

Autoreferat

dr Olga Danuta Witkowska-Piłaszewicz

Zakład Patologii Zwierząt
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2021

1. Imię i nazwisko.

Olga Danuta Witkowska-Pilaszewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Stopień naukowy: **doktor nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria**, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa 2019, tytuł rozprawy doktorskiej: *Przebieg powysiłkowej odpowiedzi ostrej fazy u koni arabskich rozpoczynających trening do rajdów długodystansowych* (z wyróżnieniem).

Tytuł: **specjalista laboratoryjnej diagnostyki weterynaryjnej**, Puławy 2019.

Tytuł: **lekarz weterynarii**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa 2016 (z wyróżnieniem).

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.05.2020 – obecnie Zakład Patologii Zwierząt, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, **adiunkt**.

10.10. 2019-30.04.2020 Zakład Patologii Zwierząt, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, **asystent**.

1.10.2018 – 30.09.2019 Katedra Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, **asystent**.

1.09.2016 - 30.08.2019 – Studia doktoranckie w ramach Zintegrowanej Szkoły Doktoranckiej Konsorcjum KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, **doktorant**.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

Jednotematyczny cykl publikacji

- a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Nowoczesne techniki monitoringu adaptacji koni wyścigowych do wzrastających obciążeń fizycznych

- b) lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Na rozprawę habilitacyjną składa się cykl powiązanych tematycznie 3 prac oryginalnych, w których jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem. Łączna punktacja publikacji, wynosi:

- sumaryczny Impact Factor (IF) według Journal Citation Report (JCR): **9,641**

- suma punktów MNiSW z godnie z wykazem MNiSW z 2019 r.: **340**

Oświadczenia współautorów zgodnie z § 4 pkt. 3 Regulaminu przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie oraz zaleceniami Rady Doskonałości Naukowej, przedstawiono w załączniku nr 5 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

- 1. Witkowska-Piłaszewicz O.,** Pingwara R., Winnicka A. The Effect of Physical Training on Peripheral Blood Mononuclear Cell Ex Vivo Proliferation, Differentiation, Activity, and Reactive Oxygen Species Production in Racehorses. Antioxidants (Basel). 2020, 9, 1155. doi:10.3390/antiox9111155. **IF 5,014; pkt. MNiSW 100**

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji i założeń badania, ocenie klinicznej zwierząt, pobraniu krwi, optymalizacji i prowadzeniu hodowli komórkowych, wykonywaniu testów cytometrycznych oraz ELISA, interpretacji wyników, doborze i analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu (rola wiodąca), przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją.

- 2. Witkowska-Piłaszewicz O.,** Grzędzicka J., Seń J., Czopowicz M., Żmigrodzka M., Winnicka A., Cywińska A., Carter C. Stress response after race and endurance training sessions and competitions in Arabian horses. *Prev Vet Med.* 2021, 188, 105265. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105265. **IF 2,304; pkt. MNiSW 140**

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji i założeń badania, ocenie klinicznej zwierząt, pobraniu krwi, wykonywaniu testów ELISA, interpretacji wyników, doborze i analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu (rola wiodąca), przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją.

- 3. Witkowska-Piłaszewicz O.,** Maśko M., Domino M., Winnicka A. Infrared Thermography Correlates with Lactate Concentration in Blood during Race Training in Horses. *Animals (Basel).* 2020, 10, 2072. doi: 10.3390/ani10112072. **IF 2,323; pkt. MNiSW 100**

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji i założeń badania, ocenie klinicznej zwierząt, pobraniu krwi, wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, wykonaniu zdjęć termograficznych, interpretacji wyników, doborze i analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu (rola wiodąca), przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Wyścigi są jedną z najstarszych form użytkowania wyczynowego koni, gdzie przede wszystkim o sukcesie w gonitwach decyduje stan zdrowia i zdolności adaptacyjne zwierzęcia. Konie trenowane do startów w wyścigach poddawane są znacznym obciążeniom układu mięśniowo-szkieletowego, co może prowadzić do patologii i pojawienia się kontuzji, wymagających długotrwałego leczenia. Zbyt intensywny wysiłek fizyczny może skutkować uszkodzeniem tkanek, tym samym osłabieniem struktur układu ruchu. Proces przebudowy tkanek organizmu, stanowi niezbędny mechanizm kompensacyjny. Jednakże przy jego znacznym nasileniu i kumulowaniu się mikrourazów, może przyczynić się do powstawania złamań zmęzeniowych.

Urazy ortopedyczne są najczęstszą przyczyną zakończenia kariery i trwałej eliminacji z użytkowania wyczynowego koni wyścigowych (Physick-Sheard, 2019). Czasami mogą prowadzić do eutanazji zwierzęcia. W 2020 r śmiertelne obrażenia odniosło pięć koni w ciągu czterech dni wyścigów w Saratodze w Stanach Zjednoczonych. Wykazano, że najczęściej złamania dotyczą trzesseczek bliższych (42.1%) lub dodatkowo kości śródręcza/śródstopia III i kości pęciny (Page, 2021). Większość z tych urazów ma miejsce pod koniec wyścigu lub podczas długotrwałych ćwiczeń o wysokiej intensywności, kiedy w wyniku zmęczenia, dochodzi do dużego przeprostu (nienaturalnego wygięcia) stawu śródręczno-paliczkowego, czy śródstopowo-paliczkowego. Istnieje wiele przypadków, w których przygotowanie i możliwości bezpiecznego udziału w gonitwie koni zostały błędnie ocenione. Aby uniknąć dalszych urazów, czy też zgonów, którym można było zapobiec, potrzebne jest poszukiwanie technik diagnostycznych umożliwiających dokładniejszą ocenę zdrowia koni rywalizujących w wyścigach. Ponadto czynnikiem potęgującym zagrożenie wystąpienia kontuzji, wydaje się być wczesny wiek rozpoczęcia kariery sportowej, albowiem treningi wyścigowe, konie rozpoczynają już, jako dwulatki.

Z wyżej wymienionych względów monitoring adaptacji do wzrastających obciążeń treningowych w tej grupie zwierząt jest niezmiernie istotny. Tylko regularne badania pozwalają

na ocenę stanu zdrowia i wydolności wysiłkowej zwierzęcia. Zwykle ocena przygotowania konia do rywalizacji w gonitwach, bazuje na badaniu klinicznym oraz monitorowaniu wartości tętna. Szczególną wagę przywiązuje się także do pomiaru spoczynkowych i powysiłkowych parametrów morfologicznych oraz biochemicznych krwi takich, jak zmiany w liczbie krwinek czerwonych i białych, wartości hematokrytu, stężenia hemoglobiny, białka całkowitego i kwasu mlekowego oraz aktywności kinazy fosfokreatynowej (EC 2.7.3.2), czy transaminazy asparaginianowej (EC 2.6.1.1) (Hinchcliff, 2014). Należy jednak zaznaczyć, że ocena tych parametrów nie umożliwia wykrycia zaburzeń na wczesnym etapie ich powstawania. Zbyt intensywna aktywność fizyczna, może zatem doprowadzić do ich pogłębienia. Zdarza się, że poprzez modyfikację reżimu treningowego, chcąc osiągnąć wysoką wydolność wysiłkową i tym samym jak najlepsze wyniki w gonitwach, trenerzy nie są w stanie zapewnić koniowi bezpieczeństwa zdrowotnego. Należy jednak podkreślić, że bardzo trudne jest opracowanie optymalnego programu treningowego zwłaszcza u zwierząt.

Ciągle brakuje biomarkerów, które umożliwiłyby holistyczną ocenę przygotowania fizycznego do zawodów i zdrowia zwierzęcia. Wiadomo, że aktywność fizyczna powoduje szereg zmian metabolicznych w organizmie sportowca, w tym wpływa na układ odpornościowy. Zaobserwowano, że ciężki wysiłek fizyczny pobudza reakcję zbliżoną do reakcji ostrej fazy u koni rajdowych (Cywińska, 2012). Proces ten charakteryzuje się podwyższonym stężeniem surowiczego amyloidu A (SAA), będącego głównym białkiem ostrej fazy u tego gatunku (Witkowska-Piłaszewicz, 2019). U koni wyścigowych, u których aktywność fizyczna ma charakter przede wszystkim beztlenowy, nie stwierdzono powysiłkowego podwyższenia stężenia SAA (Giori, 2011). Natomiast opisano wzrost ekspresji genów *TLR4*, *IL-1 β* , *IL-18*, *IL-6* i *CEBP β* we krwi (Cappelli, 2013). Ponadto zarówno u koni użytkowanych rajdowo, jak i wyścigowo, opisano kreowanie się tzw. „stanu przeciwzapalnego” wraz z postępami treningowymi, który charakteryzuje się spadkiem syntezy *IL-1 β* oraz *TNF- α* (Horohov, 2012; Witkowska-Piłaszewicz, 2019). W związku ze zmianami zachodzącymi w układzie odpornościowym pod wpływem wysiłku, poszukuje się biomarkerów, umożliwiających wczesną diagnostykę urazów, ale i gotowości do zwiększenia obciążeń treningowych. Wytypowano trzy potencjalne markery we krwi, które mogą umożliwić wczesne wykrywanie koni zagrożonych kontuzją (*IGF-1*, *IL1-RN*, i *MMP-2*) (Page 2021). Produkcja cytokin znajdujących się we krwi, zachodzi przede wszystkim w agranulocytach. Z tego powodu zarówno fenotyp i aktywność tych komórek, mogą być pomocne w ocenie gotowości konia do modyfikacji i zwiększania obciążeń fizycznych.

