). Ostatnie doniesienia naukowe udowadniają, że ATX również promuje biogenezę mitochondrialną (Li et al., 2025). Jest więc substancją wykazującą silny wpływ na najważniejsze procesy zachodzące w mitochondriach.

W doświadczeniu opisywanym w niniejszej pracy wykazano, że w wyniku długotrwałej suplementacji ATX zwiększyła się ekspresja genów związanych z dynamiką mitochondriów (*MIEF1*, *PIGBOS*) i metabolizmem energetycznym. Gen *MIEF1* koduje białko zewnętrznej błony mitochondrialnej, uczestniczące w dynamice błony poprzez regulację rozszczepień i fuzji mitochondriów (Yu et al., 2021), a jego niedobór upośledza oddychanie mitochondrialne prowadząc do mitochondrialnego OS (Xian & Liou, 2019). W PBMC pochodzących od koni wyścigowych badanych w niniejszej pracy, początkowo (punkt czasowy T0) ekspresja tego genu była niższa w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej, jednak po suplementacji ATX wzrosła w kolejnych punktach czasowych T1 i T2. Podobne zmiany obserwowano w ekspresji genu *PIGBOS*, mającego wpływ na prawidłowe funkcjonowanie zewnętrznej błony mitochondrialnej (Chu et al., 2019). Różnice w ekspresji tego genu stwierdzono w punkcie czasowym T1, ale nie obserwowano jej w kolejnych punktach. Być może różnice w ekspresji określonych genów w punktach czasowych T1 i T2 związane są z procesami

adaptacyjnymi jakie zachodzą w organizmie konia w trakcie okresu treningowego, a nie z suplementacją ATX.

W celu oceny wpływu suplementacji ATX na ekspresję genów zaangażowanych w procesy energetyczne komórki, przeanalizowano geny związane z mitochondrialną produkcją ATP (ang. adenosine triphosphate, adenozyntrifosforan) w mitochondriach. Białka PPARGC1A i PPARGC1B są transkrypcyjnymi koaktywatorami nadrodziny PPAR (ang. peroxisome proliferator-activated receptor) o wysokiej ekspresji w komórkach zwierzęcych, opierających swój metabolizm na fosforylacji oksydacyjnej i utlenianiu kwasów tłuszczowych (Chen et al., 2022; Rius-Pérez et al., 2020). PPARGC1A jest aktywnie zaangażowane w neutralizację ROS poprzez regulację ekspresji mitochondrialnych genów antyoksydacyjnych, zaś PPARGC1B specyficznie zwiększa profil anaboliczny i aktywność mitochondriów poprzez wpływ na ich funkcje energetyczne i ochronę przed OS. Genetyczna analiza PBMC wyizolowanych od koni biorących udział w doświadczeniu wykazała, że podstawowa ekspresja *PPARGC1A* była podobna w grupie badanej i kontrolnej, a suplementacja ATX nie miała na nią wpływu. W przypadku ekspresji *PPARGC1B*, zaobserwowano jej wzrost w stosunku do grupy kontrolnej widoczny już po 5 tygodniach suplementacji (punkt czasowy T1). Ponadto w grupie zwierząt przyjmujących astaksantynę stwierdzono zwiększenie ekspresji *NDUFA9*, genu odgrywającego rolę w procesach fosforylacji oksydacyjnej. Zarówno gen *PPARGC1B*, jak i *NDUFA9* odgrywają rolę w mechanizmach odpowiadających za bioenergetykę mitochondriów. Zwiększona ekspresja tych genów zgodnie z obecnym stanem wiedzy (Liu et al., 2014) poprawia dynamikę mitochondriów oraz ich metabolizm energetyczny, co wiąże się ze zmniejszonym OS i lepszą homeostazą komórkową. Wyniki niniejszej pracy wykazały, że ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm mitochondrialnego DNA (mt DNA) biorących udział w procesach translacji, transkrypcji i replikacji (Busch et al., 2019; Di Nottia et al., 2020; Ngo et al., 2014) jest pobudzana *in vivo* po suplementacji ATX. Ma to znaczenie w kontekście zdrowia i prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Badania (Thompson et al., 2018) wskazują, że brak lub deficyt białek z tej grupy może powodować pierwotne zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, a więc mieć realny wpływ na zjawisko OS, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzeń mitochondrium.

Wszystkie przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań *in vitro*, jasno wskazywały pozytywny wpływ astaksantyny na wzrost ekspresji genów związanych

z czynnością mitochondriów, zachowaniem równowagi redoks, działaniem antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym.

Główny komórkowy mechanizm ochronny przed negatywnymi skutkami OS stanowi antyoksydacyjny status enzymatyczny. To właśnie enzymy są w największym stopniu odpowiedzialne za usuwanie wolnych rodników, co z kolei zapobiega peroksydacji lipidów, a w konsekwencji uszkodzeniom komórek i indukcji odpowiedzi zapalnej. Zaproponowane dotychczas modele badań nad pomiarami OS wywołanego wysiłkiem u koni obejmowały głównie ocenę zmian w aktywności enzymów antyoksydacyjnych i poziomie markerów peroksydacji lipidów, zmian potencjału antyoksydacyjnego oraz obecność ROS w komórkach (Arfuso et al., 2022). Materiałem badawczym, służącym do analizy tych wskaźników najczęściej była krew lub/i bioptat mięśnia szkieletowego. Ocena stopnia uszkodzeń tkanki mięśniowej opierająca się jedynie na aktywności specyficznych enzymów mięśniowych we krwi (Brkljača Bottegaro et al., 2018; Mami et al., 2019) nie wskazuje wprost na przyczynę uszkodzenia tkanki mięśniowej i należy traktować ją pomocniczo.

W niniejszej pracy wpływ suplementacji astaksantyną na status antyoksydacyjny wyścigowych koni arabskich oceniono poprzez zmiany wartości TAS, aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych i stopnia peroksydacji lipidów. Ten ostatni zbadano za pomocą testu TBARS, wykorzystującego kwas tiobarbiturowy. Przyjęty schemat badania (Ryc. 3), pozwolił zarówno na określenie zmian w wyniku pojedynczej sesji treningowej jak i procesu treningowego. Po raz pierwszy wykonano takie badania w długim czasie (15 tygodni), co umożliwiło określenie związanych z wysiłkiem zmian w statusie antyoksydacyjnym u młodych koni arabskich rozpoczynających trening wyścigowy (grupa kontrolna) oraz na ocenę efektu suplementacji astaksantyną (grupa badana). Należy podkreślić, że dotychczas badania nad statusem antyoksydacyjnym w przypadku koni arabskich dotyczyły wysiłku wytrzymałościowego, a więc o charakterze tlenowym. Efekty suplementacji ATX u koni innych ras w aktywnym treningu były dotychczas opisane w literaturze przez dwa zespoły badawcze. Zespół Sato (2015) badał wpływ suplementacji ATX i L-karnityną na uszkodzenia tkanki mięśniowej wywołane intensywnym treningiem u koni wyścigowych pełnej krwi angielskiej. Badacze analizowali jedynie zmiany w aktywności enzymów mięśniowych takich jak CK i LDH-5 we krwi (Sato et al., 2015). Nie można zatem wyników ich badań wiązać bezpośrednio z uszkodzeniami wolnorodnikowymi tkanki mięśniowej, gdyż zabrakło tam specyficznych markerów stresu oksydacyjnego. Badania Kawaida et. al. (2025) dotyczyły

wpływu ATX na stan oksydacyjny mięśni szkieletowych i zmiany w statusie oksydacyjnym w okresach roztrenowania i wdrażania do treningu u koni polo. Wykorzystywano do tego celu pobrane od zwierząt biopaty mięśni szkieletowych i krew, a dodatkowo analizowano wyniki standaryzowanych testów wysiłkowych. Model badania zaprezentowany przez Kawaida et al. (2025) jest bardziej zbliżony do metodyki zastosowanej w niniejszej pracy, jednak dotyczy innej grupy koni i innego rodzaju treningu. Niniejsze badanie jest pierwszym określającym status antyoksydacyjny u koni czystej krwi arabskiej użytkowanych wyścigowo, czyli poddawanych wysiłkowi o charakterze beztlenowym.

Całkowity status antyoksydacyjny (TAS) obrazuje całkowitą pojemność antyoksydacyjną i wyraża zdolność organizmu do obrony przed wolnymi rodnikami. Parametr ten dostarcza informacji o wszystkich przeciwutleniaczach w organizmie, obejmując również te nierozpoznane lub trudne do zmierzenia (Srinivasa Rao et al., 2015). W piątym tygodniu suplementacji astaksantyną, a więc w punkcie czasowym T1 stwierdzono wzrost stężenia TAS o 31,5% w stosunku do pomiarów T0, a różnice pomiędzy grupą badaną, a kontrolną były istotne. Wraz ze wzrostem TAS zaobserwowano wyraźny, bo aż 34,5% spadek stężenia TBARS pomiędzy kolejnymi punktami czasowymi T0 i T1, również z istotnymi różnicami pomiędzy grupą badaną, a kontrolną. Wyższe wartości TAS wraz z niższym TBARS w grupie badanej wskazały na zwiększone możliwości usuwania wolnych rodników tlenowych i zmniejszony poziom peroksydacji lipidów, a więc na korzystny wpływ ATX w kontekście zmniejszania OS. Zmiany te w przypadku TAS były istotne w punkcie czasowym T1, jednak zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej zaobserwowano tendencję do wzrostu TAS w ciągu kolejnych miesięcy badania, z wartościami wyższymi w grupie koni otrzymujących astaksantynę. W przypadku TBARS w punkcie czasowym T1 jego stężenie było istotnie niższe u koni w grupie badanej i takie też pozostało do końca obserwacji. Tak wyraźne zmiany nie były wcześniej opisywane w literaturze dotyczącej przeciwutleniających dodatków paszowych u koni, czego przykładem jest brak zmian w wartościach TAS po 2-tygodniowym okresie suplementacji witaminą E lub w połączeniu z koenzymem Q<sub>10</sub> w przypadku koni rekreacyjnych (Nemec Svete et al., 2021). Warto zaznaczyć, że dodatkowo na obraz zmian wyżej wymienionych parametrów, nakładał się efekt adaptacji organizmu do wysiłku związany z treningiem wyścigowym (Tahmasebi et al., 2022; Williams, 2016). Kawaida et al. (2025) stwierdzili, że na zmiany w statusie oksydacyjnym w badanych biopatach mięśnia pólścięgnistego większy wpływ miał trening niż

podawanie astaksantyny, a zmiany adaptacyjne postępują niezależnie od suplementacji. Jest to zbieżne z faktem, że w niniejszym badaniu największe różnice stwierdzono pomiędzy kolejnymi punktami czasowymi T0 oraz T1, a mniejsze w kolejnych pomiarach, kiedy efekt treningu w adaptacji do wysiłku był już znaczący.

Pod wpływem suplementacji ATX w początkowym okresie intensywnego treningu wyścigowego, wystąpiły zmiany w antyoksydacyjnym statusie enzymatycznym. Aktywność GR w punkcie czasowym T1 spadła istotnie, aż o 45,4% w grupie badanej i pozostała niższa niż w grupie kontrolnej do końca obserwacji. Aktywność GPx, SOD i CAT, również była niższa u koni suplementowanych astaksantyną, jednak różnice nie były istotne. Z danych literaturowych wiadomo o różnych wzorcach zmian aktywności antyoksydacyjnej w odpowiedzi na suplementację antyoksydantami, w których wzrost aktywności enzymu antyoksydacyjnego interpretowano jako zjawisko korzystne (de Moffarts et al., 2005). Stwierdzony wzrost aktywności SOD w punkcie czasowym T3, ale tylko w grupie kontrolnej, można tłumaczyć faktem, że anionorodnik nadadtlenkowy neutralizowany przez SOD był wytwarzany w znacznie mniejszej ilości we wczesnym etapie treningu. W wyniku aktywacji mechanizmów łańcucha oddechowego w odpowiedzi na zwiększone zapotrzebowanie energetyczne mięśni, wraz z intensyfikacją wysiłku wzrasta produkcja anionorodnika nadadtlenkowego, co zwiększa aktywność SOD szczególnie w przypadku wysiłku wytrzymałościowego (Xie et al., 2025). Z kolei badania przeprowadzone u ludzi wykazały, że trening rozumiany jako powtarzająca się ekspozycja na zwiększone poziomy ROS, prowadzi do regulacji obrony antyoksydacyjnej, w tym zwiększenia aktywności SOD i GPx w spoczynku (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009; Miyazaki et al., 2001). W przypadku treningu koni wyścigowych obserwacje te częściowo potwierdziły się. Obserwowane zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych u koni, były słabiej wyrażone niż w przypadku ludzi, co może tłumaczyć fakt, że prawidłowe obciążenia treningowe u koni są niższe niż te stosowane u ludzi.

Wykazano, że aktywność CAT w grupie kontrolnej i badanej przez cały okres obserwacji była podobna (Publikacja 2, Fig. 3). Zapewne ma to związek z przemianami anionorodnika nadadtlenkowego, który to w wyniku redukcji przechodzi w nadttlenek wodoru, rozkładany przez CAT. Jeżeli anionorodnik nadadtlenkowy zostanie zneutralizowany we wcześniejszym etapie, albo nie będzie powstawać, ilość powstającego nadttlenku wodoru może być znacznie mniejsza (Nandi A. et al., 2019). W takich warunkach aktywność CAT pozostanie niska. Przedstawione wyniki świadczą

o wydolności enzymatycznego układu redoks na wcześniejszych etapach i pośrednio o odpowiednio prowadzonym, racjonalnym treningu, niewykraczającym poza możliwości adaptacyjne koni. Mniejszą aktywność CAT stwierdzono w grupie badanej już w punkcie T0, a różnica była podobna w kolejnych punktach czasowych. W piśmiennictwie donosi się, że aktywność katalazy zmienia się u koni sezonowo i w zależności od płci (Kurhaluk et al., 2024). W badaniach Kurhaluk et al. (2024) stwierdzono, że u klaczy jej aktywność wzrasta wiosną, latem i jesienią. Z kolei u ogierów aktywność katalazy była wyższa niż u klaczy i podobna we wszystkich porach roku. W badaniu będącym podstawą niniejszej dysertacji nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami ze względu na płeć koni.

Projekt badania zakładał możliwość oceny zmian parametrów antyoksydacyjnych również podczas pojedynczej sesji treningowej (Ryc. 3). Wybór majowej sesji (punkt T1) był podyktowany istotnymi różnicami w spoczynkowych wartościach badanych parametrów antyoksydacyjnych. Konie w punkcie czasowym T1 trenowały już z wysoką intensywnością, ale wciąż był to początek sezonu startowego, w związku z czym adaptacja mięśni do wysiłku nie była jeszcze pełna.

Po pojedynczej sesji treningowej zaobserwowano istotny wzrost TAS bezpośrednio po wysiłku, w oznaczeniu T1-1 u wszystkich koni niezależnie od suplementacji, co wskazuje na aktywację mechanizmów obrony antyoksydacyjnej. Wartości TAS, były istotnie wyższe w punktach T1-0 i T1-2 (odpowiednio pomiar spoczynkowy i po 40-minutowej restytucji) w grupie koni suplementowanych ATX, jednak względny przyrost tych wartości w efekcie wzmożonej aktywności fizycznej był niższy u koni z grupy badanej. Ta obserwacja świadczy o lepszych możliwościach unieszkodliwiania wolnych rodników w przypadku koni przyjmujących ATX. Taką interpretację potwierdzają też wyniki badań *in vitro* niniejszej pracy. We wcześniejszych badaniach stwierdzono, że zmiany statusie antyoksydacyjnym koni w odpowiedzi na wysiłek zależą od jego intensywności (Mami et al., 2019; Ott et al., 2022), jednak w doświadczeniu własnym autora stopień obciążeń u koni w grupie badanej i kontrolnej był jednakowy. W tym przypadku to ATX stanowiła dodatkowy nieenzymatyczny mechanizm antyoksydacyjny, wpływając na zmiany wartości statusu antyoksydacyjnego i różnice pomiędzy grupami.

Zarówno aktywność GPx, jak i GR zwiększała się bezpośrednio po sesji treningowej i zmniejszała się po 40-minutowej restytucji, jednakże tylko wzrost aktywności GPx w grupie kontrolnej był istotny. Pomimo braku istotności statystycznej,

obserwowane wzrosty mogą wskazywać na kompensację zwiększonej produkcji ROS związanej z intensywnym wysiłkiem. Mniejszą aktywność GPx i GR w grupie badanej, podobnie jak większą wartość TAS w tej grupie, można tłumaczyć mniejszą ilością ROS, jakie musiały zostać zneutralizowane przez te enzymy. Wskazuje to na poprawę statusu antyoksydacyjnego wynikającą z obecności dodatkowego przeciwutleniacza (ATX) w układzie antyoksydacyjnym. W grupie badanej aktywność SOD istotnie spadała w punkcie T1-3 pojedynczej sesji treningowej. Może mieć to związek z odpowiedzią na zadany wysiłek i neutralizacją anionorodnika ponadtlenkowego na wcześniejszym etapie, czyli bezpośrednim działaniem antyoksydacyjnym ATX, co sugeruje również Kawaida et al. (2025). W przypadku ich badań aktywność SOD w osoczu po standaryzowanym teście wysiłkowym była niższa u koni w grupie suplementowanej ATX. Sugerują oni, że ATX może bezpośrednio wychwycić i zneutralizować pewną ilość anionorodnika ponadtlenkowego, zmniejszając aktywność SOD.

U koni otrzymujących ATX neutralizacja wolnych rodników wydaje się wydajniejsza, szczególnie po pierwszym miesiącu suplementacji i intensywnego treningu. Dla porównania, istotny wzrost aktywności wszystkich enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, GR, CAT) stwierdzono u koni arabskich po 30-kilometrowej sesji treningowej, przy czym efekt ten w badaniu Adah et al. (2023) znacznie wzmacniała suplementacja ergotaminą (Adah et al., 2023). Porównanie to wskazuje na różnice w zaangażowaniu systemu antyoksydacyjnego w obronę przed uszkodzeniami wolnorodnikowymi w przypadku treningu beztlenowego (wyścigowego), a tlenowego (wytrzymałościowego) u koni czystej krwi arabskiej. Adaptacja organizmu do wysiłku wymaga zachwiania równowagi redoks (Miyazaki et al., 2001) w stopniu niewywołującym nadmiernych zaburzeń homeostazy prowadzących do odpowiedzi zapalnej. Dobór dawki przeciwutleniacza stosowanego jako substancji ograniczającej negatywne skutki OS, powinien jedynie w nieznacznym stopniu hamować uwalnianie ROS. W przeciwnym wypadku nie będzie możliwa właściwa stymulacja enzymatycznego układu antyoksydacyjnego, czego efektem może być osłabienie zdolności adaptacyjnych organizmu pomimo regularnych treningów (Peternelj et al., 2011). W oparciu o przedstawione w niniejszej pracy wyniki można stwierdzić, że dawka astaksantyny dobrana do badania spełniła te założenia.

Doświadczenie *in vitro* przeprowadzone w trakcie niniejszej pracy na PBMC wykazało przeciwzapalny potencjał astaksantyny. W hodowli PBMC traktowanej nadtlakiem wodoru doszło do zwiększenia stężeń cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$  wskazując na pobudzenie odpowiedzi typowej dla zapalenia w warunkach

OS, a następnie na zahamowaniu tej odpowiedzi poprzez zastosowanie astaksantyny. Wyniki te były obiecujące, ponieważ wskazywały na możliwość łagodzenia przez ATX również odpowiedzi zapalnej pobudzanej przez uszkodzenia wolnorodnikowe w warunkach *in vivo*. Chociaż powszechnie przyjmuje się, że intensywny i długotrwały wysiłek wyzwała odpowiedź zapalną, to w większość przypadków nie dochodzi do rozwinięcia się zmian klinicznych dzięki licznym mechanizmom hamującym rozwój zapalenia podczas treningu. Charakter tych mechanizmów nie jest w pełni poznany i różni się w zależności od rodzaju treningu (Moldoveanu et al., 2012). Dane literaturowe wskazują, że astaksantyna wywiera działanie przeciwzapalne poprzez supresję czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, co prowadzi do obniżenia stężeń cytokin zapalnych, takich jak IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF $\alpha$  (Chang et al., 2020; Lee et al., 2003, Pereira et al., 2020). Jest to zgodne z opisanymi wcześniej wynikami badań *in vitro*, nie znalazło jednak potwierdzenia *in vivo*. Stężenia TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10 i PGE nie różniły się istotnie pomiędzy grupami badaną, a kontrolną przez cały okres badania. Wykazano natomiast zależny od czasu spadek stężeń TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$  w obydwu grupach w punkcie czasowym T1. Wskazuje to na naturalną modulację odpowiedzi zapalnej z przesunięciem w kierunku stanu przeciwzapalnego, spowodowaną treningiem, czego nie należy raczej wiązać z suplementacją ATX, a naturalną odpowiedzią na trening wyścigowy u koni.

Bezpośredni wpływ astaksantyny na zmiany w stężeniach cytokin zapalnych w warunkach *in vivo* jest jak dotąd bardzo słabo opisany w literaturze (Ma et al., 2022), częściej stosowano modele *in vitro*. W badaniach analizujących wpływ ATX na zmiany w profilu cytokin prozapalnych u pacjentów najczęściej stwierdzano zmiany stężeń TNF $\alpha$  i IL-6. Takich wyników dostarczyły badania dotyczące endometriozy u kobiet (Rostami et al., 2023), czy suplementacji u pacjentów z cukrzycą typu II (Shokri-mashhadi et al., 2021). W obydwu wymienionych badaniach okres podawania ATX wynosił odpowiednio 8- i 12 tygodni, co wskazuje, że zastosowany w niniejszym badaniu ponad 15 tygodniowy czas suplementacji ATX jest wystarczająco długi, aby ocenić jego efekt. Doświadczenia na modelu *in vivo* u gryzoni pozwalają ocenić wpływ astaksantyny na zmiany w stężeniach cytokin zapalnych, jednak nie dotyczyły one OS związanego z wysiłkiem (Xu, et al., 2017). Działanie antyoksydacyjne ATX w kontekście wysiłkowego OS badano u biegaczy wytrzymałościowych (biegi długodystansowe) (Nieman et al., 2023) podczas 4-tygodniowej suplementacji. Nie potwierdzono wpływu tego karotenoidu na stężenia IL-6, IL-8, IL-10, białka chemotaktycznego monocytów 1 (ang. monocyte chemoattractant protein-, MCP-1), czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (ang. granulocyte colony-stimulating factor, GCSF) i IL-1 we krwi

sportowców w spoczynku i po blisko dwu i półgodzinnym biegu z wysoką intensywnością (Nieman et al., 2023). Autorzy opisanego powyżej badania sugerują, że suplementacja ATX przeciwdziałała spadkom stężenia immunoglobulin w osoczu i dlatego wywiera korzystny wpływ na układ odpornościowy biegaczy. Niestety, ze względu na odmienne wzorce odpowiedzi zapalnej wywołanej wysiłkiem u ludzi i koni, nie można takich wniosków ekstrapolować na konie. W przypadku koni indukowane wysiłkiem zmiany w stężeniach cytokin należy rozpatrywać dwójako. Z jednej strony następuje indukowany wysiłkiem wzrost stężeń cytokin typu I (typowych dla odpowiedzi ostrej fazy) jak IL-6. Z drugiej strony, generowana jest odpowiedź przeciwzapalna związana z równoczesnym uwalnianiem cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10, hamującej uwalnianie IL-6. Wzrost stężenia przeciwzapalnej IL-10 po wysiłku może być nawet 10-krotny i wydaje się być zależny od rodzaju wysiłku (Cywińska et al., 2014). Schemat takiej odpowiedzi opisano u zaawansowanych treningowo koni arabskich po pokonaniu dystansów 120 i 160 km (Cywińska et al., 2014). U koni rajdowych stan przeciwzapalny pojawia się już po 3 miesiącach regularnych treningów i wyraża się spadkiem stężeń cytokin typu I (TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ), a dopiero miesiąc później obserwowano obniżenie stężenia IL-6 we krwi (Witkowska et al. 2019). Dla koni wyścigowych, poddawanych innemu typowi wysiłku, ze względu na rodzaj przemian energetycznych, wzorce stanu przeciwzapalnego wywołanego treningiem są odmienne. Badano je przede wszystkim w oparciu o analizę ekspresji genów cytokin zapalnych (Horohov et al., 2012; Page et al., 2017), a nie na określeniu ich stężeń we krwi. W przypadku 2-letnich koni pełnej krwi angielskiej (Horohov et al., 2012) trening skutkowało ogólnym spadkiem ekspresji genów cytokin prozapalnych, co objawiało się obniżeniem ekspresji mRNA (ang. messenger RNA – matrycowe RNA) dla TNF $\alpha$  oraz tendencją spadkową w ekspresji mRNA dla IL-1 $\beta$ . Dowiedziono również, że takie spadki były bardziej wyraźne u koni otrzymujących suplementację przeciwutleniaczami, w tym *Boswellia serrata*, której działanie przeciwzapalne jest podobnie jak ATX związane z hamowaniem czynnika jądrowego NK- $\kappa$ B (Page et al., 2017). Możliwe, że efekt przeciwzapalny suplementacji przeciwutleniaczami u koni w regularnym treningu jest niewielki i można go wykryć jedynie na etapie zmian w ekspresji poszczególnych genów, a nie na podstawie oznaczania zmian w stężeniach cytokin we krwi. Należy pamiętać, że poziom cytokin zapalnych w organizmie stanowi sumę produkcji tych białek przez leukocyty, miocyty i inne komórki (Lamprecht et al., 2008; Liburt et al., 2010). Nie można wykluczyć, że działanie przeciwzapalne ATX w przedstawionym badaniu w warunkach *in vivo*

mogłoby wystąpić, jeżeli doszłoby do rozwoju stanu zapalnego, jednak wszystkie zwierzęta biorące udział w badaniu nie wykazywały żadnych objawów, nie stwierdzono u nich również zmian hematologicznych mogących świadczyć o jakiegokolwiek patologii. Mechanizmy warunkujące odpowiedź zapalną wywołaną wysiłkiem fizycznym u koni są wielowymiarowe i zależą m. in. od rodzaju treningu i rasy. Zagadnienia dotyczące przeciwzapalnego działania astaksantyny na zmiany w profilu cytokin zapalnych są do tej pory bardzo słabo poznane, a biorąc pod uwagę grupę koni wybranych do badań, uzyskane w niniejszej pracy wyniki są unikatowe i mogą stanowić punkt odniesienia dla kolejnych badań.

Całkowity czas suplementacji ATX u koni w grupie badanej trwał łącznie 6 miesięcy (do końca sezonu startowego). W trakcie tego okresu wszystkie konie biorące udział w niniejszym badaniu brały udział w gonitwach na dystansach od 1400m do 2200m. Niektóre zwierzęta w trakcie sezonu startowego ścigały się kilkukrotnie, stąd też liczba wszystkich startów koni grupy badanej wynosiła 20, zaś grupy kontrolnej 22. Liczba ukończonych wyścigów oraz liczba zwycięstw nie różniła się istotnie pomiędzy grupami.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że suplementacja ATX nie wpłynęła na osiągnięcia sportowe koni. Ocena tę należy jednak traktować ostrożnie, gdyż o sukcesie w gonitwie decyduje wiele różnych czynników np. środowiskowych i innych niezwiązanych z kondycją konia. W tym przypadku powinno się uwzględnić nie tylko liczbę zwycięstw, ale i szereg zmiennych takich jak: zajmowane miejsce, liczbę wszystkich koni startujących w danej gonitwie, czas w jakim zwierzę pokonało dystans, stopień elastyczności toru wyścigowego i warunki atmosferyczne w dniu gonitwy, liczbę startów danego konia w danym sezonie. Wszystkie dane mogące wpływać na wyniki gonitwy są archiwizowane przez Polski Tor Wyścigów Konnych i dostępne do informacji publicznej, ale by ująć je w badaniu konieczny byłby model statystyczny wymagający większej grupy zwierząt. Wyodrębnienie większej homogenicznej grupy koni wyścigowych jest dużym wyzwaniem. W rozdziale wprowadzającym omówiono metodykę treningu młodych koni wyścigowych oraz znaczenie roli trenera w tym procesie. W związku z powyższym istnieją duże różnice w warunkach utrzymania, metodach treningowych oraz sposobie żywienia pomiędzy stajniami wyścigowymi. Dotychczas nie przeprowadzono podobnego badania i brak jest danych literaturowych na ten temat, tak więc zaprojektowanie takiego modelu doświadczenia i jego realizacja mogłaby dostarczyć interesujących i cennych wyników.

## 6. Podsumowanie i wnioski

W pracy oceniano wpływ suplementacji astaksantyną (ATX) na status antyoksydacyjny, zmiany stężeń cytokin zapalnych oraz funkcje mitochondriów u koni czystej krwi arabskiej w początkowej fazie treningu wyścigowego. Badania przeprowadzono w układzie dwutorowym: *in vitro* na izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz *in vivo*. Zbadano homogeną grupę 14 koni arabskich. Sześciu koniom podawano w ciągu 15 tyg. ATX w dawce 0,52-0,58 mg/ kg m c dziennie.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Astaksantyna w hodowli izolowanych od koni arabskich PBMC, poddanych *in vitro* stresowi oksydacyjnemu wywiera efekt antyoksydacyjny poprzez ograniczenie produkcji reaktywnych form tlenu, zwiększenie ekspresji genów enzymów antyoksydacyjnych i związanych z procesem oddychania komórkowego (*SOD1*, *NRF1*, *SOD2*, *CAT*, *NRF2*, *GPx*) oraz zmniejszenie uwalnianie cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) przez PBMC.
2. Doustna suplementacja astaksantyną u młodych koni arabskich działa ochronnie poprzez pobudzenie ekspresji genów odpowiedzialnych za regulację dynamiki mitochondrialnej (*MIEF1*, *PIGBOS*, *NDUFA9*, *PPARGC1B*, *MRPL24*, *PULS1*, *TFAM*, *OXAIL*, *UQCRC2*) i mitofagię (*PINK1* i *PARKIN*).
3. Doustna suplementacja astaksantyną u młodych koni arabskich rozpoczynających trening wyścigowy stanowi skuteczne wsparcie nieenzymatycznej obrony antyoksydacyjnej. Już po miesiącu suplementacji łagodzi skutki stresu oksydacyjnego związanego z treningiem nie zaburzając przy tym wpływu produkcji wolnych rodników na adaptację do wysiłku i postępy treningowe.
4. W początkowym etapie treningu wyścigowego u młodych koni arabskich odpowiedź zapalna jest hamowana, co potwierdza spadek stężenia TNF $\alpha$  we krwi już po pierwszym miesiącu treningu, stopniowe zmniejszanie się stężenia IFN $\gamma$  w ciągu 3 miesięcy oraz dodatnia korelacja pomiędzy stężeniami IL-6 i IL-10 obserwowana jest już po miesiącu treningu.
5. Suplementacja astaksantyną u młodych koni arabskich nie zmienia modulacji odpowiedzi zapalnej w przebiegu prawidłowego treningu.

## 7. Piśmiennictwo

1. Abdelazim, K., Ghit, A., Assal, D., Dorra, N., Noby, N., Khattab, S. N., El Feky, S. E., & Hussein, A. (2023). Production and therapeutic use of astaxanthin in the nanotechnology era. *Pharmacological Reports: PR*, 75(4), 771–790. doi:10.1007/s43440-023-00488-y.
2. Adah, A.S., Ayo, J.O., Adah, D.A. et al. Molecular docking and experimental validation of the effect of ergothioneine on heat shock protein-70 following endurance exercise by Arabian stallions. (2023) *BMC Veterinary Research* 19, 27 doi:10.1186/s12917-023-03584-6.
3. Allen, K. J., van Erck-Westergren, E., & Franklin, S. H. (2016). Exercise testing in the equine athlete. *Equine Veterinary Education*, 28(2), 89–98. doi:10.1111/EVE.12410.
4. Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152. doi:10.3390/md12010128.
5. Anhold, H., Candon, R., Chan, D. S., & Amos, W. (2014). A Comparison of Elevated Blood Parameter Values in a Population of Thoroughbred Racehorses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(5), 651–655. doi:10.1016/J.JEVS.2013.12.005.
6. Aoi, W., Naito, Y., Sakuma, K., Kuchide, M., Tokuda, H., Maoka, T., Toyokuni, S., Oka, S., Yasuhara, M., & Yoshikawa, T. (2003). Astaxanthin limits exercise-induced skeletal and cardiac muscle damage in mice. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5(1), 139–144. doi:10.1089/152308603321223630.
7. Arfuso, F., Rizzo, M., Giannetto, C., Giudice, E., Cirincione, R., Cassata, G., Cicero, L., & Piccione, G. (2022). Oxidant and Antioxidant Parameters' Assessment Together with Homocysteine and Muscle Enzymes in Racehorses: Evaluation of Positive Effects of Exercise. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(6), 1176. doi:10.3390/antiox11061176.
8. Aşçı Çelik, D., & Toğay, V. A. (2023). *In vivo* protective efficacy of astaxanthin against ionizing radiation-induced DNA damage. *Chemical Biology & Drug Design*, 102(4), 882–888. doi:10.1111/cbdd.14321.

9. Atata, J. A., Ajadi, A. A., Adam, M., Olatunji, A. O., Bisalla, M., & Adamu, S. (2025). Comparative Evaluation of Hemato-biochemical and Oxidative Parameters of Racing Horses. *Media Kedokteran Hewan*, 36(1), 1–12. doi:10.20473/mkh.v36i1.2025.1-12.
10. Bailey, C. J., Reid, S. W., Hodgson, D. R., & Rose, R. J. (1999). Factors associated with time until first race and career duration for Thoroughbred racehorses. *American Journal of Veterinary Research*, 60(10), 1196–1200.
11. Baralic, I., Andjelkovic, M., Djordjevic, B., Dikic, N., Radivojevic, N., Suzin-Zivkovic, V., Radojevic-Skodric, S., & Pejic, S. (2015). Effect of Astaxanthin Supplementation on Salivary IgA, Oxidative Stress, and Inflammation in Young Soccer Players. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2015, 783761. doi:10.1155/2015/783761.
12. Bartolomé, E. and Cockram, M.S. (2016) Potential Effects of Stress on the Performance of Sport Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 40, 84-93. doi:10.1016/j.jevs.2016.01.016.
13. Bartosz G. (2010). Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radical Research*, 44(7), 711–720. doi: 10.3109/10715761003758114.
14. Bond, S., Greco-Otto, P., Sides, R., Léguillette, R., & Bayly, W. M. (2019). Assessment of high-intensity over-ground conditioning and simulated racing on aerobic and anaerobic capacities in racehorses. *Comparative Exercise Physiology*, 15(3), 199–208. doi: 10.3920/CEP190002.
15. Bourebaba, L., Serwotka-Suszczak, A., Pielok, A., Sikora, M., Mularczyk, M., & Marycz, K. (2023). The PTP1B inhibitor MSI-1436 ameliorates liver insulin sensitivity by modulating autophagy, ER stress and systemic inflammation in Equine metabolic syndrome affected horses. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1149610. doi: 10.3389/fendo.2023.1149610.
16. Brkljača Bottegaro, N., Gotić, J., Šuran, J., Brozić, D., Klobučar, K., Bojanić, K., & Vrbanac, Z. (2018). Effect of prolonged submaximal exercise on serum oxidative stress biomarkers (d-ROMs, MDA, BAP) and oxidative stress index in endurance horses. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–9. doi: 10.1186/s12917-018-1540-y.
17. Brotosudarmo, T. H. P., Limantara, L., Setiyono, E., & Heriyanto (2020). Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application.

- International Journal of Food Science*, 2020, 2156582. doi: 10.1155/2020/2156582
18. Brown, D. R., Gough, L. A., Deb, S. K., Sparks, S. A., & McNaughton, L. R. (2018). Astaxanthin in Exercise Metabolism, Performance and Recovery: A Review. *Frontiers in Nutrition*, 4, 76. doi: 10.3389/fnut.2017.00076.
  19. Burk, A. O., & Williams, C. A. (2008). Feeding management practices and supplement use in top-level event horses. *Comparative Exercise Physiology*, 5(2), 85–93. doi: 10.1017/S1478061508062786.
  20. Busch, J. D., Cipullo, M., Atanassov, I., Bratic, A., Silva Ramos, E., Schöndorf, T., Li, X., Pearce, S. F., Milenkovic, D., Rorbach, J., & Larsson, N. G. (2019). MitoRibo-Tag Mice Provide a Tool for In Vivo Studies of Mitochondrial Composition. *Cell Reports*, 29(6), 1728–1738.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.080.
  21. Chang, M. X., & Xiong, F. (2020). Astaxanthin and its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 5342. doi: 10.3390/molecules25225342.
  22. Chen, B., Wang, Y., Tang, W., Chen, Y., Liu, C., Kang, M., & Xie, J. (2022). Association between PPAR $\gamma$ , PPARGC1A, and PPARGC1B genetic variants and susceptibility of gastric cancer in an Eastern Chinese population. *BMC Medical Genomics*, 15(1), 274. doi: 10.1186/s12920-022-01428.
  23. Chen, Y., Li, S., Guo, Y., Yu, H., Bao, Y., Xin, X., ... & Jia, D. (2020). Astaxanthin attenuates hypertensive vascular remodeling by protecting vascular smooth muscle cells from oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(1), 4629189, doi: 10.1155/2020/4629189
  24. Chew, B. P., Mathison, B. D., Hayek, M. G., Massimino, S., Reinhart, G. A., & Park, J. S. (2011). Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140(3–4), 199–206. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.12.004.
  25. Chiaradia, E., Avellini, L., Rueca, F., Spaterna, A., Porciello, F., Antonioni, M. T., & Gaiti, A. (1998). Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 119(4), 833–836. doi: 10.1016/s0305-0491(98)10001-9.

26. Chu, Q., Martinez, T. F., Novak, S. W., Donaldson, C. J., Tan, D., Vaughan, J. M., Chang, T., Diedrich, J. K., Andrade, L., Kim, A., Zhang, T., Manor, U., & Saghatelian, A. (2019). Regulation of the ER stress response by a mitochondrial microprotein. *Nature Communications*, *10*(1), 4883. doi: 10.1038/s41467-019-12816-z
27. Couroucé A. (1999). Field exercise testing for assessing fitness in French standardbred trotters. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, *157*(2), 112–122. doi: 10.1053/tvj.1998.0302.
28. Crawford, K. L., Finnane, A., Greer, R. M., Barnes, T. S., Phillips, C. J. C., Woldeyohannes, S. M., Bishop, E. L., Perkins, N. R., & Ahern, B. J. (2021). Survival Analysis of Training Methodologies and Other Risk Factors for Musculoskeletal Injury in 2-Year-Old Thoroughbred Racehorses in Queensland, Australia. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 698298. doi: 10.3389/fvets.2021.698298.
29. Crisman, M. V., Scarratt, W. K., & Zimmerman, K. L. (2008). Blood proteins and inflammation in the horse. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, *24*(2), 285–vi. doi: 10.1016/j.cveq.2008.03.004.
30. Cywinska, A., Gorecka, R., Szarska, E., Witkowski, L., Dziekan, P., & Schollenberger, A. (2010). Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, (38), 23–27. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00280.x.
31. Cywińska, A., Turło, A., Witkowski, L., Szarska, E., & Winnicka, A. (2014). Changes in blood cytokine concentrations in horses after long-distance endurance rides. *Medycyna Weterynaryjna*, *70*, Article 9. dostępne:<http://medycynawet.edu.pl/images/stories/pdf/pdf2014/092014/201409568571.pdf>
32. Cywinska, A., Witkowski, L., Szarska, E., Schollenberger, A., & Winnicka, A. (2013). Serum amyloid A (SAA) concentration after training sessions in Arabian race and endurance horses. *BMC Veterinary Research*, *9*, 91. doi:10.1186/1746-6148-9-91.
33. Dadalt, E. K., & Stefani, G. P. (2024). Effects of antioxidant vitamin supplementation on sports performance, endurance and strength performance: a systematic review and meta-analysis. *Sport Sciences for Health*, *20*(3), 739–756. doi: 10.1007/s11332-024-01205-9.