Ponadto w trakcie treningów znaczną rolę odgrywa dobrostan zwierząt, który ma ogromny wpływ na wydolność wysiłkową (Negro, 2018). Konie wyścigowe w związku ze sposobem utrzymania, ale i treningiem są szczególnie narażone na nadmierny stres. Jednym z objawów zaburzeń behawioralnych związanych z niskim dobrostanem są stereotypie, związane z nadmiernym pobudzeniem nerwowym. Są one często obserwowane u koni wyścigowych (Muñoz, 2018). Ponadto w wyniku przewlekłego stresu w tej grupie zwierząt, często diagnozowane są wrzody żołądka (nawet 80% koni wyścigowych) (Vatistas, 1999). Zaobserwowane zjawiska wskazują, że może to skutkować między innymi zaburzeniami w motoryce jelit i prowadzić do kolek. Natomiast konsekwencją hamowania wchłaniania wapnia, mogą być osłabienia struktur kostnych (Nielsen, 1998). Z tego powodu dobrostan ma bardzo duży wpływ, nie tylko na osiąganе wyniki sportowe, ale i na zdrowie koni.

Podsumowując, nadal poszukuje się biomarkerów umożliwiających holistyczne podejście do zwierzęcia, poprzez wczesne wykrywanie kontuzji, ale i poprawę dobrostanu. Z wyżej wymienionych przyczyn, postanowiono przeprowadzić badania będące tematem tego osiągnięcia.

Celem prowadzonych badań było:

- 1) porównanie reakcji agranulocytów na ciężki wysiłek fizyczny koni wytrenowanych oraz rozpoczynających treningi wyścigowe,
- 2) ocena zmian stężenia kortyzolu we krwi koni w trakcie całego sezonu treningowego, z porównaniem wpływu sesji treningowych i wyścigów,
- 3) ocena przydatności nieinwazyjnej metody, jaką jest termografia, do oceny zmiany temperatury powierzchni ciała w trakcie adaptacji koni wyścigowych do wzrastających obciążeń.

Porównanie reakcji agranulocytów na ciężki wysiłek fizyczny koni wytrenowanych oraz rozpoczynających treningi wyścigowe

Powtarzalny intensywny wysiłek fizyczny może mieć wpływ na układ odpornościowy, zarówno pobudzając jego aktywność, jak i działając immunosupresyjnie. Powszechnie znany jest tzw. „paradoks elitarnych sportowców”, wskazujący na zwiększoną podatność ludzi oraz koni uprawiających sport wyczynowo na infekcje, głównie układu oddechowego (Gleeson, 20012 i 2016; Carvallo, 2017). Z drugiej strony, w 2007 r. Amerykańska Szkoła Medycyny Sportowej zainicjowała powstanie ogólnoswiatowego programu Exercise is Medicine® (EIM), którego celem jest wprowadzenie aktywności fizycznej, jako standardu w opiece klinicznej. Wynika to z tego, że aktywność fizyczna może prowadzić do kreowania się tzw. „stanu przeciwzapalnego”, co wykazano u ludzi i koni (Gleeson, 2011; Horohov, 2012; Witkowska-Piłaszewicz, 2019). Jednakże badania te przede wszystkim opierają się o zmiany w stężeniu, czy ekspresji cytokin immunomodulujących we krwi. Brakuje danych dotyczących wpływu wysiłku na reakcje poszczególnych populacji komórek krwi, które mogą być kolejnym źródłem syntezy tych białek. Do tej pory, opublikowano tylko jedno badanie z ograniczoną liczbą koni (3 osobniki), w którym wykazano, że procent limfocytów T regulatorowych CD4+ (Treg) maleje po ukończeniu rajdu na dystansie 50-mil (80 km), bez zmiany w ilości limfocytów T CD8+ cytotoksycznych (Tc) (Hines, 1994). W wyniku braku prac dotyczących zmian fenotypu i funkcji monocytów oraz limfocytów koni związanych z wpływem wysiłku fizycznego, postanowiono przeprowadzić badania, których wyniki przedstawiono w pracy:

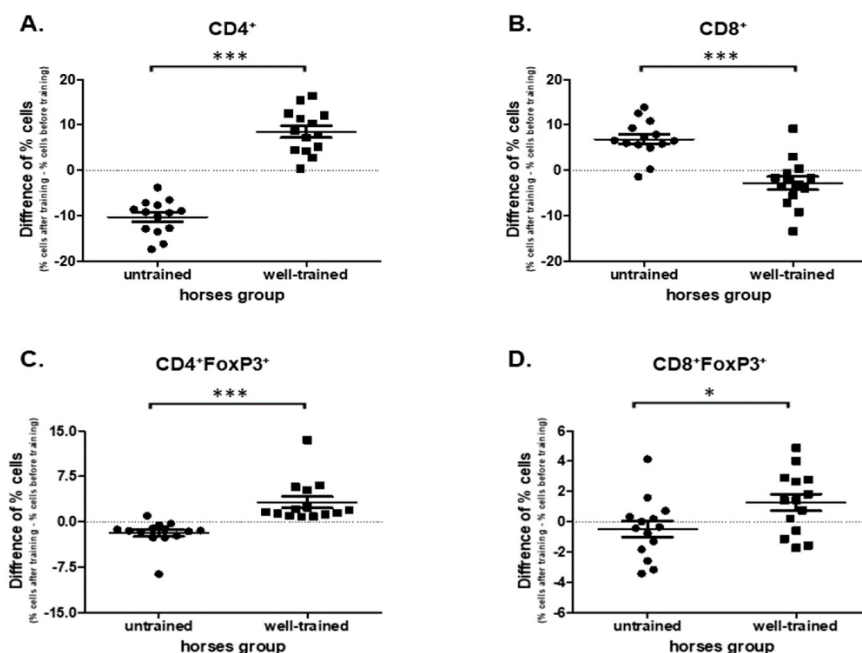
Witkowska-Piłaszewicz O., Pingwara R., Winnicka A. *The Effect of Physical Training on Peripheral Blood Mononuclear Cell Ex Vivo Proliferation, Differentiation, Activity, and Reactive Oxygen Species Production in Racehorses. Antioxidants (Basel).* 2020, 9, 1155. doi: 10.3390/antiox9111155. IF 5,014; pkt. MNiSW 100

W badaniu po raz pierwszy holistycznie przeanalizowano wpływ ciężkiego treningu na aktywność agranulocytów koni wyścigowych o różnym stopniu wytrenowania. Wnioski, wyciągnięto na podstawie analizy cytometrycznej komórek oraz produkowanych przez nie cytokin. Do tej pory wykorzystanie cytometrii przepływowej u koni było bardzo rzadko

przeprowadzane, z tego względu wyniki badań będące częścią ocenianego osiągnięcia, mają bardzo duży wkład w rozwój dyscypliny weterynarii. Po raz pierwszy tak szeroko oceniono reakcję komórkową na wysiłek u koni.

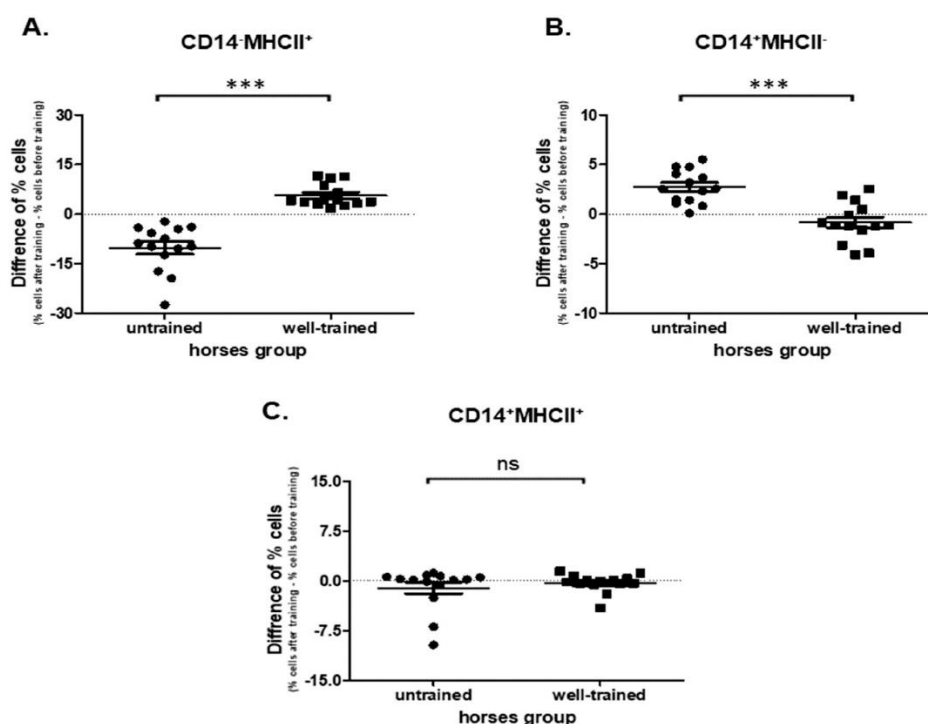
W osiągnięciu wykazano, że u doświadczonych koni wyścigowych w wyniku intensywnego treningu dochodzi do zwiększonej proliferacji limfocytów T, zarówno pomocniczych Treg (CD4+), jak i cytotoksycznych Tc (CD8+), w przeciwieństwie do niedoświadczonych zwierząt, gdzie ta reakcja uległa zahamowaniu. Inni autorzy wykazali, że po intensywnym treningu na bieżni dochodzi do zahamowania proliferacji limfocytów (Kurcz, 1988), jednakże zarówno obciążenia fizyczne, jak i warunki hodowli komórkowych były inne, niż w przedstawionym do oceny osiągnięciu. Przede wszystkim w hodowli komórkowej komórki stymulowano fitohemaglutyniną (PHA) oraz kostymulowano IL-2. Taki schemat aktywacji komórek, do tej pory praktycznie nie był stosowany u koni. Kostymulacja jest niezmiernie istotna dla uzyskania adekwatnych wyników badań nad aktywnością komórek, ponieważ u innych gatunków wykazano, że aktywacja limfocytów T bez kostymulacji może prowadzić do ich anergii (Huang, 2012). U ludzi, wyniki badań związanych z wpływem ciężkiego wysiłku na proliferację limfocytów są sprzeczne, aczkolwiek sugeruje się, że niezależnie od intensywności wysiłku, reakcja ta może być zahamowana po ostrym treningu, trwającym dłużej niż 1 godzinę (Siedlik, 2016).

Ponadto wykazano, że, zarówno limfocyty jak i monocyty, polaryzują w kierunku fenotypu przeciwwzapalnego u wytrenowanych koni, co świadczy o adaptacji do zwiększonych obciążeń treningowych. Po wysiłku w tej grupie zwierząt, wzrastał odsetek limfocytów T regulatorowych CD4+FoxP3+. Prace dotyczące tej subpopulacji komórek są nieliczne u tego gatunku (Robbin, 2011; Hamza, 2011). Inną grupą leukocytów, których odsetek wzrastał po wysiłku u koni wytrenowanych, były limfocyty T cytotoksyczne regulatorowe (CD8+FoxP3+). Należy zaznaczyć, że te komórki nie były do tej pory opisane u koni. Limfocyty CD8+FoxP3+ wykazują tak samo, jak limfocyty T CD4+FoxP3+, ważne funkcje immunosupresyjne, są zdolne do skutecznego blokowania nadmiernej autoagresji i utrzymywania homeostazy immunologicznej organizmu u ludzi (Yu, 2018). Natomiast u koni niewytrenowanych malał odsetek limfocytów T regulatorowych i wzrastał cytotoksycznych, tym samym potwierdzono nasilenie się reakcji o charakterze prozapalnym po ciężkim wysiłku.



Ryc 1. Zmiany odsetka komórek CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), CD4⁺FoxP3⁺ (C) i CD8⁺FoxP3⁺ (D) u koni wytrenowanych i niewytrenowanych po ciężkim wysiłku fizycznym (Witkowska-Piłaszewicz et al. Antioxidants, 2020)

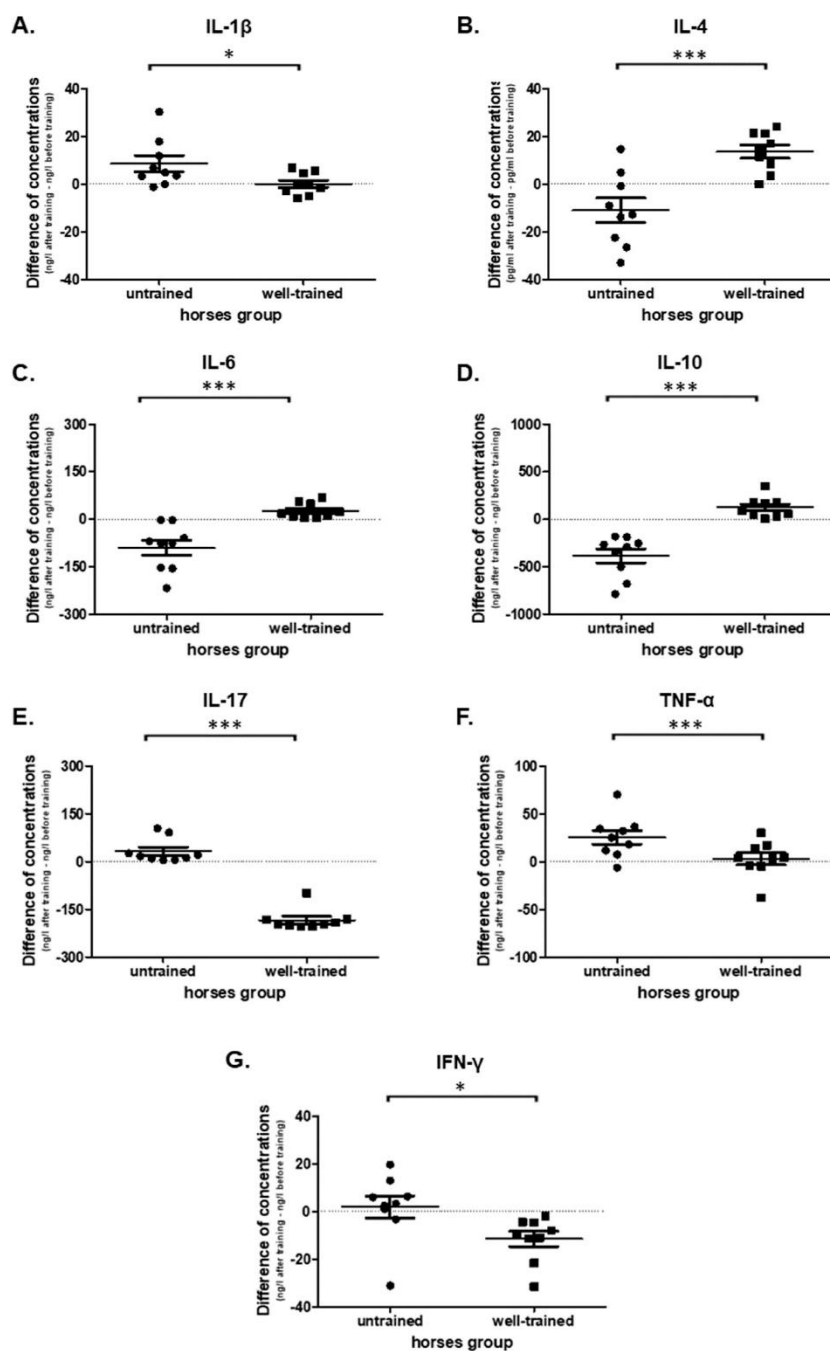
Monocyty odpowiadają za prezentację obcych antygenów limfocytom T, fagocytozę oraz wydzielanie cytokin i chemokin o różnych właściwościach. W dostępnej literaturze brakuje badań dotyczących fenotypu i funkcji tych agranulocytów u koni (Sarkar, 2016; Larson, 2019; Kiku, 2003). U ludzi komórki te są klasyfikowane jako prozapalne monocyty: klasyczne (CD14⁺⁺ CD16⁻) i pośrednie (CD14⁺ CD16⁺) oraz o działaniu przeciwzapalnym – nieklasyczne (CD14⁺ CD16⁺⁺) (Ziegler-Heitbrock, 2010). U koni z powodu braku lub bardzo ograniczonej dostępności swoistych gatunkowo przeciwciał, wysnuto hipotezę, że monocyty CD14⁻ MHCII⁺ są równoważne ludzkim nieklasycznym, podczas gdy CD14⁺ MHCII⁺ reprezentują pośrednie, a CD14⁺ MHCII⁻ klasyczne (Sarkar, 2016, Larson, 2019). U koni wytrenowanych wzrastał odsetek monocytów CD14⁻MHCII⁺, natomiast u niedoświadczonych malał, z towarzyszącym wzrostem odsetka komórek CD14⁺MHCII⁻.