34. De Maré, L., Boshuizen, B., Vidal Moreno de Vega, C., de Meeûs, C., Plancke, L., Gansemans, Y., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., de Oliveira, J. E., Hosotani, G., Oosterlinck, M., & Delesalle, C. (2022). Profiling the Aerobic Window of Horses in Response to Training by Means of a Modified Lactate Minimum Speed Test: Flatten the Curve. *Frontiers in Physiology*, 13, 792052. doi: 10.3389/fphys.2022.792052.
35. de Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J., & Lekeux, P. (2005). Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 169(1), 65–74. doi: 10.1016/j.tvjl.2003.12.012.
36. Di Nottia, M., Marchese, M., Verrigni, D., Mutti, C. D., Torraco, A., Oliva, R., Fernandez-Vizarra, E., Morani, F., Trani, G., Rizza, T., Ghezzi, D., Ardisson, A., Nesti, C., Vasco, G., Zeviani, M., Minczuk, M., Bertini, E., Santorelli, F. M., & Carrozzo, R. (2020). A homozygous MRPL24 mutation causes a complex movement disorder and affects the mitoribosome assembly. *Neurobiology of Disease*, 141. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104880.
37. Drake, J. C., Wilson, R. J., & Yan, Z. (2016). Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(1), 13–22. doi: 10.1096/fj.15-276337.
38. Dutra, M. T., Alex, S., Mota, M. R., Sales, N. B., Brown, L. E., & Bottaro, M. (2018). Effect of strength training combined with antioxidant supplementation on muscular performance. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 43(8), 775–781. doi: 10.1139/apnm-2017-0866.
39. Eren, B., Tuncay Tanrıverdi, S., Aydın Köse, F., & Özer, Ö. (2019). Antioxidant properties evaluation of topical astaxanthin formulations as anti-aging products. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(1), 242–250. doi: 10.1111/jocd.12665.
40. Evans, D. L., & Rose, R. J. (1988). Cardiovascular and respiratory responses in Thoroughbred horses during treadmill exercise. *The Journal of Experimental Biology*, 134, 397–408. doi: 10.1242/jeb.134.1.397.
41. Faude, O., Kindermann, W., & Meyer, T. (2009). Lactate threshold concepts: how valid are they?. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 39(6), 469–490. doi: 10.2165/00007256-200939060-00003.

42. Finno, C. J., & McKenzie, E. C. (2025). Vitamin E and Selenium-Related Manifestations of Muscle Disease. *The Veterinary Clinics of North America. Equine practice*, 41(1),77–93. doi: 10.1016/j.cveq.2024.11.001.
43. Firth, E. C., Rogers, C. W., Perkins, N. R., Anderson, B. H., & Grace, N. D. (2004). Musculoskeletal responses of 2-year-old Thoroughbred horses to early training. 1. Study design, and clinical, nutritional, radiological and histological observations. *New Zealand Veterinary Journal*, 52(5), 261–271. doi: 10.1080/00480169.2004.36438.
44. Fisher-Wellman, K., & Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine : DM*, 8,1. doi: 10.1186/1476-5918-8-1.
45. Foreman, J. H., Bayly, W. M., Grant, B. D., & Gollnick, P. D. (1990). Standardized exercise test and daily heart rate responses of thoroughbreds undergoing conventional race training and detraining. *American Journal of Veterinary Research*, 51(6), 914–920. doi: 10.2460/AJVR.1990.51.06.914.
46. Gomez-Cabrera, M. C., Ristow, M., & Viña, J. (2012). Antioxidant supplements in exercise: worse than useless?. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 302(4), E476–E479. doi: 10.1152/ajpendo.00567.2011.
47. Gondim F.J., Zoppi C., dos Reis Silveira L., Pereira-da-Silva L., Vaz de Macedo D., (2009) Possible Relationship Between Performance and Oxidative Stress in Endurance Horses, *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(4) 206-212. doi:10.1016/j.jevs.2009.02.006.
48. Gowd, V., Xiao, J., Wang, M., Chen, F., & Cheng, K. W. (2021). Multi-Mechanistic Antidiabetic Potential of Astaxanthin: An Update on Preclinical and Clinical Evidence. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(24). doi: 10.1002/mnfr.202100252.
49. Hanák J., P. Jahn, R. Kabe%, M. Sedlinská, Z. Íert, J. Mezerová, O. Chvátal, (2001), A Field Study of Oxygen Consumption and Estimated Energy Expenditure in the Exercising Horse. *Acta Veterinaria Brno* 70: 133-139. doi: 10.2754/avb200170020133.
50. Harkins, J. D., Beadle, R. E., & Kamerling, S. G. (1993). The correlation of running ability and physiological variables in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 25(1), 53–60. doi: 10.1111/j.2042-3306.1993.tb02902.x.

51. Harkins, J. D., & Kamerling, S. G. (1991). Assessment of treadmill interval training on fitness. *Journal of Equine Veterinary Science*, 11(4), 237–242. doi: 10.1016/S0737-0806(06)80987-1.
52. Hennes, N., Briant, C., Lorcet, C., Ruet, A., & Lansade, L. (2024). Behaviours exhibited during training predict physical tiredness in harness trotter horses. *Applied Animal Behaviour Science*, 274, 106245. doi: 10.1016/J.APPLANIM.2024.106245.
53. Higgins, M. R., Izadi, A., & Kaviani, M. (2020). Antioxidants and Exercise Performance: With a Focus on Vitamin E and C Supplementation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(22), 8452. doi: 10.3390/ijerph17228452.
54. Horohov, D. W., Sinatra, S. T., Chopra, R. K., Jankowitz, S., Betancourt, A., & Bloomer, R. J. (2012). The Effect of Exercise and Nutritional Supplementation on Proinflammatory Cytokine Expression in Young Racehorses During Training. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(12), 805–815. doi: 10.1016/j.jevs.2012.03.017.
55. Hussein, G., Nakagawa, T., Goto, H., Shimada, Y., Matsumoto, K., Sankawa, U., & Watanabe, H. (2007). Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SHR/NDmcr-cp. *Life Sciences*, 80(6), 522–529. doi: 10.1016/j.lfs.2006.09.041.
56. Išović, J., Čamo, D., Čutuk, R., & Zahirović, A. (2023). The Influence of Various Physical Activity on Hematological and Biochemical Parameters in Draft and Sport Horses. *International Journal of Veterinary Science*, 12(5), 708–714. doi: 10.47278/journal.ijvs/2023.014.
57. Janczarek, I., Wilk, I., Kędzierski, W., Stachurska, A., & Kowalik, S. (2017). Offtrack training ameliorates emotional excitability in purebred Arabian racehorses. *Canadian Journal of Animal Science*, 97(1), 42–50. doi:10.1139/CJAS-2016-0062.
58. Janicki, B., Kochowicz, A., Cygan-Szczegielniak, D., & Krumrych, W. (2012). Fundamentals of exercise physiology in horses. *Medycyna Weterynaryjna*, 68(6), 323–327. dostęp: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123212610>
59. Kawai, M., Minami, Y., Sayama, Y., Kuwano, A., Hiraga, A., & Miyata, H. (2009). Muscle fiber population and biochemical properties of whole body muscles in Thoroughbred horses. *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 292(10), 1663–1669. doi: 10.1002/ar.20961.

60. Kawaida, M. Y., Kwon, O. S., Ahn, A., Reiter, A. S., Tillquist, N. M., Noh, S. G., Lee, J. W., Moore, T. E., & Reed, S. A. (2025). Effects of an astaxanthin-containing supplement on oxidative status in skeletal muscle and circulation during deconditioning and reconditioning periods in polo ponies. *Physiological Reports*, 13(8), e70346. doi: 10.14814/phy2.70346
61. Kędzierski, W. (2010). The effect of training on plasma L-carnitine metabolism in purebred Arabian horses. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 19(3), 398–407. doi: 10.22358/jafs/66302/2010.
62. Kedzierski, W., Bergero, D., & Assenza, A. (2009). Trends of hematological and biochemical values in the blood of young race horses during standardized field exercise tests. *Acta Veterinaria*, 59(5–6), 457–466. doi: 10.2298/AVB0906457K
63. Kedzierski, W., Strzelec, K., Cywińska, A., & Kowalik, S. (2013). Salivary Cortisol Concentration in Exercised Thoroughbred Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(12), 1106–1109. doi: 10.1016/j.jevs.2013.04.011.
64. Kiessling, M., Gindlhuber, J., Sintou, A., Matzer, I., Radulović, S., Trummer-Herbst, V., Ajdari, A., Voglhuber-Höllner, J., Holzer, M., Rodriguez, T. A., Leitinger, G., Zirlik, A., Bers, D. M., Sattler, S., & Ljubojevic-Holzer, S. (2025). A transmission electron microscopy platform for assessing mitochondrial and nuclear architecture in cardiomyocytes. *Cell Reports Methods*, 5(11), 101212. doi: 10.1016/j.crmeth.2025.101212.
65. Kim, S. H., & Kim, H. (2018). Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review. *Nutrients*, 10(9), 1137. doi: 10.3390/nu10091137.
66. Klecel, W., Drobik-Czwarno, W., & Martyniuk, E. (2021). 36 Factors influencing racing performance in Polish Thoroughbreds and Purebred Arabian horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 100, 103499. doi: 10.1016/j.jevs.2021.103499
67. Kobayashi, M., Kuribara, K., & Amada, A. (1999). Application of V200 values for evaluation of training effects in the young thoroughbred under field conditions. *Equine Veterinary Journal*. Supplement, 30, 159–162. Doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tbo5208.x.
68. Kobayashi, M., Kuribara, K., & Amada, A. (1999). Application of V200 values for evaluation of training effects in the young thoroughbred under field conditions.

- Equine Veterinary Journal. Supplement*, 30, 159–162. doi:10.1111/j.2042-3306.1999.tb05208.x.
69. Kohandel, Z., Farkhondeh, T., Aschner, M., Pourbagher-Shahri, A. M., & Samarghandian, S. (2022). Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 145, 112179. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112179.
70. Kong, L., Li, S., Fu, Y., Cai, Q., Du, X., Liang, J., & Ma, T. (2025). Mitophagy in relation to chronic inflammation/ROS in aging. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 480(2), 721–731. doi:10.1007/s11010-024-05042-9.
71. Kurhaluk, Natalia & Tkaczenko, Halina & Tkachova, Iryna & Lukash, Oleksandr. (2024). Activity of antioxidant enzymes in the blood of Shetland pony mares and stallions involved in recreational horseback riding: role of photoperiod and exercise. *The Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Science NAAS of Ukraine*. doi: 74-86. 10.32900/2312-8402-2024-132-74-86.
72. Lamprecht, E. D., Bagnell, C. A., & Williams, C. A. (2008). Inflammatory responses to three modes of intense exercise in Standardbred mares – a pilot study. *Comparative Exercise Physiology*, 5(3–4), 115–125. doi: 10.1017/S1478061509294448.
73. Lee, H. Y., Kim, J. Y., Kim, K. H., Jeong, S., Cho, Y., & Kim, N. (2020). Gene Expression Profile in Similar Tissues Using Transcriptome Sequencing Data of Whole-Body Horse Skeletal Muscle. *Genes*, 11(11), 1359. doi: 10.3390/genes11111359.
74. Lee, S. J., Bai, S. K., Lee, K. S., Namkoong, S., Na, H. J., Ha, K. S., Han, J. A., Yim, S. V., Chang, K., Kwon, Y. G., Lee, S. K., & Kim, Y. M. (2003). Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Molecules and Cells*, 16(1), 97–105. dostę: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14503852/>
75. Li, C., Yan, Y., Wang, K., & Jiang, T. (2025). Astaxanthin alleviates oxidative stress and skeletal muscle damage by promoting mitochondrial biogenesis. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1577408. doi:10.3389/fvets.2025.1577408
76. Liburt, N. R., Adams, A. A., Betancourt, A., Horohov, D. W., & McKeever, K. H. (2010). Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, (38), 280–288. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00275.x.

77. Lindner, A., Mosen, H., Kissenbeck, S., Fuhrmann, H., & Sallmann, H. P. (2009). Effect of blood lactate-guided conditioning of horses with exercises of differing durations and intensities on heart rate and biochemical blood variables. *Journal of Animal Science*, 87(10), 3211–3217. doi: 10.2527/jas.2009-2001.
78. Littiere, T. O., Costa, G. B., Sales, N. A. A., Carvalho, J. R. G., Rodriguez, I. D. M., Ramos, G. V., & Ferraz, G. C. (2025). Evaluating plasma lactate running speed derived parameters for predicting maximal lactate steady state in teaching horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 147, 105385. doi: 10.1016/j.jevs.2025.105385.
79. Liu, R., Jin, P., Yu, L., Wang, Y., Han, L., Shi, T., & Li, X. (2014). Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS one*, 9(3), e92810. doi: 10.1371/journal.pone.0092810.
80. Liu, S., & Dařová, K. (2025). Effects of Astaxanthin on Chronic Exercise Fatigue. *Physiological Research*, 74(4), 657–667. doi.org/10.33549/physiolres.935603
81. Logan, A. A., & Nielsen, B. D. (2021). Training young horses: The science behind the benefits. *Animals*, 11(2), 1–13. doi: doi.org/10.3390/ani11020463.
82. López-Rivero, J. L., Agüera, E., Monterde, J. G., Rodríguez-Barbudo, M. V., & Miró, F. (1989). Comparative study of muscle fiber type composition in the middle gluteal muscle of andalusian, thoroughbred and arabian horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 9(6), 337–340. doi:10.1016/S0737-0806(89)80072-3.
83. Ma, B., Lu, J., Kang, T., Zhu, M., Xiong, K., & Wang, J. (2022). Astaxanthin supplementation mildly reduced oxidative stress and inflammation biomarkers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 99, 40–50. doi: 10.1016/j.nutres.2021.09.005.
84. Mairbäurl H. (2013). Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Frontiers in Physiology*, 4, 332. doi: 10.3389/fphys.2013.00332.
85. Mami, S., Khaje, G., Shahriari, A., & Gooraninejad, S. (2019). Evaluation of Biological Indicators of Fatigue and Muscle Damage in Arabian Horses After Race. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78, 74–78. doi: 10.1016/j.jevs.2019.04.007.
86. Maoka, T. (2011). Carotenoids in marine animals. *Marine Drugs*, 9(2), 278–293. Doi: 10.3390/md9020278.

87. Massie, S., Bayly, W., Ohmura, H., Takahashi, Y., Mukai, K., & Léguillette, R. (2024). Field-training in young two-year-old thoroughbreds: investigating cardiorespiratory adaptations and the presence of exercise induced pulmonary hemorrhage. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 159. doi: 10.1186/s12917-024-03997-x.
88. Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., Haga, S., Ji, L. L., & Ohno, H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 84(1-2), 1–6. doi:10.1007/S004210000342.
89. Moldoveanu, A. I., Shephard, R. J., & Shek, P. N. (2001). The cytokine response to physical activity and training. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 31(2), 115–144. doi: 10.2165/00007256-200131020-00004.
90. Mularczyk, M., Bourebaba, N., Marycz, K., & Bourebaba, L. (2022). Astaxanthin Carotenoid Modulates Oxidative Stress in Adipose-Derived Stromal Cells Isolated from Equine Metabolic Syndrome Affected Horses by Targeting Mitochondrial Biogenesis. *Biomolecules*, 12(8). doi:10.3390/biom12081039.
91. Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other nutrients from *haematococcus pluvialis*—*Multifunctional applications*. In *Marine Drugs* (Vol. 18, Issue 9). MDPI AG. doi: 10.3390/md18090459.
92. Munsters, C. C., van Iwaarden, A., van Weeren, R., & Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. (2014). Exercise testing in Warmblood sport horses under field conditions. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 202(1), 11–19. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.07.019.
93. Murai, T., Kawasumi, K., Tominaga, K., Okada, Y., Kobayashi, M., & Arai, T. (2019). Effects of astaxanthin supplementation in healthy and obese dogs. *Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.)*, 10, 29–35. doi: 10.2147/VMRR.S186202
94. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9613090. doi:10.1155/2019/9613090.
95. Nemeč Svete, A., Vovk, T., Bohar Topolovec, M., & Kruljč, P. (2021). Effects of Vitamin E and Coenzyme Q10 Supplementation on Oxidative Stress Parameters in Untrained Leisure Horses Subjected to Acute Moderate Exercise. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 908. doi:10.3390/antiox10060908

96. Ngo, H. B., Lovely, G. A., Phillips, R., & Chan, D. C. (2014). Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nature Communications*, 5, 3077. doi:10.1038/ncomms4077.
97. Ni, Y., Wu, T., Yang, L., Xu, Y., Ota, T., & Fu, Z. (2018). Protective effects of astaxanthin on a combination of D-galactose and jet lag-induced aging model in mice. *Endocrine Journal*, 65(5), 569–578. doi: 10.1507/endocrj.EJ17-0500.
98. Nieman, D. C., Woo, J., Sakaguchi, C. A., Omar, A. M., Tang, Y., Davis, K., Pecorelli, A., Valacchi, G., & Zhang, Q. (2023). Astaxanthin supplementation counters exercise-induced decreases in immune-related plasma proteins. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1143385. doi:10.3389/fnut.2023.1143385.
99. Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
100. Ohmura, H., Matsui, A., Hada, T., & Jones, J. H. (2013). Physiological responses of young thoroughbred horses to intermittent high-intensity treadmill training. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 59. doi:10.1186/1751-0147-55-59.
101. Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal*, 40(3), e104705. doi:10.15252/embj.2020104705.
102. Ott, E. C., Cavinder, C. A., Wang, S., Smith, T., Lemley, C. O., & Dinh, T. T. N. (2022). Oxidative stress biomarkers and free amino acid concentrations in the blood plasma of moderately exercised horses indicate adaptive response to prolonged exercise training. *Journal of Animal Science*, 100(4), skac086. doi:10.1093/jas/skac086.
103. Page, A.E.; Stewart, J.C.; Holland, R.E.; Horohov, D.W. (2017) The Impact of Trammg Regimen on the Inflammatory Response to Exercise in 2-Year-Old Thoroughbreds. *Journal of Equine Veterinary Science* 58, 78-83 doi:10.1016/j.jevs.2017.08.0112017.
104. Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2014). Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Experimental Gerontology*, 56, 182–188. doi: 10.1016/j.exger.2014.01.021.
105. Park, J. S., Kim, H. W., Mathison, B. D., Hayek, M. G., Massimino, S., Reinhart, G. A., & Chew, B. P. (2010). Astaxanthin uptake in domestic dogs and cats. *Nutrition & Metabolism*, 7, 52. oi:10.1186/1743-7075-7-52.

106. Peng, J. J., Lin, S. H., Liu, Y. T., Lin, H. C., Li, T. N., & Yao, C. K. (2019). A circuit-dependent ROS feedback loop mediates glutamate excitotoxicity to sculpt the *Drosophila* motor system. *eLife*, 8, e47372. doi:10.7554/eLife.47372
107. Pereira, C. P. M., Souza, A. C. R., Vasconcelos, A. R., Prado, P. S., & Name, J. J. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 47(1), 37–48. doi:10.3892/ijmm.2020.4783.
108. Peternelj, TT., Coombes, J.S., (2011). Antioxidant Supplementation during Exercise Training. *Sports Medicine* 41, 1043–1069 doi:10.2165/11594400-000000000-00000.
109. Poole, D. (2004). Current concepts of oxygen transport during exercise. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 1(1), 5–22. doi:10.1079/ECP20036.
110. Porter, C., Reidy, P. T., Bhattarai, N., Sidossis, L. S., & Rasmussen, B. B. (2015). Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 47(9), 1922–1931. doi: 10.1249/MSS.0000000000000605.
111. Powers, S. K., Deminice, R., Ozdemir, M., Yoshihara, T., Bomkamp, M. P., & Hyatt, H. (2020). Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *Journal of Sport and Health Science*, 9(5), 415. doi:10.1016/J.JSHS.2020.04.001.
112. Powers, S. K., & Hogan, M. C. (2016). Exercise and oxidative stress. *The Journal of Physiology*, 594(18), 5079. doi:10.1113/JP272255
113. Quadrilatero, J., Rahman, F. A., Thoms, J. P., & Hian-Cheong, D. J. (2025). Molecular regulation of mitochondrial turnover by exercise: tissue adaptation through mitochondrial biogenesis and mitophagy. *Mitophagy in Health and Disease: Mechanisms, Health Implications, and Therapeutic Opportunities*, 119–142. doi: 10.1016/B978-0-443-15260-3.00018-1
114. Ramasamy, R., Bhattacharyya, S., Kohn, T. P., & Miller, L. E. (2025). Antioxidant Supplementation for Erectile Dysfunction: Systematic Review and Meta-Analysis of Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trials. *The World Journal of Men's Health*, 43(1), 81–91. doi:10.5534/wjmh.230280
115. Rius-Pérez, S., Torres-Cuevas, I., Millán, I., Ortega, Á. L., & Pérez, S. (2020). PGC-1 $\alpha$ , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, , 1452696. doi: 10.1155/2020/1452696.

116. Rogers, C. W., Bolwell, C. F., & Gee, E. K. (2012). Proactive Management of the Equine Athlete. *Animals : an open access journal from MDPI*, 2(4), 640–655. doi:10.3390/ani2040640
117. Ropka-Molik, K., Stefaniuk-Szmukier, M., Z Ukowski, K., Piórkowska, K., & Bugno-Poniewierska, M. (2017). Exercise-induced modification of the skeletal muscle transcriptome in Arabian horses. *Physiological Genomics*, 49(6), 318–326. doi:10.1152/physiolgenomics.00130.2016
118. McGivney, B. A., Eivers, S. S., MacHugh, D. E., MacLeod, J. N., O'Gorman, G. M., Park, S. D., Katz, L. M., & Hill, E. W. (2009). Transcriptional adaptations following exercise in thoroughbred horse skeletal muscle highlights molecular mechanisms that lead to muscle hypertrophy. *BMC Genomics*, 10, 638. doi:10.1186/1471-2164-10-638
119. Rostami, S., Alyasin, A., Saedi, M., Nekoonam, S., Khodarahmian, M., Moeini, A., & Amidi, F. (2023). Astaxanthin ameliorates inflammation, oxidative stress, and reproductive outcomes in endometriosis patients undergoing assisted reproduction: A randomized, triple-blind placebo-controlled clinical trial. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1144323. doi: 10.3389/fendo.2023.1144323
120. Sato, F., Omura, T., Ishimaru, M., Endo, Y., Murase, H., & Yamashita, E. (2015). Effects of Daily Astaxanthin and L-Carnitine Supplementation for Exercise-Induced Muscle Damage in Training Thoroughbred Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(10), 836–842. doi:10.1016/J.JEVS.2015.08.003
121. Shatoor, A. S., & Al Humayed, S. (2021). Astaxanthin Ameliorates high-fat diet-induced cardiac damage and fibrosis by upregulating and activating SIRT1. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7012–7021. doi:10.1016/j.sjbs.2021.07.079
122. Shokri-Mashhadi, N., Tahmasebi, M., Mohammadi-Asl, J., Zakerkish, M., & Mohammadshahi, M. (2021). The antioxidant and anti-inflammatory effects of astaxanthin supplementation on the expression of miR-146a and miR-126 in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *International Journal of Clinical Practice*, 75(5), e14022. doi:10.1111/ijcp.14022
123. Siasos, G., Tsigkou, V., Kosmopoulos, M., Theodosiadis, D., Simantiris, S., Tagkou, N. M., Tsimpiktsioglou, A., Stampouloglou, P. K., Oikonomou, E., Mourouzis, K., Philippou, A., Vavuranakis, M., Stefanadis, C., Tousoulis, D., &

- Papavassiliou, A. G. (2018). Mitochondria and cardiovascular diseases—from pathophysiology to treatment. *Annals of Translational Medicine*, 6(12), 256. doi:10.21037/ATM.2018.06.21
124. Smith, R. K. W., & Goodship, A. E. (2008). The Effect of Early Training and the Adaptation and Conditioning of Skeletal Tissues. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 24(1), 37–51. doi: 10.1016/J.CVEQ.2007.11.005
  125. Srinivasa Rao, P. V. L. N., Kiranmayi, V. S., Swathi, P., Jeyseelan, L., Suchitra, M. M., & R. Bitla, A. (2015). Comparison Of Two Analytical Methods Used For The Measurement Of Total Antioxidant Status. *Journal of Antioxidant Activity*, 1(1), 22–28. doi:10.14302/ISSN.2471-2140.JAA-14-617
  126. Stucchi, L., Lo Feudo, C. M., Stancari, G., Conturba, B., & Ferrucci, F. (2022). Effect of the Administration of a Nutraceutical Supplement in Racehorses with Lower Airway Inflammation. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(18), 2479. doi.:10.3390/ani12182479.
  127. Szarska, E., Cywińska, A., Ostaszewski, P., & Kowalska, A. (2014). Effectiveness of training programmes used in two stables of thoroughbred race horses. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(4), 681–685. doi: 10.2478/PJVS-2014-0099
  128. Tahmasebi, W., Kazemi, V., Reza, H., Chenari, B., & Moradi, M. (2022). Effects of Exercise and Training on Oxidative Stress and Antioxidants. *New Approaches in Exercise Physiology*, 4(7), 145–177. doi.:10.22054/NASS.2022.69791.1119
  129. Thiruvankadan, A. K., Kandasamy, N., & Panneerselvam, S. (2009). Inheritance of racing performance of Thoroughbred horses. *Livestock Science*, 121(2–3), 308–326. doi.:10.1016/J.LIVSCI.2008.07.009
  130. Thompson, K., Mai, N., Oláhová, M., Scialó, F., Formosa, L. E., Stroud, D. A., Garrett, M., Lax, N. Z., Robertson, F. M., Jou, C., Nascimento, A., Ortez, C., Jimenez-Mallebrera, C., Hardy, S. A., He, L., Brown, G. K., Marttinen, P., McFarland, R., Sanz, A., Battersby, B. J., Taylor, R. W. (2018). OXA1L mutations cause mitochondrial encephalopathy and a combined oxidative phosphorylation defect. *EMBO Molecular Medicine*, 10(11), e9060. doi: 10.15252/EMMM.201809060.
  131. Valberg, S. J., & McKenzie, E. C. (2025). Muscle Disorders of Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 41(1), doi.:10.1016/S0749-0739(25)00004-5

132. Von Wittke, P., Lindner, A., Deegen, E., & Sommer, H. (1994). Effects of training on blood lactate-running speed relationship in thoroughbred racehorses. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 77(1), 298–302. doi:10.1152/jappl.1994.77.1.298
133. Wang, Y., Liu, N., & Lu, B. (2019). Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(7), 859–875. doi:10.1111/cns.13140
134. Wiecek, M., Maciejczyk, M., Szymura, J., Szygula, Z., & Kantorowicz, M. (2015). Changes in Non-Enzymatic Antioxidants in the Blood Following Anaerobic Exercise in Men and Women. *PloS one*, 10(11), e0143499. doi:10.1371/journal.pone.0143499
135. Williams C. A. (2016). The effect of oxidative stress during exercise in the horse. *Journal of Animal Science*, 94(10), 4067–4075. doi:10.2527/jas.2015-9988
136. Witkowska-Piłaszewicz, O., Baska, P., Czopowicz, M., Żmigrodzka, M., Szarska, E., Szczepaniak, J., Nowak, Z., Winnicka, A., & Cywińska, A. (2019). Anti-Inflammatory State in Arabian Horses Introduced to the Endurance Training. *Animals : an open access journal from MDPI*, 9(9), 616. doi: 10.3390/ani9090616
137. Wong, A. S. M., Morrice-West, A. V., Hitchens, P. L., & Whitton, R. C. (2023). The association between Thoroughbred racehorse training practices and musculoskeletal injuries in Victoria, Australia. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1260554. doi: 10.3389/fvets.2023.1260554
138. Wu, L., Lyu, Y., Srinivasagan, R., Wu, J., Ojo, B., Tang, M., El-Rassi, G. D., Metzinger, K., Smith, B. J., Lucas, E. A., Clarke, S. L., Chowanadisai, W., Shen, X., He, H., Conway, T., von Lintig, J., & Lin, D. (2020). Astaxanthin-Shifted Gut Microbiota Is Associated with Inflammation and Metabolic Homeostasis in Mice. *The Journal of Nutrition*, 150(10), 2687–2698. doi:10.1093/jn/nxaa222
139. Xian, H., & Liou, Y. C. (2019). Loss of MIEF1/MiD51 confers susceptibility to BAX-mediated cell death and PINK1-PRKN-dependent mitophagy. *Autophagy*, 15(12), 2107–2125. doi:10.1080/15548627.2019.1596494
140. Xie, Y., Gu, Y., Li, Z., Zhang, L., & Hei, Y. (2025). Effects of exercise on different antioxidant enzymes and related indicators: a systematic review and

- meta-analysis of randomized controlled trials. *Scientific Reports*, 15(1), 12518. doi:10.1038/s41598-025-97101-4
141. Xu, J., Rong, S., Gao, H., Chen, C., Yang, W., Deng, Q., Huang, Q., Xiao, L., & Huang, F. (2017). A Combination of Flaxseed Oil and Astaxanthin Improves Hepatic Lipid Accumulation and Reduces Oxidative Stress in High Fat-Diet Fed Rats. *Nutrients*, 9(3), 271. doi:10.3390/nu9030271
142. Yu, R., Liu, T., Jin, S. B., Ankarcona, M., Lendahl, U., Nistér, M., & Zhao, J. (2021). MIEF1/2 orchestrate mitochondrial dynamics through direct engagement with both the fission and fusion machineries. *BMC Biology*, 19(1), 229. doi:10.1186/s12915-021-01161-7
143. Zhang, L., & Wang, H. (2015). Multiple Mechanisms of Anti-Cancer Effects Exerted by Astaxanthin. *Marine Drugs*, 13(7), 4310–4330. doi: 10.3390/md13074310

Strony internetowe:

Źródło internet 1, <https://torsluzewiec.pl/strefa-wyscigowa/wyniki/> (dostęp z dnia 20.12.2025)

Źródło internet 1, <https://podkowa.eu/pl/p/Astaksantyna-naturalna-tabletki-12mg/1707> (dostęp z dnia 12.07.2025)

Źródło internet 2, <https://www.fullbuckethealth.com/products/medical-muscle-performance-horse-supplement?variant=22311944126522> (dostęp z dnia 12.07.2025)

**8. Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu oraz oświadczenia współautorów**





## OPEN Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy

Beata Giercuskiewicz-Hecold<sup>1</sup>, David Pajuelo<sup>2</sup>, Zofia Steczkiewicz<sup>3</sup>, Anna Cywinska<sup>4</sup> & Krzysztof Marycz<sup>5</sup>✉

Astaxanthin, a strong antioxidant carotenoid, has shown promising features in mitigating inflammation and oxidative stress and so that has been considered as a supplement for high-performance animals. In this study, we aimed to evaluate the effects of astaxanthin on oxidative stress, inflammation, and mitochondrial health in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from Arabian racehorses. Horse-derived peripheral blood mononuclear cells exposed to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) presented increased reactive oxygen species (ROS) accumulation and overexpression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ . The addition of astaxanthin to cell culture reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced inflammatory response by decreasing the expression levels of all the tested pro-inflammatory cytokines. Moreover, astaxanthin displayed a potential antioxidant response by increasing the expression of genes related to antioxidative defense, such as *NRF1*, *SOD2*, and *GPX*. Interestingly, PBMCs isolated from the horses orally supplemented with astaxanthin increased the expression of the mitophagy-related genes *PINK1* and *PARKIN*. Moreover, genes related to mitochondrial dynamics and energy production, such as *PPARGC1B*, *NDUFA9*, and *MRPL24*, as well as genes associated with mitochondrial function, structure and dynamics, such as *PIGBOS*, *MRLP24*, *PUSL1* and *TFAM* were upregulated in PBMCs isolated from astaxanthin supplemented horses. Altogether, these findings indicate that astaxanthin may be a beneficial dietary supplement for equine health, supporting resilience against oxidative stress and inflammatory challenges, and improving the recovery and performance of racing horses.

**Keywords** Horses, Astaxanthin, Dietary supplementation, Oxidative stress, Inflammation, Mitochondria, PBMC

### Abbreviations

PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
OS	Oxidative stress

Astaxanthin is a naturally occurring carotenoid with potent antioxidant properties, commonly found in marine organisms such as microalgae, salmon, and shrimp. The chemical structure of astaxanthin, which includes

<sup>1</sup>Doctoral School, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland. <sup>2</sup>Faculty of Health Sciences, Universidad Europea de Valencia, 46010 Valencia, Spain. <sup>3</sup>Department of Experimental Biology, Faculty of Biology and Animal Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 27B, 50-375 Wrocław, Poland. <sup>4</sup>Department of Basic and Preclinical Sciences, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland. <sup>5</sup>International Institute of Translational Medicine (MIMT), ul. Jesionowa 11, 55-114 Malin Wisznia Mała, Poland. ✉email: kmmarycz@ucdavis.edu

conjugated double bonds and hydroxyl groups, allows it to efficiently scavenge free radicals and protect cells from oxidative damage<sup>1,2</sup>. This strong antioxidant capacity has sparked interest in its potential applications in animal nutrition, particularly for high-performance animals such as racehorses<sup>3,4</sup>. Given the high metabolic demand and oxidative stress that racehorses experience during training and competition, incorporating astaxanthin into their diet could offer significant health benefits by mitigating oxidative damage and enhancing recovery. Studies have demonstrated that astaxanthin can reduce markers of oxidative stress and improve overall antioxidant status in animals. For example, a study by Ambati et al. (2014) highlighted the broad-spectrum antioxidant activity of astaxanthin, which includes protecting lipids, proteins, and DNA from oxidative damage<sup>5</sup>. Additionally, it has been shown that dietary astaxanthin had beneficial effects on the antioxidant status of not only race horses, but also for other animals<sup>6–8</sup>.

To investigate the protective effects of astaxanthin against oxidative stress, we used a model involving horse-derived peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In this model, oxidative stress was induced by treating the cells with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which significantly increases the production of reactive oxygen species (ROS). This method effectively simulates the oxidative stress conditions that cells might encounter in vivo, allowing the investigation of the cellular responses and the potential protective effects of antioxidants like astaxanthin.

Oxidative stress and inflammation are closely linked processes that can detrimentally affect the health and performance of racehorses<sup>9</sup>. During intense physical activity, the production of ROS can overwhelm the body's antioxidant defenses, leading to cellular damage and the activation of inflammatory pathways. Elevated ROS levels cause oxidative modifications to cellular components such as lipids, proteins, and DNA, which can disrupt normal cellular functions and trigger stress responses. These oxidative modifications are recognized by the immune system as damage signals, leading to the activation of inflammatory pathways<sup>10</sup>. Oxidative stress induces the activation of transcription factors such as nuclear factor-kappa B (NF-κB) and activator protein 1 (AP-1), which are pivotal in regulating the expression of pro-inflammatory cytokines. This activation results in the increased production and release of cytokines such as interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and interferon-gamma (IFN-γ). These pro-inflammatory cytokines play a crucial role in initiating and sustaining the inflammatory response. In racehorses, the systemic release of these cytokines due to oxidative stress can trigger the processes, which in a certain extent, may contribute to the impaired muscle function and recovery but also promotes chronic health issues such as joint diseases and metabolic muscle disorders. Inflammation exceeding certain levels is particularly detrimental for racehorses as it affects overall performance and health<sup>11</sup>. Inflammation in muscle tissues can result in pain, stiffness, and reduced muscle function, making it difficult for horses to perform at their peak levels. Moreover, chronic inflammation can lead to fatigue, slower recovery times, and increased susceptibility to injuries and illnesses. Therefore, it is crucial to manage and balance the triggering of inflammation to ensure the optimal health and performance of racehorses. Effective management of oxidative stress and inflammation in racehorses involves strategies that enhance antioxidant defenses and reduce pro-inflammatory signals. This can be achieved through dietary supplementation with antioxidants such as astaxanthin, which has been shown to reduce oxidative damage and modulate inflammatory responses<sup>3,4</sup>. By reducing oxidative stress and pro-inflammatory signaling, astaxanthin can help maintain muscle health, improve recovery times, and enhance overall performance in racehorses.

Mitophagy, the selective degradation of damaged mitochondria by autophagy, plays a vital role in maintaining mitochondrial quality and cellular health<sup>12</sup>. This process involves the identification and removal of dysfunctional mitochondria, which are then targeted for degradation and recycling within lysosomes. Efficient mitophagy ensures the removal of mitochondria that produce excessive ROS, thereby preventing the accumulation of oxidative stress within cells<sup>12</sup>. By maintaining a population of healthy mitochondria, mitophagy helps to sustain cellular energy production and minimize cellular damage.

In the context of reducing inflammation and oxidative stress, mitophagy is crucial<sup>12,13</sup>. Dysfunctional mitochondria are significant sources of ROS, which can damage cellular components and trigger inflammatory pathways. When damaged mitochondria are not effectively removed, they can lead to increased oxidative stress and the activation of pro-inflammatory signaling cascades, such as the NF-κB pathway, resulting in the production of cytokines like TNF-α, IL-1β, and IL-6. These cytokines further exacerbate inflammation, creating a vicious cycle of oxidative stress and inflammatory responses.

The importance of mitophagy in cellular health and its role in disease prevention has been highlighted in various studies. For instance, studies have shown that enhancing mitophagy can alleviate oxidative stress and inflammation in neurodegenerative diseases and metabolic disorders<sup>14</sup>. Moreover, research indicates that promoting mitophagy can protect against myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing oxidative damage and inflammation<sup>15</sup>. In high-performance racehorses, where the energy demands and oxidative stress levels are elevated, enhanced mitophagy can support sustained energy production and stamina, which are critical for optimal performance. By maintaining mitochondrial health through effective mitophagy, racehorses can better manage the increased metabolic demands of intense physical activity. This not only improves their performance but also reduces the risk of oxidative stress-related damage and inflammation, thereby promoting overall health and longevity.

Our study aims to explore the therapeutic potential of astaxanthin in promoting mitophagy as a means to reduce oxidative stress and inflammation in racehorses. By in vitro demonstrating that astaxanthin enhances the expression of genes involved in the mitophagy process, such as PINK1 and PARKIN, we provide evidence for its role in improving mitochondrial quality and cellular resilience. This therapeutic approach highlights the importance of targeting mitochondrial health to mitigate the detrimental effects of oxidative stress and inflammation, thereby supporting the performance and well-being of high-performance racehorses. In our study, we discovered that the number of ROS-positive cells was reduced, the expression of pro-inflammatory cytokines was decreased, and mitophagy was modulated in PBMCs derived from astaxanthin supplemented

horses. These findings suggest that astaxanthin not only provides antioxidative and anti-inflammatory benefits but also enhances mitochondrial quality control mechanisms, offering a comprehensive approach to improving the health and performance of racehorses.

## Results

### Evaluation of the in vitro protective effect of astaxanthin against oxidative stress in horse-derived PBMCs

As shown at Fig. 1.A, treatment with  $H_2O_2$  (oxidative stress condition, OS) increased the number of ROS-positive cells, while decreased the number of ROS-negative cells. Most importantly, the addition of astaxanthin at either 10  $\mu$ M (OS + ASTA10) or 20  $\mu$ M (OS + ASTA20) partially restored the control phenotype by reducing the number of ROS-positive cells and increasing the number of ROS-negative cells (Fig. 1.A). These data were presented in bar graphs and statistically analyzed, showing that  $H_2O_2$  significantly increased ROS accumulation in cells (Fig. 1.B). Although astaxanthin decreased the ROS production by reducing the ROS-positive cells and increasing the ROS-negative cells, these changes were not statistically significant (Fig. 1.B).

The quantitative analysis of reactive nitrogen species (RNS) revealed that the addition of astaxanthin at 20  $\mu$ M increased the levels of cellular RNS, as shown by the decrease of RNS-negative cells and the increase of the number of RNS-positive cells (Fig. 2A–C). When the cell population was gated according to the cell viability (live/dead), the accumulation of RNS mentioned above was seen mainly in the live cell population (Fig. 2A,D). When focused on the dead cell population, it has been shown that astaxanthin reduced the number of RNS-positive cells, probably because most of the RNS-positive cells were still alive (Fig. 2A,E,F). Overall, these results suggest that horse-derived PBMCs do not induce RNS production in response to an external oxidative stress induction with  $H_2O_2$  and so that, in the tested conditions, astaxanthin increases the nitrosative stress.

To deeper characterize the antioxidant properties of astaxanthin in horse-derived PBMCs, the cells were challenged with  $H_2O_2$  and the expression of genes associated with the detoxification of oxidative stress were evaluated upon the treatment with astaxanthin. As shown in Fig. 3, none of the selected genes (*SOD1*, *NRF1*, *SOD2*, *CAT*, *NRF2*, *GPX*) was induced in the presence of  $H_2O_2$ . This might result from the sampling time since the gene expression might have been induced earlier and then inhibited once the genes have been transcribed and translated. Most importantly, the treatment with astaxanthin increased the gene expression of *NRF1*, *SOD2*, and *GPX* compared to the  $H_2O_2$ -treated condition (Fig. 3B,C,F). Altogether, the gene expression analysis indicates that the treatment with astaxanthin increased the expression of genes associated with the detoxification of oxidative stress and might prime the PBMCs to be protected against reactive oxygen species.

### Anti-inflammatory properties of astaxanthin in horse-derived PBMCs

Incubation with  $H_2O_2$  increased the protein expression levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$  and TNF $\alpha$ , indicating that horse PBMCs elicit an inflammatory response when stimulated with hydrogen peroxide (Fig. 4A–D). Interestingly, the addition of astaxanthin at 10  $\mu$ M decreased the inflammatory response by reducing the protein levels of INF $\gamma$  and TNF $\alpha$  (Fig. 4C,D). Most importantly, a concentration-dependent effect was observed for astaxanthin regarding its anti-inflammatory properties, demonstrated by the decrease of protein level of all tested cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$  and TNF $\alpha$ ) significantly different between the treatment with 10  $\mu$ M and 20  $\mu$ M (Fig. 4A–D). Altogether, these results indicate the anti-inflammatory potential of astaxanthin in horse-derived PBMCs.

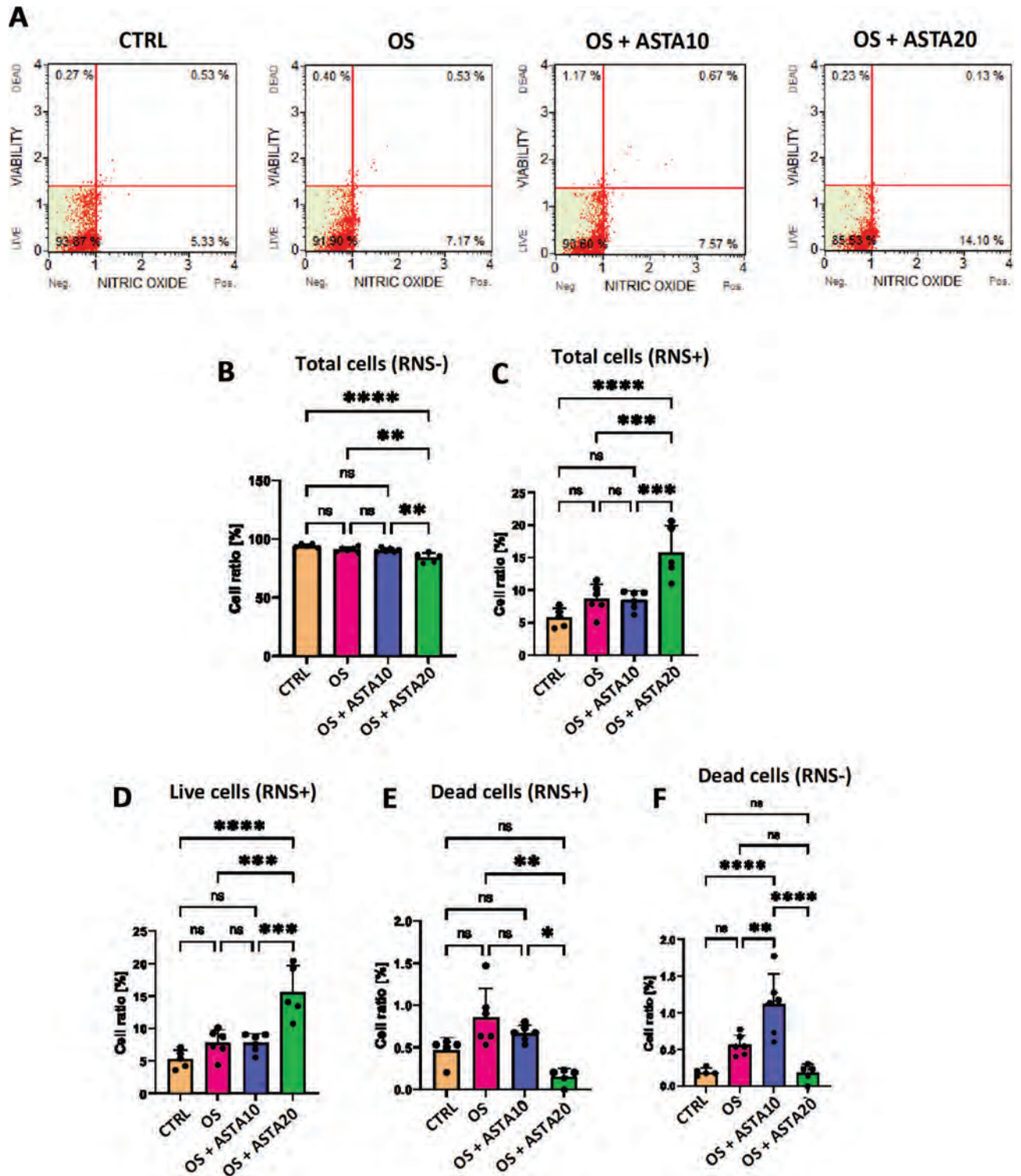
### The effect of astaxanthin oral supplementation in racehorses on the expression of genes associated with mitochondrial functionality and oxidative stress in PBMCs

The figures below (from Figs. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 and 17) represent the average relative gene expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) for the control and the astaxanthin supplemented groups at the three time points, together with the relative gene expression of all subjects individually.

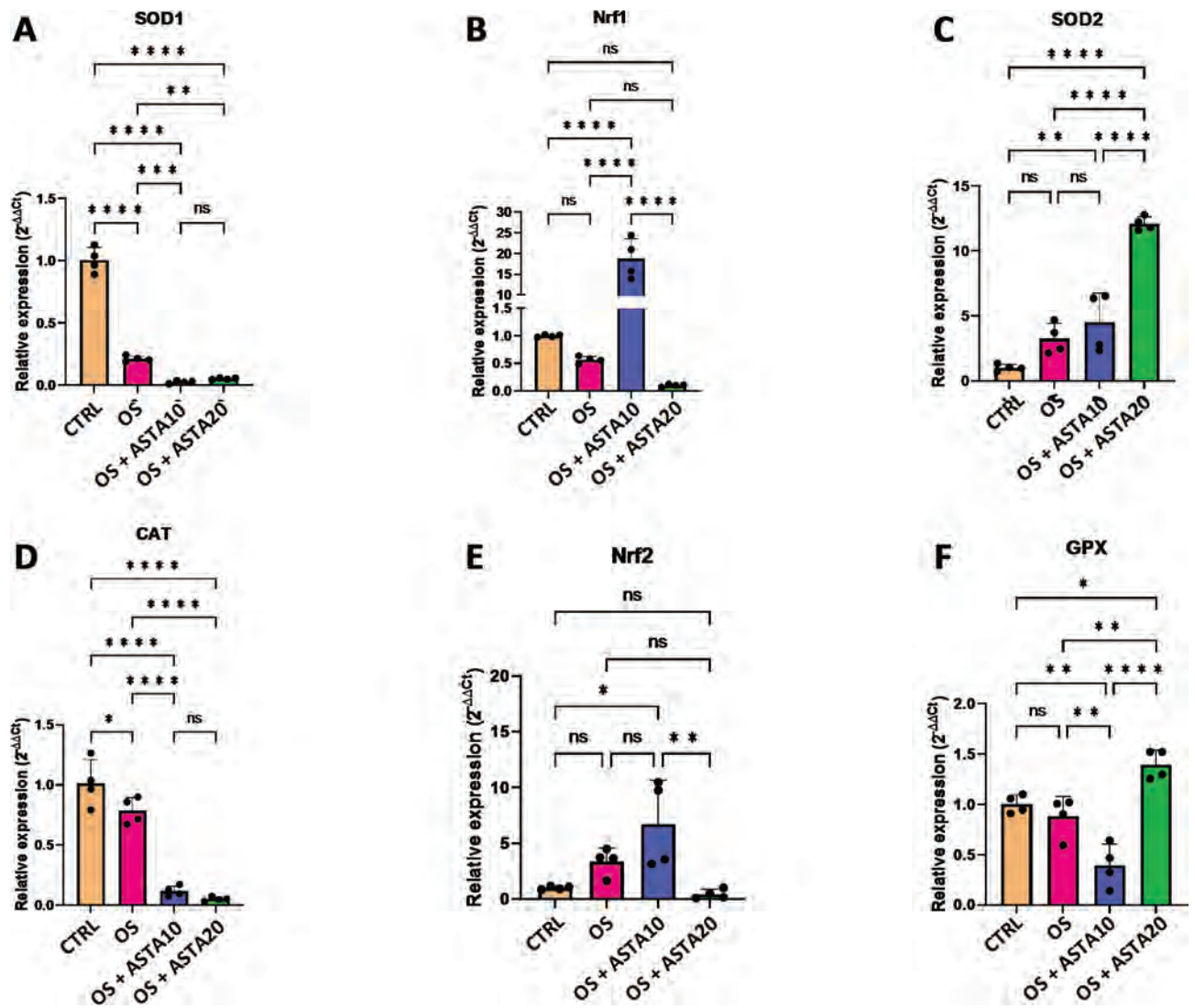
PINK1 (PTEN Induced Kinase 1) is a mitochondrial kinase directly related with the mitochondrial quality control, participating in the mitophagy process<sup>16</sup>. In damaged mitochondria, which are a source of reactive oxygen species that cause severe molecular damage to the cell, PINK1 is not properly internalized and binds to the outer mitochondrial membrane. Then, PINK1 recruits PARKIN (Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase) protein and target damaged mitochondria for degradation through autophagy<sup>16,17</sup>. Removal of damaged mitochondria therefore helps to reduce the accumulation of ROS, to limit the ROS-derived cellular damage such as lipid peroxidation, and make a more efficient use of the cellular energy. The presented results showed that, although at day 0 (baseline) the expression level of *PINK1* and *PARKIN* was lower in the supplemented group compared to the control group, 10 weeks after the supplementation the expression of *PINK1* and *PARKIN* increased compared to the control group, indicating that oral supplementation with astaxanthin induced the expression of these genes in vivo (Figs. 5 and 6). The expression level of *PARKIN* was already increased compared to control after only 5 weeks of supplementation (Fig. 6), demonstrating that this gene presented a faster response compared to *PINK1*. Overall, oral intake of the astaxanthin supplement increased the expression of genes involved in the mitophagy process that actively protect from cellular oxidative stress.

Further analyses indicate the impact of astaxanthin supplementation on the regulation of genes associated with mitochondrial dynamics and structure. *MIEF1* (mitochondrial elongation factor 1) encodes an outer mitochondrial membrane protein that participates in the mitochondrial membrane dynamics by regulating mitochondrial fission and fusion<sup>18</sup>. It has been shown that *MIEF1* deficiency impaired mitochondrial respiration and dynamics, leading to induced mitochondrial oxidative stress<sup>19</sup>. The results of the present study indicated that, initially, the *MIEF1* expression level was lower in the supplemented group than in the control group at day 0 (Fig. 7). However, the expression of the *MIEF1* gene was activated upon astaxanthin supplementation, being higher in the supplemented group after 5 weeks and 10 weeks (Fig. 7). The association of mitochondria





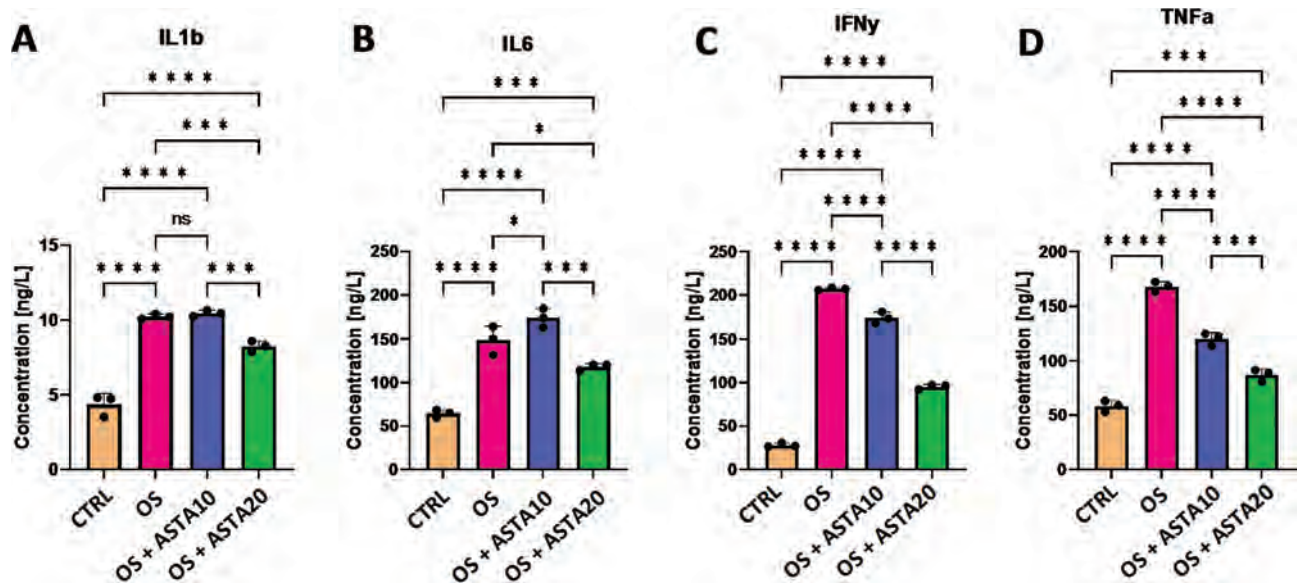
**Fig. 2.** Effect of astaxanthin in the nitrosative stress of horse PBMCs. RNS accumulation in control cells (CTRL), oxidative stress-induced cells (OS) and oxidative stress-induced cells treated with astaxanthin at 10  $\mu$ M (OS + ASTA10) or 20  $\mu$ M (OS + ASTA20) was tested using the Muse Analyzer Flow Cytometry. (A) Flow cytometry histograms show the percentage of viable and RNS-positive cells. (B–F) Bar graphs show the statistical analysis of all pairwise comparisons in RNS-negative and RNS-positive cells. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as: \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.



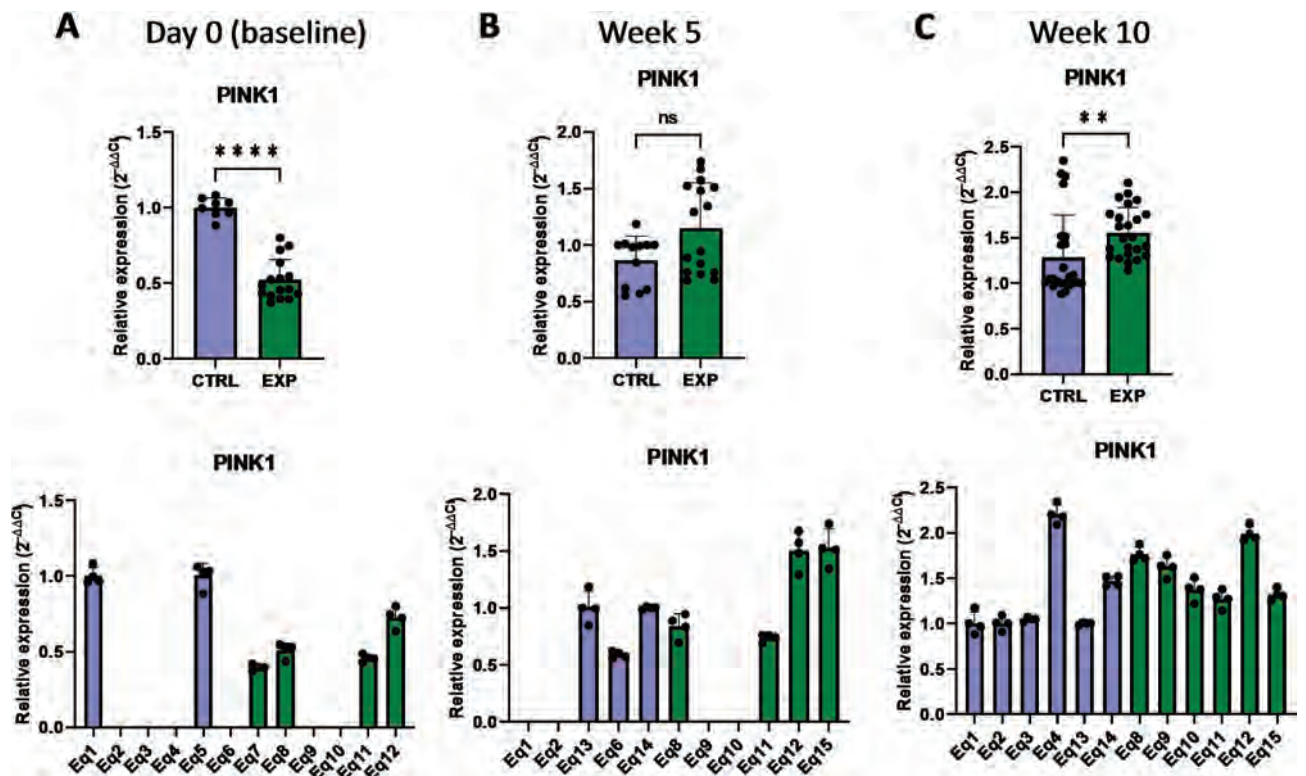
**Fig. 3.** Effect of astaxanthin on the gene expression of oxidative stress markers in horse PBMCs. (A–F) Analysis of the gene expression levels of selected oxidative stress markers (*SOD1*, *NRF1*, *SOD2*, *CAT*, *NRF2*, *GPX*) in control cells (CTRL), oxidative stress-induced cells (OS) and oxidative stress-induced cells treated with astaxanthin at 10  $\mu$ M (OS + ASTA10) or 20  $\mu$ M (OS + ASTA20) by qRT-PCR. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

and other cellular organelles are mediated by a number of proteins. Among them, *PIGBOS* (PIGB Opposite Strand) encodes for a microprotein that localizes to the mitochondrial outer membrane where it interacts with CLCC1, mediating in the unfolded protein response (UPR) originated by endoplasmic reticulum stress. It has been demonstrated that loss of *PIGBOS* leads to heightened UPR and increased cell death<sup>20</sup>. In this regard, the presented results demonstrated that the expression of *PIGBOS* increased in response to the oral supplementation with astaxanthin, evidenced by the increased mRNA levels of *PIGBOS* after 5 weeks compared to the control group (Fig. 8). Collectively, these results demonstrate that astaxanthin promotes the expression of genes that participate in the structure and function of mitochondria.

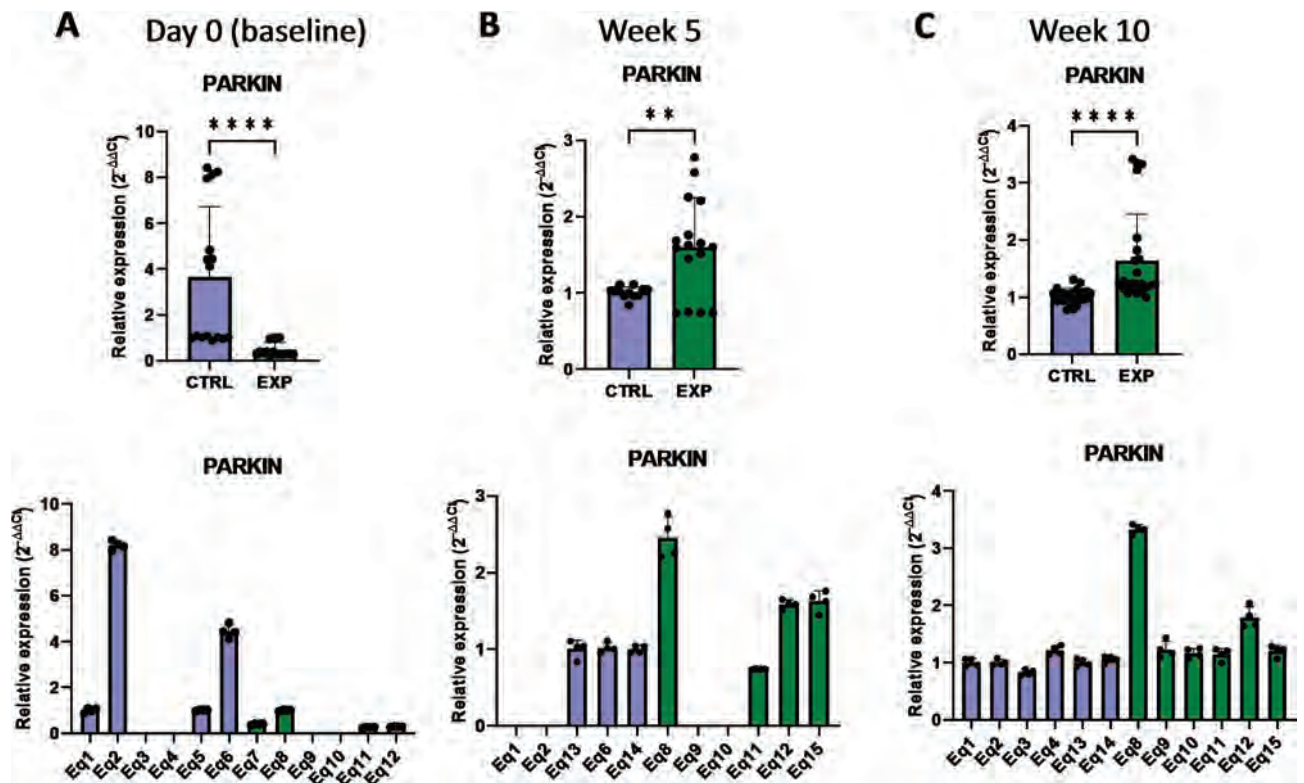
In order to evaluate whether the supplementation with astaxanthin regulates the expression of genes involved in the energy metabolism of the cell, some genes associated with the mitochondrial processes linked to ATP production we selected for further analyses. *PPARGC1A* and *PPARGC1B* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha/beta) are transcriptional coactivators of the PPAR superfamily highly expressed in oxidative tissues, participating in the oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation<sup>21,22</sup>. *PPARGC1A* is actively involved in reactive oxygen species detoxification by regulating the expression of mitochondrial antioxidant genes, such as manganese superoxide dismutase, catalase, peroxiredoxin 3 and 5, uncoupling protein 2, thioredoxin 2, and thioredoxin reductase<sup>21,22</sup>. *PPARGC1B* specifically enhances the mitochondrial activity and anabolic profile by the effect on the mitochondrial function and protection from oxidative stress<sup>21</sup>. The analysis of PBMCs isolated from supplemented horses revealed that the basal expression



**Fig. 4.** Effect of astaxanthin on the inflammatory response of horse PBMCs. (A–D) Analysis of the protein levels of selected pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) in control cells (CTRL), oxidative stress-induced cells (OS) and oxidative stress-induced cells treated with astaxanthin at 10  $\mu$ M (OS + ASTA10) or 20  $\mu$ M (OS + ASTA20) by ELISA. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.



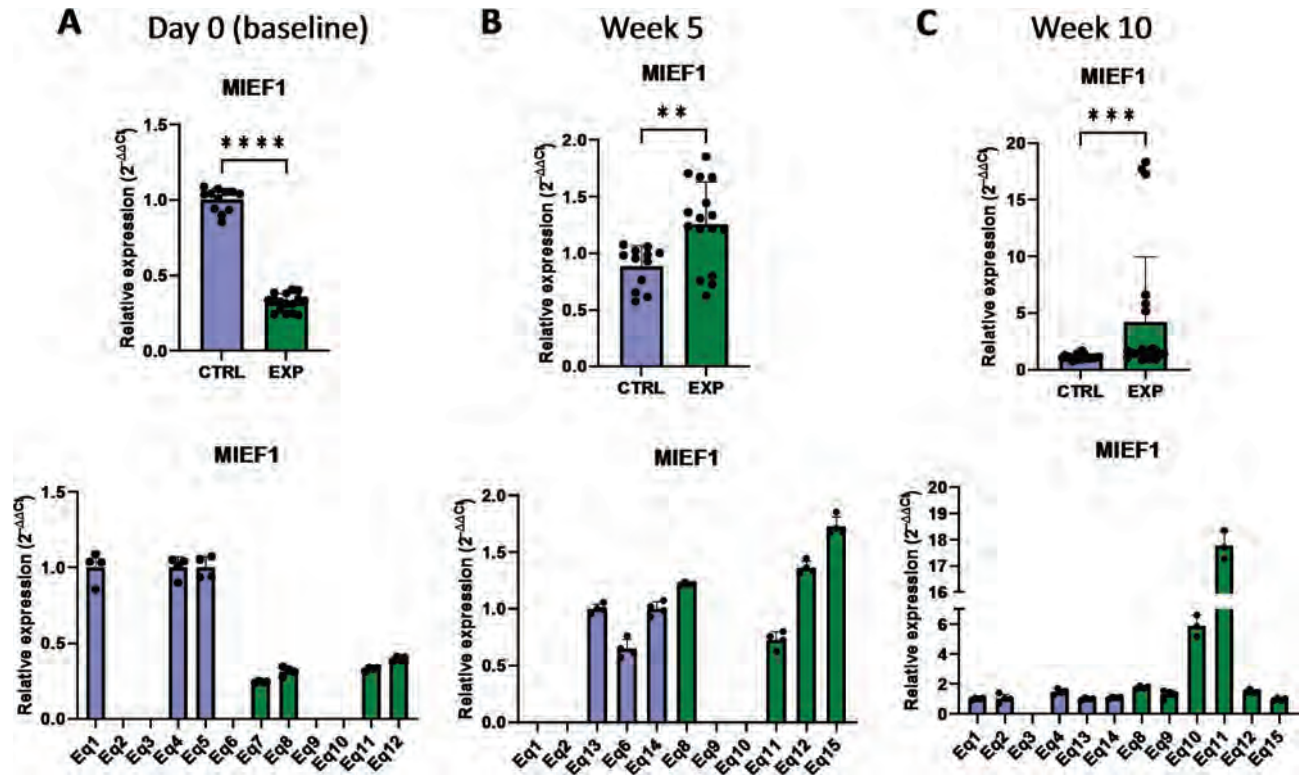
**Fig. 5.** Effect of the oral astaxanthin supplementation in the *PINK1* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *PINK1* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.



**Fig. 6.** Effect of the oral astaxanthin supplementation in the *PARKIN* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *PARKIN* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

levels of *PPARGC1A* were similar in the control and supplemented group, and astaxanthin intake did not change this phenotype during the 10 weeks period (Fig. 9). However, *PPARGC1B* expression responded to the astaxanthin supplementation, since its expression levels were initially lower in the supplemented group at day 0 but increased at week 5, being higher than in the control group (Fig. 10). Mitochondria produce most of the cellular energy during the oxidative phosphorylation process. In this regard, *NDUFA9* (NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A9) encodes for a protein subunit of the complex I, and lack of a functional *NDUFA9* has been associated with defects of the assembly and stability of this complex<sup>23,24</sup>. According to the results presented in this study, astaxanthin supplementation for 5 weeks increased the expression levels of *NDUFA9* compared to the control group (Fig. 11). Altogether, the results showed that supplementation with astaxanthin increases the expression of genes related to the energy production in mitochondria.

Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes for proteins and enzymes directly related to the mitochondrial function and structure. The alteration of the mitochondrial gene expression machinery might lead to an impaired mitochondrial function and generate lethal levels of reactive oxygen species. In this regard, a key structural component of mitochondria is *MRPL24* (mitochondrial ribosomal protein L24), the mitochondrial ribosomal protein large 24, which is 1 of the 82 protein components of mitochondrial ribosomes, playing an essential role in the mitochondrial translation process<sup>25</sup>. Indeed, it has been shown that absence or deficiency of this family of proteins may cause primary oxidative phosphorylation disorders<sup>25</sup>. Interestingly, the expression level of *MRPL24* gene was lower in supplemented group at baseline compared to the control group, but this phenotype changed to a higher expression in the astaxanthin-supplemented group after 10 weeks (Fig. 12). Another important structural and functional component of mitochondria is *PUSL1* (tRNA pseudouridine synthase-like 1), a mitochondrial matrix protein and interacts with the mitoribosome, being required for the translation of transcripts within mitochondria<sup>26</sup>. These transcripts include key membrane proteins of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) machinery located in the mitochondrial inner membrane, whose deficiency or malfunction may generate reactive oxygen species within mitochondria. Closely related to *PUSL1*, the transcriptional regulator *TFAM* (mitochondrial transcription factor A) is required for protein transcription, replication and packaging of mtDNA<sup>27</sup>. In this case, supplementation with astaxanthin increased the *PUSL1* and *TFAM* expression levels after 5 weeks compared to the control group (Figs. 13 and 14). Indeed, in the case of *TFAM*, this increase in expression levels was extended up to 10 weeks, despite initially (at baseline) lower levels of expression than in the control group (Fig. 14).

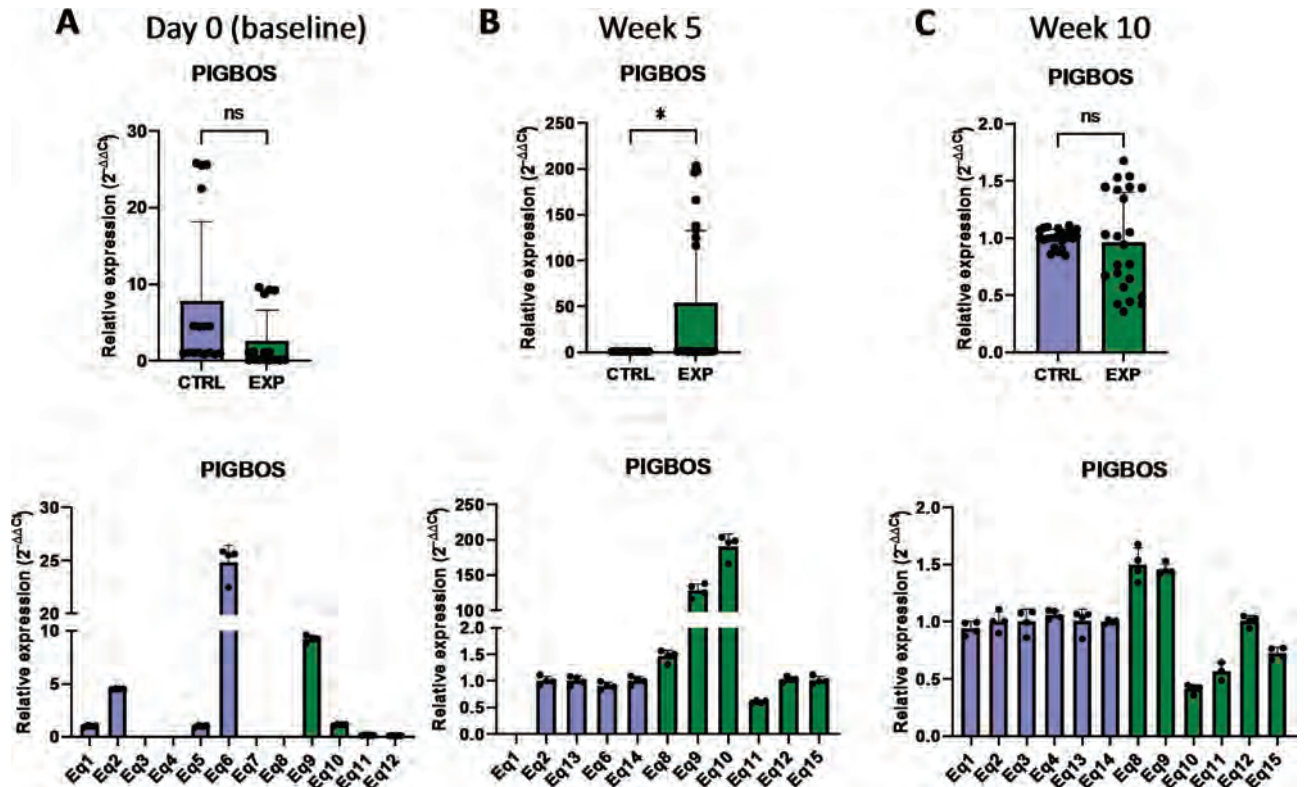


**Fig. 7.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *MIEF1* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *MIEF1* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

The expression of other genes associated with the protein expression within mitochondria, such as *OXA1L* (mitochondrial Inner Membrane Protein OXA1L) and *UQCRC2* (ubiquinol-cytochrome C reductase core protein 2)<sup>28,29</sup>, was not affected by astaxanthin supplementation (Figs. 15 and 16). In addition, no changes were observed in the expression of the FIS gene, involved in the mitochondrial fission (Fig. 17). Overall, these results revealed that the expression of genes involved in the metabolism of mtDNA is promoted in vivo upon supplementation with astaxanthin.

## Discussion

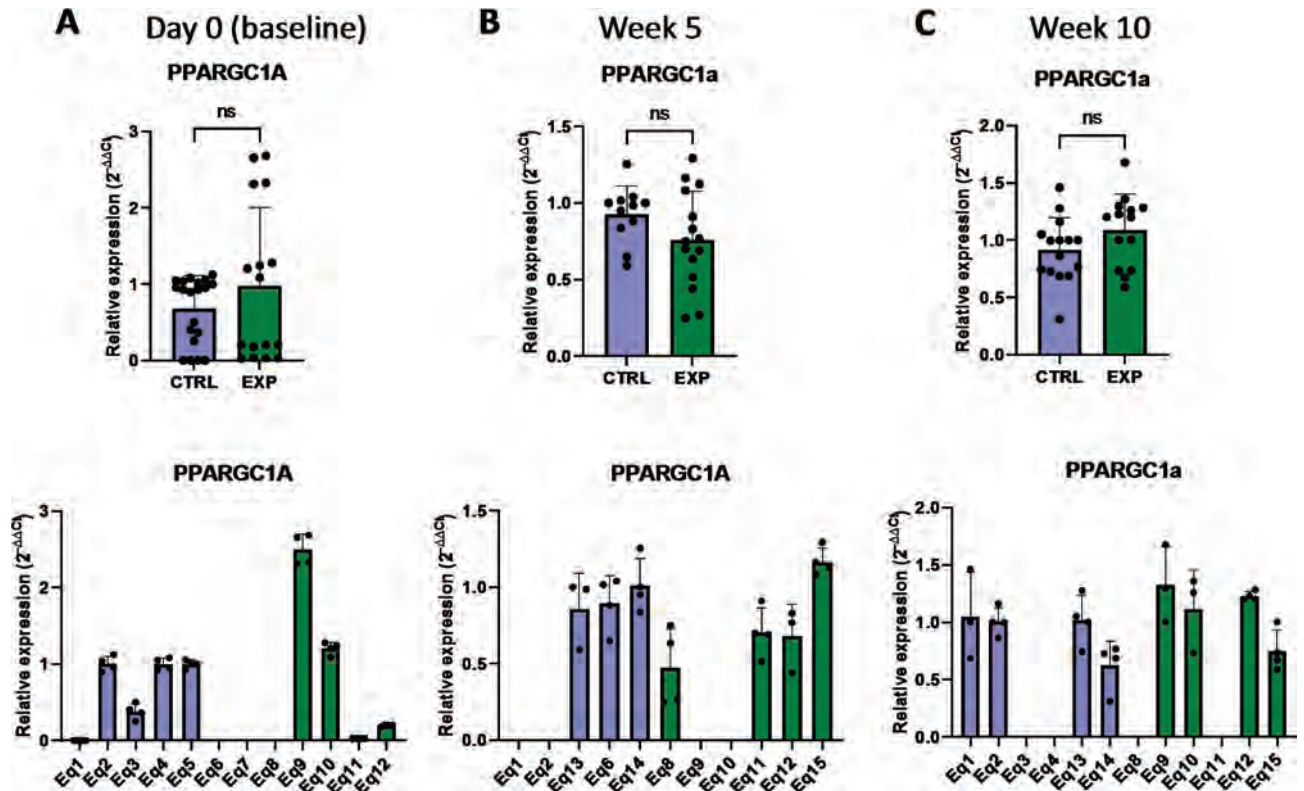
In horses, oxidative stress is a common issue that can lead to various health problems, including inflammation and compromised cellular functions. The present study aimed to evaluate the protective effects of astaxanthin against oxidative stress in horse-derived peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and to explore its potential anti-inflammatory properties and the effects on mitochondrial function. It has been demonstrated that astaxanthin exerts a positive effect on reducing the number of ROS-positive cells that were induced by oxidative stress. The application in vitro of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) significantly increased the number of ROS-positive cells in horse-derived PBMCs, indicating induced oxidative stress. However, the addition of astaxanthin at the concentrations of 10 μM (OS+ASTA10) and 20 μM (OS+ASTA20) partially restored the cellular phenotype, as shown by a reduction in the number of ROS-positive cells and an increase in ROS-negative cells. Although these changes were not statistically significant, they suggest a trend towards the antioxidative effect of astaxanthin. This observation aligns with previous research demonstrating the antioxidant capacity of astaxanthin in various cell types, including its ability to scavenge free radicals and reduce oxidative damage<sup>5,30</sup>. Furthermore, the quantification of reactive nitrogen species (RNS) revealed an interesting phenomenon where astaxanthin increased the levels of cellular RNS, particularly in the alive cell population. This unexpected result suggests a complex interaction between astaxanthin and nitrosative stress pathways. The differential impact on RNS and ROS indicates that while astaxanthin can mitigate oxidative stress, it might also modulate nitrosative pathways, possibly through a feedback mechanism that needs further exploration<sup>31</sup>. Moreover, daily astaxanthin supplementation for 5 and 10 weeks increased the expression of *NRF1*, *SOD2*, and *GPX*, suggesting its role in priming cells for enhanced antioxidative responses. This is consistent with findings from other studies where astaxanthin supplementation upregulated antioxidant genes and enzymes, thus providing cellular protection against oxidative stress<sup>32</sup>.