Ryc 2. Zmiany odsetka komórek CD14-MHCII⁺ (A), CD14⁺MHCII⁻ (B) i CD14⁺MHCII⁺ (C) u koni wytrenowanych i niewytrenowanych po ciężkim wysiłku fizycznym (Witkowska-Piłaszewicz et al. Antioxidants, 2020)

Produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) jest jedną z głównych funkcji monocytów, która pozwala im modulować funkcję innych komórek odpornościowych (Matés, 2008). Wykazano, że zarówno u zwierząt wytrenowanych i niewytrenowanych, wysiłek zwiększał ilość reaktywnych form tlenu produkowanych przez komórki CD14⁺, aczkolwiek u zwierząt niewytrenowanych ich synteza była większa. Wiadomo, że stres oksydacyjny może aktywować przeciwzapalne układy sygnałowe (Webb, 2017). U ludzi wykazano, że tylko przy braku suplementacji przeciwutleniaczami, wysiłek fizyczny zwiększa ekspresję wrażliwych na ROS regulatorów transkrypcji odpowiedzi na insulinę oraz receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma (PPAR γ), pełniących funkcje immunoregulacyjne (Ristow, 2009). Zgodnie z koncepcją mitohormozy, stres oksydacyjny wywołany aktywnością fizyczną powoduje także odpowiedź adaptacyjną promującą endogenną zdolność obronną antyoksydacyjną (Merry, 2016). Z tego powodu uważa się, że na początku aktywności fizycznej, wzmożona produkcja reaktywnych form tlenu, może być również procesem prowadzącym do kreowania się stanu przeciwzapalnego na dalszych etapach treningów.

W celu uzyskania bardziej szczegółowych danych, określono także zmiany w funkcjonalności agranulocytów, za pomocą oceny produkcji cytokin. U koni wytrenowanych komórki produkowały po wysiłku znaczne ilości białek o działaniu przeciwzapalnym (tj. IL-4, IL-6, IL-10), jednocześnie zmniejszając syntezę prozapalnych (IL-17, $\text{INF}\gamma$). Należy zaznaczyć, że zarówno IL-4, jak i IL-6 mogą mieć działanie pro-, jak i przeciwzapalne (Tanaka, 2014; Woodward, 2010). Natomiast w grupie zwierząt rozpoczynających treningi, aktywowane były procesy zapalne charakteryzujące się wzrostem stężenia IL-1 β , IL-17, $\text{TNF}\alpha$ oraz obniżeniem IL-6 i IL-10. Uzyskane wyniki dotyczące funkcjonalności agranulocytów, potwierdzają, że ciężki wysiłek fizyczny pobudza aktywność prozapalną komórek układu odpornościowego u koni rozpoczynających treningi, natomiast u wytrenowanych reakcja ta jest zahamowana. Ponadto należy podkreślić, że jest to pierwsze badanie określające zmianę stężenia IL-17 po krótkotrwałym wysiłku u tego gatunku. U ludzi wykazano, że białko to pośredniczy na wczesnych etapach przebudowy ścięgien (Millar, 2016), natomiast nadmierna reakcja zapalna jest hamowana przez wzrost stężenia IL-6 i IL-10 (Ackermann, 2012). U koni wytrenowanych potwierdzono opisane zjawisko. Natomiast u zwierząt niewytrenowanych wiadomo, że procesy adaptacyjne w układzie mięśniowo-szkieletowym są nasilone.



Ryc 3. Zmiany stężenia cytokin: IL-1 β (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-17 (E), TNF- α (F) i IFN- γ (G), produkowanych przez komórki jednojądrzaste u koni wytrenowanych i niewytrenowanych po ciężkim wysiłku fizycznym (Witkowska-Piłaszewicz et al. Antioxidants, 2020)

Podsumowując, w omawianym osiągnięciu w oparciu o ocenę zmian fenotypu i reakcji agranulocytów wykazano, że podczas treningu wyścigowego, układ odpornościowy również dostosowuje się do wzrastających obciążeń fizycznych. **Agranulocyty dobrze wytrenowanych koni polaryzują do fenotypu przeciwzapalnego, podczas gdy reakcje prozapalne występują u niewytrenowanych zwierząt w trakcie ciężkiej aktywności fizycznej. Dlatego dużo uwagi należy poświęcić badaniom wysiłkowym, zwłaszcza na początku treningu wyścigowego.** Pobranie krwi jest zabiegiem o stosunkowo małej inwazyjności, tym samym testy czynnościowe i określające zmiany w fenotypie i aktywności komórek krwi, mogą w przyszłości stać się biomarkerem zmian adaptacyjnych, wywołanych wysiłkiem u koni. Poszerzenie wiedzy na temat zmian dotyczących układu odpornościowego ma duże znaczenie w zapobieganiu chorobom i utrzymaniu dobrostanu koni. Ponadto wykorzystanie cytometrii przepływowej w ocenie funkcjonowania komórek układu odpornościowego w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych, które do tej pory było rzadko stosowane u tego gatunku, jest przydatnym narzędziem.

Ocena zmian stężenia kortyzolu we krwi koni w trakcie całego sezonu treningowego porównana z wpływem sesji treningowych i wyścigów

Stres towarzyszący treningowi i jego wpływ na dobrostan zwierzęcia może niepokoić osoby związane z końmi użytkowanymi wyczynowo. Kortyzol jest hormonem uwalnianym w odpowiedzi na czynniki uszkodzające środowiska, a więc zmiany jego stężenia mogą być nie tylko dodatkowym parametrem opisującym obciążenie w trakcie treningu, ale i określającym dobrostan. Wiadomo, że hormon ten odgrywa istotną rolę w adaptacji do wzrastających obciążeń treningowych (Viru i Viru, 2004; Ponce, 2019), będąc niezbędnym do regeneracji układu mięśniowo-szkieletowego poprzez stymulację syntezy białek czy produkcji i magazynowania glikogenu (Stachowicz i Lebedzińska, 2016). Optymalny, a zarazem niezbędny poziom stresu nazywany jest „eustresem” (McEwen, 2019). Eustres ma pozytywny wpływ na dobrostan zwierzęcia. Należy jednak pamiętać, że przewlekłe wysokie stężenie kortyzolu we krwi może doprowadzić do dekompensacji mechanizmów adaptacyjnych, tym samym mieć niekorzystny wpływ na organizm. Z tego powodu ocena wpływu stresu na

organizm jest trudna. Prowadzone do tej pory badania dotyczyły przede wszystkim wpływu jednokrotnego wysiłku na stężenie kortyzolu (Peeters, 2011; Kedzierski 2013). Z tego powodu postanowiono zbadać kortyzol we krwi u tych samych koni w ciągu kilku miesięcy treningów i porównać ze stężeniem w trakcie zawodów. Wyniki badania przedstawiono w pracy:

Witkowska-Piłaszewicz O., Grzędzicka J., Seń J., Czopowicz M., Żmigrodzka M., Winnicka A., Cywińska A., Carter C. *Stress response after race and endurance training sessions and competitions in Arabian horses. Prev Vet Med. 2021, 188, 105265. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105265. IF 2,304; pkt. MNiSW 140*

Należy podkreślić, że jest to pierwsze badanie przeprowadzone w przebiegu całego sezonu treningowego i startów w zawodach u koni po raz pierwszy użytkowanych wyczynowo. Wykazano, że w trakcie prawidłowo prowadzonych sesji treningowych u koni wyścigowych, nie obserwuje się znacznego wzrostu stężenia kortyzolu we krwi. W związku z tym, aktywność fizyczną można uznać za eustres dla konia. Poziom tego hormonu we krwi wzrastał nieznacznie po treningu wyścigowym, bo o mniej niż 2 µg/dl, co jest stosunkowo niską wartością, porównując ją z wynikami innych badań, gdzie obserwowano 0,5-2-krotny wzrost stężenia kortyzolu (Kedzierski 2013; Peeters, 2011).

Ponadto, pierwszy kontakt z bramką startową, który uznawany jest za bardzo niebezpieczny dla jeźdźców i zwierząt, ze względu na nieprzewidywalne zachowania koni związane ze strachem, okazał się nie mieć negatywnego wpływu na stężenie kortyzolu. Tym samym po raz pierwszy oceniono laboratoryjnie poziom stresu związany z nową, nieznaną do tej pory sytuacją dla zwierzęcia. Udowodniono, że jeśli koń jest odpowiednio traktowany, zna i ufa swojemu dżokejowi, takiego typu sytuacje nie wywołują reakcji stresowej.

Wykazano także, że udział w gonitwach powoduje wyraźny wzrost stężenia kortyzolu we krwi, co jest związane z większym obciążeniem fizycznym. Z tego względu, wydaje się, że zbyt częsty udział w wyścigach może stać się w pewnym momencie niebezpieczny dla zwierzęcia. Pomiar stężenia kortyzolu we krwi dodany do badania wysiłkowego, umożliwia uzyskanie bardziej szczegółowych danych dotyczących dobrostanu i obciążeń treningowych u koni.