**Fig. 8.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *PIGBOS* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *PIGBOS* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

The results proved also the anti-inflammatory potential of astaxanthin, related to its antioxidative properties. In vitro treatment of horse-derived PBMCs with  $H_2O_2$  increased the protein expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , and TNF $\alpha$ , indicating an inflammatory response and elevated oxidative stress levels. This is consistent with the well-documented phenomenon where oxidative stress can trigger inflammatory pathways, leading to the activation of immune cells and the release of pro-inflammatory cytokines. The addition of astaxanthin, particularly at 20  $\mu$ M, significantly reduced the levels of these cytokines in a concentration-dependent manner. This decrease in cytokine levels suggests that astaxanthin effectively mitigates both oxidative stress and the subsequent inflammatory response. The antioxidant action of astaxanthin likely interrupts the feedback loop between oxidative stress and inflammation, thereby reducing the overall inflammatory burden. These findings are supported by previous studies that have shown the anti-inflammatory effects of astaxanthin, including the inhibition of pro-inflammatory cytokine production and suppression of NF- $\kappa$ B signaling pathways. For instance, Kim et al. (2011) reported that astaxanthin protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage and inflammatory responses by inhibiting NF- $\kappa$ B activation<sup>33</sup>. Similarly, Park et al. (2010) demonstrated that astaxanthin supplementation decreased oxidative stress and inflammation in humans<sup>34</sup>, highlighting its potential as a therapeutic agent for inflammatory conditions.

The in vivo trial with horses further corroborated the in vitro findings. Our study focused on astaxanthin supplementation as a clinical treatment for influencing oxidative stress and inflammation, chosen over other approaches such as photobiomodulation, electrical stimulation, and ultrasound treatment, which may offer different and/or complementary effects. Oral supplementation with astaxanthin led to increased expression of genes associated with mitochondrial functionality and oxidative stress mitigation. Specifically, the expression of *PINK1* and *PARKIN*, genes involved in the mitophagy process, was elevated, indicating enhanced mitochondrial quality control mechanisms. This is particularly important for racehorses, as efficient mitophagy helps maintain optimal cellular function and energy production under the high metabolic demands of intensive physical activity. Mitophagy, the selective degradation of damaged mitochondria by autophagy, is crucial in preserving mitochondrial health and preventing cellular dysfunction. Mitophagy study is widely conducted through gene expression analysis, which provides valuable insights into the regulatory mechanisms governing this process<sup>35,36</sup>. In the context of high-performance racehorses, maintaining robust mitochondrial function is vital for sustaining stamina and performance. The presented findings that astaxanthin supplementation enhances mitophagy through the upregulation of *PINK1* and *PARKIN* genes suggest that astaxanthin could play a significant role



**Fig. 9.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *PPARGC1A* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *PPARGC1A* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

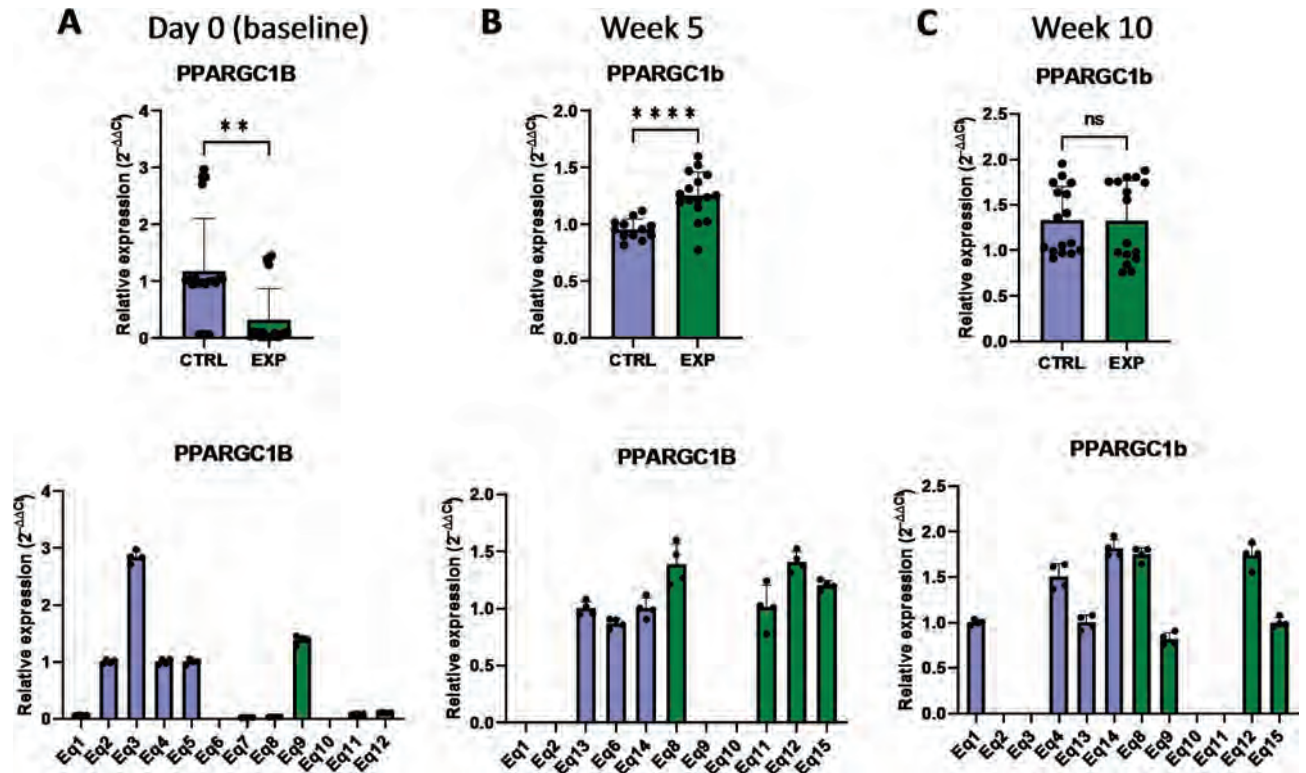
in improving mitochondrial quality and overall cellular health in racehorses. This aligns with studies showing that astaxanthin promotes mitophagy and protects cells from oxidative stress-induced mitochondrial damage<sup>37</sup>. Additionally, astaxanthin enhanced the expression of genes linked to mitochondrial dynamics (*MIEF1* and *PIGBOS*) and energy metabolism (*PPARGC1B*, *NDUFA9*). The increased expression of these genes suggests that astaxanthin supplementation enhances mitochondrial structure, function, and bioenergetics, thus supporting cellular health and reducing oxidative damage. This is supported by previous research, which has demonstrated that improved mitochondrial dynamics and energy metabolism are associated with better cellular health and reduced oxidative stress<sup>38</sup>. Since the detailed characterization of mitophagy and mitochondrial dynamics, as well as gender-based differences, were beyond the scope of this study, future research performed with a different study design will be crucial to further elucidate these aspects. Importantly, while our findings in Arabian racehorses align with those in other large mammals<sup>7,8,34,39</sup>, species-specific differences in metabolism, immune responses, and oxidative stress susceptibility may influence astaxanthin's effects. Monogastric species like horses and dogs absorb astaxanthin likely differently than ruminants, where fermentation might alter its bioavailability. Additionally, oxidative stress in racehorses is exercise-induced, whereas in cattle, it is linked to metabolic disorders. Altogether, although horses share some physiological and metabolic characteristics with other mammals, significant differences exist, especially in training responses and disease susceptibility, hence, results from equine studies cannot be directly extrapolated to humans.

Overall, the findings presented in this study indicate that astaxanthin has significant potential as an antioxidant and anti-inflammatory agent in horse-derived PBMCs. The *in vivo* data further support its role in enhancing mitochondrial function and protecting against oxidative stress. These results suggest that astaxanthin could be a valuable dietary supplement for equine health, promoting resilience against oxidative and inflammatory challenges.

## Materials and methods

### Horses and blood sampling

The *in vivo* part of this study included 12 (7 stallions and 5 mares) privately owned 3-year-old Arabian horses in regular training for flat races at Służewiec Race Track in Warsaw. All horses were from the same training stable, were trained by one trainer and maintained similar training level during the study. They were kept in standard stalls, fed on a standard diet for racing Arabians, including hay, oats, and concentrate balanced to



**Fig. 10.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *PPARGC1B* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *PPARGC1B* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

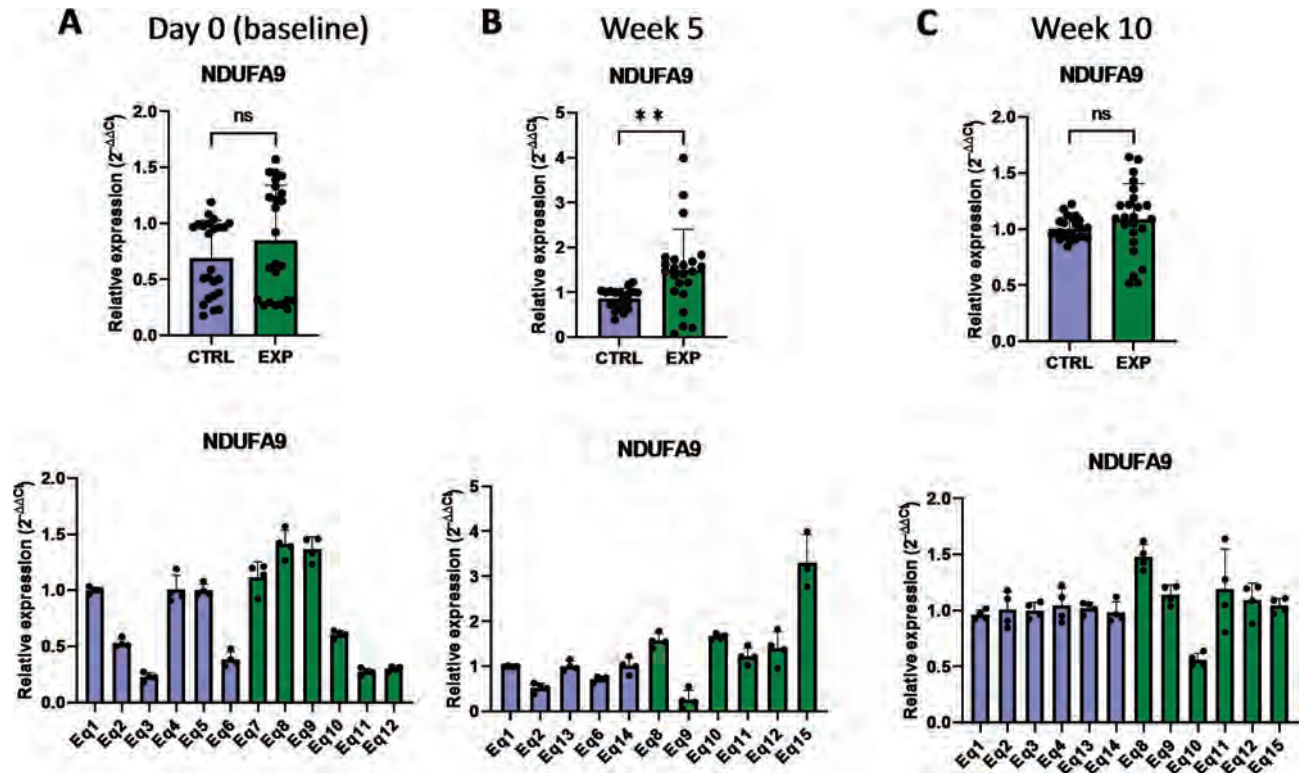
meet the nutritional recommendations. Salt and water were available *ad libitum*. The horses were clinically healthy, as confirmed by a certified vet surgeon; dewormed and vaccinated according to the routine schedule, not earlier than 3 weeks before the onset of the study. In the case of concomitant disabilities or diseases, horses were excluded from the study.

At the beginning of the study (in April) the horses were randomly allocated in the supplemented group (4 stallions and 2 mares) and control group (3 stallions and 3 mares). The supplemented group received daily astaxanthin supplementation, orally, at a dose of 250 mg per horse which corresponded to the dose of 0.52–0.58 mg/kg body weight. The control group received placebo (physiological saline). Stallions and mares trained together in a mixed group with the same intensity at the same place (Służewiec Racetrack in Warsaw), according to the exercise schedule designed by the trainer.

Blood samples were collected monthly (week 0 – before supplementation and during supplementation in week 5 and week 10) as a part of health examination, in the morning, before any activity, from the jugular vein. During the sampling procedure, the horses were handled by their regular riders to minimize the stress, as recommended by the Ethical Committee guidelines. All the procedures of blood sampling were performed as part of routine health examination, therefore, according to the European directive EU/2010/63 and Polish regulations regarding experiments on animals, there was no need for the approval of the Ethics Committee for the described procedures, which qualified as non-experimental clinical veterinary practices, and excluded from the directive. A written consent for the use of blood for scientific analyses was obtained from the trainer.

### Isolation and culture of horse peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Fresh blood from horses was collected into heparin tubes. PBMCs isolation was performed as described previously<sup>40</sup>. Briefly, PBMCs were isolated by density gradient centrifugation for 30 min at 400 g, at room temperature (MPW-352R, MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland), using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich/Merck, Poznan, Poland). A buffy coat layer of PBMCs cells was collected and washed three times with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Merck, Poznan, Poland). Cells were cultured on cell culture flask 25 cm<sup>2</sup> in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich/Merck, Poznan, Poland) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich/Merck, Poznan, Poland) and 1% penicillin-streptomycin antibiotic (PS, Biowest). Cells were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.



**Fig. 11.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *NDUFA9* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *NDUFA9* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

### Induction of oxidative stress in PBMCs

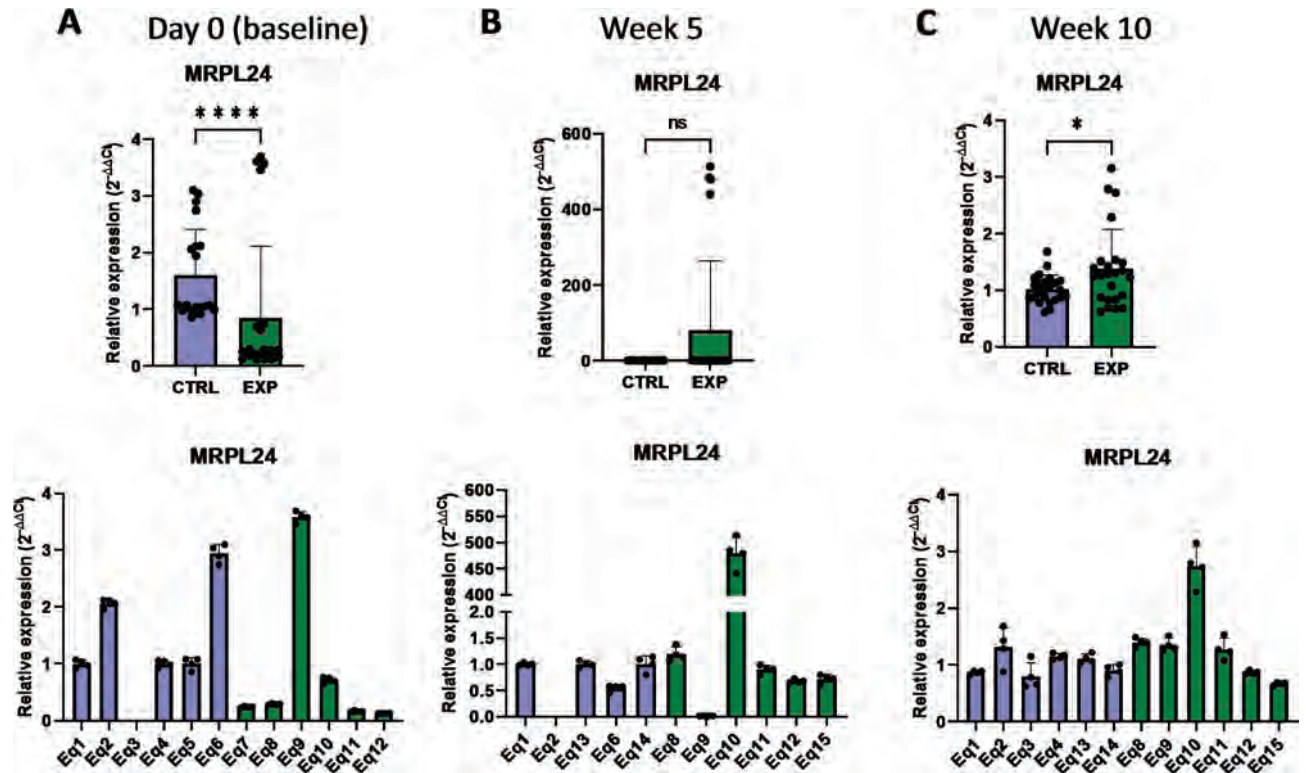
PBMCs were suspended at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml and treated with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) at a concentration of 100  $\mu M$  in culture medium without FBS to induce cellular oxidative stress, as previously described<sup>41</sup>. After 6 hours, cells were treated with astaxanthin at 10  $\mu g/ml$  and 20  $\mu g/ml$  for 24 h<sup>4</sup>. Then, the expression of selected markers at gene and protein level, the oxidative stress and the nitrosative stress were assessed as described below.

### MUSE analysis of oxidative stress and nitrosative stress of PBMCs

Oxidative stress was analyzed using the Muse Oxidative Stress Kit (Luminex/Merck, Poznan, Poland) and nitric oxide levels using MUSE Nitric Oxide Kit (Luminex/Merck, Poznan, Poland)<sup>42</sup>. Analysis was performed according to the protocol from the manufacturer. Readings were taken using a MUSE Cell Analyser (Sigma-Aldrich/Merck, Poznan, Poland).

### Quantitative Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from PBMCs following the previously described method of Chomczynski and Sacchi<sup>43</sup>. Blood was collected into the Tempus™ Blood RNA Tubes (Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland) and poured into a 50 ml falcon tube. The total volume was brought to 12 ml by the addition of PBS (Merck, Poznan, Poland). The tubes were vortexed vigorously at maximum vortex speed for 30 s. The samples were then centrifuged at 4 °C at 4000xg for 30 min (MPW-352R, MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland). The pellet was suspended in 400  $\mu l$  RNA Wash Buffer 1 (BLIRT S.A, Gdansk, Poland) and then the total RNA was isolated using Extractme Total RNA Kit (BLIRT S.A, Gdansk, Poland) according to the manufacturer's instructions. The purity and quantity of RNA was assessed at 260 and 280 nm with a spectrophotometer (Epoch, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). 300 ng of total RNA was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland) to remove genomic DNA. cDNA was then synthesized on the RNA template using RevertAid RT (Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland) according to the manufacturer's protocols. Digestion of genomic DNA and cDNA synthesis were performed using a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The obtained cDNA was then used for quantitative PCR. Gene expression levels were evaluated using SensiFAST SYBR Green Kit (Bioline, London, UK)<sup>44</sup>. 5  $\mu l$  of SensiFAST SYBR Master mix, 2.5  $\mu l$  of targeted primer and 2.5  $\mu l$  of tested cDNA were added to each reaction. All RT-qPCR reactions were performed using CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and BioRad CFX Maestro software. Thermal cycle conditions were as



**Fig. 12.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *MRPL24* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *MRPL24* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

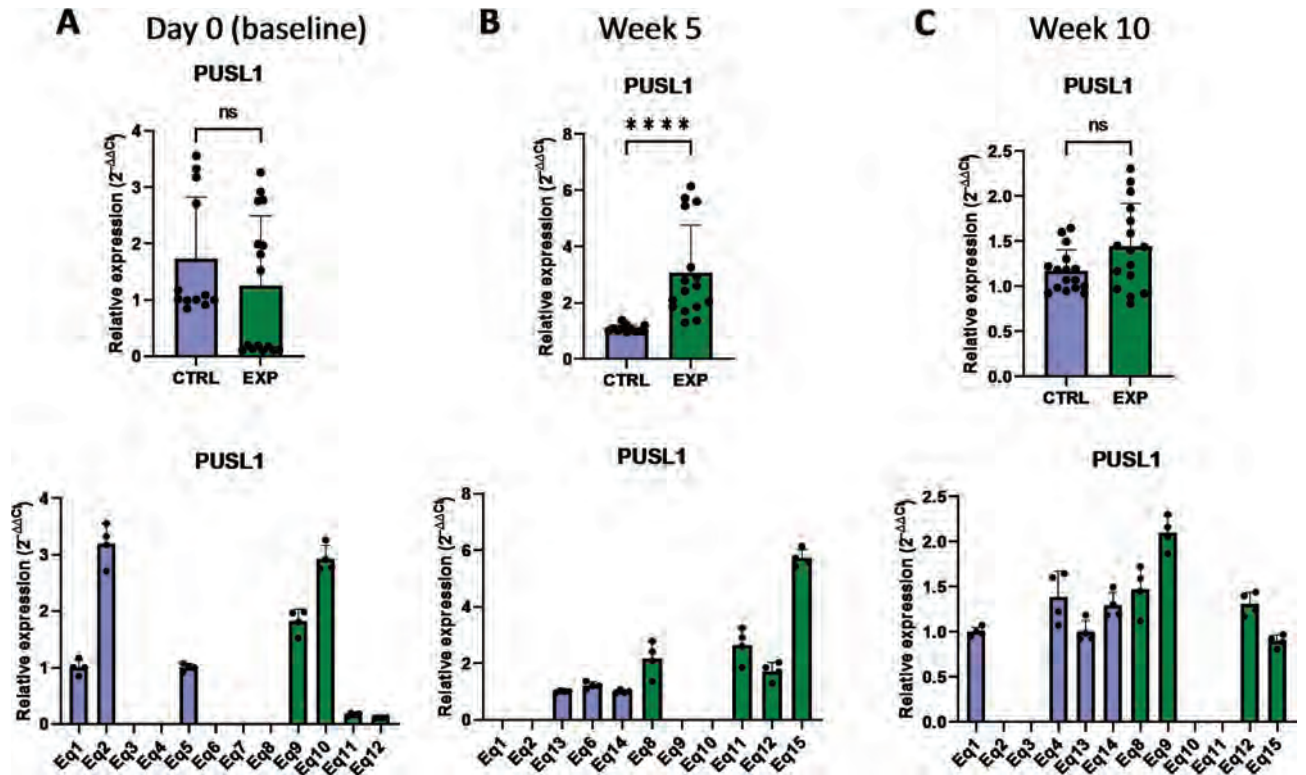
follows: 95 °C for 2 min, then 40 cycles at 95 °C for 15 s, annealing for 15 s in temperature specified for tested primers, and elongation at 72 °C for 15 s. The transcript levels were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) as a control and calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CQ}$  method. The sequences for all used primers are listed in Table 1.

#### Analysis of protein levels using ELISA assays (IL1 $\beta$ , IL6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )

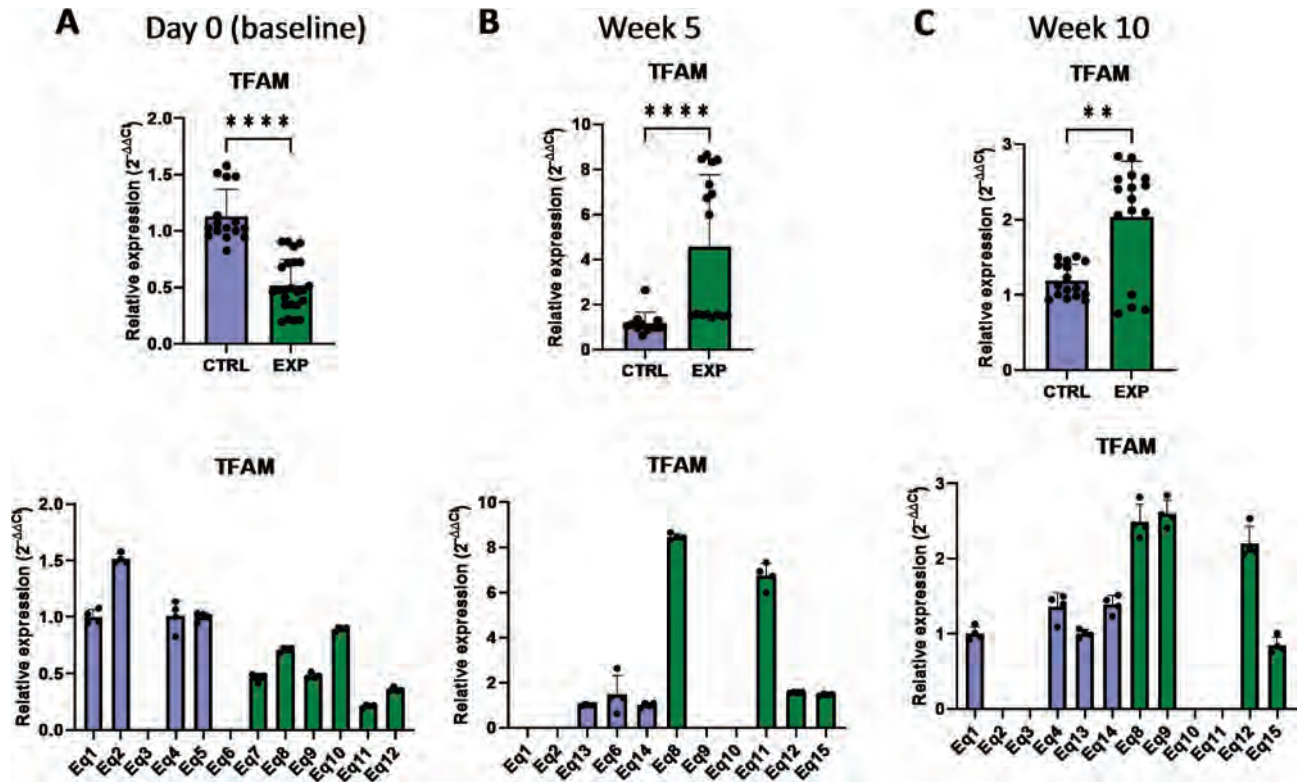
Protein levels of IL1 $\beta$ , IL6, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  were analyzed in culture media using enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) as previously described<sup>40</sup>. For this purpose, the Horse Interleukin 1 Beta ELISA Kit, Horse Interleukin 6 ELISA Kit, Horse Interferon  $\gamma$  ELISA Kit and Horse Tumour Necrosis Factor Alpha ELISA Kit (BT LAB) were used. Analyses were performed according to the manufacturer's protocols and readings were taken at 450 nm using a plate reader (Epoch, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany).

#### Statistical analysis

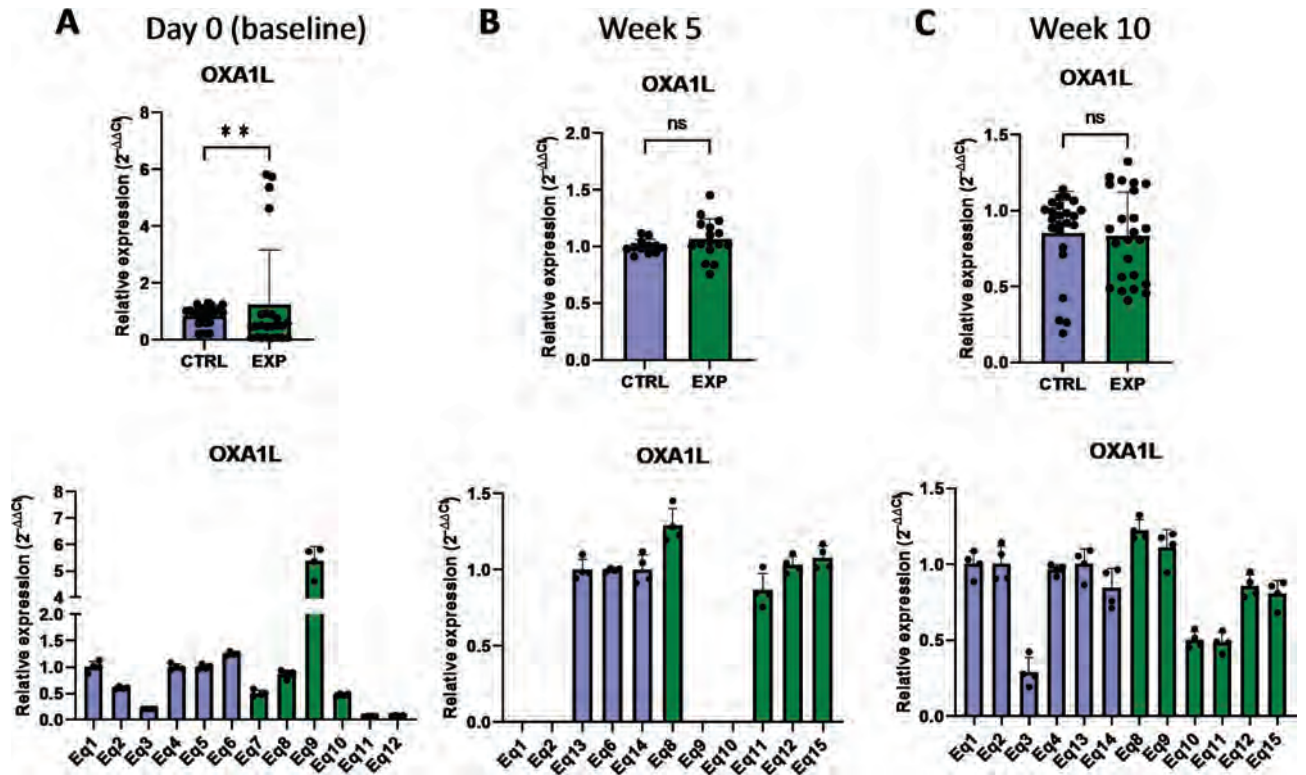
Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9 software (La Jolla, CA, USA). Data were analyzed using One-way ANOVA with Tukey's post-hoc correction. Statistically significant differences are indicated with asterisks and depicted as follows;  $p < 0.05$  as \*,  $p < 0.01$  as \*\*,  $p < 0.001$  as \*\*\*,  $p < 0.0001$  as \*\*\*\*.



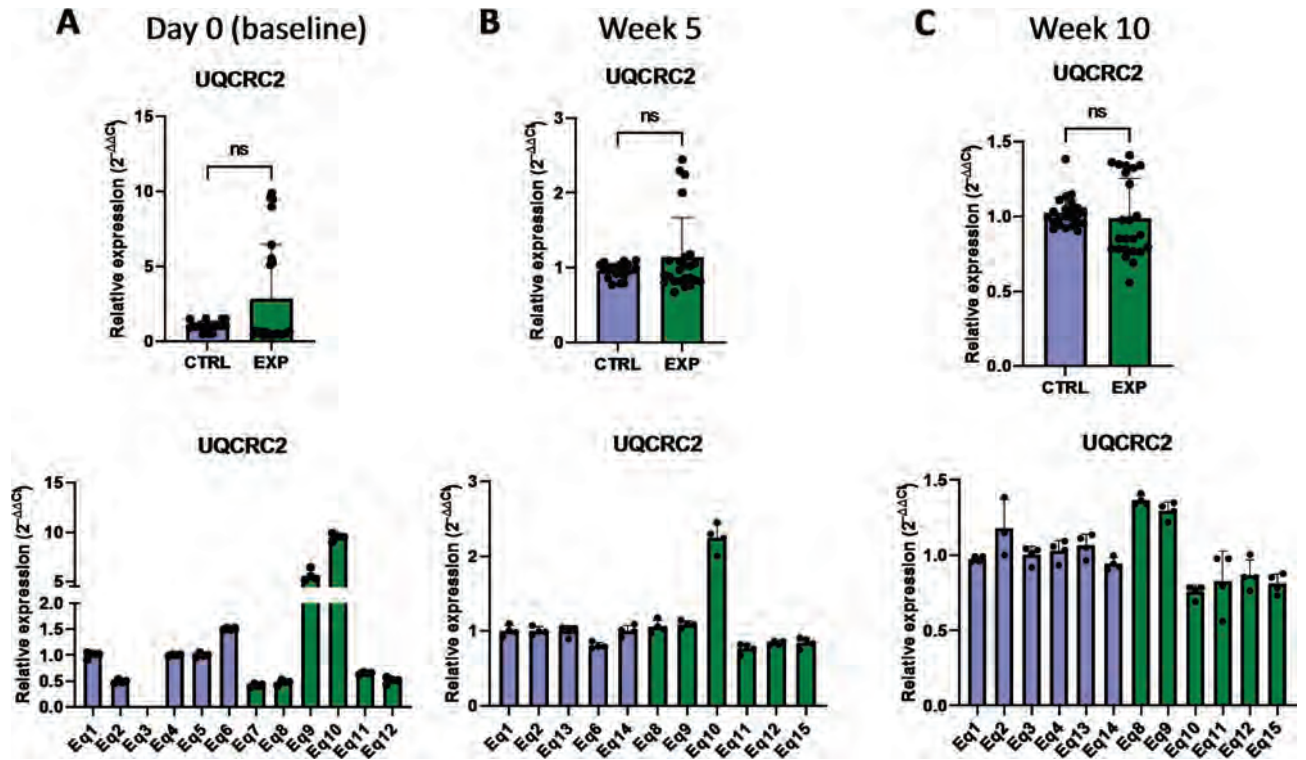
**Fig. 13.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *PUSL1* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *PUSL1* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.



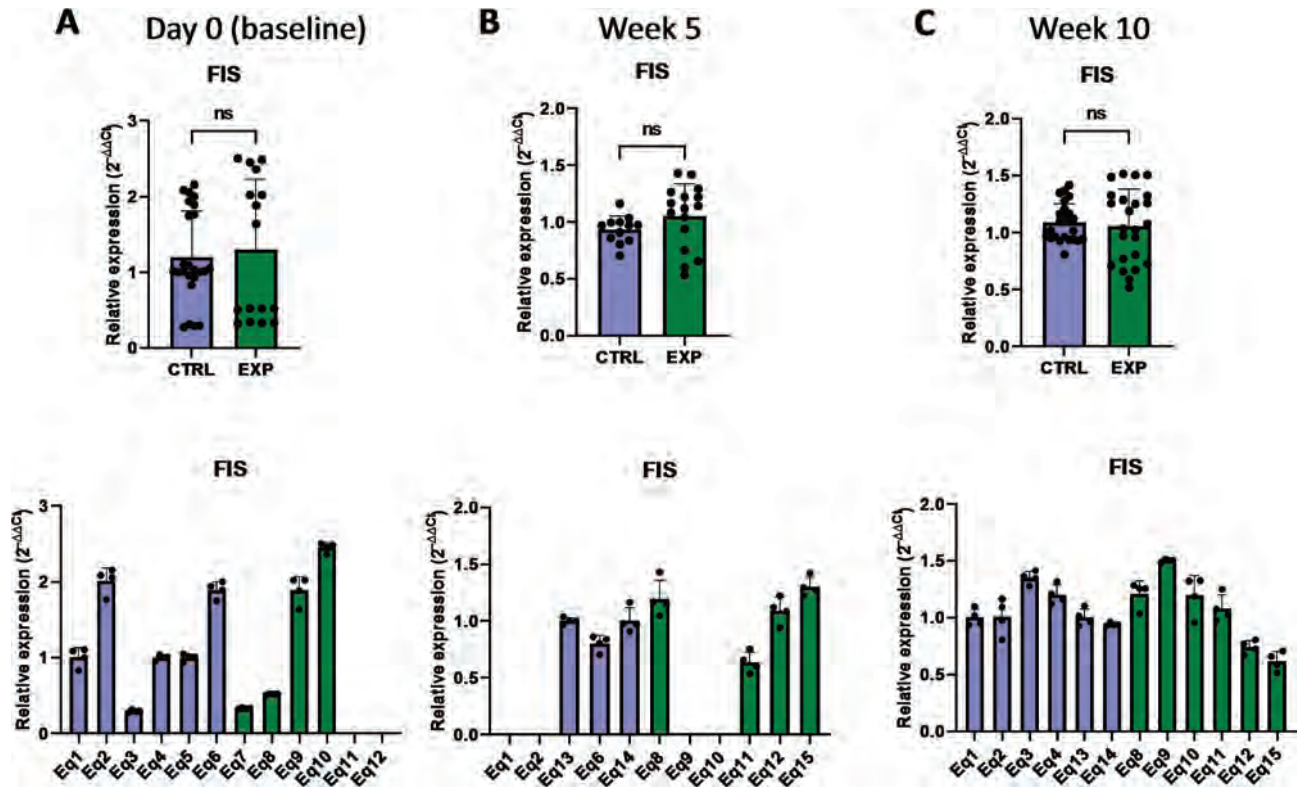
**Fig. 14.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *TFAM* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *TFAM* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.



**Fig. 15.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *OXA1L* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *OXA1L* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.



**Fig. 16.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *UQCRC2* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *UQCRC2* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.



**Fig. 17.** Effect of the oral astaxanthin supplementation on the *FIS* gene expression of horse-derived PBMCs. Analysis of the *FIS* gene expression levels by qRT-PCR at day 0 (A), week 5 (B) and week 10 (C) in horse-derived PBMCs. CTRL, non-treated control; EXP, supplemented group. Graphs in the top row represent the average of all subjects, and graphs in the bottom row represent the values for each subject individually. Mean and standard deviation are given. Statistical significance is depicted as; \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001, \*\*\*\* p-value < 0.0001; ns, not significant.

Gene	Primer	Primer sequence 5'-3'	Amplicon Length (bp)	Accession No.
<i>SOD1</i>	F: R:	CATTCCATCATTGGCCGCAC GAGCGATCCCAATCACACCA	130	NM_001081826.3
<i>Nrf1</i>	F: R:	GGATTGTGCCTTCCATTCTCTG TCCAATGTCACCACCTCCACA	193	XM_014739148.2
<i>SOD2</i>	F: R:	GGACAAACCTGAGCCCAAT TTGGACACCAGCCGATACAG	125	NM_001082517.2
<i>CAT</i>	F: R:	ACCAAGGTTTGGCCTCACAA TTGGGTCAAAGCCAACCTGT	112	XM_014729341.2
<i>Nrf2</i>	F: R:	AAACCAGTGGGTCTGCCAA AATGAAGTCTGGGCTCTCGATG	188	XM_001496992.5
<i>GPX</i>	F: R:	TCGAGCCCAACTTCACACTC AAGTCCAGGCGACATCGTT	178	NM_001166479.1
<i>Pink1</i>	F: R:	GCACAATGAGCCAGGAGCTA GGGGTATTACGCGAAGGTA	298	XM_014737247.2
<i>PARKIN</i>	F: R:	CTGGAGGATTTAGTCCCGGAGC CCATGGCTGGAGTTGAACCTG	138	XM_005608126.3
<i>MIEF1</i>	F: R:	ATGCTGGGCATCGTACAC CGGAGCCGTGACTTCTCAA	284	XM_023631522.1
<i>PIGBOS</i>	F: R:	GTTGGGGTGGCTCAGATCAA ACCCCTCCTTACCGCTACT	126	XM_014733689.2
<i>PPARGC1A</i>	F: R:	TCTACCTAGGATGCATGG GTGCAAGTAGAAACACTGC	74	XM_023638290.1
<i>PPARGC1B</i>	F: R:	CAACTATCTTGCCGACACCC ATGGGTTCACTCTCGGGTT	162	XM_023617445.1
<i>NDUFA9</i>	F: R:	TTGGTATTCAGGCCACACCC GCTGGCTTCACGCTTCAAC	103	XM_001494601.4
<i>MRPL24</i>	F: R:	ATGATCCCTAGCGAAGCACC TGTAGAGACTCGTACCCGCT	123	XM_001500466.4
<i>PUSL1</i>	F: R:	TCAGCCACTTCCAGGACCTA AGCCACATCCAAGCTGTCTG	120	XM_023636049.1
<i>TFAM</i>	F: R:	ATGATGGCTTTGAGTCCAGG CTAGATGATGGCGGAGACTT	154	XM_023643450.1
<i>OXA1L</i>	F: R:	GACCTAGAAACCGTGGGACG GGAAGATCACTTGGCTCCCC	105	XM_005603213.3
<i>UQCRC2</i>	F: R:	TGCTTCGTCTTGCATCCAGT AACTCCGGTGACGTGGTAAC	193	XM_001494381.5
<i>FIS</i>	F: R:	GGTGCGAAGCAAGTACAACG GTTGCCACAGCCAGATAGA	118	XM_001504462.5
<i>GAPDH</i>	F: R:	GATGCCCAATGTTTGTGA AAGCAGGGATGATGTTCTGG	250	NM_001163856.1

**Table 1.** Primers used in this study.

## Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 11 December 2024; Accepted: 7 March 2025

Published online: 26 April 2025

## References

- Bjørklund, G. et al. The role of astaxanthin as a nutraceutical in health and age-related conditions. *Mol. Basel Switz.* **27**, 7167 (2022).
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. & Goycoolea, F. M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 185–196 (2006).
- Giercuskiewicz-Hecold, B. et al. Astaxanthin supplementation does not alter training-related changes in inflammatory cytokine profile in Arabian racing horses. *Antioxidants* **13**, 905 (2024).
- Mularczyk, M., Bourebaba, N., Marycz, K. & Bourebaba, L. Astaxanthin carotenoid modulates oxidative stress in adipose-derived stromal cells isolated from equine metabolic syndrome affected horses by targeting mitochondrial biogenesis. *Biomolecules* **12**, 1039 (2022).
- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S. & Aswathanarayana, R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. *Mar. Drugs*. **12**, 128–152 (2014).
- Giercuskiewicz-Hecold, B. et al. The effect of long term Astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. *Sci. Rep.* **14**, 27991 (2024).
- Chew, B. P. et al. Dietary Astaxanthin enhances immune response in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **140**, 199–206 (2011).
- Murai, T. et al. Effects of Astaxanthin supplementation in healthy and obese dogs. *Vet. Med. Auckl. NZ.* **10**, 29–35 (2019).
- Shono, S., Gin, A., Minowa, F., Okubo, K. & Mochizuki, M. The oxidative stress markers of Horses—the comparison with other animals and the influence of exercise and disease. *Anim. Open. Access. J. MDPI.* **10**, 617 (2020).
- Gambini, J. & Stromsnes, K. Oxidative stress and inflammation: from mechanisms to therapeutic approaches. *Biomedicines* **10**, 753 (2022).
- Bundgaard, L., Sørensen, M., Aa., Nilsson, T., Salling, E. & Jacobsen, S. Evaluation of systemic and local inflammatory parameters and manifestations of pain in an equine experimental wound model. *J. Equine Vet. Sci.* **68**, 81–87 (2018).
- Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N. & Okamoto, K. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J.* **40**, e104705 (2021).
- Kong, L. et al. Mitophagy in relation to chronic inflammation/ROS in aging. *Mol. Cell. Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s11010-024-05042-9> (2024).
- Wang, Y., Liu, N. & Lu, B. Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci. Ther.* **25**, 859–875 (2019).
- Siasos, G. et al. Mitochondria and cardiovascular diseases—from pathophysiology to treatment. *Ann. Transl. Med.* **6**, 256 (2018).
- Matsuda, S., Kitagishi, Y. & Kobayashi, M. Function and characteristics of PINK1 in mitochondria. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 601587 (2013).
- Ge, P., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. PINK1 and parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* **15**, 20 (2020).
- Yu, R. et al. MIEF1/2 orchestrate mitochondrial dynamics through direct engagement with both the fission and fusion machineries. *BMC Biol.* **19**, 229 (2021).
- Xian, H. & Liou, Y. C. Loss of MIEF1/MiD51 confers susceptibility to BAX-mediated cell death and PINK1-PRKN-dependent mitophagy. *Autophagy* **15**, 2107–2125 (2019).
- Chu, Q. et al. Regulation of the ER stress response by a mitochondrial microprotein. *Nat. Commun.* **10**, 4883 (2019).
- Chen, B. et al. Association between PPAR $\gamma$ , PPARGC1A, and PPARGC1B genetic variants and susceptibility of gastric cancer in an Eastern Chinese population. *BMC Med. Genomics.* **15**, 274 (2022).
- Rius-Pérez, S., Torres-Cuevas, I., Millán, I., Ortega, Á. L. & Pérez, S. PGC-1 $\alpha$ , inflammation, and oxidative stress: an integrative view in metabolism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 1452696 (2020).
- Emahazion, T., Beskow, A., Gyllenstein, U. & Brookes, A. J. Intron based radiation hybrid mapping of 15 complex I genes of the human electron transport chain. *Cytogenet. Cell. Genet.* **82**, 115–119 (1998).
- Baertling, F. et al. NDUFA9 point mutations cause a variable mitochondrial complex I assembly defect. *Clin. Genet.* **93**, 111–118 (2018).
- Di Nottia, M. et al. A homozygous MRPL24 mutation causes a complex movement disorder and affects the mitoribosome assembly. *Neurobiol. Dis.* **141**, 104880 (2020).
- Busch, J. D. et al. MitoRibo-Tag mice provide a tool for in vivo studies of mitoribosome composition. *Cell. Rep.* **29**, 1728–1738e9 (2019).
- Ngo, H. B., Lovely, G. A., Phillips, R. & Chan, D. C. Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nat. Commun.* **5**, 3077 (2014).
- Homberg, B., Rehling, P. & Cruz-Zaragoza, L. D. The multifaceted mitochondrial OXA insertase. *Trends Cell. Biol.* **33**, 765–772 (2023).
- Thompson, K. et al. OXA1L mutations cause mitochondrial encephalopathy and a combined oxidative phosphorylation defect. *EMBO Mol. Med.* **10**, e9060 (2018).
- Goto, S. et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid Astaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1512**, 251–258 (2001).
- Peng, J. J. et al. A circuit-dependent ROS feedback loop mediates glutamate excitotoxicity to sculpt the Drosophila motor system. *eLife* **8**, e47372 (2019).
- Ni, Y. et al. Protective effects of Astaxanthin on a combination of D-galactose and jet lag-induced aging model in mice. *Endocr. J.* **65**, 569–578 (2018).
- Kim, S. H. & Kim, H. Inhibitory effect of Astaxanthin on oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction—a mini-review. *Nutrients* **10**, 1137 (2018).
- Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L. & Chew, B. P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr. Metab.* **7**, 18 (2010).
- Wang, Z. et al. Identifying mitophagy-related genes as prognostic biomarkers and therapeutic targets of gastric carcinoma by integrated analysis of single-cell and bulk-RNA sequencing data. *Comput. Biol. Med.* **163**, 107227 (2023).
- Tian, J., Zhang, L., Shi, K. & Yang, L. The role of mitophagy-related genes in prognosis and immunotherapy of cutaneous melanoma: a comprehensive analysis based on single-cell RNA sequencing and machine learning. *Immunol. Res.* **73**, 30 (2025).
- Nishida, Y., Nawaz, A., Hecht, K. & Tobe, K. Astaxanthin as a novel mitochondrial regulator: A new aspect of carotenoids, beyond antioxidants. *Nutrients* **14**, 107 (2021).
- Liu, R. et al. Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS One.* **9**, e92810 (2014).

39. Dujíčková, L. et al. Astaxanthin added during post-warm recovery mitigated oxidative stress in bovine vitrified oocytes and improved quality of resulting blastocysts. *Antioxid. Basel Switz.* **13**, 556 (2024).
40. Bourebaba, L. et al. The PTP1B inhibitor MSI-1436 ameliorates liver insulin sensitivity by modulating autophagy, ER stress and systemic inflammation in equine metabolic syndrome affected horses. *Front. Endocrinol.* **14**, 1149610 (2023).
41. Chiu, H. Y., Tsao, L. Y. & Yang, R. C. Heat-shock response protects peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from hydrogen peroxide-induced mitochondrial disturbance. *Cell. Stress Chaperones.* **14**, 207–217 (2009).
42. Bourebaba, L., Michalak, I., Baouche, M., Kucharczyk, K. & Marycz, K. Cladophora glomerata methanolic extract promotes chondrogenic gene expression and cartilage phenotype differentiation in equine adipose-derived mesenchymal stromal stem cells affected by metabolic syndrome. *Stem Cell. Res. Ther.* **10**, 392 (2019).
43. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
44. Bourebaba, N., Sikora, M., Qasem, B., Bourebaba, L. & Marycz, K. Sex hormone-binding Globulin (SHBG) mitigates ER stress and improves viability and insulin sensitivity in adipose-derived mesenchymal stem cells (ASC) of equine metabolic syndrome (EMS)-affected horses. *Cell. Commun. Signal. CCS.* **21**, 230 (2023).

### Author contributions

B.G.H., A.C. and K.M. designed the study; K.M. supervised the study; B.G.H., Z.S. and A.C. conducted the research; B.G.H., Z.S., D.P., A.C. and K.M. analyzed the data; D.P. prepared the original draft; D.P., A.C. and K.M. reviewed and edited the manuscript; K.M. participated in project management; B.G.H., A.C. and K.M. provided critical resources.

### Funding

This work was financially supported by the International Institute of Translational Medicine (MIMT).

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

All the procedures of blood sampling were performed as part of routine health examination, therefore, according to the European directive EU/2010/63 and Polish regulations regarding experiments on animals, there was no need for the approval of the Ethics Committee for the described procedures. Nevertheless, the experimental protocols were described and submitted to the 2nd Local Ethical Committee for Animal Experiments at the Warsaw University of Life Sciences (SGGW). The protocols were qualified as “no need for approval” by this committee, since they were considered as non-experimental clinical veterinary procedures. A written consent for the use of blood for scientific analyses was obtained from the trainer.

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

#### Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to K.M.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2025



# OPEN The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study

Beata Giercuskiewicz-Hecold<sup>1</sup>, Marek Kulka<sup>2</sup>, Michał Czopowicz<sup>3</sup>, Jacek Wilczak<sup>4</sup>, Ewa Szarska<sup>5</sup>, Katarzyna Strzelec<sup>6</sup>, Arkadiusz Grzeczka<sup>7</sup>, Szymon Graczyk<sup>7</sup>, Adrian Hryniszyn<sup>7</sup>, Malwina Mularczyk<sup>8</sup>, Krzysztof Marycz<sup>8,9</sup> & Anna Cywińska<sup>7</sup>✉

Astaxanthin due to its strong antioxidant activity is believed to reduce oxidative stress and therefore is considered as feed additive in pathological conditions and also for the athletes. It is promoted by several equine web portals, however, data supporting that concept in horses is limited. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of astaxanthin supplementation on the parameters of oxidative status in 3 years old, racing Arabian horses during long term observation and the changes related to a single training session of high intensity. Six horses were supplemented with astaxanthin at a dose of 0.52–0.58 mg/kg BW and 7 received no supplementation. Astaxanthin supplementation resulted in the increase in total antioxidant status by 31.5%, accompanied by decreases in the amount of total thiobarbituric acid-reactive substances -TBARS and glutathione reductases - GR values by 34.5% and 45.4%, respectively, after 1 month and this effect persisted until the end of the observation. After individual training session the activities of glutathione peroxidases and GR were lower by 69% and 46%, respectively, and TBARS lower by 38% in supplemented horses. These results directly confirmed the beneficial effects of astaxanthin supplementation on the antioxidant status of race horses. Astaxanthin partially counterbalance the training-related oxidative stress, save the horse natural antioxidant defense, and shift the redox status towards a more reducing environment. At the same time, exercise-induced reactive oxygen species production at certain level was maintained and so that contributed to training progress.

**Keywords** Race horses, Training, Oxidative stress, Antioxidants, Dietary supplementation

## Abbreviations

BAS	Basophil count
CAT	Catalases
CK	Creatine kinase
dROMs	Reactive oxygen metabolites
EOS	Eosinophil count
GPx	Glutathione peroxidases
GR	Glutathione reductases

<sup>1</sup>Doctoral School, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland. <sup>2</sup>Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland. <sup>3</sup>Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland. <sup>4</sup>Department of Physiology, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland. <sup>5</sup>Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Kozielska 4, 01-001 Warsaw, Poland. <sup>6</sup>Department of Horse Breeding and Use, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland. <sup>7</sup>Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Torun, Lwowska 1, 87-100 Torun, Poland. <sup>8</sup>International Institute of Translational Medicine, Jesionowa 11, 55-114 Malin, Wisznia Mała, Poland. <sup>9</sup>Department of Veterinary Medicine and Epidemiology, Veterinary Institute for Regenerative Cures, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95516, USA. ✉email: anna\_cywinska@weterynaria.pl

HCT	Hematocrit
HGB	Hemoglobin concentration
LA	Lactic acid
LDH	5-lactate dehydrogenase isoenzyme-5
LYM	Lymphocyte count
MDA	Malondialdehyde
MON	Monocyte count
NEU	Neutrophil count
PLT	Platelet count
RBC	Red blood cell count
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Dismutases
TAC	Total antioxidant capacity
TAS	Total antioxidant status
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	The amount of total thiobarbituric acid-reactive substances
WBC	White blood cell count

Oxidative stress is defined as an imbalance between increased levels of reactive oxygen species (ROS) generated during aerobic metabolism which cannot be balanced by the activity of antioxidant mechanisms<sup>1–4</sup>. Muscle tissue in both human and equine athletes is particularly vulnerable to ROS-induced damage due to the very rapid metabolism of muscle cells aimed at producing high amount of energy during exercise. Performance horses, regardless of the discipline, undergo this process even in anaerobic efforts e.g. short time racing when the oxygen consumption increases even 30-fold above the basal level<sup>5</sup>. Under normal physiological conditions, cells maintain redox homeostasis by generating and eliminating free radicals including ROS. This can occur through intracellular enzymatic antioxidant mechanisms or through the action of antioxidants. The enzymatic antioxidants include the superoxide dismutases (SOD), catalases (CAT), glutathione peroxidases (GPx), and reductases (GR). In the process of training of performance horses, oxidative stress is somewhat desirable, as moderate ROS production during exercise promotes positive physiological adaptations in active skeletal muscles (e.g. mitochondrial biogenesis, synthesis of antioxidant enzymes and stress proteins)<sup>4</sup>. This is necessary to achieve a high fitness level and the ability to participate in sports competitions. On the other hand, excessive training that does not match the age and condition of the animal has negative consequences and leads to the decrease of athletic performance. Oxidative stress and antioxidant response has been reported both after single bout of strenuous exercise in endurance horses that undergo aerobic effort<sup>5–7</sup> and in race horses that undergo anaerobic effort<sup>8–10</sup>. Training has been shown to affect both, the oxidative stress and antioxidant status, however, routine exercise does not seem to produce the sufficiently high level of oxidative stress to induce considerable damage of muscle cells<sup>8,11,12</sup>. Regardless of the experimental design, the studies indicate that proper nutrition is critical for the welfare of performance horses, including the reduction of oxidative stress.

Astaxanthin, a red pigment commonly extracted from various microorganisms and marine algae such as *Haematococcus pluvialis* or the yeast *Phaffia rhodozyma*, has emerged as a promising new antioxidant that may be beneficial in preventing and/or reducing the risk of negative consequences of oxidative stress-induced cell and tissue damage<sup>13</sup>. Chemically, astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ -carotene-4,4'-dione, C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>) belongs to the xanthophyll family, the oxygen derivatives of carotenoids. It has 13 conjugated double bonds that are perfectly symmetrical with respect to the 15–15' position, and the backbone is an unsaturated hydrocarbon chain of 40 carbon atoms in length. The most noteworthy feature of astaxanthin's chemical structure is the presence of oxygen atoms in the tetraterpene chain and the conjugated double bonds. This structure is responsible for the molecule's strong antioxidant properties and remarkable polarity<sup>14</sup>. Compared to other carotenoids such as  $\beta$ -carotene and lycopene, astaxanthin has better bioavailability thanks to its amphiphathic properties<sup>15</sup>. It can integrate into the lipid bilayer of cell membranes and affect their properties and functions. In fact, astaxanthin is able to quench and scavenge ROS including hydrogen peroxide, superoxide anion, singlet oxygen, etc. in both the inner and outer layers of cell membranes, demonstrating its unique potential compared to other antioxidants. In contrast, ascorbic acid (vitamin C) acts only on the outer layer of cell membranes, whereas  $\beta$ -carotene or  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) act on the inner layer<sup>13</sup>. This explains a high bioactive potential of astaxanthin. Astaxanthin is thought to have a potential antioxidant activity 10-fold higher than  $\beta$ -carotene and 100 times higher than  $\alpha$ -tocopherol<sup>16</sup>. Many reports have already confirmed the beneficial pharmacological properties of astaxanthin not only in terms of its antioxidant activity, but also its anti-inflammatory<sup>17</sup>, immunostimulant, anti-cancer<sup>18</sup>, and anti-diabetic<sup>19</sup> properties. To date most research on astaxanthin supplementation have been conducted to investigate its potential use in humans, including the use of its antioxidant properties to reduce the negative effects of oxidative stress in human athletes<sup>20,21</sup>. Previous research conducted in both in vitro cell-cultures and in vivo animal models provide some evidence to support the use of astaxanthin as a dietary supplement for both athletes and recreationally active people. According to the pharmacological models, metabolism, performance and recovery should improve after 3–5 weeks of intake<sup>20</sup>. However, a recent report found no effect of 4 weeks of astaxanthin supplementation on the markers of muscle damage or soreness in resistance-trained males<sup>22</sup>.

In animal nutrition, astaxanthin-rich algae *H. pluvialis* have been used as feed additives to improve the quality of animal products and the European regulations authorized its consumption up to a certain degree<sup>23,24</sup>. Recently, astaxanthin has achieved the status of a 'super nutrient' and is the subject of an increasing number of scientific studies<sup>14,25</sup>. Its use in animals particularly susceptible to oxidative stress associated with intense skeletal muscle metabolism such as performance horses is a now matter of lively discussion. So far several combinations

of antioxidant vitamins (mainly vitamin E and C), trace elements (zinc, copper, and selenium), SOD and ergothioneine have been used in horses<sup>26–31</sup> and their effects are generally viewed as beneficial.

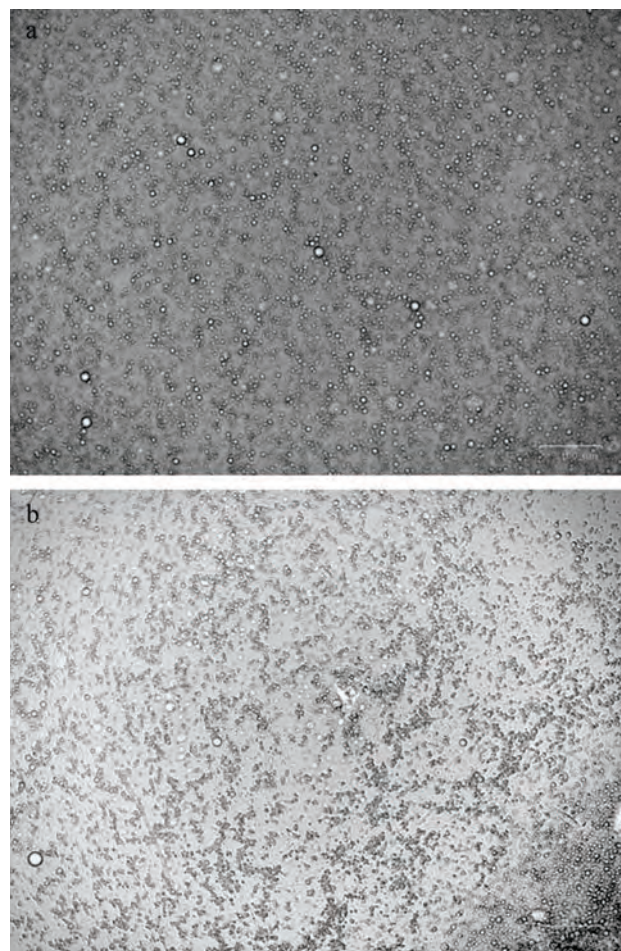
Astaxanthin is recommended as a supplement for sport horses by several equine web portals, but the hypothesis regarding its effect has been studied only indirectly, in combination with L-carnitine, based on the activities of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase isoenzyme-5 (LDH-5) in blood<sup>32</sup>. Direct effect of astaxanthin on oxidative stress in horses has never been studied. Therefore, this study aimed to assess the effect of micellar form of astaxanthin administered to Arabian race horses at a dose of 250 mg per a horse (0.52–0.58 mg/kg BW) on the parameters of oxidative status during long-term observation and the changes related to a single training session of high intensity. To formulate the first broad characteristics, the panel of parameters of oxidative stress was used: the total antioxidant status (TAS), the amount of total thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and blood activities of the enzymes involved in antioxidant defense such as GPx, GR, SOD, and CAT.

## Results

The astaxanthin content in the administered supplement was  $0.1520 \pm 0.0052$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (coefficient of variation [CV%] of 3.42%) and total carotenoids (as  $\beta$  carotene) content was  $0.9889 \pm 0.0485$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (CV% of 4.90%). After a monthly storage of the micelles, no separation of the water and oil phases could be observed. Additionally, imaging with the ZOE™ Fluorescent Cell Imager confirmed the stability of the micelles (Fig. 1) on the day of micelle preparation (Fig. 1a) and after 1 month (Fig. 1b).

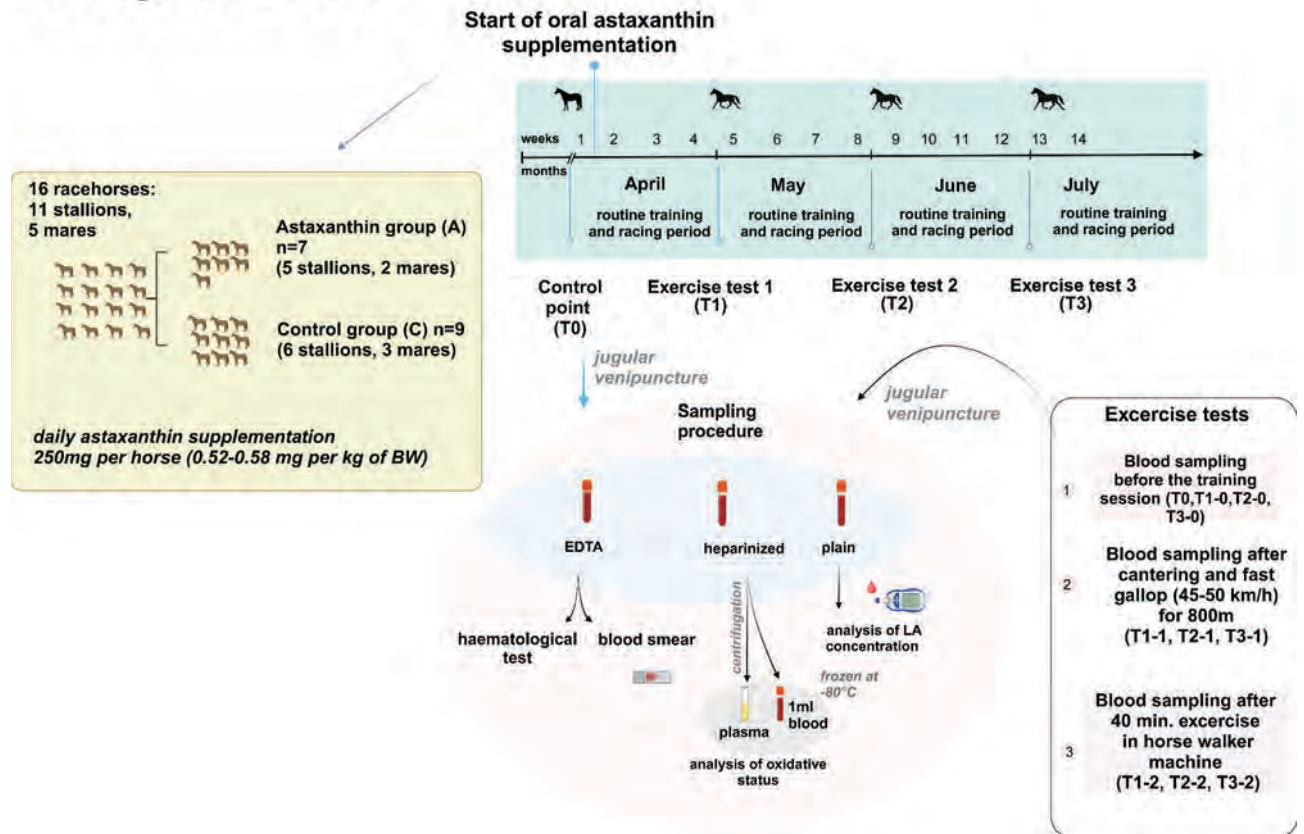
Evaluation of the long-term effect of astaxanthin supplementation (Fig. 2) on the baseline oxidative status, involved examination of horses (including blood tests) at four time-points: in April just before the beginning of intensive training sessions and astaxanthin supplementation (this testing denoted as T0), and then monthly before the intensive training session (pre-session) – in May (after 1 month of training, T1-0), June (after 2 months of training, T2-0), and in July (after 3 months of training, T3-0).

To evaluate the effect of astaxanthin supplementation (Fig. 2) on oxidative status during a single training session, in May the horses were subjected to the field exercise test including blood tests 2 more times: right after the training session involving fast gallop (T1-1), and after 40-min. restitution in the horse walker (T1-2).



**Fig. 1.** Visualization of micelles, (a) day 1, (b) day 30.

# Study scheme



**Fig. 2.** Study design. Created with BioRender.com.

Of the initial number of 16 Arabian horses (11 stallions and 5 mares), 2 stallions and 1 mare were excluded due to the accidental contusions that interrupted their training, so finally the astaxanthin (A) group consisted of 6 horses (4 stallions and 2 mares) and the control (C) group consisted of 7 horses (5 stallions and 2 mares). There was no difference in sex distribution between groups ( $p=0.999$ ). In June and July, the horses were already involved in racing, so the analyses were performed on smaller number of animals: 11 horses (5 from A group and 6 from C group) in June (T2-0), and 9 horses (4 from A group and 5 from C group) in July (T3-0). The numbers of starts as well as the time of the first start and the numbers of won races were similar in both groups ( $p=0.850$ ).

The increases in lactic acid (lactate, LA) concentration in blood after training sessions were significant ( $p=0.001$ ) and similar in both groups ( $p=0.210$ ) which confirmed that the effort was similar and relatively high for both groups.

The hematological parameters before entering the intensive training (T0) and before training sessions (T1-0, T2-0, and T3-0) fell within reference intervals for horses<sup>33</sup> and did not differ significantly between the A and C groups (Table 1). In both groups, erythrogram parameters i.e. red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT) as well as white blood cell count (WBC) increased significantly after the training session (at T1-1;  $p \leq 0.001$  and  $p=0.013$ , respectively) and reverted to the baseline value after 40-min. restitution in horse walker (at T1-2; Table 2).

## Long-term effect of astaxanthin supplementation on the oxidative status

None of resting oxidative status measurements in April (before supplementation) differed significantly between groups (Table 3). The long-term effect of astaxanthin supplementation on the oxidative status measurements at rest involved significant increase in TAS, and significant decrease in GR and TBARS (Fig. 3).

TAS measurements in the C group remained unchanged compared to the resting (T0) value until July, when it increased, however, this change was not significant ( $p=0.056$ ). In the A group, TAS increased after one month of supplementation and was significantly higher than in the C group on May ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3a). GR activity remained unchanged in the C group for the whole study, with slight (insignificant) decrease in June. In the A group, GR activity markedly decreased ( $p < 0.001$ ) and remained lower than in the C group till the end of observation (Fig. 3b). GPx activity remained unchanged in the C group for the whole study, however, large variations among individuals were noted. In the A group, GPx activity decreased between resting (T0) and pre-session in May (T1-0), however the differences were not significant and the variations among individuals were considerable (Fig. 3c). SOD activity remained unchanged in the C group until July, when it increased significantly

Hematological measurement	Group	Time points at which hematological measurements were taken				Comparison between				Interaction between time and group	
		T0	T1-0	T2-0	T3-0	Time points (T0, T1-0, T2-0, T3-0)		Groups (A, C)		F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value
						F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value	F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value		
RBC [T/L]	A	10.0 (9.0, 10.9)	9.9 (9.0, 10.9)	10.0 (9.0, 10.9)	9.9 (8.9, 10.8)	0.72 (3,37)	0.545	0.04 (1,37)	0.839	0.82 (3,37)	0.490
	C	10.3 (9.5, 11.2)	10.3 (9.4, 11.1)	9.6 (8.6, 10.6)	10.1 (9.1, 11.0)						
	RSE	0.55	0.58	0.30	0.35						
HGB [g/dl]	A	14.7 (13.5, 15.9)	14.8 (13.7, 16.0)	14.8 (13.6, 16.0)	14.6 (13.4, 15.8)	0.70 (3,37)	0.560	1.22 (1,37)	0.729	0.67 (3,37)	0.577
	C	15.2 (14.1, 16.3)	15.4 (14.3, 16.4)	14.4 (13.1, 15.6)	14.9 (13.8, 16.1)						
	RSE	0.79	0.86	0.41	0.58						
HCT [%]	A	42 (39, 45)	41 (38, 44)	41 (38, 44)	40 (37, 44)	1.10 (3,37)	0.361	0.11 (1,37)	0.742	0.54 (3,37)	0.661
	C	43 (40, 46)	42 (39, 45)	40 (36, 43)	42 (38, 45)						
	RSE	2.6	3.0	1.3	1.6						
PLT [G/l]	A	187 (161, 213)	147 (121, 173)	82 (55, 110)	174 (146, 202)	24.86 (3,37)	<0.001*	1.33 (1,37)	0.256	1.49 (3,37)	0.233
	C	175 (151, 199)	113 (89, 137)	95 (64, 125)	149 (122, 177)						
	RSE	20.3	30.5	17.4	19.7						
WBC [G/l]	A	10.0 (9.1, 10.9)	8.9 (8.1, 9.8)	9.3 (8.3, 10.2)	9.4 (8.5, 10.4)	1.19 (3,37)	0.327	0.11 (1,37)	0.740	0.65 (3,37)	0.586
	C	9.5 (8.7, 10.3)	9.4 (8.6, 10.2)	9.0 (7.9, 10.0)	9.3 (8.3, 10.2)						
	RSE	0.85	1.06	0.68	0.42						
NEU [G/l]	A	4.9 (4.1, 5.7)	4.6 (3.8, 5.4)	4.8 (4.0, 5.6)	4.6 (3.8, 5.4)	0.08 (3,37)	0.972	2.36 (1,37)	0.133	0.72 (3,37)	0.549
	C	4.0 (3.3, 4.7)	4.1 (3.4, 4.8)	3.9 (3.0, 4.7)	4.3 (3.5, 5.1)						
	RSE	0.60	0.63	0.59	0.40						
LYM [G/l]	A	4.3 (3.7, 4.8)	3.6 (3.1, 4.2)	3.8 (3.2, 4.4)	4.0 (3.4, 4.6)	3.70 (3,37)	0.020*	3.26 (1,37)	0.079	1.07 (3,37)	0.373
	C	4.8 (4.3, 5.3)	4.5 (4.0, 5.0)	4.3 (3.7, 4.9)	4.3 (3.7, 4.8)						
	RSE	0.35	0.51	0.19	0.24						
MON [G/l]	A	0.60 (0.51, 0.69)	0.55 (0.46, 0.64)	0.50 (0.40, 0.60)	0.51 (0.41, 0.61)	2.07 (3,37)	0.121	0.04 (1,37)	0.839	1.28 (3,37)	0.297
	C	0.53 (0.44, 0.61)	0.56 (0.48, 0.65)	0.53 (0.43, 0.63)	0.49 (0.40, 0.59)						
	RSE	0.061	0.047	0.080	0.049						
EOS [G/l]	A	0.18 (0.11, 0.24)	0.12 (0.06, 0.19)	0.14 (0.07, 0.21)	0.26 (0.19, 0.33)	4.03 (3,37)	0.014*	4.53 (1,37)	0.040*	1.07 (3,37)	0.375
	C	0.12 (0.06, 0.18)	0.09 (0.03, 0.15)	0.09 (0.01, 0.16)	0.13 (0.06, 0.20)						
	RSE	0.035	0.021	0.043	0.111						
BAS [G/l]	A	0.05 (0.03, 0.07)	0.08 (0.06, 0.10)	0.07 (0.05, 0.09)	0.07 (0.05, 0.09)	5.53 (3,37)	0.003*	0.01 (1,37)	0.991	1.10 (3,37)	0.360
	C	0.06 (0.05, 0.08)	0.08 (0.06, 0.10)	0.06 (0.04, 0.08)	0.08 (0.06, 0.10)						
	RSE	0.011	0.016	0.008	0.013						

**Table 1.** Analysis of hematological measurements at rest using the mixed linear model. Hematological measurements are presented as the estimated marginal means with 95% confidence intervals (CI 95%) in parentheses and residual standard error (RSE). Hematological measurements were performed in April just before the beginning of intensive training sessions and astaxanthin supplementation (T0), and then monthly before the intensive training session (pre-session) – in May (after 1 month of training, T1-0), June (after 2 months of training, T2-0), and in July (after 3 months of training, T3-0). A – astaxanthin group, C – control group, RBC – red blood cell count, HGB – hemoglobin concentration, HCT – hematocrit, PLT – platelet count, WBC – white blood cell count, NEU – neutrophil count, LYM – lymphocyte count, MON – monocyte count, EOS – eosinophil count, BAS – basophil count, RSE – residual standard error, df<sub>1</sub> – degrees of freedom associated with the among-group sum of squares, df<sub>2</sub> – degrees of freedom associated with the within-group (error) sum of squares. \*Significant at α = 0.05.

(*p* < 0.001), in contrast to the A group where it remained unchanged during whole time of observation, however, large variations among individuals were also noted (Fig. 3e). TBARS (Fig. 3d) remained unchanged in the C group with large variations among individuals. In the A group, TBARS decreased significantly one month after the beginning of astaxanthin supplementation (*p* < 0.001) and remained lower than in the C group till the end of the observation. Neither time nor astaxanthin supplementation affected the CAT activity, however, the values largely varied among individuals.