Ponadto porównano reakcje stresową u koni osiągających najlepsze i najgorsze lokaty w gonitwach, udowadniając, że zwierzęta o lepszych wynikach charakteryzują się mniejszym powysiłkowym wyrzutem kortyzolu do krwi. Tym samym potwierdzono, że powysiłkowe zmiany w stężeniu kortyzolu we krwi, mogą być wykorzystane w ocenie wytrenowania konia.

Dodatkowo, w tym badaniu określono stężenie kortyzolu we krwi także u koni rajdowych w trakcie sesji treningowych i zawodów. W tej grupie zwierząt zbliżona reakcja stresowa pojawiała się po treningu i zawodach, co jest związane z inną naturą długotrwałej aktywności aerobowej. Podczas rajdów długodystansowych źródłem energii są głównie kwasy tłuszczowe i glikogen (Koch i Britton, 2008), a więc mobilizacja energii jest stymulowana głównie przez kortyzol. Ponadto spoczynkowe stężenie kortyzolu w dniu zawodów także okazało się być wyższe, niż w dni treningowe. Wydaje, się być to związane między innymi z emocjami zwierząt związanymi ze współzawodnictwem, ale i z transportem do miejsca rozgrywania zawodów (Janczarek, 2013).

Podsumowując, **wykazano, że monitoring stężenia kortyzolu we krwi może być dobrym uzupełnieniem badań, dotyczących optymalnego treningu. Określenie zmian stężenia tego hormonu po wysiłku, może pomóc uniknąć przetrenowania oraz pośrednio zminimalizować możliwości pojawienia się kontuzji. Ponadto może być także dobrym parametrem do określenia poziomu wytrenowania konia wyścigowego.** Dodatkowo pomiar stężenia kortyzolu we krwi umożliwia określenie dobrostanu zwierzęcia, ponieważ wysokie stężenie tego hormonu wskazuje na wystąpienie reakcji stresowej.

Ocena przydatności nieinwazyjnej metody, jaką jest termografia, do oceny zmiany temperatury powierzchni ciała w trakcie adaptacji koni wyścigowych do wzrastających obciążeń wysiłkowych

Wydolność wysiłkową można wyrazić za pomocą pomiarów, takich jak prędkość przy tętnie 200 uderzeń na minutę (V200), czy maksymalny pobór tlenu (VO_{2max}) w trakcie biegu, co nie zawsze jest możliwe do przeprowadzenia u koni. Przez łatwość w wykonaniu oznaczenia, jednym z najpopularniejszych parametrów wykorzystywanych w praktyce sportowej, jest stężenie kwasu mlekowego (lactic acid, LA) we krwi (Allen, 2016). Monitorowanie LA we krwi jest niezbędne do ustalenia optymalnej intensywności treningu

i dostosowania się do rosnącego obciążenia pracą. Jednakże określenie stężenia LA wymaga trzykrotnego pobrania krwi w trakcie treningu (w spoczynku, zaraz po zakończeniu wysiłku i po 30 min restytucji), co może być stresujące dla zwierzęcia i wymaga obecności lekarza weterynarii. Dlatego ciągle poszukuje się nieinwazyjnych metod umożliwiających ocenę obciążeń fizycznych i reakcji organizmu u koni użytkowanych wyczynowo. Dużą potrzebę dostosowania takich technik, warunkuje nie tylko zmniejszenie stresu u zwierząt wiążanego z pobieraniem krwi, ale i zewnętrzne przepisy. W trakcie wyścigów czy zawodów rozgrywanych w dyscyplinach jeździeckich zrzeszonych w ramach Międzynarodowej Federacji Jeździeckiej, istnieje ograniczenie stosowania inwazyjnych procedur, w tym pobierania krwi.

Z tego powodu, postanowiono sprawdzić, czy nieinwazyjna metoda, jaką jest termografia, może być wykorzystana w celu monitorowania treningu u koni wyścigowych. Wyniki badania zostały przedstawione w pracy:

Witkowska-Piłaszewicz O, Maśko M, Domino M, Winnicka A. Infrared Thermography Correlates with Lactate Concentration in Blood during Race Training in Horses. *Animals (Basel)*. 2020, 10, 2072. doi: 10.3390/ani10112072. IF 2,323; pkt. MNiSW 100

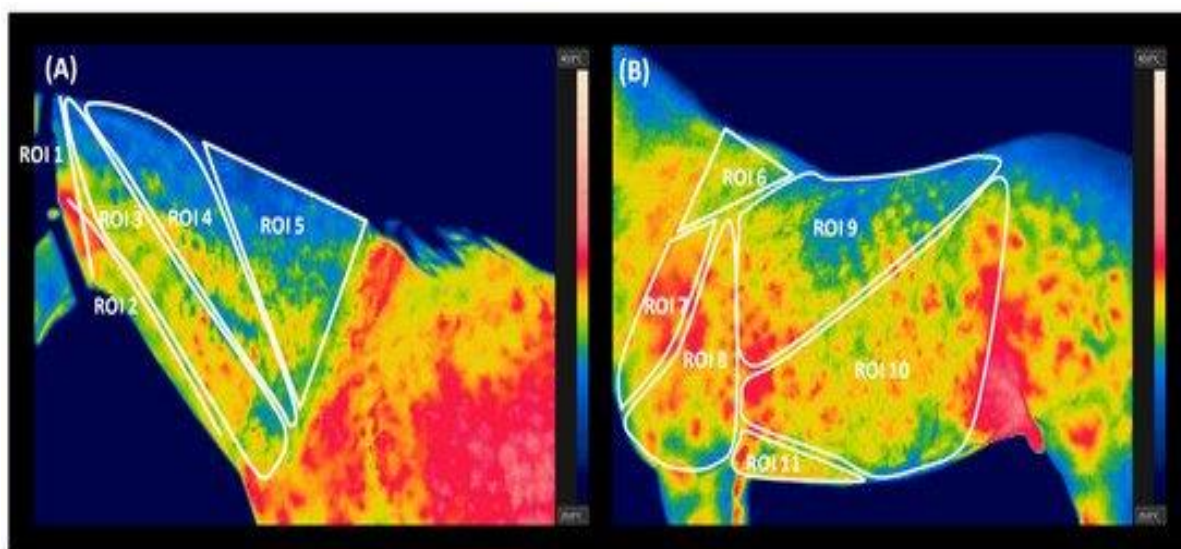
Termografia jest nieinwazyjną metodą umożliwiającą ocenę zmian temperatury na powierzchni ciała. Ta nowoczesna technika dopiero od niedawna znajduje swoje zastosowanie w medycynie weterynaryjnej. Do tej pory opisywano jej wykorzystanie przede wszystkim w ortopedii, jako narzędzia ułatwiającego zidentyfikowanie źródła kulawizny, czy w ocenie dopasowania siodła (Soroko, 2013; Masko, 2019). Ponadto może być pomocna w określeniu predyspozycji koni do wysiłku (Van Hoogmoed, 2000; Prochno, 2020). Jednakże nie ma danych dotyczących przydatności termografii w monitoringu treningu.

Ponad 80% energii wcześniej zmagazynowanej w ATP jest w trakcie wysiłku uwalniane w postaci ciepła, dlatego wraz ze wzmożoną aktywnością mięśni, następuje stopniowy wzrost temperatury ciała (Hodgson, 1994). U ludzi potwierdzono korelację pomiędzy maksymalnym zużyciem tlenu a wysokością temperatury powierzchni ciała w trakcie wysiłku (Chudecka, 2012). Udowodniono także, że diagnostyka termograficzna pozwala na ocenę metabolizmu mięśni u sportowców (Ding, 2001). Takich danych natomiast brakuje u koni.