### The effect of astaxanthin supplementation on oxidative status during a single training session

Significant changes occurred in all oxidative status measurements except CAT (Table 4). The training session was analyzed after one month of astaxanthin supplementation and therefore the measurements before training session already differed significantly between groups. TAS before the training was significantly higher in the A

Hematological measurement	Group	Time points at which hematological measurements were taken			Mauchly's test for sphericity (p-value)	Comparison between				Interaction between time and group	
		T1-0	T1-1	T1-2		Time points (T1-0, T1-1, T1-2)		Groups (A, C)		F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value
						F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value	F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value		
RBC [T/l]	A	10.1 (9.0, 11.1)	12.1 (10.8, 13.5)	10.3 (9.4, 11.1)	0.169	16.22 (2,20)	<0.001*	0.31 (1,10)	0.589	0.55 (2,20)	0.585
	C	10.3 (9.4, 11.1)	11.7 (10.6, 12.9)	9.7 (9.0, 10.4)							
	RSE	1.04	1.37	0.86							
HGB [g/dl]	A	15.1 (13.7, 16.4)	18.5 (16.4, 20.6)	15.5 (14.3, 16.7)	0.148	17.30 (2,20)	<0.001*	0.57 (1,10)	0.469	0.64 (2,20)	0.540
	C	15.4 (14.2, 16.5)	17.8 (16.0, 19.6)	14.5 (13.5, 15.5)							
	RSE	1.35	2.13	1.16							
HCT [%]	A	41 (37, 46)	54 (47, 62)	43 (40, 46)	0.032*	18.0 (1.30,13.0) <sup>a</sup>	0.001*	1.05 (1,10)	0.330	0.80 (1.30,13.0) <sup>a</sup>	0.421
	C	42 (39, 46)	50 (44, 57)	40 (37, 42)							
	RSE	4.2	7.5	3.0							
PLT [G/l]	A	147 (106, 187)	140 (110, 170)	154 (118, 190)	0.800	2.46 (2,20)	0.111	0.46 (1,10)	0.515	1.73 (2,20)	0.202
	C	113 (79, 147)	141 (115, 167)	152 (121, 182)							
	RSE	40.5	30.4	36.2							
WBC [G/l]	A	9.0 (7.7, 10.4)	11.2 (9.5, 12.9)	9.9 (8.8, 11.0)	0.019*	7.61 (1.26,12.6) <sup>a</sup>	0.013*	0.08 (1,10)	0.780	0.52 (1.26,12.6) <sup>a</sup>	0.528
	C	9.4 (8.3, 10.5)	10.7 (9.2, 12.1)	9.6 (8.7, 10.5)							
	RSE	1.31	1.72	1.07							
NEU [G/l]	A	4.8 (4.0, 5.6)	5.1 (4.1, 6.1)	5.6 (4.5, 6.6)	0.008*	2.96 (1.20,12.0) <sup>a</sup>	0.107	7.86 (1,10)	0.100	1.36 (1.20,12.0) <sup>a</sup>	0.276
	C	4.1 (3.4, 4.8)	4.2 (3.4, 5.1)	4.3 (3.4, 5.2)							
	RSE	0.83	0.99	1.06							
LYM [G/l]	A	3.5 (2.6, 4.3)	5.2 (4.2, 6.2)	3.7 (3.0, 4.3)	0.007*	14.8 (1.20,12.0) <sup>a</sup>	0.002*	5.12 (1,10)	0.047*	0.58 (1.20,12.0) <sup>a</sup>	0.492
	C	4.5 (3.8, 5.2)	5.7 (4.8, 6.6)	4.6 (4.1, 5.1)							
	RSE	0.86	1.04	0.61							
MON [G/l]	A	0.57 (0.46, 0.68)	0.71 (0.60, 0.83)	0.48 (0.38, 0.58)	0.312	8.86 (2,20)	0.002*	0.39 (1,10)	0.547	3.76 (2,20)	0.041*
	C	0.56 (0.47, 0.66)	0.58 (0.48, 0.67)	0.52 (0.44, 0.61)							
	RSE	0.111	0.117	0.101							
EOS [G/l]	A	0.13 (0.08, 0.17)	0.12 (0.08, 0.15)	0.12 (0.09, 0.15)	0.936	0.12 (2,20)	0.890	1.92 (1,10)	0.196	1.31 (2,20)	0.293
	C	0.09 (0.05, 0.13)	0.10 (0.07, 0.12)	0.09 (0.06, 0.12)							
	RSE	0.044	0.034	0.035							
BAS [G/l]	A	0.09 (0.06, 0.11)	0.08 (0.05, 0.1)	0.06 (0.04, 0.08)	0.176	5.29 (2,20)	0.014*	0.03 (1,10)	0.867	2.11 (2,20)	0.147
	C	0.08 (0.06, 0.10)	0.08 (0.06, 0.1)	0.07 (0.05, 0.09)							
	RSE	0.027	0.026	0.023							
LA [mmol/l]	A	0.05 (0.05, 0.05)	17.3 (8.12, 26.5)	1.79 (0.42, 3.16)	<0.001*	23.2 (1.02,10.2) <sup>a</sup>	0.001*	1.79 (1,10)	0.210	2.57 (1.02,10.2) <sup>a</sup>	0.140
	C	0.05 (0.05, 0.05)	9.12 (1.35, 16.9)	1.87 (0.72, 3.03)							
	RSE	0.000	9.234	1.370							

**Table 2.** Analysis of hematological measurements using repeated-measure analysis of variance. Hematological measurements are presented as the estimated marginal means with 95% confidence intervals (CI 95%) in parentheses and residual standard error (RSE). Hematological measurements were performed right after the training session involving fast gallop (T1-1), and after 40-min. restitution in the horse walker (T1-2). A – astaxanthin group, C – control group, RBC – red blood cell count, HGB – hemoglobin concentration, HCT – hematocrit, PLT – platelet count, WBC – white blood cell count, NEU – neutrophil count, LYM – lymphocyte count, MON – monocyte count, EOS – eosinophil count, BAS – basophil count, LA – lactate concentration, RSE – residual standard error, df<sub>1</sub> – degrees of freedom associated with the among-group sum of squares, df<sub>2</sub> – degrees of freedom associated with the within-group (error) sum of squares. <sup>a</sup> Greenhouse–Geisser correction for sphericity applied. \*Significant at α=0.05.

group ( $p=0.024$ ), increased significantly immediately after the training in both groups ( $p<0.001$ ), reaching similar values in both groups and then decreased after 40-min. restitution, remaining significantly higher in the A group ( $p<0.001$ , Fig. 4a). GR activity was significantly lower in the A group ( $p<0.001$ ) before the training (pre-session, T1-0), then slightly increased in both groups remaining significantly lower in the A group ( $p=0.002$ ) and after restitution decreased to similar values in both groups (Fig. 4b). GPx activity was at similar level in both groups before the training and after exercise it increased significantly only in the C group ( $p<0.001$ ) being also significantly higher than in the A group ( $p<0.001$ ) and decreased after restitution to similar level in both groups (Fig. 4c). SOD activity remained unaffected by training except for restitution value, which decreased significantly in the A group ( $p=0.007$ ), being also significantly lower than in the C group ( $p<0.001$ ) (Fig. 4e). TBARS remained unaffected by the training effort, however was significantly lower in the A group in all time

Oxidative status measurements	Group	Time points at which oxidative status measurements were taken				Comparison between				Interaction between time and group	
						Time points (T0, T1-0, T2-0, T3-0)		Groups (A, C)			
		T0	T1-0	T2-0	T3-0	F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value	F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value	F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value
TAS [ $\mu\text{mol/l}$ ]	A	78.9 (67.3, 90.5)	103.8 (92.2, 115)	93.6 (82.0, 105)	116 (103, 130)	12.36 (3,39)	< 0.001*	11.01 (1,39)	0.002*	1.63 (3,39)	0.197
	C	71.0 (60.3, 81.8)	74.9 (64.2, 85.7)	77.3 (65.8, 88.8)	98.1 (85.6, 111)						
	RSE	12.13	6.01	15.27	8.24						
TBARS [nmol/l]	A	8.27 (7.30, 9.25)	5.42 (4.45, 6.39)	5.33 (4.36, 6.31)	5.31 (4.12, 6.50)	6.72 (3,39)	< 0.001*	12.86 (1,39)	< 0.001*	5.13 (3,39)	0.004*
	C	7.49 (6.59, 8.39)	7.64 (6.74, 8.54)	6.31 (5.34, 7.29)	8.00 (6.93, 9.07)						
	RSE	1.015	1.107	1.368	1.139						
GR [U/l]	A	341 (306, 376)	186 (152, 221)	207 (173, 242)	217 (175, 260)	11.50 (3,39)	< 0.001*	29.04 (1,39)	< 0.001*	10.84 (3,39)	< 0.001*
	C	315 (283, 347)	328 (296, 360)	272 (238, 307)	337 (299, 374)						
	RSE	32.62	37.53	44.17	38.91						
GPx [U/l]	A	326 (282, 370)	258 (214, 302)	271 (228, 315)	258 (205, 310)	0.77 (3,39)	0.520	2.47 (1,39)	0.124	2.67 (3,39)	0.061
	C	296 (255, 336)	317 (277, 358)	302 (259, 346)	323 (276, 370)						
	RSE	44.93	39.56	46.68	36.75						
SOD [U/l]	A	2.71 (2.42, 3.00)	2.48 (2.20, 2.77)	2.56 (2.28, 2.85)	2.98 (2.65, 3.30)	12.32 (3,39)	< 0.001*	2.24 (1,39)	0.143	2.41 (3,39)	0.081
	C	2.69 (2.42, 2.95)	2.85 (2.58, 3.11)	2.70 (2.42, 2.98)	3.45 (3.15, 3.74)						
	RSE	0.238	0.171	0.216	0.194						
CAT [U/l]	A	11.3 (8.2, 14.3)	12.2 (9.2, 15.3)	11.6 (8.5, 14.6)	10.1 (6.80, 13.3)	2.10 (3,34)	0.118	7.10 (1,34)	0.012*	0.44 (3,34)	0.725
	C	15.7 (12.4, 19.0)	17.2 (13.9, 20.6)	17.6 (14.3, 21.0)	15.9 (12.6, 19.2)						
	RSE	1.29	0.98	1.68	2.28						

**Table 3.** Analysis of oxidative status measurements at rest using the mixed linear model. Oxidative status measurements are presented as the estimated marginal means with 95% confidence intervals (CI 95%) in parentheses and residual standard error (RSE). Oxidative status measurements were performed in April just before the beginning of intensive training sessions and astaxanthin supplementation (T0), and then monthly before the intensive training session (pre-session) – in May (after 1 month of training, T1-0), June (after 2 months of training, T2-0), and in July (after 3 months of training, T3-0). A – astaxanthin group, C – control group, TAS – total antioxidant status, TBARS – thiobarbituric acid-reactive substances, GR – glutathione reductases, GPx – glutathione peroxidases, SOD – superoxide dismutases, CAT – catalases, RSE – residual standard error, df<sub>1</sub> – degrees of freedom associated with the among-group sum of squares, df<sub>2</sub> – degrees of freedom associated with the within-group (error) sum of squares. \*Significant at  $\alpha = 0.05$ .

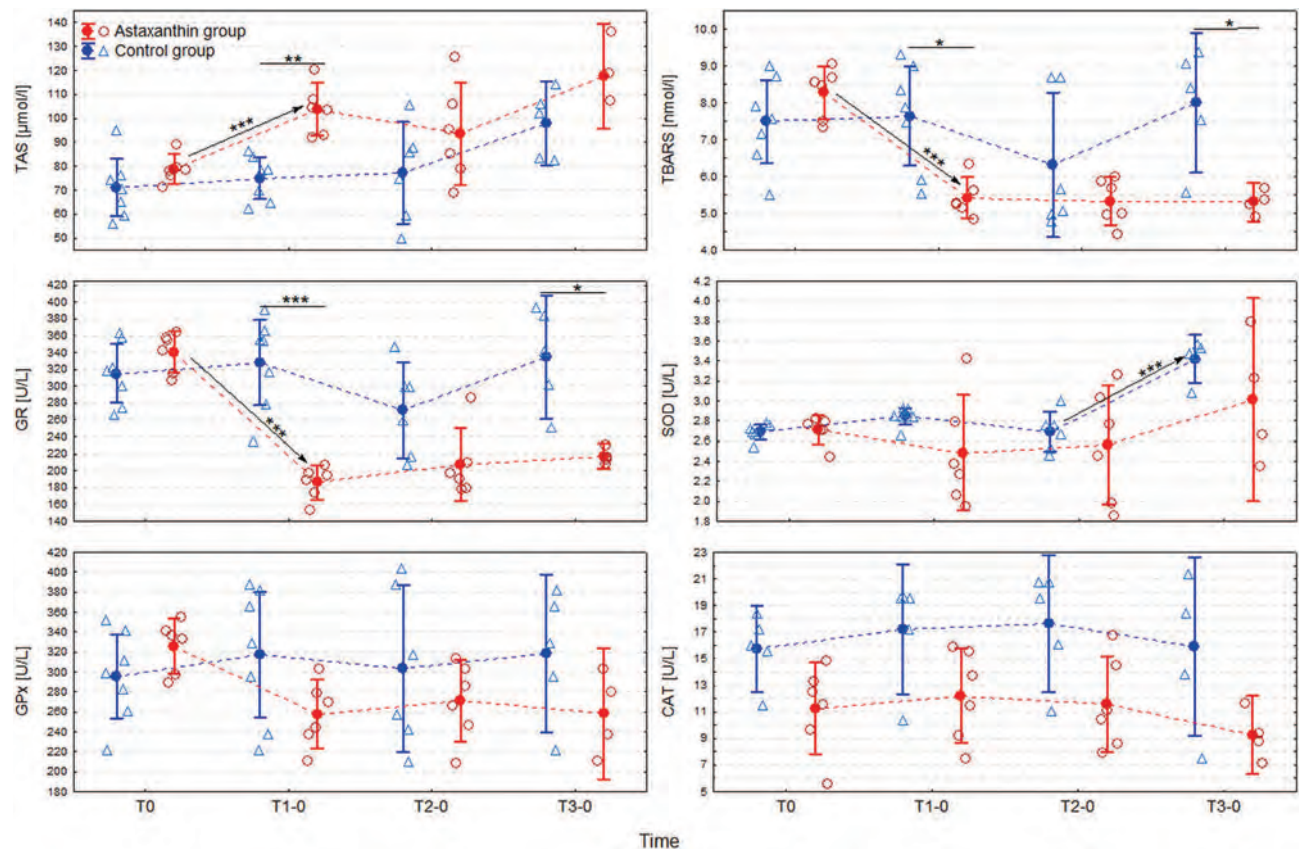
points due to its significant decrease between resting (T0) and pre-session testing in May (T1-0) ( $p = 0.004$ ) (Fig. 4d). CAT remained unaffected by training and at similar level in both groups (Fig. 4f).

## Discussion

The beneficial effect of astaxanthin in the horses has been suggested by *in vitro* studies<sup>34</sup> and *in vivo* observations<sup>32</sup>, but these data did not show the direct antioxidant effect of supplementation. Moreover, the recommended dosage of commercially available supplements is wide. Sato et al.<sup>32</sup> administered to the horses supplement that contained 37.5 mg of astaxanthin, however, the manufacturer of AstaReal<sup>®</sup> mentioned the studies with 75 mg and 30–100 mg doses<sup>35</sup> and other company recommended much higher dose: 937.5 mg twice daily<sup>36</sup>. Astaxanthin has been proven to be safe and beneficial at very high doses: 50 mg/kg and even 200 mg/kg in rats<sup>37,38</sup>. Beagle dogs and cats were safely dosed with up to 40 mg and 10 mg, respectively, which corresponds to 3–4 mg/kg<sup>39</sup>. However, in the study lasting for 6 weeks the dose of 0.3 mg/kg was used<sup>40</sup>. In the present study the dose of 250 mg per horse was chosen, which on one hand, seems to be high enough to clearly evaluate the effect of astaxanthin supplementation and on the other hand completely safe in the 3 months supplementation period according to currently available data.

The presented results have shown the effect of astaxanthin supplementation on general antioxidant status and the antioxidant defense measured as TAS, the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation reflected by TBARS as well as the effect of the high-intensity training session on these measurements. The study design allowed also to investigate the exercise-related changes in the level of antioxidant status related to the beginning of race training in Arabian horses without supplementation. Previously, antioxidant status in Arabian horses has been described only in endurance effort (aerobic in nature), so this study is the first report on antioxidant status in racing Arabians (anaerobic effort).

Many methods have been proposed for measuring exercise-induced stress, including the markers of lipid peroxidation, reactive oxygen metabolites, antioxidant potential/status, the antioxidant enzyme activity, and the muscle enzyme activity being an indirect measurement of oxidative damage<sup>5,9</sup>. The methods are limited by the study protocol, and the most common measurements are the activities of antioxidant enzymes and muscle enzymes in blood. However, the presence of reactive oxygen metabolites, expressed as reactive oxygen metabolites (dROMs) in blood, has also been shown as a result of exertion<sup>5,10</sup>.



**Fig. 3.** The long-term effect of astaxanthin supplementation on the parameters of oxidative status. Statistical significance is indicated above the lines as follows: \*  $0.01 \leq p < 0.5$ , \*\*  $0.001 \leq p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

The indirect beneficial effect of astaxanthin supplementation in race horses has been reported as a reduction of muscle enzymes creatine phosphokinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH-5) leakage into circulation<sup>32</sup>. Continuous astaxanthin supplementation for 8 weeks led to the decreases in CK and LDH activities measured 4 h after an intense training session. In this study, we looked deeper in the mechanisms by measuring antioxidant parameters which give the insight into the level of oxidative stress that occurs as a direct result of the training as well as single bout of exercise. The activities of muscle enzymes were not measured, as marked CK increases occur at least 2 h after the training session<sup>12,30,41</sup>. Instead we used the exercise test that allows to investigate the changes in post exercise LA concentrations and the decreases after 40-min. restitution. Compared to Sato et al.<sup>32</sup> findings, in our study the antioxidant effect of astaxanthin supplementation was observed earlier, after 4 weeks of supplementation and then remained at the similar level till the end of the observation period.

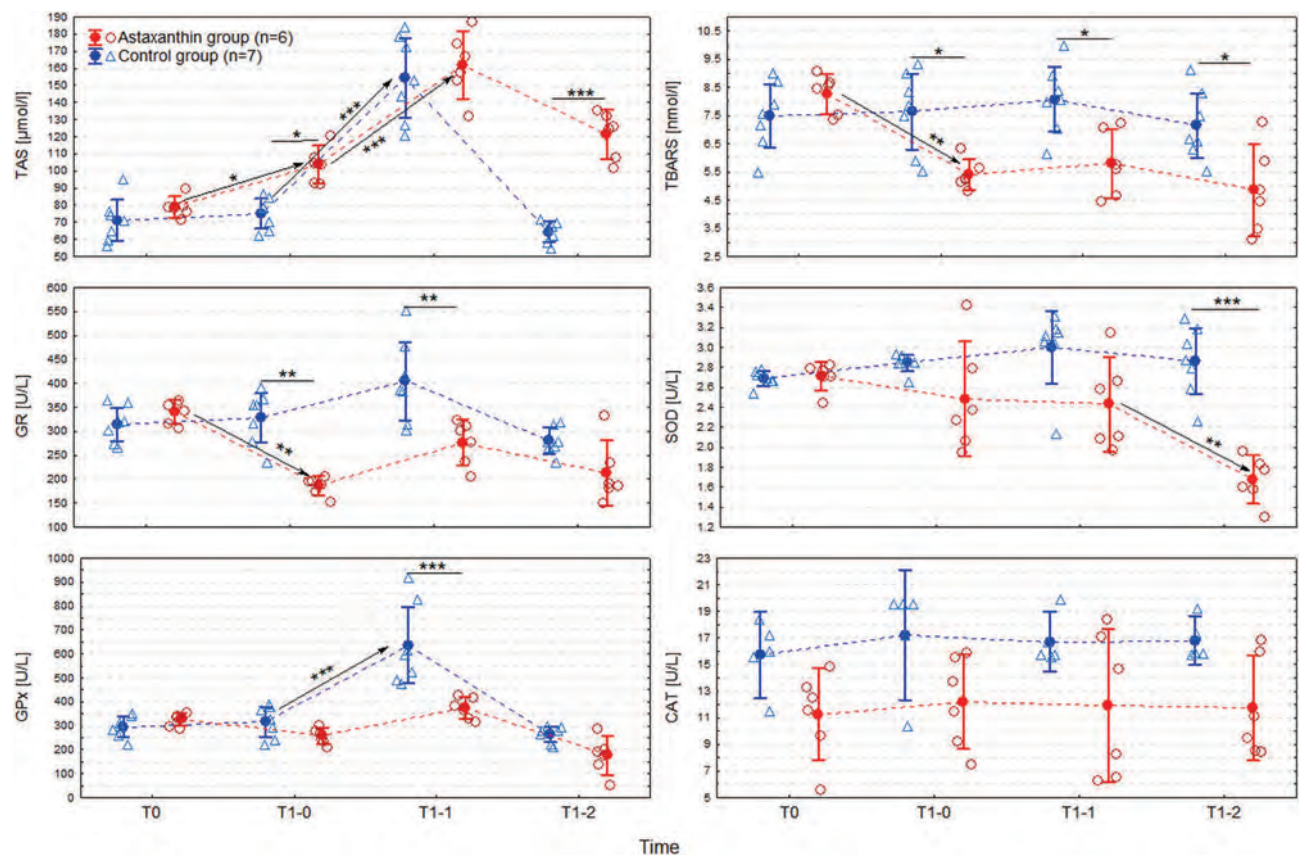
Changes of hematological measurements and LA concentration confirmed that the training session examined in this study posed a significant effort for horses, required for the training progress, however, the effort did not exceed exercise capacity of the horses, as indicated by the decreases after 40-min. restitution. The measurements of oxidative stress changed after single training session and during whole training period and the effect of astaxanthin supplementation was significant.

Higher TAS values observed one month after astaxanthin supplementation accompanied by lower TBARS indicate the improvement in ROS removal, and diminished level of lipid peroxidation. The oxidant/antioxidant imbalance phenomenon has been described in race horses as occurring during a 3-month race period<sup>27</sup>. The design of the present study covered this period and provided more details regarding the changes related to training and supplementation.

TAS or total antioxidant capacity (TAC) provide the information regarding overall antioxidant status, involving all the antioxidants in the body, including the ones not recognized yet or difficult to measure. It increased by 31.5% after one month of astaxanthin supplementation, together with the decrease in TBARS by 34.5%. The change was significant only in the 1st month, however, in both astaxanthin and control groups of horses a tendency to increase in TAS during 4 months of intensive training was seen with higher values in the supplemented group. Thus, long term changes related to the race training were proved, however, such changes were not detected in the horses that began moderate training<sup>42</sup>. It is expectable that supplementation with antioxidants should increase TAS and it was confirmed in our study. However, it has also been reported that 2 weeks of supplementation with vitamin E alone or in combination with coenzyme Q<sub>10</sub> did not affect either TAS at rest or after exercise in leisure horses<sup>29</sup>.

Oxidative status measurements	Group	Time points at which oxidative status measurements were taken						Mauchly's test for sphericity (p-value)	Comparison between						
		Time points (T0, T1-0, T1-1, T1-2)							Time points (T0, T1-0, T1-1, T1-2)		Groups (A, C)		Interaction between time and group		
		T0	T1-0	T1-1	T1-2	F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value		F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value	F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value	F-statistic (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> )	p-value	
TAS [μmol/l]	A	78.9 (69.6, 88.2)	104 (94.8, 113)	162 (142, 182)	122 (112, 131)										
	C	71.0 (62.4, 79.6)	74.9 (66.7, 83.2)	154 (136, 173)	64.4 (55.9, 73.0)			99.8 (1.80,19.8) <sup>a</sup>	<0.001*	28.6 (1.11)	<0.001*	9.95 (1.80,19.8)	0.001*		
	RSE	10.33	9.93	22.59	10.30										
TBARS [nmol/l]	A	8.27 (7.37, 9.18)	5.42 (4.40, 6.44)	5.81 (4.72, 6.90)	4.86 (3.60, 6.11)										
	C	7.49 (6.65, 8.33)	7.64 (6.70, 8.58)	8.07 (7.06, 9.08)	7.14 (5.98, 8.30)			5.86 (3,33)	0.003*	19.0 (1.11)	0.001*	5.34 (3,33)	0.004*		
	RSE	1.006	1.132	1.214	1.394										
GR [U/l]	A	341 (312, 370)	186 (148, 225)	277 (212, 341)	213 (169, 257)										
	C	315 (288, 342)	328 (293, 364)	405 (345, 465)	280 (240, 321)			10.2 (3,33)	<0.001*	48.4 (1.11)	<0.001*	6.44 (3,33)	0.002*		
	RSE	32.17	42.71	72.16	48.57										
GPx [U/l]	A	326 (292, 360)	258 (209, 307)	375 (257, 493)	177 (124, 229)										
	C	296 (264, 327)	317 (273, 363)	636 (527, 745)	264 (216, 313)			31.2 (1.68,18.4) <sup>a</sup>	<0.001*	18.0 (1.11)	0.001*	7.72 (1.68,18.4)	0.001*		
	RSE	37.96	54.77	131.2	58.14										
SOD [U/l]	A	2.71 (2.61, 2.81)	2.48 (2.14, 2.82)	2.43 (2.05, 2.81)	1.68 (1.40, 1.95)										
	C	2.69 (2.60, 2.78)	2.85 (2.53, 3.16)	3.00 (2.65, 3.35)	2.86 (2.61, 3.12)			5.44 (3,33)	0.004*	34.0 (1.11)	<0.001*	7.72 (3,33)	0.001*		
	RSE	0.108	0.376	0.420	0.307										
CAT [U/l]	A	11.3 (8.5, 14.0)	12.2 (8.9, 15.6)	11.9 (8.0, 15.8)	11.7 (9.0, 14.5)										
	C	15.7 (12.7, 18.8)	17.2 (13.5, 20.9)	16.7 (12.4, 21)	16.8 (13.8, 19.8)			0.55 (3,33)	0.655	7.60 (1.11)	0.022*	0.04 (3,33)	0.989		
	RSE	2.99	3.65	4.27	2.97										

**Table 4.** Analysis of oxidative status measurements using repeated-measure analysis of variance. Oxidative status measurements are presented as the estimated marginal means with 95% confidence intervals (CI 95%) in parentheses and residual standard error (RSE). Oxidative status measurements were performed right after the training session involving fast gallop (T1-1), and after 40-min. restitution in the horse walker (T1-2). A – astaxanthin group, C – control group, TAS – total antioxidant status, TBARS – thiobarbituric acid-reactive substances, GR – glutathione reductases, GPx – glutathione peroxidases, SOD – superoxide dismutases, CAT – catalases, RSE – residual standard error, df<sub>1</sub> – degrees of freedom associated with the among-group sum of squares, df<sub>2</sub> – degrees of freedom associated with the within-group (error) sum of squares. <sup>a</sup>Greenhouse–Geisser correction for sphericity applied. \*Significant at α = 0.05.



**Fig. 4.** The effect of astaxanthin supplementation on oxidative status during a single training session. Statistical significance is indicated above the lines as follows: \*  $0.01 \leq p < 0.5$ , \*\*  $0.001 \leq p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Major antioxidant defense and so that antioxidant status is enzymatic. Antioxidant enzymes orchestrate in removing free radicals and in turn prevent lipid peroxidation. GR and GPx act as a system for reduction and peroxidation of glutathione disulfide, which allows to utilize hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), and other organic hydroperoxides with the electron from glutathione. SOD acts synergistically with GPx by catalyzing the dismutation of the superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) into molecular oxygen ( $\text{O}_2$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , then converted by CAT into oxygen and water.

Results presented in this study show that GR activity significantly decreased by 45.4% one month after astaxanthin supplementation and remained lower than in control group by the end of the observation. GPx, SOD, and CAT activities also tended to be lower in astaxanthin-supplemented horses, but the differences were not significant. Studies report various patterns of the changes in antioxidant activities of enzymes in response to antioxidant supplementation, but the increases were interpreted as beneficial<sup>27</sup>. However, astaxanthin's mechanism of action is more complex than supplements tested in equine studies. Astaxanthin is a ROS scavenger acting by both donating electrons and by bounding free radicals and so that form a non-reactive product. Additionally, due to a unique chemical structure with a series of conjugated bounds in non-polar region, the molecule can remove free radicals by transporting them along its own carbon chain outside the cell where other antioxidant can neutralize them<sup>43</sup>. It seems that astaxanthin supplementation posed an additional background for removing free radicals and increasing the redox capacity, leading to higher TAS values. Training itself does not seem to affect the activities of antioxidant enzymes, except SOD which increased in July (after 4 months of training) in control group but not the group supplemented with astaxanthin. The patterns of changes in the activities of antioxidant enzymes in response to training in horses vary across the literature. The decreases in SOD and GPx activities in Thoroughbred horses have been reported in 6th and 12th weeks of training but GPx increased in the horses supplemented with antioxidant vitamins and trace elements<sup>27</sup>. In leisure horses subjected to training of moderate intensity SOD and GPx levels did not change<sup>29</sup> or varied, mostly decreased at the beginning of training and increased in 2nd (GPx) and 8th (SOD) weeks of exercise<sup>42</sup>. Human studies have shown that training, understood as repeating exposure to increased ROS levels leads to the upregulation of antioxidant defense including increasing SOD and GPx activities at rest<sup>44,45</sup>. Similar phenomenon may be expected in horses, however, it is likely dependent on the time and intensity of training. It should be strongly indicated that the training loads recommended for horses are much lower than recommended for humans, which can also influence the type, level and time of changes in antioxidant enzymes' activities.

The intensive training leads to ROS production which in turn may result in lipid peroxidation<sup>3</sup>. TBARS assay gives an insight into overall levels of oxidative stress due to the fact that it allows for the measurement

of many products of lipid peroxidation. Thiobarbituric acid (TBA) used in the assay bounds malondialdehyde (MDA), the most commonly measured product of lipid peroxidation but also other molecules derived from this process<sup>46</sup>. In the present study, TBARS was not affected by the training process, but significantly influenced by astaxanthin supplementation. It cannot be excluded that training related changes in lipid peroxidation occur earlier as it was shown in the 2nd week of moderate training in the horses that were not trained before<sup>42</sup>. The astaxanthin effect occurred after one month of administration when TBARS level was significantly lower by 34.5% in the horses supplemented with astaxanthin, then remained lower until the end of observation. Other studies regarding antioxidant supplementation have reported lower or no differences. After 30 days of vitamin E supplementation, MDA production did not change in Thoroughbred horses undergoing low-intensity exercise and interval training<sup>30</sup>. Ergothioneine administration for 4 weeks in Arabian stallions resulted in the reduction of MDA concentrations by 5%<sup>31</sup>. Unfortunately, singularly assessed MDA production cannot be directly compared to TBARS measurements and even TBARS assay results should not be compared across different laboratories due to possible pre-analytical differences and assay conditions that do not allow even minor variations in the protocol<sup>46</sup>.

Marked increase in TAS accompanied by marked decrease in TBARS (both by over 30%) proved the beneficial effect of astaxanthin on the antioxidant defense in the examined horses. Decrease in TBARS indicates also lower level of lipid peroxidation, which likely deals also with the oxidative damage of the muscles. Such high level of changes has not been reported before in the literature regarding dietary antioxidants for horses.

The training session produced significant increases in TAS immediately after exercise in all horses regardless of the supplementation, indicating that antioxidant defense was triggered by exercise. However, the values before and 40 min after exercise were higher in astaxanthin supplemented horses. Thus, the relative increase was lower in supplemented horses (1.6-fold vs. 2-fold in the control group). Similar TAS increases (1.6-fold and 1.7-fold) have been reported in Arabian horses after 1250- and 1400- meters races<sup>9</sup>. In contrast, moderate exercise in sedentary horses produced only a slight increase (by 7.5%) and only in the 1st days of training<sup>42</sup>. It confirms that TAS changes in response to exercise depend on the intensity of effort, but in the present study they were also influenced by astaxanthin supplementation.

Both GPx and GR activities tended to increase immediately after training session and decrease after 40-min. restitution. Still, only the increase in GPx activity in the control group was significant. The increases, visible although not significant, may show the compensation triggered by increased ROS production during an effort, while the depletion after restitution may be related to already reduced ROS amount. Lower activities of these enzymes in the supplemented group of horses seem to mirror lower pool of ROS that must be removed and a better antioxidant state, resulting from the presence of astaxanthin that poses an additional antioxidant.

The differences in SOD activities were slight and insignificant in the C group and the only significant difference was the decrease after 40-min. restitution in the horses supplemented with astaxanthin additionally suggesting its synergistic action with endogenous antioxidant system. Various effects of astaxanthin on the activities of antioxidant enzymes have been presented in the literature. The increases in SOD, CAT, and GPx activities have been reported in cell lines subjected to oxidative stress<sup>47</sup>. However, in mice undergoing moderate intensity exercise the decreases have been observed<sup>48</sup>. Similarly, various results have been reported regarding the activities of antioxidant enzymes in response to the effort.

Slight, insignificant changes in the activities of SOD and GPx have occurred after moderate exercise in leisure horses<sup>29,42</sup>. Slight but significant decreases in GPx activities have been reported in Arabians after 1250- and 1400- meters races<sup>9</sup>. In contrast, significant post exercise increases dealing with all antioxidant enzymes (SOD, GPx, GR, CAT) activities have been reported in Arabians after 30 km training session and have been markedly amplified by ergothioneine supplementation<sup>31</sup>.

As it has been mentioned, a certain ROS concentration is beneficial for proper adaptation to the workload. Low concentrations of ROS increase Ca<sup>2+</sup> release and force production, but further increase leading to high amounts of ROS result in the drop in force output<sup>49</sup>. Moreover, adaptation occurs only when the stimulus (ROS concentrations) exceeds minimal threshold, overloading the system<sup>45</sup>. Thus, the dose of antioxidant should be carefully chosen to allow proper adaptation resulting from the training sessions including the upregulation of the body's antioxidant defense. The dose selected in the present study allowed for contribution to the antioxidant defense, thus it seems that the production of ROS necessary to induce adaptive changes was maintained.

TBARS values did not change significantly in response to the exercise in this study, however, the levels in the horses supplemented with astaxanthin were lower in all sampling points. There are reports showing increased or unchanged lipid peroxidation rate measured as MDA production in response to exercise. Pronounced increases have been found in endurance horses. In Arabian stallions after 30 km long training MDA production increased 1.8-fold, but at lower extent in the horses supplemented with ergothioneine<sup>31</sup>. An increase in TBARS has been reported also after 160 km endurance ride together with the decrease in TAS in the halfway<sup>6</sup>. Shorter exercise sessions generally produced less or no increases. Chiaradia et al.<sup>11</sup> have shown the slight but significant increase in MDA production after training session in Maremmana race stallions. Similarly, in untrained leisure horses subjected to moderate exercise MDA levels increased by 47%, but remained unchanged when vitamin E was supplemented<sup>29</sup>. Other studies regarding single, short time training sessions have reported no changes in MDA concentrations after exercise. Such results have been obtained in Standardbreds conditioned for 8 weeks before the examined training session<sup>12</sup> and in Arabians after 1250- and 1400- meters races, regardless of the distance<sup>9</sup>.

The results presented in this study confirmed the beneficial effects of astaxanthin supplementation on the antioxidant status of Arabian horses that begin their race training. Astaxanthin seems to counterbalance the training-related oxidative stress partially. The selected dosing seems proper to shift the redox status towards more reducing environment, which is undoubtedly beneficial for the health and welfare of a horse. At the same time, the effects of training sessions which trigger ROS production and, in this manner, contribute to training progress are maintained.

## Methods

### Yeast biomass cultivation, astaxanthin extraction and micellization

The *P. rhodozyma* NCYC 874 strain (National Yeast Culture Collection, Great Britain) was cultured for 72 h at 21 °C in a shaker at 160 rpm (LS 500 POL-EKO Apparatus, Wodzisław Śląski, Poland) on YPD medium (Sigma Aldrich; Poznań, Poland). Cells were harvested by centrifugation at 3200 × g for 5 min. at 4 °C.

Ten g of the collected biomass was extracted with continuous shaking (160 rpm, 30 °C, 2 h) with 200 ml of acetone (Sigma Aldrich; Poznań, Poland). Then, the cells were centrifuged at 3200 × g for 5 min. at 4 °C. The acetone was evaporated in a ventilated incubator at 35 °C in the dark. The astaxanthin concentration and total carotenoid content (as β-carotene) in the sample was determined in an external laboratory (ChemProf Doradztwo Chemiczne s.c. Olsztyn, Poland) using the HPLC/UV-VIS method.

To ensure the stability of astaxanthin, the micellization process was carried out in a high-pressure homogenizer (NS1001L2K, Niro-Savi; Italy) at a pressure of 200 bar. 0.5% (w/w) methylcellulose (Certeck; Poland), 16.6% (w/w) rapeseed oil (Kruszwica; Poland) and 83.4% (w/w) astaxanthin suspended in water were used to prepare micelles. Emulsion stability was assessed visually using the ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) after one month of storage. To improve the organoleptic properties, astaxanthin micelles were mixed with water and 10% (w/w) malt.

### Horses and training

Sixteen privately owned 3 years old Arabian horses, 11 stallions and 5 mares, in regular race training were enrolled in the study. All horses were stabled in one racing facility (Służewiec Race Track in Warsaw) and trained by the same trainer. The animals were selected on the basis of similar advancement in training. Clinical examination by qualified veterinarian and hematological analysis were performed to exclude pathological conditions. All horses were dewormed and vaccinated according to the routine schedule, not earlier than 3 weeks before the onset of the study. They were housed in the same environment and fed the diet of hay, oats, and concentrate which maintained the recommendation for racing Arabian horses, on average, digestible energy of 0.27 MJ/kg BW per day and protein of 2.5 g/kg BW per day, divided into 3 meals. The diet was adjusted individually to each horse, depending on the training progress and so was the workload. Salt and water were available *ad libitum*. At the beginning of the study (in April), the horses were randomly allocated into the astaxanthin (A) group (5 stallions and 2 mares) and control (C) group (6 stallion and 3 mares). The A group was supplemented daily with astaxanthin at a dose of 250 mg per a horse which corresponded to the dose of 0.52–0.58 mg/kg BW. The C group did not receive any supplementation.

Stallions and mares trained together in a mixed group with the same intensity at Służewiec Race Track in Warsaw according to the exercise schedule involving 2 intensive training sessions every week. The intensive training sessions included warm-up walking and trotting with the rider (about 15 min.), followed by cantering and fast gallop (45–50 km/h) for 800 m, and 40 min. of exercise in a horse walker.

### Blood samples

Blood samples were collected by jugular venipuncture in the time points presented at Fig. 2. During the sampling procedure the horses were handled by their usual riders to minimize stress, as recommended by the Ethical Committee guidelines. Samples were collected using 0.8 mm needle into 3 vacuum tubes: EDTA tube for hematological tests, heparinized tube for oxidative status measurements, and plain tube for the analysis of lactic acid (lactate, LA) concentration. LA concentration was determined immediately after blood collection by ejecting a drop of blood onto a single-use lactate strip (Accusport, Roche). EDTA and heparinized samples were transported to the laboratory at +4 °C and analyzed within 6 h after collection. In EDTA-blood, the following hematological measurements were performed using an automated hematology analyzer: red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT), white blood cell count (WBC), neutrophil count (NEU), lymphocyte count (LYM), monocyte count (MON), eosinophil count (EOS), basophil count (BAS), and platelet count (PLT). The measurements were performed in a certified laboratory and the methods were validated according to certification standards. The high-quality peripheral blood smears stained with the May-Grünwald-Giemsa reagent were assessed in the light microscope (Primo Star, Zeiss, Germany) under 1000× magnification (with standard leukocyte differential count). The leukocyte differential count was performed by classifying one hundred leukocytes into five subpopulations: neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes, and lymphocytes. One ml of blood from the heparinized tube was transferred into another tube, while the rest was centrifuged and plasma was harvested. Then, both heparinized blood and plasma samples were immediately frozen and kept at -80°C until the analysis of oxidative status.

All the procedures of blood sampling were performed as part of routine health examination and exercise test and thus, according to the European directive EU/2010/63<sup>50</sup> and Polish regulations regarding experiments in animal there was no need for the approval of Ethics Committee for the described procedures, qualified as non-experimental clinical veterinary practices, excluded from the directive. The trainer granted a written informed consent for the use of blood for scientific analyses.

### Oxidative status measurements

TAS as well as GR and CAT activities were analyzed in plasma samples using dedicated commercial kits (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Co. Antrim, UK and Sigma Aldrich for CAT) by either colorimetric or UV methods according to the protocols supplied by the manufacturer. GPx and SOD activities were quantified in the whole blood using the Randox assay kits (RANSEL and RANSOD kit; Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Co. Antrim, UK) according to the manufacturer's manuals. The measurements were performed spectrophotometrically using Biochrom Anthos Zenyth 200 spectrophotometer (Cambridge, UK) at a wavelength of 505 nm for the enzymes activity and 600 nm for TAS. According to the manufacturer's declaration, the TAS assay was linear up to 2.5

mmol/l, which allowed for the detection of clinically important results without sample dilution. The intra-assay TAS variability (expressed as CV%) was 4.8% at 100  $\mu$ mol/l. The detection limit of GR assay was 10 U/l and the linearity was up to 387 U/l. The detection limit of CAT assay was 1  $\mu$ U of CAT activity and the linearity was ensured by testing the undiluted samples and the samples diluted 1:5 and 1:10. The inter- and intra-assay variability (CV%) was <9% in all cases. The detection limit of SOD assay was 1.25 U/l. The biological role of SOD is dismutation of superoxide radicals, and the measurement of its activity is based on the degree of inhibition of this reaction (one unit of SOD corresponds to 50% inhibition). The measurements were provided within 30% and 60% of the inhibition of the sample diluent rate. The intra- and interassay variables for RANSOD assay declared by the manufacturer were 4.6% and 7.1%, respectively. The detection limit of GPx was 75 U/l and the method ensured linearity up to 925 U/l. The intra- and interassay variables for RANSEL assay declared by the manufacturer were 4.9% and 7.3%, respectively. The protocol described by Ohkawa et al.<sup>51</sup> was used to measure TBARS. Briefly, plasma samples were incubated with reaction mixture containing 0.8% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 10% acetic acid, and 0.17% thiobarbituric acid (TBA) for 1 h at 100 °C. Then, the samples were centrifuged and absorbance values were read at 530 nm using a spectrophotometer (Biochrom Anthos Zenyth 200 spectrophotometer, Cambridge, UK). Values were referred to a calibration curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane. The detection limit of TBARS was 1.25 nmol/l. The intra-assay variability (CV%) was 6.8% at 5 nmol/l TBARS.

### Statistical analysis

Numerical variables and residuals (errors) were shown to be normally distributed according to the normal probability quantile-quantile (Q-Q) plots and Shapiro-Wilk W test. Hematological measurements and oxidative status measurements were compared between time points (within-subject factor) and groups (between-subject factor) using the mixed linear model (MLM) if the number of horses differed between timepoints (analysis of the long-term effect of astaxanthin supplementation on baseline oxidative status i.e. comparison between T0, T1-0, T2-0, T3-0 timepoints) or using the repeated-measure analysis of variance (RM-ANOVA) with the post-hoc Tukey's test for unequal groups if the number of horses remained stable (analysis of the effect of astaxanthin supplementation on oxidative status during a single training session i.e. comparison between T0, T1-0, T1-1, T1-2 timepoints). In RM-ANOVA, the sphericity assumption was verified using the Mauchly's test of sphericity and, if violated, the Greenhouse-Geisser correction of degrees of freedom was applied. In MLM, a horse was fitted as the random effect and the time and group as the fixed effects and pairwise comparisons were performed using the paired and unpaired Student's t-test with the Bonferroni-Holm correction for multiple comparisons. Results were presented as the estimated marginal means with 95% confidence intervals (CI 95%) in parentheses in each group in subsequent timepoints with the residual standard error (RSE) for each timepoint. RSE was calculated as the square root of the mean square residual (error). On graphs, the oxidative status measurements were presented as the arithmetic mean, standard deviation ( $\pm$  SD), and individual measurements in each group in subsequent timepoints. Categorical data were presented as counts and proportions in groups and compared between groups with the Fisher exact test. All tests were 2-tailed. A significance level ( $\alpha$ ) was set at 0.05. The analysis was performed in TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA) and IBM SPSS Statistics 29 (IBM Corp., Armonk, NY).

### Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 24 July 2024; Accepted: 24 October 2024

Published online: 14 November 2024

### References

- Preiser, J. C. Oxidative stress. *J. Parent. Ent Nutr.* **36**, 147–154. <https://doi.org/10.1177/0148607111434963> (2012).
- Powers, S. K. & Hogan, M. C. Exercise and oxidative stress. *J. Physiol.* **594**, 5079–5080 (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5023702/>
- Williams, C. A. The effect of oxidative stress during exercise in the horse. *J. Anim. Sci.* **94**, 4067–4075. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9988> (2016).
- Powers, S. K. et al. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J. Sport Health Sci.* **9**, 415–425 (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7498668/>
- Bottegaro, N. B. et al. Effect of prolonged submaximal exercise on serum oxidative stress biomarkers (d-ROMs, MDA, BAP) and oxidative stress index in endurance horses. *BMC Vet. Res.* **14**, 216. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1540-y> (2018). <https://bmcbvetres.biomedcentral.com/articles/>
- Frankiewicz-Józko, A. & Szarska, E. Anti-oxidant level to exercise in the blood of endurance horses. *Biol. Sport* **17**, 217–227 (2000).
- Marlin, D. J. et al. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J. Nutr.* **132**, 1622S–1627S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1622S> (2002).
- Piccione, G., Fazio, F. & Giudice, E. Oxidative stress in standardbred horses during official races of 1600 and 2000 meters. *Med. Veter.* **63**, 12 (2007). <http://www.medycynawet.edu.pl/images/stories/pdf/pdf2007/122007/200712s15541557.pdf>
- Mami, S., Khaje, G., Shahriari, A. & Gooraninejad, S. Evaluation of biological indicators of fatigue and muscle damage in Arabian horses after race. *J. Equine Vet. Sci.* **78**, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.04.007> (2019).
- Arfuso, F. et al. Oxidant and Antioxidant Parameters' Assessment Together with Homocysteine and Muscle Enzymes in Racehorses: Evaluation of Positive Effects of Exercise. *Antioxid. (Basel)* **11**, 1176 (2022). <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/6/1176>
- Chiaradia, E. et al. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp. Biochem. Physiol. Part. B* **119**, 833–836. [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(98\)10001-9](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(98)10001-9) (1998).
- Smarsh, D. N. & Williams, C. A. Oxidative stress and antioxidant status in standardbreds: Effect of age and acute exercise before and after training. *J. Equine Vet. Sci.* **47**, 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.07.019> (2016).
- Mularczyk, M., Michalak, I. & Marycz, K. Astaxanthin and Other Nutrients from *Haematococcus Pluvialis*—Multifunctional Applications. *Mar. Drugs* **18**, 459 (2020). <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/9/459>

14. Budriesi, R. et al. Chemical Features and Biological Effects of Astaxanthin Extracted from *Haematococcus pluvialis* Flotow: Focus on Gastrointestinal System. *Biol. Life Sci. Forum.* **12**, 31 (2022). <https://www.mdpi.com/2673-9976/12/1/31>
15. Yang, Y., Kim, B., Lee, J. Y. Astaxanthin structure metabolism, and health benefits. *J. Hum. Nutr. Food Sci.* **1**, 1003 (2013). <https://www.jscimedcentral.com/public/assets/articles/nutrition-1-1003.pdf>
16. Miki, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **6**, 141–146 (1991). <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac199163010141/html>
17. Chang, M. X. & Xiong, F. Astaxanthin and its effects in inflammatory responses and inflammation-associated diseases: Recent advances and future directions. *Molecules* **25**, 5342 (2020). <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/22/5342>
18. Zhang, L. & Wang, H. Multiple Mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin. *Mar. Drugs* **13**, 4310–4330 (2015). <https://www.mdpi.com/1660-3397/13/7/4310>
19. Gowd, V., Xiao, J., Wang, M., Chen, F. & Cheng, K. Multi-mechanistic antidiabetic potential of astaxanthin: An update on preclinical and clinical evidence. *Mol. Nutr. Food Res.* **65**, 2100252. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100252> (2021).
20. Brown, D. R., Gough, L. A., Deb, S. K., Sparks, S. A. & McNaughton, L. R. Astaxanthin in exercise metabolism, performance and recovery: A review. *Front. Nutr.* **4**, 76 (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5778137/>
21. Kawamura, T. & Muraoka, I. Exercise-induced oxidative stress and the effects of antioxidant intake from a physiological viewpoint. *Antioxidants (Basel)* **7**, 119 (2018). <https://www.mdpi.com/2076-3921/7/9/119>
22. Waldman, H. S., Bryant, A. R., Parten, A. L., Grozier, C. D. & McAllister, M. J. Astaxanthin supplementation does not affect markers of muscle damage or inflammation after an exercise-induced muscle damage protocol in resistance-trained males. *J. Strength. Cond. Res.* **37**, e413–e421. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000004408> (2023).
23. EFSA Safety of astaxanthin for its use as a novel food in food supplements. *EFSA J.* **18**, 5993 (2020). <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5993>
24. EFSA Safety of Schizochytrium sp. oil as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J.* **18**, 6242 (2020). <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6242>
25. Wahab, N. R. A., Affandi, M. M. R., Fakurazi, S., Alias, E. & Hassan, H. Nanocarrier system: State-of-the-art in oral delivery of astaxanthin. *Antioxidants (Basel)* **11**, 1676 (2022). <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/9/1676>
26. Barbe, F., Sacy, A., Bonhomme, P. & Chevaux, E. Effect of antioxidant supplementation to horses on muscle integrity and resistance to training. EAAP – 65th Annual Meeting, Copenhagen 2014, 186 (2014). [https://doi.org/10.3920/9789086867998\\_225](https://doi.org/10.3920/9789086867998_225)
27. De Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J. & Lekeux, P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet. J.* **169**, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.12.012> (2005).
28. Lacerda, Y., Nascimento, A., Alves, F. R. & Reghim, L. S. Physical preparation and antioxidant supplementation for endurance racehorses. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Anim.* **19**, 23–31 (2018). <https://www.scielo.br/rjrbspa/a/7LcHRMzQbzJNznCPbCpNHKC/>
29. Nemeč Svete, A., Vovk, T., Bohar Topolovec, M. & Kruljč, P. Effects of Vitamin E and Coenzyme Q10 Supplementation on Oxidative stress parameters in untrained leisure horses subjected to acute moderate exercise. *Antioxidants (Basel)* **10**, 908 (2021). <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/6/908>
30. Kent, E. et al. Comparison of an antioxidant source and antioxidant plus BCAA on athletic performance and post exercise recovery of horses. *J. Equine Vet. Sci.* **121**, 104200. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104200> (2023).
31. Adah, A. S., Ayo, J. O., Adah, D. A., Nwonuma, C. O. & Lawal, T. A. Molecular docking and experimental validation of the effect of ergothioneine on heat shock protein-70 following endurance exercise by Arabian stallions. *BMC Vet. Res.* **19**, 27. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03584-6> (2023). <https://bmcbvetres.biomedcentral.com/articles/>
32. Sato, F. et al. Effects of daily astaxanthin and L-carnitine supplementation for exercise-induced muscle damage in training thoroughbred horses. *J. Equine Vet. Sci.* **35**, 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.08.003> (2015).
33. Hinchliff, K. W., Kaneps, A. J. & Geor, J. R. Basic and clinical sciences of the equine athlete In: *Equine Sports Medicine and Surgery*. Elsevier Health Sciences (2014).
34. Mularczyk, M., Bourebaba, N., Marycz, K. & Bourebaba, L. Astaxanthin carotenoid modulates oxidative stress in adipose-derived stromal cells isolated from equine metabolic syndrome affected horses by targeting mitochondrial biogenesis. *Biomolecules* **27**, 1039 (2022). <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/8/1039>
35. <https://astaxanthin.net/pages/horse.html>, Access 5 Oct 2023.
36. <https://www.drugs.com/vet/fullbucket-equine-medical-muscle.html> access 5.10.2023.
37. Hussein, G. et al. Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SHR/NDmcr-Cp. *Life Sci.* **80**, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.09.041> (2007).
38. Shatoor, A. S. & Al Humayed, S. Astaxanthin ameliorates high-fat diet-induced cardiac damage and fibrosis by upregulating and activating SIRT1. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 7012–7021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.079> (2021).
39. Park, J. S. et al. Astaxanthin uptake in domestic dogs and cats. *Nutr. Metabol (Lond)* **7**, 52. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-52> (2010). <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/>
40. Murai, T. et al. Effects of astaxanthin supplementation in healthy and obese dogs. *Vet. Med. (Auckl)* **10**, 29–35 (2019). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6385744/>
41. <https://www.rossdales.com/laboratories/tests-and-diseases/creatinine-kinase-ck>, Access 5 Oct 2023.
42. Ott, E. C. et al. Oxidative stress biomarkers and free amino acid concentrations in the blood plasma of moderately exercised horses indicate adaptive response to prolonged exercise training. *J. Anim. Sci.* **100**, skac086 (2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9030216/>
43. Pereira, C. P. M., Souza, A. C. R., Vasconcelos, A. R., Prado, P. S. & Name, J. J. Antioxidant and antiinflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* **47**, 37–48 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7723678/>
44. Miyazaki, H. et al. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **8**, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s004210000342> (2001).
45. Fisher-Wellman, K. & Bloomer, R. J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn. Med.* **8**, 1 (2009). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2642810/>
46. De Leon, J. A. D. & Borges, C. R. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *J. Vis. Exp.* **12**, 159. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9617585/> (2020).
47. Hormozi, M., Ghoreishi, S. & Baharvand, P. Astaxanthin induces apoptosis and increases activity of antioxidant enzymes in LS-180 cells. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **47**, 891–895. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1580286> (2019).
48. Zhou, Y. et al. High-dose astaxanthin supplementation suppresses antioxidant enzyme activity during moderate-intensity swimming training in mice. *Nutrients* **11**, 1244 (2019). <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/6/1244>
49. Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E. & Viña, J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol. Med.* **15**, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.001> (2008).
50. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063>
51. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3) (1979).

## Acknowledgements

We wish to thank the Sluzewiec Race Track for cooperation and supporting the research.

## Author contributions

Conceptualization – B.G.H., A.C. Investigation – B.G.H, M.K., M.C., E.S., K.S., A.G., S.G., A.H., M.M., A.C. Methodology – M.K., J.W., E.S., K.S., A.G., S.G., A.H., M.M. Formal analysis – B.G.H., M.C., J.W., A.C. Writing—Original Draft – B.G.H., K.M., M.C., A.C. Writing—Review and Editing – M.K., M.C., J.W., E.S., K.S., K.M., A.C. Supervision – K.M., A.C. All authors contributed to the interpretations of the results, the discussion and prepared the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Declarations

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Ethical approval and consent to participate

All the procedures of blood sampling were performed as part of routine health examination and exercise test and thus, according to the European directive EU/2010/63 and Polish regulations regarding experiments in animal there was no need for the approval of Ethics Committee for the described procedures, qualified as non-experimental clinical veterinary practices, excluded from the directive. The trainer granted a written informed consent for the use of blood for scientific analyses. The authors complied with the ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>).

### Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.C.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2024





## Article

# Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses

Beata Giercuskiewicz-Hecold <sup>1</sup>, Marek Kulka <sup>2</sup>, Michał Czopowicz <sup>3</sup> , Ewa Szarska <sup>4</sup>, Katarzyna Strzelec <sup>5</sup> , Arkadiusz Grzeczka <sup>6,7</sup> , Szymon Graczyk <sup>6,7</sup> , Marta Wiśniewska <sup>6</sup>, Zofia Jędrzejkowska <sup>6</sup>, Aleksandra Rumińska <sup>6</sup>, Krzysztof Marycz <sup>8,9</sup> and Anna Cywińska <sup>7,\*</sup>

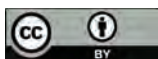
- <sup>1</sup> Doctoral School, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland; b.giercuskiewicz@gmail.com
- <sup>2</sup> Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland; marek\_kulka@sggw.edu.pl
- <sup>3</sup> Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland; michal\_czopowicz@sggw.edu.pl
- <sup>4</sup> Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Kozielska 4, 01-001 Warsaw, Poland; eszarska@gmail.com
- <sup>5</sup> Department of Horse Breeding and Use, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; katarzyna.strzelec@up.lublin.pl
- <sup>6</sup> Student of the Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland; grzeczka@umk.pl (A.G.); graczyk72@gmail.com (S.G.); 310947@stud.umk.pl (M.W.)
- <sup>7</sup> Department of Basic and Preclinical Sciences, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland
- <sup>8</sup> International Institute of Translational Medicine, Jesionowa 11, Malin, 55-114 Wisznia Mała, Poland; krzysztofmarycz@gmail.com
- <sup>9</sup> Department of Veterinary Medicine and Epidemiology, Veterinary Institute for Regenerative Cures, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95516, USA
- \* Correspondence: anna\_cywinska@weterynaria.pl; Tel.: +48-501-136-300



**Citation:** Giercuskiewicz-Hecold, B.; Kulka, M.; Czopowicz, M.; Szarska, E.; Strzelec, K.; Grzeczka, A.; Graczyk, S.; Wiśniewska, M.; Jędrzejkowska, Z.; Rumińska, A.; et al. Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants* **2024**, *13*, 905. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

Academic Editor: Alessandra Napolitano

Received: 14 June 2024  
Revised: 18 July 2024  
Accepted: 23 July 2024  
Published: 26 July 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** This study aimed to evaluate the oral supplementation of astaxanthin (ATX) on inflammatory markers in 3-year-old Arabian racehorses. Despite the recognized antioxidant and anti-inflammatory properties of ATX observed in vitro in rodent models and in human athletes, the effects in equine subjects remain unknown. This study involved a controlled trial with 14 horses receiving either ATX (six horses) or a placebo (eight horses), monitored over four months of race training. Inflammatory cytokines: TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, and prostaglandin E (PGE), were measured monthly to assess the impact of ATX on the inflammatory response. The results indicated no significant differences in measured parameters between the ATX and the control group during the study. However, a significant time-dependent decrease in TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  levels ( $p = 0.001$ ) was observed in both groups, suggesting that regular training naturally modulates inflammatory responses. Moreover, positive correlations were noted between TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  ( $p < 0.001$ ) in the early phase of the study and between IL-6 and IL-10 ( $p = 0.008$ ) in the later phase. Hematological parameters remained stable and within reference ranges, indicating no adverse effects of ATX supplementation. Performance metrics, including the number of races completed and wins, showed no significant differences between groups, suggesting that ATX did not enhance athletic performance under the study conditions. Overall, while ATX supplementation affected neither cytokine levels nor performance in Arabian racehorses, the natural anti-inflammatory effects of regular training were evident. Further research is needed to explore potential benefits of ATX supplementation under different conditions, such as in horses with subclinical inflammation or varying training regimens, to fully clarify its role and applications in equine sports medicine.

**Keywords:** astaxanthin; horse; race training; cytokines; anti-inflammatory state

## 1. Introduction

Astaxanthin (ATX) is a potent carotenoid antioxidant recommended as a supplement for both humans and animals across various indications. Due to its unique chemical structure, ATX exhibits superior bioavailability and demonstrates an antioxidant potency that is tenfold greater than of  $\beta$ -carotene and a hundredfold greater than of  $\alpha$ -tocopherol [1–3]. In the bloodstream of dogs and cats, ATX is transported by high-density lipoprotein (HDL) and is taken up by leukocytes, thereby being distributed to all subcellular structures. The biokinetic uptake of astaxanthin in dogs and cats exhibits similarities to that observed in humans [4,5], making ATX an ideal antioxidant dietary additive.

Supplementation with ATX has been extensively investigated for its multiple effects in reducing and preventing oxidative stress and tissue damage [2,6,7]. In humans, the beneficial effects of ATX include anti-inflammatory, immunostimulant [8], anti-cancer [9], and anti-diabetic properties [10]. Notably, its anti-inflammatory action has been documented not only in clinical patients but also in athletes experiencing immune perturbations and inflammatory responses due to physical exertion [11,12].

In animals, ATX-rich algae *Haematococcus pluvialis* have been recommended as feed additives to enhance the quality of animal-derived products and are approved for human consumption to a certain extent [13,14]. Additionally, ATX has shown benefits as a supplement in dogs with obesity-related inflammatory disorders [15] and horses suffering from equine metabolic syndrome [7]. Rodent models have further demonstrated that ATX may alleviate oxidative stress in mice and rats subjected to a high-fat diet [16–18].

Currently, astaxanthin (ATX) supplementation for horses is gaining increasing interest. It is commercially recommended for various groups of healthy horses, including those engaged in moderate to heavy work, as well as growing and elderly ones. Additionally, the use of ATX is widespread in injured, immune-compromised, and allergic horses [19–21], as well as horses with muscle disorders such as tying-up syndrome or polysaccharide storage myopathy (PSSM). In racehorses, antioxidants have been proposed as supplements reducing inflammation in the musculoskeletal system [22,23] and airways [24]. Due to the strong antioxidant properties of ATX and the fact that the mechanism by which it limits exercise-induced muscle damage has been recognized in mice [25], it is widely considered as a supplement for human athletes [12] and seems to be a perfect candidate also for horses. Additionally, antioxidants including ATX are not currently forbidden by anti-doping regulations.

However, the rapidly increasing popularity of ATX in horses is scarcely supported by scientific evidence. It has been shown that long-term supplementation with ATX and L-carnitine is associated with lower serum creatinine kinase (CK) activity and a tendency toward lower lactate dehydrogenase isoenzyme-5 (LDH-5) activity, suggesting these compounds may reduce the rate of exercise-induced muscle damage [22]. Current anti-inflammatory recommendations for horses are based only on in vitro studies, rodent studies, and observations in humans [26–29]. In the last decade, interest in the welfare of the exercised horse has grown considerably since the animals must face potentially stressful situations during their training and work. Hence, evaluating their stress response could be the primary approach to success in the horses' performance and welfare, as described in common equestrian disciplines [30]. An inflammatory response triggered by exercise has been documented in both humans [31–33] and horses [34–36]. This response involves musculoskeletal microdamage and metabolic derangements related to oxidative stress. However, regular training leads to adaptations that include a reduction in inflammation, sometimes described as an "anti-inflammatory state" [37,38]. It has also been reported that this reduction in inflammatory response in young racehorses may be further enhanced by nutritional supplementation with curcumin, *Boswellia*, coenzyme Q10, L-carnitine, and D-ribose [23]. Therefore, it has been hypothesized that astaxanthin supplementation may have a similar effect.

The objective of this study was to evaluate changes in serum concentrations of inflammatory markers (cytokines and prostaglandin E, PGE) during the initial months of

race training in Arabian horses. A reduction in training-related inflammatory responses in ATX-supplemented horses, expressed as either an earlier or more pronounced decrease in the concentrations of inflammatory markers was anticipated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Horses and Training

This study included 14 (9 stallions and 5 mares) privately owned 3-year-old Arabian horses under training for flat races. All horses were kept in stables belonging to the Służewiec Racetrack in Warsaw and fed on a diet composed of hay, oats, and concentrate satisfying the nutritional recommendations for racing Arabians. Salt and water were available ad libitum. The horses were trained by the same trainer and were at a similar training level. They were clinically examined by a certified veterinary surgeon as well as dewormed and vaccinated according to the routine schedule, not earlier than 3 weeks before the onset of the study. At enrollment, the horses were examined for gait regularity and basic clinical measurements (rectal temperature, heart rate, respiratory rate, mucous membranes, respiratory sounds, and gut sounds) and classified as healthy and fit for race training. Before and after races, the horses underwent the routine health check provided by a certified veterinary surgeon according to the regulations applied for races. Concomitant disabilities or diseases were the criteria for exclusion from the study.

At the beginning of the study (in April), the horses were randomly (simple randomization based on a pseudorandom number generator) allocated to the ATX group (4 stallions and 2 mares) and control group (5 stallions and 3 mares). The ATX group was supplemented with ATX at a daily dose of 250 mg per horse, which corresponded to a dose of 0.52–0.58 mg/kg body weight. The control group did not receive any supplementation.

Stallions and mares trained together with the same intensity at the Służewiec Racetrack in Warsaw according to the exercise schedule involving 2 intensive training sessions every week. The intensive training sessions included warm-up walking and trotting with a rider (about 15 min), followed by cantering and a fast gallop (45–50 km/h) for 800 m, and then 40 min. of exercise in a horse walker. To evaluate the long-term effect of astaxanthin supplementation (Figure 1) on the inflammatory markers, the horses were examined 4 times: in April just before they started intensive training sessions and ATX supplementation, and then monthly before the intensive training sessions—in May after 1 month of training, in June after 2 months of training, and in July after 3 months of training.

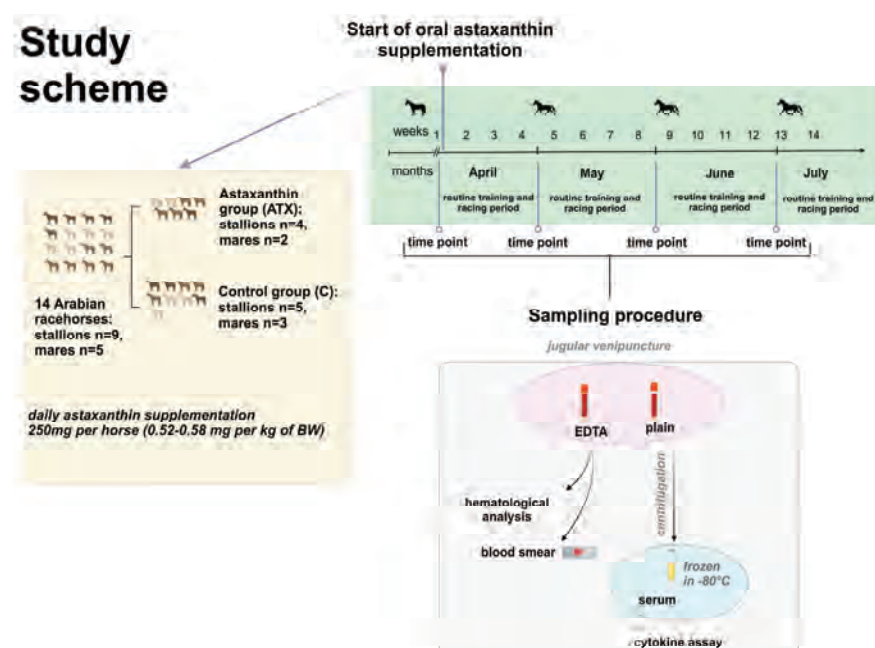


Figure 1. Study design. Created with BioRender.com.

## 2.2. Blood Sampling

During the sampling procedure, the horses were handled by their regular riders to minimize stress, as recommended by the Ethical Committee guidelines. All of the procedures of blood sampling were performed as part of routine health examinations, and thus, according to the European directive EU/2010/63 [39] and Polish regulations regarding experiments on animals, there was no need for the approval of the Ethics Committee for the described procedures, which qualified as non-experimental clinical veterinary practices, and were excluded from the directive. A written consent for the use of blood for scientific analyses was obtained from the trainer.

Blood samples were collected from the jugular vein, at rest, before each training session between 6:00 and 6:30 a.m. Samples were collected into BD Vacutainer (Becton Dickinson, Reading, UK) EDTA tubes (Becton Dickinson, UK) for hematological analysis, and dry (serum) tubes (Becton Dickinson, UK) for cytokine and PGE analyses. All samples were stored at 4 °C and EDTA samples were analyzed within 6 h after collection. Blood in dry tubes was allowed to clot and centrifuged for 10 min at 1000× *g*. Then, the serum was harvested and kept at −80 °C until cytokine and PGE quantification. The following hematological parameters were measured using an automated hematology analyzer (Sysmex XN-10, Lincolnshire, IL, USA): red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT), white blood cell count (WBC), neutrophil count (NEU), lymphocyte count (LYM), monocyte count (MON), eosinophil count (EOS), basophil count (BAS), and platelet count (PLT). Leukocyte differential count and blood cell morphology were assessed on high-quality peripheral blood smears stained with the May–Grünwald–Giemsa reagent using a light microscope (Primo Star, Zeiss, Jena, Germany) under 1000× magnification.

## 2.3. Cytokine and PGE Assays

The concentrations of 4 cytokines (tumor necrosis factor  $\alpha$ —TNF $\alpha$ , interferon  $\gamma$ —IFN $\gamma$ , interleukin 6—IL-6, and interleukin 10—IL-10) and one prostaglandin (PGE) were measured using immunoenzymatic commercial assays dedicated for equine species (Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA) according to the manufacturer's protocols. Serum samples for PGE quantification were diluted 1:2. The absorbance was measured with a Multiscan Reader (Labsystem, Helsinki, Finland) using a Genesis V 3.00 software program. Intra- and inter-plate precision of the assays (expressed as the coefficient of variation; CV) were CV < 10% and CV < 12%, respectively. The quantification range was 15.6–1000 pg/mL for the TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and IL-6 assays, 7.8–500 pg/mL for the IL-10 assay, and 24.7–2000 pg/mL for the PGE assay.

## 2.4. Statistical Analysis

Numerical variables (hematological measurements as well as cytokine and PGE concentrations) were examined for normality of distribution using the normal probability Q-Q plots and the Shapiro–Wilk test. As the normality assumption was violated ( $p < 0.001$  for TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, PGE, and  $p = 0.01$  for IFN $\gamma$ ), they were summarized using the median and range in tables and median, interquartile range (IQR), and individual measurements in figures. Cytokine concentrations were compared between two groups at each time point using the Mann–Whitney U test. If no significant difference was detected, the groups were merged and the change of cytokine concentrations in time was assessed using the Friedman test. If the latter proved significant, it was followed by the Wilcoxon signed-rank test to identify time points at which the cytokine concentrations significantly differed. The Mann–Whitney U test was also used to compare the numbers of races and wins between the two groups. Correlations between the cytokine and PGE concentrations were analyzed on the common group of 14 horses using the Spearman rank correlation coefficient ( $R_s$ ). All tests were two-tailed, and the significance level ( $\alpha$ ) was set at 0.05. No correction for multiple comparisons was applied to avoid increasing the type II error (i.e., to increase the power of statistical comparisons negatively affected by small group sizes). The statistical analysis was performed with TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

### 3. Results

All horses trained regularly during the study period and did not exhibit visible muscle damage or any other pathological conditions. Most horses were presented at official races and the number of completed races as well as the number of wins did not differ significantly between the groups ( $p = 0.662$  and  $p = 0.852$ , respectively) (Table 1). Five horses were sampled three instead four times (one month was missing) and one horse was sampled only twice due to the race plan. The horses were not sampled if they were planned to participate in a race the following day. Missing values were replaced by the arithmetic mean calculated from the measurements of all horses examined in a corresponding month.

**Table 1.** Numbers of races and wins in the astaxanthin (ATX) and control groups during the study period.

	ATX Group (n = 6)	Control Group (n = 8)	<i>p</i> -Value
Number of races completed			0.662
0	1	2	
1	0	1	
2	1	1	
3	2	1	
4	0	1	
5	0	0	
6	2	2	
Number of races won			0.852
0	3	4	
1	2	4	
2	1	0	

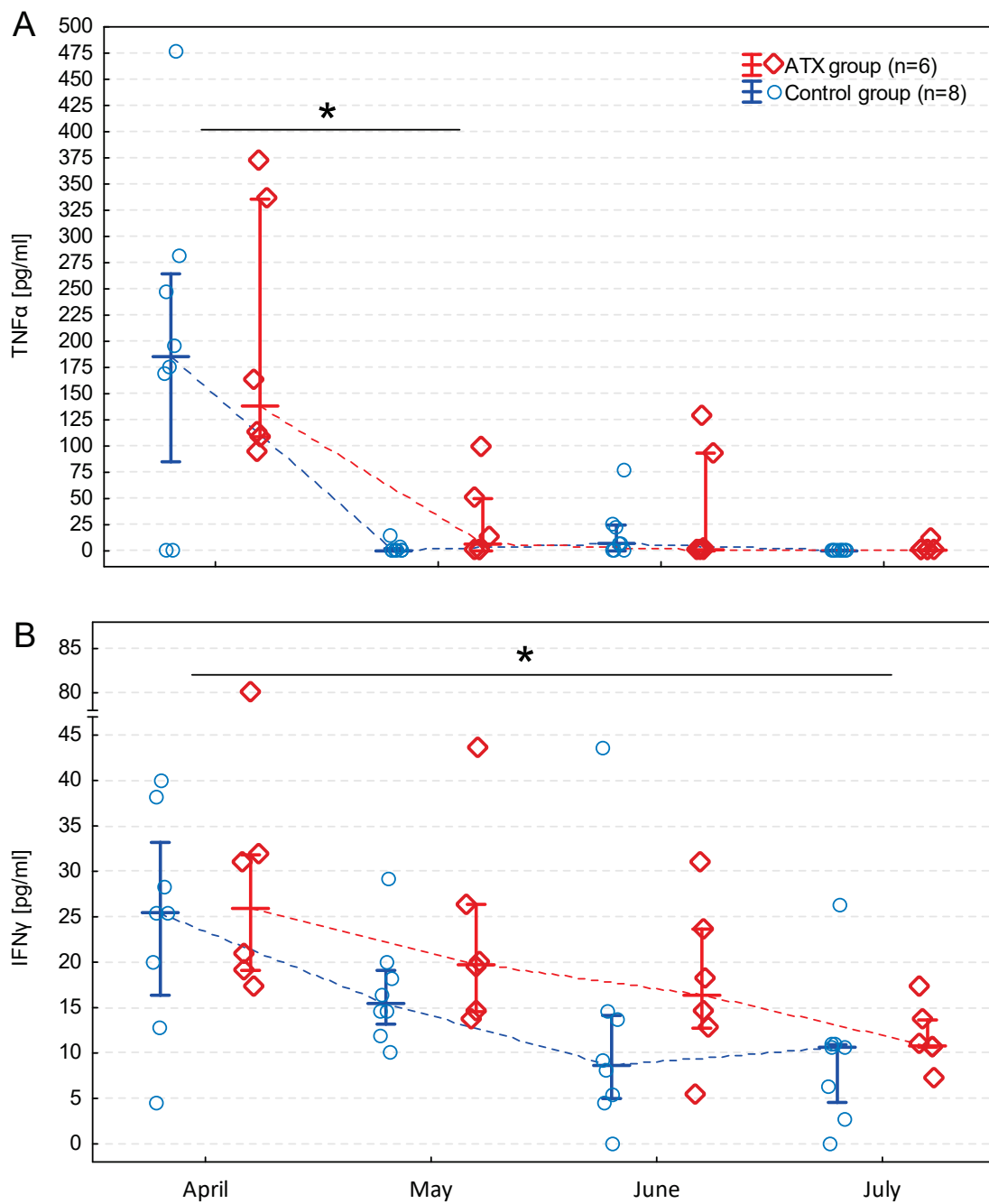
The basic hematological results (WBC, RBC, HCT, and HGB) remained within the reference intervals [40] during the entire study (Table 2) and in the subsequent months. No abnormalities were found in the microscopic examination of the blood cells.

**Table 2.** Hematological measurements in studied horses in the subsequent months presented as the median and range in the astaxanthin (ATX) and control groups. WBC—white blood cell count, RBC—red blood cell count, HGB—hemoglobin concentration, HCT—hematocrit.

	Group	Month				Friedman Test
		April	May	June	July	<i>p</i> -Value
WBC [G/L]	ATX (n = 6)	10.1 (9.7–11.7)	8.9 (7.6–10.2)	9.6 (8.1–12.1)	9.4 (8.3–11.5)	0.126
	Control (n = 8)	9.8 (7.8–10.8)	9.5 (8.1–11.7)	9.9 (8.8–10.9)	9.0 (8.3–10.3)	
RBC [G/L]	ATX (n = 6)	10.3 (9.4–11.8)	9.9 (9.9–11.4)	10.1 (8.9–12.3)	10.4 (9.3–12.1)	0.341
	Control (n = 8)	10.3 (8.1–12.8)	9.9 (4.1–12.8)	10.6 (9.3–13.1)	10.3 (8.7–12.4)	
HGB [g/dL]	ATX (n = 6)	15.0 (14.1–17.4)	14.8 (13.6–17)	14.5 (14.1–15.7)	15.9 (14.0–18.8)	0.509
	Control (n = 8)	15.6 (12.8–17.5)	14.9 (6.1–17.8)	15.7 (15.7–18.9)	15.9 (13.3–18.7)	
HCT [%]	ATX (n = 6)	43.0 (40.5–49.1)	40.7 (37.9–46.4)	42.3 (37.0–55.9)	44.1 (38.1–54.5)	0.362
	Control (n = 8)	43.4 (35.9–49.6)	40.8 (17.4–51.7)	45.1 (37.4–55.7)	43.6 (36.6–51.7)	

The concentrations of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, and PGE did not differ significantly between groups; however, the time effect was significant in terms of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  (Table 3). The concentration of TNF $\alpha$  was the highest in April, then decreased significantly in May ( $p = 0.009$ ) and remained significantly lower in June ( $p = 0.015$ ) and July ( $p = 0.007$ ) (Figure 2A). Similarly, the concentration of IFN $\gamma$  was the highest in April and then decreased gradually, reaching a significantly lower value in July ( $p = 0.006$ ) (Figure 2B).

The concentrations of IL-6 and IL-10 did not change significantly during the study period (Table 3).



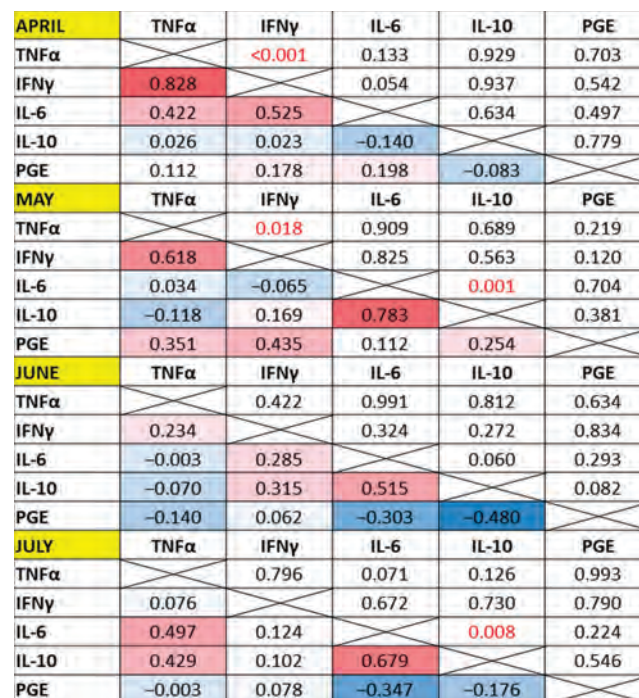
**Figure 2.** Changes in tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (A) and interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (B) concentrations in the subsequent months presented as medians, interquartile ranges, and individual measurements in the astaxanthin (ATX) and control groups. Asterisks (\*) indicate significantly different time points according to the Wilcoxon signed-rank test.

When all 14 horses were analyzed together, significant positive correlations were observed between TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  concentrations in April ( $R_s = 0.83$ ,  $p < 0.001$ ) and May ( $R_s = 0.62$ ,  $p = 0.018$ ) and between IL-6 and IL-10 concentrations in May ( $R_s = 0.78$ ,  $p = 0.001$ ) and July ( $R_s = 0.68$ ,  $p = 0.008$ ) (Figure 3).

**Table 3.** Cytokine and PGE concentrations in the astaxanthin (ATX) and control group, presented as the median and range. TNF $\alpha$ —tumor necrosis factor  $\alpha$ , IFN $\gamma$ —interferon  $\gamma$ , IL-6—interleukin 6, IL-10—interleukin 10, PGE—prostaglandin E.