Jest to pierwsza praca w literaturze światowej, gdzie porównano powszechnie używany parametr stosowany do oceny obciążeń treningowych, jakim jest stężenie kwasu mlekowego z temperaturą powierzchniową poszczególnych partii mięśni (temperatura maksymalna - T Max, minimalna - T Min i średnia - T Aver). W badaniu wyznaczono jedenaście obszarów do analizy termograficznej (regions of interest - ROI). Hipertermię miejscową powysiłkowa zaobserwowano we wszystkich partiach badanych mięśni. Wykazano, że największy wzrost temperatury bezpośrednio po wysiłku, następuje w obszarach wyznaczonych dla mięśni: najszerzego grzbietu (*m. latissimus dorsi*), skośnego zewnętrznego brzucha (*m. obliquus externus abdominis*) oraz piersiowego poprzecznego (*m. pectoralis transversus*). Natomiast najwyższą korelację pomiędzy zmianami w stężeniu kwasu mlekowego we krwi i temperaturą, wykazano po 30 min restytucji dla regionu części piersiowej mięśnia czworobocznego (*m. trapezius pars thoracica*), który odgrywa kluczową rolę podczas galopu. Ponadto jest to związane także z budową histologiczną tego mięśnia, ponieważ zawiera on dużo włókien typu I (Kawai, 2009), które odzyskują większą część energii w wyniku fosforylacji oksydacyjnej (Korzeniewski, 2003), prowadząc do syntezy ATP i uwalniania ciepła. Tym samym, w poddawanych ocenie osiągnięciu wykazano, że pomiary termograficzne powinny być wykonywane 30 min po zakończeniu treningu. U ludzi temperatura powierzchni ciała w początkowej fazie aktywności fizycznej spada, a następnie stopniowo wzrasta (Boguszewski, 2014), co jest wynikiem reakcji skórnych naczyń krwionośnych. Zwężenie powierzchniowych naczyń krwionośnych utrzymuje się tak długo, jak długo trwa trening, ograniczając przepływ krwi i powodując zatrzymanie ciepła w organizmie (Charkoudian, 1985). Natomiast rozszerzenie naczyń rozpoczyna się po zakończeniu aktywności fizycznej, prowadząc do wydzielenia ciepła do otoczenia. W innym badaniu zasugerowano, że pełny rozwój reakcji metabolicznych i termoregulacyjnych pracujących tkanek wymaga czasu (Tunley, 2004).

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że najlepiej wykonywać pomiary termograficzne celowane na część piersiową mięśnia czworobocznego po 30 min od zakończenia treningu. Tak wykonane badanie najdokładniej odzwierciedla obciążenie treningowe. **Udowodniono, że u koni wyścigowych termografia powysiłkowa może być przydatna w monitorowaniu adaptacji do wzrastających obciążeń fizycznych. Tym samym, być dobrym nieinwazyjnym narzędziem oceny parametrów wysiłkowych u koni.** Uzyskane wyniki przyczyniają się przede wszystkim, do polepszenia dobrostanu zwierząt poprzez odpowiednie dostosowanie obciążeń treningowych do poziomu zaawansowania wytrenowania konia. Dokładniejsza i szybsza diagnostyka wpływa na lepsze zapobieganie

występowania urazów układu mięśniowo-szkieletowego, tym samym na ograniczenie kosztów leczenia i ewentualnej rehabilitacji, co ma duży wpływ na wyniki finansowe. Dalsze badania powinny skupić się na stworzeniu algorytmu do oceny termograficznej treningu koni wyścigowych.



Ryc 4. Obszary (ROI) wybrane do analizy termograficznej (Witkowska-Piłaszewicz et al., Animals 2020)

Podsumowanie

Osiągnięcie przedstawione do oceny ma znaczenie zarówno na poziomie poznawczym, ale i aplikacyjnym. Wykazano, że nowe do tej pory niestosowane techniki diagnostyczne, jakimi są określanie zmian aktywności i fenotypu agranulocytów, dodanie do profilu laboratoryjnego oznaczeń stężenia kortyzolu czy termografia, mogą być pomocne w określaniu wydolności fizycznej koni wyścigowych. Co więcej przyczyniają się one do poprawy dobrostanu zwierząt poprzez lepsze dostosowanie obciążeń treningowych do poziomu zaawansowania wytrenowania zwierzęcia. Uzyskane wyniki mogą wpływać również na aspekt ekonomiczny, przez wzgląd na szybszą diagnostykę i zmniejszenie częstotliwości występowania kontuzji i ograniczenie kosztów leczenia oraz rehabilitacji. O wysokiej jakości prac będących częścią poddanego ocenie osiągnięcia, potwierdza fakt, że mimo niedawnej publikacji są już cytowane.

Bibliografia

1. Ackermann, P.W., Domeij-Arverud, E., Leclerc, P., Amoudrouz, P., Nader, G.A. Anti-inflammatory cytokine profile in early human tendon repair. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2012, 21, 1801–1806.
2. Allen, K., van Erck-Westergren, E., Franklin, S. Exercise testing in the equine athlete. *Equine Vet. Educ.* 2016, 28, 89–98.
3. Boguszewski, D., Adamczyk, J.G., Urbańska, N., Mrozek, N., Piejko, K., Janicka, M., Białoszewski, D. Using thermal imaging to assess the effect of classical massage on selected physiological parameters of upper limbs. *Biomed. Hum. Kinet.* 2014, 6, 146–150.
4. Cappelli, K., Amadori, M., Mecocci, S., Miglio, A., Antognoni, M.T., Razzuoli, E. Immune Response in Young Thoroughbred Racehorses under Training. *Animals.* 2020 10,1809.
5. 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.
6. Carvallo, F.R., Uzal, F.A., Diab, S.S., Hill, A.E., Arthur, R.M. Retrospective study of fatal pneumonia in racehorses. *J. of Vet. Diagn. Invest.* 2017, 29, 450–456.
7. Charkoudian, N. Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. *J. Appl. Physiol.* 1985, 109, 1221–1228.
8. Chudecka, M., Lubkowska, A. The use of thermal imaging to evaluate body temperature changes of athletes during training and a study on the impact of physiological and morphological factors on skin temperature. *Hum. Mov.* 2012, 13, 33–39.
9. Cywińska, A., Szarska, E., Górecka, R., Witkowski, L., Hecold, M., Bereznowski, A., Schollenberger, A., Winnicka, A. Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses. *Res. Vet. Sci.* 2012, 93, 1402-1406.
10. Ding, H., Wang, G., Lei, W., Wang, R., Huang, L., Xia, Q., Wu, J. Non-invasive quantitative assessment of oxidative metabolism in quadriceps muscles by near infrared spectroscopy. *Br. J. Sports Med.* 2001, 35, 441–444
11. Fazio, F., Medica, P., Cravana, C., Ferlazzo, A. Effects of competition experience and transportation on the adrenocortical and thyroid responses of horses. *Vet. Rec.* 2008, 163, 713-716.
12. Gibbons, N., Goulart, M.R., Chang, Y.M., Efstathiou, K., Purcell, R., Wu, Y., Peters, L.M., Turmaine, M., Szladovits, B., Garden, O.A. Phenotypic heterogeneity of peripheral monocytes in healthy dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2017, 190, 26–30.
13. Giori, L., Morett, P., Giordano, A., Paltrinieri, S. Short-term Evaluation of Serum Amyloid A after Exercise in Clinically Healthy Horses. *J. Equine. Vet. Sci.* 2011, 31, 499-501.
14. Gleeson, M., Bishop, N.C., Stensel, D.J., Lindley, M.R., Mastana, S.S., Nimmo, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 9, 607-615.
15. Gleeson, M. Immunological aspects of sport nutrition. *Immunol Cell Biol.* 2016b, 94, 117–123.
16. Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira, M., McCauley, T., Tauler, P., Muhamad, A.S. Respiratory infection risk in athletes: association with antigen-stimulated IL-10 production and salivary IgA secretion. *Scand J Med Sci Sports.* 2012, 22, 410-417.