	Group	Month				Friedman Test
		April	May	June	July	<i>p</i> -Value
TNF $\alpha$	ATX (n = 6)	138 (94.4–372)	6.5 (0–98.9)	1.1 (0–129)	0.6 (0–12.2)	<0.001
	Control (n = 8)	185.4 (0–477)	0 (0–15.6)	7.2 (0–76.7)	0 (0–1.2)	
	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	0.846	0.259	0.999	0.256	
IFN $\gamma$	ATX (n = 6)	25.9 (17.3–80.0)	19.7 (13.6–43.6)	16.4 (5.5–30.9)	10.8 (7.3–17.3)	0.001
	Control (n = 8)	25.5 (4.6–40.0)	15.5 (10.0–29.1)	8.6 (0–43.6)	10.6 (0–26.4)	
	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	0.747	0.299	0.196	0.394	
IL-6	ATX (n = 6)	0 (0–55.0)	0 (0–107.0)	0 (0–99.0)	5.4 (0–108)	0.597
	Control (n = 8)	0 (0–130)	0 (0–0)	0 (0–79.0)	0 (0–10.8)	
	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	0.518	0.112	0.928	0.321	
IL-10	ATX (n = 6)	0 (0–0)	0 (0–59.7)	0 (0–13.2)	0.15 (0–0.7)	0.908
	Control (n = 8)	4.0 (0–107)	0 (0–8.5)	0 (0–1.3)	0 (0–7.0)	
	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	0.063	0.419	0.323	0.886	
PGE	ATX (n = 6)	2395 (2330–2585)	2444 (2389–2521)	2506 (2375–2537)	2418 (2364–2512)	0.510
	Control (n = 8)	2424 (1468–2540)	2419 (2324–2490)	2418 (1164–2570)	2421 (2177–2565)	
	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	0.949	0.272	0.333	0.948	

<sup>a</sup> Mann–Whitney U test.



**Figure 3.** A correlation heatmap showing Spearman’s rank correlation coefficients among the five cytokines in 14 horses at the subsequent time points (cells below the diagonal) and their *p*-values (cells above the diagonal). The intensity of the color indicates the closeness of the value to 1 (red) or -1 (blue). The *p*-values in red are those considered significant at  $\alpha = 0.05$ .

#### 4. Discussion

Despite the anticipated benefits of ATX due to its strong antioxidant and anti-inflammatory properties observed *in vitro*, in rodent models, and in human athletes, the results of this study did not indicate a significant effect of ATX on cytokine concentrations in the blood of Arabian horses training for flat races. The concentrations of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, and PGE did not differ significantly between the ATX and control groups throughout the study period.

The literature data have shown that ATX exerts an anti-inflammatory effect by suppressing the NF- $\kappa$ B transcription factor, leading to a decrease in the levels of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$  [8,27,28,41]. A recent *in vitro* study has confirmed that ATX affects the whole network of inflammatory factors, with a particular effect on IL-6, and also protects the cells from inflammatory damage by stimulating p53 and inhibiting transcription factor STAT3 [42]. Moreover, ATX regulates the Th1/Th2 balance leading to a decrease in Th2 cytokine levels (IL-4 and IL-5) and an increase in Th1 derived IFN- $\gamma$  [8,43,44]. Additionally, ATX inhibits the production of other inflammatory mediators by suppressing the activation and/or protein degradation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) [8,29]. Possibly the anti-inflammatory mechanism is interrelated with the antioxidant effect of ATX [41], which additionally encouraged its use in racing horses. The selection of inflammatory mediators measured in this study was based on the mechanisms listed above. It was expected that in supplemented horses the concentrations of the above-mentioned mediators would decrease earlier or in a more pronounced manner, as has been reported in literature in other conditions.

The anti-inflammatory effect of ATX expressed as the changes in cytokine concentrations has been evidenced *in vitro* and in rodent models, as well as in people with chronic inflammatory conditions. Significant decreases in serum levels of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  were observed in women with endometriosis treated with ATX for 12 weeks [45]. In diabetic patients, the serum IL-6 level decreased after 8 weeks of ATX supplementation [46]. The 14-week supplementation in the present study seems long enough to exert an apparent effect; however, no significant changes occurred. In the literature, IL-6 and TNF $\alpha$  have been investigated most often and their changes after ATX supplementation were the most pronounced. Interestingly, a meta-analysis of randomized controlled clinical trials confirmed the reduction of IL-6 levels upon ATX supplementation, but not the decreases in TNF $\alpha$  levels [47–49]. In non-rodent animals, the proinflammatory cytokines were studied only *in vitro*, in a bovine endometrial epithelial cell line, and ATX reduced LPS-induced production of IL-6 and TNF- $\alpha$  [50].

In human athletes, ATX supplementation has been postulated to offer a recovery benefit due to its properties of inhibition of both pro-oxidant and pro-inflammatory intermediates [12]. Unfortunately, this recommendation is based only on *in vitro* and rodent studies that indicated suppression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [27]. A more recent study, however, has not confirmed any apparent effect of a 4-week ATX supplementation on the IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, GCSF, and IL-1ra concentrations in the blood of runners at rest and after a 2.25 h long run at close to 70% maximal oxygen uptake (VO $_{2max}$ ), where similar exercise-induced increases occurred regardless of the supplementation [51]. The authors claimed that *in vitro* and rodent findings do not extend to inflammatory-like responses induced by exercise. In their opinion, the immune support from ATX supplementation in the runners was linked to the normalization of post-exercise plasma levels of immune-related proteins including immunoglobulins within 24 h [51].

An exercise-induced inflammatory response has been reported in humans and horses, but the patterns and the occurrence of this reaction are only partially similar. Thus, the effect of ATX described in Nieman et al.'s [51] study cannot be simply extrapolated to horses.

In horses, the exercise-induced changes in cytokine levels in the blood are recognized in two aspects: exercise-induced increases after exertion and the generation of an anti-inflammatory state, which protects the horse from fully developed inflammation after triggering a cytokine response after the effort. Both types of changes seem to be related

to the type of exercise. In long-lasting endurance efforts, the post-exercise effect after the longest distances of 120 and 160 km included primarily a two-fold increase in the level of IL-6 accompanied by a 10-fold increase in IL-10 concentration [52]. Thus, it has been postulated that an exercise-induced acute phase response was triggered and promoted by type 1 cytokines, and at the same time, it was strongly inhibited by anti-inflammatory IL-10, preventing the development of inflammation and clinical conditions. At that time, an anti-inflammatory state had already been suggested in racing horses [23] and suspected also in equine endurance athletes. Then, it was shown that in endurance horses, an anti-inflammatory state occurred 3 months after beginning regular training and was expressed by decreases in type 1 cytokines (TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), and one month later, the blood level of IL-6 decreased [38].

In racing horses, the different patterns of an anti-inflammatory state triggered by race training have been reported based on cytokine gene expression [23,37]. In 2-year-old Thoroughbreds, training resulted in an overall reduction in inflammatory markers, particularly observed as a decrease in the baseline expression of mRNA for TNF $\alpha$  and a diminishing tendency in the expression of mRNA for IL-1 $\beta$  [23]. The decreases were more pronounced in horses that had received antioxidant supplementation including *Boswellia*, whose anti-inflammatory action is related to the inhibition of nuclear factor-kB [23]. These findings partially correspond with the results obtained in this study, which have indicated that the decreases in the TNF $\alpha$  concentration in blood were also most pronounced but there was no difference related to ATX supplementation, even though both *Boswellia* and ATX act via similar, nuclear factor-kB dependent mechanisms. This inconsistency may be related to the methodology used in the studies, the gene expression level in the study of Horohov et al. [23], and the level of cytokine protein in blood examined in the present study. It is possible that the anti-inflammatory effect of antioxidant supplementation in horses in regular training is slight and can be detected at the stage of gene expression but not during cytokine release, which is influenced by other factors and poses a sum of the production by leukocytes, myocytes, and other cells, as has been shown in treadmill experiments [53,54].

Moreover, Horohov et al. [23] measured only the expression of mRNA for IL-1, IL-6, and TNF $\alpha$  as proinflammatory cytokines and IFN $\gamma$  as a marker of lymphokine-activated killer (LAK) cells. In a later study on 2-year-old Thoroughbreds, more cytokines and related proteins such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A, CCL8, HSP-90, TLR-4, TNF $\alpha$ , TNFSF13B, and VEGFA were examined and an exercise-related anti-inflammatory state was characterized by an inflammation score involving the expression of 10 examined markers and the correlations among them [37]. With 8 weeks of training, the inflammation score either increased or decreased, depending on the training regime. Other studies have reported higher levels of the expression of mRNA for inflammation-related cytokines in trained horses when compared to sedentary animals [34,55]. The present study involved racing Arabians, so the training plan was different than described in the previous studies regarding Thoroughbreds [23,34,37]. Generally, Arabians worked at lower speeds but for longer distances.

Although it is commonly accepted that an intense or long-lasting effort triggers an inflammatory response that does not develop into a clinical condition due to the limiting mechanisms that occur with training, the character of these mechanisms is still not fully understood. Moreover, the patterns of anti-inflammatory mechanisms seem to differ regarding the type of training. The results of the present study indicated that in Arabian racing horses, the anti-inflammatory mechanisms are triggered very early, after 4 weeks of training, and depend mainly on a decrease in TNF $\alpha$  concentration. It has also been shown that after a further 3 months of training the concentration of IFN $\gamma$  decreases. These decreases seem to be supported by the balance between IL-6 and IL-10, shown as a positive correlation in the present study.

It can be postulated that ATX did not affect the level of cytokines in the blood because their concentrations were very low, indicating the low level of proinflammatory response in general. This is in line with a study on healthy geldings, representing various breeds, sup-

plemented with resveratrol for 3 weeks, which did not change the production of cytokines in stimulated leukocytes [56]. It is also worth mentioning that basic hematological parameters (WBC, RBC, HCT, and HGB) remained within reference intervals and did not show significant variations throughout the study, further suggesting that ATX supplementation did not negatively affect overall health.

The main limitations of this study include the small group of animals that remained in regular training and racing until the end of the observation. The horses were sampled in regular intervals, monthly, so some samples were missed due to the racing plan. Unfortunately, this could not be avoided in a field trial involving performance horses. Another limitation is the fact that this study involved only healthy horses that did not show any abnormalities or poor performance. It cannot be excluded that an anti-inflammatory effect of ATX could have occurred if subclinical inflammation had developed. In such circumstances, some benefits of ATX supplementation may have occurred.

## 5. Conclusions

The results of the present study have shown a notable time-dependent decrease in  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IFN}\gamma$  concentrations in both groups (ATX and control), indicating a natural inflammatory response modulation toward an anti-inflammatory state due to training. This reduction was evident early, after 4 weeks of training, and persisted, highlighting the effect of exercise itself rather than ATX supplementation. It seems likely that the cytokine response to the training is too slight to be affected by ATX; its anti-inflammatory action deals mainly with chronic and progressive inflammatory conditions.

Positive correlations between  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IFN}\gamma$  in the early phase of the study and between IL-6 and IL-10 in later stages suggest complex interplays between these cytokines during the inflammatory response and adaptation to training.

While ATX is recognized for its potential antioxidant and anti-inflammatory effects, its supplementation did not significantly alter cytokine levels or enhance performance in Arabian racehorses within the scope of this study. Future research should explore the effects of ATX under different conditions, such as in horses with subclinical inflammation or different training regimens, to fully understand its potential benefits.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.G.-H., K.M. and A.C.; Methodology, Data curation, Visualization, and Investigation: B.G.-H., M.K., M.C., E.S., K.S., A.G., S.G., M.W., Z.J., A.R., K.M. and A.C.; Writing—original draft preparation, B.G.-H., M.K., M.C., K.M. and A.C.; Writing—review and editing, K.M. and A.C.; Supervision, K.M. and A.C.; Project administration, K.M. and A.C.; Funding acquisition, A.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was partially funded by the state budget funds allocated by the Minister of Education and Science under the program “Student Scientific Clubs Create Innovations” (project No. SKN/SP/570330/2023).

**Institutional Review Board Statement:** Ethical review and approval were waived for this study, due to the fact that all of the procedures of blood sampling were performed as part of routine health examinations; thus, according to the European directive EU/2010/63 and Polish regulations regarding experiments on animals, there was no need for the approval of the Ethics Committee for the described procedures, which qualified as non-experimental clinical veterinary practices and were excluded from the directive.

**Informed Consent Statement:** Written consent for the use of blood for scientific analyses was obtained from the trainer.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

ATX, astaxanthin; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IFN $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; PGE: prostaglandin E; HDL, high-density lipoprotein; PSSM, polysaccharide storage myopathy; CK, creatinine kinase; LDH-5, lactate dehydrogenase isoenzyme-5; RBC, red blood cell count; HGB, hemoglobin concentration; HCT, hematocrit; WBC, white blood cell count; NEU, neutrophil count; LYM, lymphocyte count; MON, monocyte count; EOS, eosinophil count; BAS, basophil count; PLT, platelet count; CV, coefficient of variation; IQR, interquartile range;  $R_s$ , Spearman rank correlation coefficient; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; LPS, lipopolysaccharide; LAK, lymphokine-activated killer cells, iNOS, inducible nitric oxide synthase, COX-2, cyclooxygenase 2.

## References

- Budriesi, R.; Micucci, M.; Daglia, M.; Corazza, I.; Biotti, G.; Mattioli, L.B. Chemical Features and Biological Effects of Astaxanthin Extracted from *Haematococcus pluvialis* Flotow: Focus on Gastrointestinal System. *Biol. Life Sci. Forum* **2022**, *12*, 31. [CrossRef]
- Brotosudarmo, T.H.P.; Limantara, L.; Setiyono, E.; Heriyanto. Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application. *Int. J. Food Sci.* **2020**, *2020*, 2156582. [CrossRef] [PubMed]
- Miki, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *6*, 141–146. [CrossRef]
- Park, J.S.; Kim, H.W.; Mathison, B.D.; Hayek, M.G.; Massimino, S.; Reinhart, G.A.; Chew, B.P. Astaxanthin uptake in domestic dogs and cats. *Nutr. Metab.* **2010**, *7*, 52. [CrossRef] [PubMed]
- Xia, W.; Tang, N.; Kord-Varkaneh, H.; Low, T.Y.; Tan, S.C.; Wu, X.; Zhu, Y. The effects of astaxanthin supplementation on obesity, blood pressure, CRP, glycemic biomarkers, and lipid profile: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol. Res.* **2020**, *161*, 105113. [CrossRef] [PubMed]
- Mularczyk, M.; Michalak, I.; Marycz, K. Astaxanthin and Other Nutrients from *Haematococcus Pluvialis*—Multifunctional Applications. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 459. [CrossRef] [PubMed]
- Mularczyk, M.; Bourebaba, N.; Marycz, K.; Bourebaba, L. Astaxanthin Carotenoid Modulates Oxidative Stress in Adipose-Derived Stromal Cells Isolated from Equine Metabolic Syndrome Affected Horses by Targeting Mitochondrial Biogenesis. *Biomolecules* **2022**, *27*, 1039. [CrossRef]
- Chang, M.X.; Xiong, F. Astaxanthin and Its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions. *Molecules* **2020**, *25*, 5342. [CrossRef] [PubMed]
- Zhang, L.; Wang, H. Multiple Mechanisms of Anti-Cancer Effects Exerted by Astaxanthin. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4310–4330. [CrossRef] [PubMed]
- Gowd, V.; Xiao, J.; Wang, M.; Chen, F.; Cheng, K. Multi-Mechanistic Antidiabetic Potential of Astaxanthin: An Update on Preclinical and Clinical Evidence. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, 2100252. [CrossRef]
- Baralic, I.; Andjelkovic, M.; Djordjevic, B.; Dikic, N.; Radivojevic, N.; Suzin-Zivkovic, V.; Radojevic-Skodric, S.; Pejic, S. Effect of astaxanthin supplementation on salivary IgA, oxidative stress, and inflammation in young soccer players. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 783761. [CrossRef] [PubMed]
- Brown, D.R.; Gough, L.A.; Deb, S.K.; Sparks, S.A.; McNaughton, L.R. Astaxanthin in Exercise Metabolism, Performance and Recovery: A Review. *Front. Nutr.* **2017**, *4*, 76. [CrossRef] [PubMed]
- EFSA. Safety of astaxanthin for its use as a novel food in food supplements. *EFSA J.* **2020**, *18*, 5993.
- EFSA. Safety of *Schizochytrium* sp. oil as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J.* **2020**, *18*, 6242.
- Murai, T.; Kawasumi, K.; Tominaga, K.; Okada, Y.; Kobayashi, M.; Arai, T. Effects of astaxanthin supplementation in healthy and obese dogs. *Vet. Med.* **2019**, *10*, 29–35. [CrossRef] [PubMed]
- Xu, J.; Rong, S.; Gao, H.; Chen, C.; Yang, W.; Deng, Q.; Huang, Q.; Xiao, L.; Huang, F.A. Combination of Flaxseed Oil and Astaxanthin Improves Hepatic Lipid Accumulation and Reduces Oxidative Stress in High Fat-Diet Fed Rats. *Nutrients* **2017**, *9*, 271. [CrossRef] [PubMed]
- Wu, L.; Lyu, Y.; Srinivasagan, R.; Wu, J.; Ojo, B.; Tang, M.; El-Rassi, G.D.; Metzinger, K.; Smith, B.J.; Lucas, E.A.; et al. Astaxanthin-Shifted Gut Microbiota Is Associated with Inflammation and Metabolic Homeostasis in Mice. *J. Nutr.* **2020**, *150*, 2687–2698. [CrossRef] [PubMed]
- Boshra, S.A. Astaxanthin Attenuates Adiponectin, Calprotectin, miRNA222 and miRNA378 in Obesity induced by High-Fat Diet in Rats. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2022**, *23*, 609–618. [CrossRef] [PubMed]
- Available online: <https://www.fullbuckethealth.com/blogs/news/review-of-antioxidants-for-horses-astaxanthin> (accessed on 10 June 2024).
- Available online: <https://feedplanetmagazine.com/blog/natural-astaxanthin-and-l-carnitine-for-muscle-health-and-strength-1410> (accessed on 10 June 2024).
- Available online: <https://sciencesupplements.co.uk/products/muscleaid-horse-muscle-soreness-supplement?variant=45150387863858> (accessed on 10 June 2024).

22. Sato, F.; Omura, T.; Ishimaru, M.; Endo, Y.; Murase, H.; Yamashita, E. Effects of Daily Astaxanthin and L-Carnitine Supplementation for Exercise-Induced Muscle Damage in Training Thoroughbred Horses. *J. Equine Vet. Sci.* **2015**, *35*, 836–842. [[CrossRef](#)]
23. Horohov, D.; Sinatra, S.; Raj, M.D.; Jankowit, S.; Betancourt, A.; Bloomer, R.J. The effect of Exercise and Nutritional Supplementation on Proinflammatory Cytokine Expression in Young Racehorses During Training. *J. Equine Vet. Sci.* **2012**, *32*, 805–815. [[CrossRef](#)]
24. Stucchi, L.; Lo Feudo, C.M.; Stancari, G.; Conturba, B.; Ferrucci, F. Effect of the Administration of a Nutraceutical Supplement in Racehorses with Lower Airway Inflammation. *Animals* **2022**, *12*, 2479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Aoi, W.; Naito, Y.; Sakuma, K.; Kuchide, M.; Tokuda, H.; Maoka, T.; Toyokuni, S.; Oka, S.; Yasuhara, M.; Yoshikawa, T. Astaxanthin limits exercise-induced skeletal and cardiac muscle damage in mice. *Antioxid. Redox Signal.* **2003**, *5*, 139–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Available online: <https://blog.biostarus.com/astaxanthin-super-antioxidant/> (accessed on 10 June 2024).
27. Lee, S.J.; Bai, S.K.; Lee, K.S.; Namkoong, S.; Na, H.J.; Ha, K.S.; Han, J.A.; Yim, S.V.; Chang, K.; Kwon, Y.G.; et al. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol. Cells* **2003**, *16*, 97–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Park, J.S.; Chyun, J.H.; Kim, Y.K.; Line, L.L.; Chew, B.P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr. Metab.* **2010**, *7*, 18. [[CrossRef](#)]
29. Choi, S.K.; Park, Y.S.; Choi, D.K.; Chang, H.I. Effects of astaxanthin on the production of NO and the expression of COX-2 and iNOS in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *12*, 1990–1996.
30. Piccione, G.; Arfuso, F.; Fazio, F.; Bazzano, M.; Giannetto, C. Serum Lipid Modification Related to Exercise and Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation in Jumpers and Thoroughbred Horses. *J. Equine Vet. Sci.* **2014**, *34*, 1181–1187. [[CrossRef](#)]
31. Nielsen, A.R.; Pedersen, B.K. The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2007**, *32*, 833–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Woods, J.A.; Vieira, V.J.; Keylock, K.T. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **2009**, *29*, 381–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Da Rosa, P.C.; Bertomeu, J.B.; Royes, L.F.F.; Osiecki, R. The physical exercise-induced oxidative/inflammatory response in peripheral blood mononuclear cells: Signaling cellular energetic stress situations. *Life Sci.* **2023**, *15*, 321. [[CrossRef](#)]
34. Cappelli, K.; Felicetti, M.; Capomaccio, S.; Nocelli, C.; Silvestrelli, M.; Verini-Supplizi, A. Effect of training status on immune defence related gene expression in Thoroughbred: Are genes ready for the sprint? *Vet. J.* **2013**, *195*, 373–376. [[CrossRef](#)]
35. Turło, A.; Cywińska, A.; Czopowicz, M.; Witkowski, L.; Jaśkiewicz, A.; Winnicka, A. Racing Induces Changes in the Blood Concentration of Serum Amyloid A in Thoroughbred Racehorses. *J. Equine Vet. Sci.* **2016**, *36*, 15–18. [[CrossRef](#)]
36. Arfuso, F.; Giannetto, C.; Fazio, F.; Panzera, F.; Piccione, G. Training Program Intensity Induces an Acute Phase Response in Clinically Healthy Horses. *J. Equine Vet. Sci.* **2020**, *88*, 102986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Page, A.E.; Stewart, J.C.; Holland, R.E.; Horohov, D.W. The Impact of Training Regimen on the Inflammatory Response to Exercise in 2-Year-Old Thoroughbreds. *J. Equine Vet. Sci.* **2017**, *58*, 78–83. [[CrossRef](#)]
38. Witkowska-Piłaszewicz, O.; Baška, P.; Czopowicz, M.; Żmigrodzka, M.; Szarska, E.; Szczepaniak, J.; Nowak, Z.; Winnicka, A.; Cywińska, A. Anti-Inflammatory State in Arabian Horses Introduced to the Endurance Training. *Animals* **2019**, *9*, 616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063> (accessed on 10 June 2024).
40. Hinchcliff, K.W.; Kaneps, A.J.; Geor, J.R. *Equine Sports Medicine and Surgery. Basic and Clinical Sciences of the Equine Athlete*; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2014.
41. Pereira, C.P.M.; Souza, A.C.R.; Vasconcelos, A.R.; Prado, P.S.; Name, J.J. Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2021**, *47*, 37–48. [[CrossRef](#)]
42. Wu, Y.; Bashir, M.A.; Shao, C.; Wang, H.; Zhu, J.; Huang, Q. Astaxanthin targets IL-6 and alleviates the LPS-induced adverse inflammatory response of macrophages. *Food Funct.* **2024**, *15*, 4207–4222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Davinelli, S.; Melvang, H.M.; Andersen, L.P.; Scapagnini, G.; Nielsen, M.E. Astaxanthin from Shrimp Cephalothorax Stimulates the Immune Response by Enhancing IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-2 Secretion in Splenocytes of *Helicobacter Pylori*-Infected Mice. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kohandel, Z.; Farkhondeh, T.; Aschner, M.; Pourbagher-Shahri, A.M.; Samarghandian, S. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *145*, 112179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rostami, S.; Alyasin, A.; Saedi, M.; Nekoonam, S.; Khodarahmian, M.; Moeini, A.; Amidi, F. Astaxanthin ameliorates inflammation, oxidative stress, and reproductive outcomes in endometriosis patients undergoing assisted reproduction: A randomized, triple-blind placebo-controlled clinical trial. *Front. Endocrinol.* **2023**, *14*, 1144323. [[CrossRef](#)]
46. Shokri-Mashhadi, N.; Tahmasebi, M.; Mohammadi-Asl, J.; Zakerkish, M.; Mohammadshahi, M. The antioxidant and anti-inflammatory effects of astaxanthin supplementation on the expression of miR-146a and miR-126 in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Int. J. Clin. Pract.* **2021**, *75*, e14022. [[CrossRef](#)]
47. Ma, B.; Lu, J.; Kang, T.; Zhu, M.; Xiong, K.; Wang, J. Astaxanthin supplementation mildly reduced oxidative stress and inflammation biomarkers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr. Res.* **2022**, *99*, 40–50. [[CrossRef](#)]

48. Hajizadeh-Sharafabad, F.; Zahabi, E.S.; Malekhamadi, M.; Zarrin, R.; Alizadeh, M. Carotenoids supplementation and inflammation: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 8161–8177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Heidari, M.; Chaboksafar, M.; Alizadeh, M.; Sohrabi, B.; Kheirouri, S. Effects of Astaxanthin supplementation on selected metabolic parameters, anthropometric indices, Sirtuin1 and TNF- $\alpha$  levels in patients with coronary artery disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1104169. [[CrossRef](#)]
50. Wan, F.C.; Zhang, C.; Jin, Q.; Wei, C.; Zhao, H.B.; Zhang, X.L.; You, W.; Liu, X.M.; Liu, G.F.; Liu, Y.F.; et al. Protective effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells. *Biol. Reprod.* **2020**, *102*, 339–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nieman, D.C.; Woo, J.; Sakaguchi, C.A.; Omar, A.M.; Tang, Y.; Davis, K.; Pecorelli, A.; Valacchi, G.; Zhang, Q. Astaxanthin supplementation counters exercise-induced decreases in immune-related plasma proteins. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1143385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cywinska, A.; Turło, A.; Witkowski, L.; Szarska, E.; Winicka, A. Changes in blood cytokine concentrations in horses after long-distance endurance rides. *Med. Weter.* **2014**, *70*, 568–571.
53. Lamprecht, E.L.; Bagnell, C.; Williams, C. Inflammatory responses to three modes of intense exercise in Standardbred mares: a pilot study. *Comp. Ex. Physiol.* **2009**, *5*, 115–125. [[CrossRef](#)]
54. Liburt, N.R.; Adams, A.A.; Betancourt, A.; Horohov, D.W.; McKeever, K.H. Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. *Equine Vet. J. Suppl.* **2010**, *38*, 280–288. [[CrossRef](#)]
55. Capomaccio, S.; Cappelli, K.; Spinsanti, G.; Mencarelli, M.; Muscettola, M.; Felicetti, M.; Verini Supplizi, A.; Bonifazi, M. Athletic humans and horses: Comparative analysis of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) expression in peripheral blood mononuclear cells in trained and untrained subjects at rest. *BMC Physiol.* **2011**, *11*, 3. [[CrossRef](#)]
56. Martin, L.M.; Johnson, P.J.; Amorim, J.R.; DeClue, A.E. Effects of Orally Administered Resveratrol on TNF, IL-1 $\beta$ , Leukocyte Phagocytic Activity and Oxidative Burst Function in Horses: A Prospective, Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1453. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Warszawa, dn. 20.09.2025

Beata Giercuskiewicz-Hecold  
Szkola Doktorska  
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 Warszawa  
tel. 504 201 363  
beata\_giercuskiewicz\_hecold1@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Pajuelo, D., Steczkiewicz, Z., Cywińska, A., & Marycz, K\*. (2025).  
Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in  
peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy. *Scientific Reports*, 15, Article 1.  
doi:10.1038/s41598-025-93661-7

Mój udział własny polegał na opracowaniu koncepcji artykułu oraz metodologii, pozyskaniu materiału  
i wykonywaniu badań, gromadzeniu, analizie i opracowywaniu danych oraz przygotowywaniu  
manuskryptu.



Podpis



Warszawa, dn. 30.01.2026

prof. dr hab. Anna Cywińska  
Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych,  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
ul. Szosa Bydgoska 13,  
87-100 Toruń  
anna\_cywinska@umk.pl

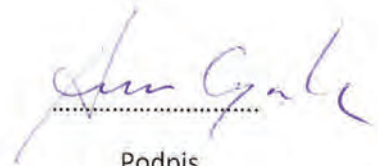
**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Pajuelo, D., Steczkiewicz, Z., Cywińska, A., & Marycz, K\*. (2025).  
Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in  
peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy. Scientific Reports, 15, Article 1.  
doi:10.1038/s41598-025-93661-7

Mój własny polegał na pomocy w realizacji doświadczeń, opracowaniu koncepcji artykułu oraz  
krytycznej edycji manuskryptu.



Podpis





PODPIS ZAUFANY

KRZYSZTOF  
**MARYCZ**  
29.01.2026 20:16:32 GMT+1  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

Berkeley, dn. 28.01.2026

Prof. dr hab. Krzysztof Marycz  
International Institute of Translation Medicine  
ul. Jesionowa 11  
55-114 Malin  
christophe\_marycz@berkeley.edu

**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**  
**w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Pajuelo, D., Steczkiewicz, Z., Cywińska, A., & Marycz, K\*. (2025).  
Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in  
peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy. Scientific Reports, 15, Article 1.  
doi:10.1038/s41598-025-93661-7

Udział własny polegał na pomocy w realizacji doświadczeń, opracowaniu koncepcji artykułu oraz  
krytycznej edycji manuskryptu i nadzorze merytorycznym.

.....

Podpis



Valencia, Spain, Monday  
September 22<sup>nd</sup>, 2025

Name: David Pajuelo Gamez  
institution: Universidad Europea de Valencia  
address: Paseo de la Alameda 7, Valencia 46010, Spain  
phone number: +34 650533935  
e-mail address: David.pajuelo@universidadeuropea.es

**Veterinary Discipline Council**  
**Warsaw University of Life Sciences**  
**in Warsaw**

#### **Co-authorship statement**

I hereby declare that in the publication:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Pajuelo, D., Steczkiewicz, Z., Cywinska, A., & Marycz, K. (2025).  
Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in  
peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy. *Scientific reports*, 15(1), 14633.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-93661-7>

My individual contribution to its creation consisted of analyzing the data, writing the original draft  
and editing and reviewing the final version of the manuscript.

**PAJUELO** Digitally signed  
**GAMEZ** by PAJUELO  
**DAVID -** GAMEZ DAVID -  
**48444698M** 48444698M  
Date: 2025.09.22  
20:28:08 +02'00'

Signature



Wrocław, dn. 20.01.2026

mgr. inż. Zofia Steczkiewicz  
Zakład Biologii Eksperymentalnej  
Instytut Biologii  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
ul. Norwida 27B  
50-375 Wrocław  
zofia.steckiewicz@uprw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Pajuelo, D., Steczkiewicz, Z., Cywińska, A., & Marycz, K\*. (2025).  
Astaxanthin supplementation in Arabian racing horses mitigates oxidative stress and inflammation in  
peripheral blood mononuclear cells through enhanced mitophagy. *Scientific Reports*, 15, Article 1.  
doi:10.1038/s41598-025-93661-7

Udział własny polegał na przeprowadzeniu badań (analiza ekspresji genów) i opracowaniu wyników.

Podpisany podpisem osobistym:.....

**ZOFIA JADWIGA STECKIEWICZ**  
2026-01-22 09:44:40+0100

Podpisany z użyciem eDO App.



Warszawa, dn. 20.08.2025

Beata Giercuskiewicz-Hecold  
Szkoła Doktorska  
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 Warszawa  
tel. 504 201 363  
beata\_giercuskiewicz\_hecold1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. *Scientific Reports*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

Mój udział własny polegał na opracowaniu koncepcji artykułu oraz metodologii, pozyskaniu materiału i wykonywaniu badań, gromadzeniu, analizie i opracowywaniu danych, przygotowywaniu manuskryptu oraz projektowaniu rycin.



Podpis



Warszawa, dn. 30.01.2026

prof. dr hab. Anna Cywińska  
Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych,  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
ul. Szosa Bydgoska 13,  
87-100 Toruń  
anna\_cywinska@umk.pl

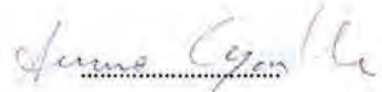
**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**  
**w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczk, A., Graczyk, S., Hrynyszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. *Scientific Reports*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

Mój udział własny polegał na pomocy w realizacji doświadczeń, opracowaniu koncepcji artykułu, metodologii, krytycznej edycji manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym.



Podpis





**PODPIS ZAUFANY**  
**KRZYSZTOF**  
**MARYCZ**  
29.01.2026 20:16:33 GMT+1  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

Berkeley, dn. 28.11.2026

Prof. dr hab. Krzysztof Marycz  
International Institute of Translation Medicine  
ul. Jesionowa 11  
55-114 Malin  
christophe\_marycz@berkeley.edu

**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**  
**w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczką, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. *Scientific Reports*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji artykułu oraz krytycznej edycji manuskryptu i nadzorze merytorycznym.

.....  
Podpis



Warszawa, dn. 24.09.2025 r.

prof. dr hab. Michał Czopowicz  
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 Warszawa  
tel. 22 59 36111  
michal\_czopowicz@sggw.edu.pl

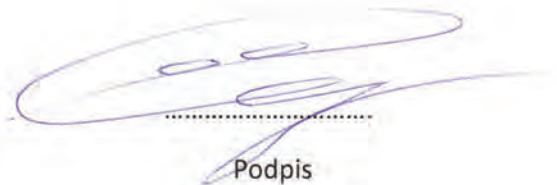
**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**  
**w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeccka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. Scientific Reports, 14(1):27991, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie statystycznej wyników.



Podpis



Warszawa, dn.

20/01/26

Dr Marek Kulka  
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 Warszawa  
tel. 22 59 36168  
marek\_kulka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. *Scientific Reports*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu części doświadczeń, odpowiedzi na recenzję oraz pomocy doktorantce w opracowaniu metodyki i redakcji tekstu manuskryptu.

..........

Podpis



Warszawa, dn. 26/01/26

Dr Jacek Wilczak  
Katedra Nauk Fizjologicznych  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159  
02-776 Warszawa  
tel. 22 59 36270  
jacek\_wilczak@sggw.edu.pl


Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. Scientific Reports, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przeprowadzeniu części doświadczeń oraz krytycznej edycji manuskryptu.

26/01/26 

Podpis



Lublin, dn. 23.09.2025

Dr hab. Katarzyna Strzelec, prof. uczelni  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
tel. 817102460  
[katarzyna.strzelec@up.lublin.pl](mailto:katarzyna.strzelec@up.lublin.pl)

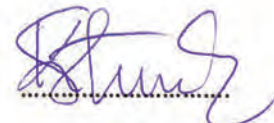
**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. *Scientific Reports*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w realizacji części doświadczeń związanych z przeprowadzeniem testów wysiłkowych u koni oraz krytycznej edycji manuskryptu.



Podpis



Wrocław, dn. 23.09.2025

Dr inż. Malwina Mularczyk  
ul. Gagarina 5/15  
54-620 Wrocław  
tel. 536 953 880  
malwinamularczyk@wp.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. Scientific Reports, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

Mój wkład w powstanie pracy obejmował przygotowanie preparatu z astaksantyną oraz jego dostarczenie do badań.

.....  
Podpis



Warszawa, dn. 28.01.2026/

dr hab. n. roln. Ewa SZARSKA, prof. nadzw. WIHE  
Samodzielna Pracownia Fizjologii Stosowanej  
Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii  
ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa  
tel. 22 261 853-117  
e.szarska@wihe.waw.pl

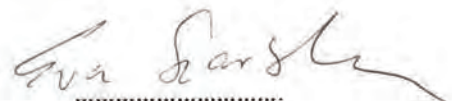
**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Wilczak, J., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Hryniszyn, A., Mularczyk, M., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). The effect of long term astaxanthin supplementation on the antioxidant status of racing Arabian horses – preliminary study. Scientific Reports, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77732-9>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w projektowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń oraz krytycznej ocenie manuskryptu.



Podpis



Warszawa, dn. 20.08.2025

Beata Giercuskiewicz-Hecold  
Szkola Doktorska  
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 Warszawa  
tel. 504 201 363  
beata\_giercuskiewicz\_hecold1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**  
**w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczką, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, 13, Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

Mój udział własny polegał na konceptualizacji, opracowaniu metodologii, pozyskaniu materiałów i wykonaniu badań, analizie formalnej oraz przygotowaniu manuskryptu

  
Podpis





Berkeley, dn. 28.01.2026

Prof. dr hab. Krzysztof Marycz  
International Institute of Translation Medicine  
ul. Jesionowa 11  
55-114 Malin  
[christophe\\_marycz@berkeley.edu](mailto:christophe_marycz@berkeley.edu)

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, 13, Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w realizacji części doświadczeń, opracowaniu koncepcji artykułu oraz krytycznej edycji manuskryptu i nadzorze merytorycznym.

.....

Podpis



Warszawa, dn. 30.01.2026

prof. dr hab. Anna Cywińska  
Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych,  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
ul. Szosa Bydgoska 13,  
87-100 Toruń  
anna\_cywinska@umk.pl

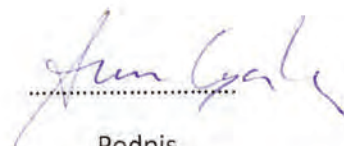
**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**  
**w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, 13, Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

Mój udział własny polegał na pomocy w realizacji doświadczeń, opracowaniu koncepcji artykułu, metodologii, krytycznej edycji manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym.



Podpis



Warszawa, dn. 24.09.2025 r.

prof. dr hab. Michał Czopowicz  
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 Warszawa  
tel. 22 59 36111  
michal\_czopowicz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**  
**w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, 13(8):905, <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie statystycznej wyników.



.....  
Podpis



Warszawa, dn.

26/01/26

Dr Marek Kulka  
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 Warszawa  
tel. 22 59 36168  
marek\_kulka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczką, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, 13, Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu części doświadczeń, przygotowaniu rycin oraz pomocy doktorantce w opracowaniu metodyki i przygotowaniu tekstu manuskryptu.

.....  


Podpis



Lublin, dn. 23.09.2025

Dr hab. Katarzyna Strzelec, prof. uczelni  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie |  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
tel. 817102460  
[katarzyna.strzelec@up.lublin.pl](mailto:katarzyna.strzelec@up.lublin.pl)

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczka, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, 13, Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w realizacji części doświadczenia związanych z przeprowadzeniem testów wysiłkowych u koni.



Podpis



Warszawa, dn. 28.01.2026

dr hab. n. roln. Ewa SZARSKA, prof. nadzw. WIHE  
Samodzielna Pracownia Fizjologii Stosowanej  
Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii  
ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa  
tel. 22 261 853-117  
e.szarska@wihe.waw.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Giercuskiewicz-Hecold, B., Kulka, M., Czopowicz, M., Szarska, E., Strzelec, K., Grzeczką, A., Graczyk, S., Wiśniewska, M., Jędrzejkowska, Z., Rumińska, A., Marycz, K., & Cywińska, A\*. (2024). Astaxanthin Supplementation Does Not Alter Training-Related Changes in Inflammatory Cytokine Profile in Arabian Racing Horses. *Antioxidants*, 13, Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080905>

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przeprowadzaniu części doświadczeń.



Podpis