17. Hamza, E., Gerber, V., Steinbach, F., Marti, E. Equine CD4+CD25highT cells exhibit regulatory activity by close contact and cytokine-dependent mechanisms in vitro. *Immunology*. 2011,134, 292–304.
18. Hinchcliff, K.K., Geor, R. Exercise testing in the field. In: Hinchcliff K.K., Kanepis A., Geor R., editors. *Equine Sports Medicine and Surgery*. 2nd ed. Volume 1. Saunders Elsevier; Philadelphia, PA, USA: 2014. pp. 1254–1257.
19. Hines, M.T., Leroux, A.J., Schott, H.C. Changes in Lymphocyte Subpopulations Following Prolonged Exercise in Horses. In *Proceedings of the 12th Annual Veterinary Medical Forum*, San Francisco, CA, USA, 2–5 June 1994; 1016.
20. Hodgson, D.R., Davis, R.E., McConaghy, F.F. Thermoregulation in the horse in response to exercise. *Br. Vet. J.* 1994, 150, 219–235.
21. 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
22. Huang, J., Meyer, C., Zhu, C. T cell antigen recognition at the cell membrane. *Mol Immunol.* 2012, 52, 155–64.
23. Janczarek, I., A. Bereznowski, K. Strzelec. The influence of selected factors and sport results of endurance horses on their saliva cortisol concentration. *Pol. J. Vet. Sci.* 2013, 10.2478/PJVS-2013-0074
24. Kawai, M., Minami, Y., Sayama, Y., Kuwano, A., Hiraga, A., Miyata, H. Muscle fiber population and biochemical properties of whole body muscles in Thoroughbred horses. *Anat. Rec.* 2009, 292, 1663–1669.
25. Kędzierski, W., Cywińska, A., Strzelec, K., Kowalik, S. Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Anim Sci J.* 2014, 85, 313–7.
26. Kiku, Y., Kusano, K.I., Miyake, H., Fukuda, S., Takahashi, J., Inotsume, M., Hirano, S., Yoshihara, T., Toribio, R.E., Okada, H. Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by Experimental Endotoxemia in Horse. *J. Vet. Med. Sci.* 2003, 65, 857–863.
27. Koch, L.G., Britton, S.L. Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. *J Physiol.* 2008, 586, 83–95.
28. Korzeniewski, B. Regulation of oxidative phosphorylation in different muscles and various experimental conditions. *Biochem. J.* 2003, 375, 799–804,
29. Kurcz, E., Lawrence, L., Kelley, K.W., Miller, P. The effect of intense exercise on the cell-mediated immuneresponse of horses. *J. Equine Vet. Sci.* 1988, 8, 237–239.
30. Larson, E.M., Babasyan, S., Wagner, B. Phenotype and function of IgE-binding monocytes in equine Culicoides hypersensitivity. *PLoS ONE*, 2020, 15, e0233537.
31. Masko, M., Krajewska, A., Zdrojkowski, L., Domino, M., Gajewski, Z. An application of temperature mapping of horse's back for leisure horse-rider-matching. *Anim. Sci. J.* 2019, 90, 1396–1406.
32. Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Márquez, J. Intracellular redox status and oxidative stress: Implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* 2008, 82, 273–299.
33. McEwen, B.S. The good side of "stress". *Stress.* 2019, 22, 524–525.
34. Merry, T.L., Ristow, M. Mitohormesis in exercise training. *Free Radic Biol Med.* 2016, 98, 123–130.
35. Millar, N.L., Akbar, M., Campbell, A.L., Reilly, J.H., Kerr, S.C., McLean, M., Frleta-Gilchrist, M., Fazzi, U.G., Leach, W.J., Rooney, B.P. IL-17A mediates inflammatory and tissue remodelling events in early human tendinopathy. *Sci. Rep.* 2016, 6, 27149.

36. Muñoz, L., León, C., Cruces, J., Ortiz, R., Briones, M., Locomotor Stereotypies and Racing Performance in Thoroughbred Horses. *Journal of Veterinary Behavior*. 2018, 25, 24-27.
37. Negro, S., Bartolomé, E., Molina, A., Solé, M., Gómez, M.D., Valera, M. Stress level effects on sport performance during trotting races in Spanish Trotter Horses. *Res Vet Sci*. 2018, 118, 86-90.
38. Nielsen, B., Potter, D., Greene, W., Morris, E., Murray- Gerzik, M., Smith, B., Martin, M. Characterization of changes related to mineral balance and bone metabolism in the young racing Quarter Horse. *J of Equine Vet Scien*. 18, 1998, 190-200.
39. Page, A.E., Adam, E., Arthur, R., Barker, V., Franklin, F., Friedman, R., Grande, T., Hardy, M., Howard, B., Partridge, E., Rutledge, M., Scollay, M., Stewart, J.C., Vale, A., Horohov, D.W. Expression of select mRNA in Thoroughbreds with catastrophic racing injuries. *Equine Vet J*. 2021, doi: 10.1111/evj.13423. Epub ahead of print.
40. Peeters, M., Sulon, J., SerTEyn, D., Vandenheede, M. Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *J Vet Behav*. 2010, 5, 216.
41. Physick-Sheard, P.W., Avison, A., Chappell, E., MacIver, M. Ontario Racehorse Death Registry, 2003-2015: Descriptive analysis and rates of mortality. *Equine Vet J*. 2019, 51, 64-76.
42. Ponce, P., Del Arco, A., Loprinzi, P. Physical Activity versus Psychological Stress: Effects on Salivary Cortisol and Working Memory Performance. *Medicina (Kaunas)*. 2019, 55, 119.
43. Prochno, H.C., Barussi, F.M., Bastos, F.Z., Weber, S.H., Bechara, G.H., Rehan, I.F., Michelotto, P.V. Infrared Thermography Applied to Monitoring Musculoskeletal Adaptation to Training in Thoroughbred Race Horses. *J. Equine Vet. Sci*. 2020, 87, 102935.
44. Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., KiehnTOPf, M., Stumvoll, M., Kahn, C.R., Blüher, M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106, 8665-70.
45. Robbin, M.G.; Wagner, B.; Noronha, L.E.; Antczak, D.F.; De Mestre, A.M. Subpopulations of equine blood lymphocytes expressing regulatory T cell markers. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2011, 140, 90–101.
46. Sarkar, S., Chelvarajan, L., Go, Y.Y., Cook, F., Artiushin, S., Mondal, S., Anderson, K., Eberth, J., Timoney, P.J., Kalbfleisch, T.S. Equine Arteritis Virus Uses Equine CXCL16 as an Entry Receptor. *J. Virol*. 2016, 90, 3366–3384.
47. Siedlik, J.A., Benedict, S.H., Landes, E.J., Weir, J.P., Vardiman, J.P., Gallagher, P.M. Acute bouts of exercise induce a suppressive effect on lymphocyte proliferation in human subjects: A meta-analysis. *Brain Behav. Immun*. 2016, 56, 343–351.
48. Soroko, M., Henklewski, R., Filipowski, H., Jodkowska, E. The effectiveness of thermographic analysis in equine orthopaedics. *J. Equine Vet. Sci*. 2013, 33, 760–762.
49. Stachowicz, M., LebieDzińska, A. The effect of diet components on the level of cortisol. *Eur Food Res Technol*, 2016, 242, 2001–2009.
50. Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014, 10, a016295.
51. Tunley, B.V.; Henson, F.M. Reliability and repeatability of thermographic examination and the normal thermographic image of the thoracolumbar region in the horse. *Equine Vet. J*. 2004, 36, 306–312.
52. Van Hoogmoed, L., Snyder, J., Allen, A., Waldsmith, J. Use of infrared thermography to detect performance enhancing techniques in horses. *Equine Vet. Educ*. 2000, 12, 102–107.

53. Vatistas, N.J., Snyder, J.R., Carlson, G., Johnson, B., Arthur, R.M., Thurmond, M., Zhou, H., Lloyd, K.L. Cross-sectional study of gastric ulcers of the squamous mucosa in thoroughbred racehorses. *Equine Vet J Suppl.* 1999, 29, 34-9.
54. Viru, A., Viru, M. Cortisol--essential adaptation hormone in exercise. *Int J Sports Med.* 2004, 25, 461-4.
55. Webb, R., Hughes, M.G., Thomas, A.W., Morris, K. The Ability of Exercise-Associated Oxidative Stress to Trigger Redox-Sensitive Signalling Responses. *Antioxidants.* 2017, 6, 63.
56. Witkowska-Piłaszewicz, O., Baska, 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 (Basel).* 2019, 27, 9, 616.
57. Witkowska-Piłaszewicz, O., Baska, P., Czopowicz, M., Żmigrodzka, M., Szczepaniak, J., Szarska, E., Winnicka, A., Cywińska, A. Changes in Serum Amyloid A (SAA) Concentration in Arabian Endurance Horses During First Training Season. *Animals (Basel).* 2019, 9, 330.
58. Woodward, E.A., Prêle, C.M., Nicholson, S.E., Kolesnik, T.B., Hart, P.H. The anti-inflammatory effects of interleukin-4 are not mediated by suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1). *Immunology.* 2010, 131, 118-27.
59. Yu, Y., Ma, X., Gong, R., Zhu, J., Wei, L., Yao, J. Recent advances in CD8+ regulatory T cell research. *Oncol Lett.* 2018, 15, 8187-8194.
60. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood,* 2010, 116, e74–e80

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W 2016 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Zintegrowanej Szkole Doktoranckiej Konsorcjum Naukowego "Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność", gdzie już program studiów obejmował między innymi krótkoterminowe staże w ośrodkach pozostałych konsorcjantów tj. w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach, Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu oraz na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie, w celu poszerzenia i udoskonalenia technik badawczych.

Moim pierwszym miejscem pracy (2018/19), gdzie byłam zatrudniona na stanowisku asystenta naukowo-badawczego, była Katedra Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach na **Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu**. W trakcie zatrudnienia powstały trzy prace we współpracy z Instytutem Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie:

Żmigrodzka M., Rzepecka A., Krzyzowska M., Witkowska-Pilaszewicz O., Cywińska A., Winnicka A. The cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway and its role in the pathogenesis of human and dog hematological malignancies. J Physiol Pharmacol 2018, 69, 5, 653 DOI: 10.26402/jpp.2018.5.01. IF 2018 2,478; MNiSW 25

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Rzepecka A., Żmigrodzka M., Witkowska-Pilaszewicz O., Cywińska A., Winnicka A. CD4 and MHCII phenotypic variability of peripheral blood monocytes in dogs. PLOS ONE 2019, 14, e0219214. Doi: 10.1371/journal.pone.0219214. IF 2,78; MNiSW 100

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na pozyskiwaniu materiału do badań oraz na przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Witkowska-Pilaszewicz O., Kaszak I., Żmigrodzka M. Winnicka A., Sacharczuk M., Szczepaniak J., Cywińska A. Equine atypical myopathy – a review. Animal Science Papers and Reports, 2019, 337, 233-242. IF 0,7; MNiSW 40.

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji i napisaniu manuskryptu (rola wiodąca), przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją.

Ponadto odbyłam również staże zagraniczne w renomowanych ośrodkach naukowych. W 2019 roku odbyłam miesięczny staż w największym centrum badawczym zajmującym się końmi wyścigowymi - Gluck Equine Center na **Uniwersytecie w Kentucky w USA**. Zajmowałam się tam oceną cytometryczną komórek krwi koni z zespołem metabolicznym. Ponadto między innymi w wyniku tej współpracy powstała praca wchodząca w skład omawianego osiągnięcia naukowego:

Witkowska-Piłaszewicz O, Grzędzicka J, Seń J, Czopowicz M, Żmigrodzka M, Winnicka A, Cywińska A, Carter C. *Stress response after race and endurance training sessions and competitions in Arabian horses. Prev Vet Med. 2021, 188, 105265. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105265. IF 2,30; pkt. MNiSW 140*

Dwukrotnie odbyłam staż w Szkole Cytometrii w **Szwajcarii na Uniwersytecie w Genewie** (14-19.04.2019 oraz 9-14.03.2020), gdzie doskonaliłam się z techniki cytometrii przepływowej. Ta współpraca umożliwiła udoskonalenie warsztatu badawczego i poznanie bardziej zaawansowanych technik diagnostycznych.

Ponadto od 2020 r. biorę udział w projekcie **wymiany bilateralnej naukowców pomiędzy Polską a Francją PHC Polonium** pt. „Cellular and molecular responses of dairy cows to mammary gland infection” nr umowy PPN/BFR/2020/1/00057/U/00001. W trakcie wspólnych badań planuje się poddanie ocenie reakcji układu odpornościowego w gruczole mlekowym krów z zapaleniem tego narządu.

Ponieważ jestem także praktykującym lekarzem weterynarii zainteresowało mnie rozwiązanie problemu specyficznych wyników badań hematologicznych u kuców. Postanowiono określić, czy parametry krwi różnią się w poszczególnych grupach tych koni i sprawdzić, czy ogólne wartości parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi, które są normalne dla koniowatych mają zastosowanie u kuców. Badanie zostało przeprowadzone

we współpracy z Virginia Maryland College of Veterinary Medicine, USA, Wydziałem Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych w Toruniu, Wydziałem Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach w Poznaniu oraz z Wydziałem Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki w Lublinie. Jest to pierwsze badanie na świecie udowadniające, że u kucy w ocenie hematologicznej nie można stosować normalnych wartości dla gatunków z rodziny koniowatych. Przede wszystkim w trakcie badania pacjenta należy zwracać uwagę na takie parametry, jak wartości stężenia kwasu mlekowego, trójglicerydów i aktywność aminotransferazy asparaginianowej (EC 2.6.1.1) oraz kinazy kreatynowej (EC 2.7.3.2). Wyniki zostały przedstawione w publikacji:

Witkowska-Pilasiewicz O., Cywińska A., Michlik-Polczyńska K., Czopowicz M., Strzelec K., Biazik A., Parzeniecka-Jaworska M., Crisman M., Witkowski L. Variations in haematological and biochemical parameters in healthy ponies. BMC Vet Res, 2021, 17, 38. doi: 10.1186/s12917-020-02741-5. IF 2019 1,8; pkt. MNiSW 140

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji i założeń badania, ocenie klinicznej zwierząt, pobraniu krwi, interpretacji wyników, doborze i analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

W trakcie pracy w Katedrze Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu byłam odpowiedzialna za przedmiot „**Choroby wewnętrzne koni**” oraz prowadziłam zajęcia „**Rozród koni**” i staże kliniczne z tych przedmiotów. Byłam także jednym z opiekunów Sekcji Hippiatrycznej Koła Naukowego (2018-2019 r.).

Od pierwszego roku studiów doktoranckich (2016 r.) prowadzę zajęcia z przedmiotów „**Patofizjologia zwierząt**”, „**Immunologia kliniczna**” oraz „**Pathophysiology**” dla studentów polsko i anglojęzycznych kierunku weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Ponadto prowadziłam/prowadzę ćwiczenia z przedmiotów: „**Techniki diagnostyczne**”, „**Inżynieria przeciwciał monoklonalnych**” oraz „**Metody produkcji przeciwciał monoklonalnych**” dla kierunków Biotechnologia oraz Bioinżynieria Zwierząt Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W 2019 r. wraz z zespołem stworzyliśmy fakultet „**Clinical Immunology**” dla studentów anglojęzycznych Instytutu

Medycyny Weterynaryjnej SGGW. W 2021r. stałam się głównym pomysłodawcą fakultetu pt. „**Perspektywy zawodowe lekarza weterynarii**”, którego jestem koordynatorem.

Ponadto ciągle podnoszę swoje kompetencje, biorąc udział w kursach w zakresie innowacyjnych umiejętności dydaktycznych i obsługi programów do tworzenia i prowadzenia zajęć e-learningowych w języku angielskim, programie podnoszenia kompetencji pracowników naukowo-dydaktycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie w 2018 roku POWR.03.04.00-00-D008/17-00 oraz z zakresu relacji międzykulturowych prowadzonych dla pracowników SGGW w Warszawie (22-23.01.2020), czy w szkoleniu „Nauczyciele akademicki SGGW wobec studentów niepełnosprawnych” (13.02.2020).

Od początku mojej obecności w Szkole Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (2010) byłam zaangażowana w działalność Koła Naukowego Medyków Weterynaryjnych, którego dwukrotnie sprawowałam stanowisko prezesa. Praca w Kole Naukowym oraz krajowa i międzynarodowa współpraca z organizacjami naukowymi studentów zaowocowała zorganizowaniem I Międzynarodowej Konferencji Naukowej Studentów Weterynarii „Non sibi sed omnibus – Nie dla siebie, ale dla wszystkich” (2015 r.), której tradycja organizacji do dziś jest kontynuowana w Instytucie Medycyny Weterynaryjnej SGGW.

W trakcie studiów doktoranckich aktywnie uczestniczyłam w działalności Koła Naukowego Medyków Weterynaryjnych, jako opiekun naukowy. W 2018 r. studenci, nad którymi sprawowałam opiekę zdobyli pierwszą nagrodę za referat w języku angielskim na IV Międzynarodowej Konferencji Naukowej Studentów Weterynarii „Non sibi sed omnibus – Nie dla siebie, ale dla wszystkich”. Aktualnie jestem promotorem jednej pracy magisterskiej i jednej pracy inżynierskiej studentów kierunku Bioinżynieria Zwierząt.

W 2018 r. otrzymałam podziękowanie od Jego Magnificencji Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia organizatorskie. Od 2019 r. biorę także czynny udział w organizacji Festiwalu Nauki dla uczniów szkół podstawowych, mającego na celu promocję nauki już na wczesnym etapie edukacji młodzieży.

Ponadto jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Hipiatrycznego, w ramach którego pomagałam w organizacji XV Międzynarodowej Konferencji Hipiatrycznej PTH 2019. Jestem też członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych. W 2019 roku byłam członkiem Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie i ogólnouczelnianej Rady Doktorantów SGGW, a w 2021 roku zostałam wybrana, jako reprezentant do Rady Dyscypliny Weterynaria w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Od 2021 r. jestem

członkiem Komisji ds. sprawozdań naukowych i dydaktyki w Katedrze Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej.

Jestem także autorem 14 prac poglądowych w branżowych czasopismach polskich dotyczących głównie praktycznych aspektów medycyny weterynaryjnej, takich jak choroby wewnętrzne koni, czy onkologia weterynaryjna.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Od początku mojej pracy naukowej przede wszystkim zajmowałam się tematyką fizjologii wysiłku u koni. Temat pracy doktorskiej dotyczył oceny roli powysiłkowej reakcji ostrej fazy w adaptacji treningowej koni arabskich trenowanych do rajdów długodystansowych. Adaptacja do wzrastających obciążeń obejmuje wiele mechanizmów, często niewystarczająco dokładnie poznanych. Podobnie jak u ludzi i psów, ciężki wysiłek pobudza reakcję zbliżoną do reakcji ostrej fazy, obejmującą zmiany stężeń cytokin i białek ostrej fazy. U koni podobna reakcja pojawia się również w przebiegu treningu. Nie wiadomo jednak było, czy jest ona wyrazem adaptacji, czy świadczy o zbyt dużym obciążeniu, które może zwiększać ryzyko rozwoju chorób ortopedycznych. Jako pierwsza na świecie wykazałam, że tylko w trakcie ciężkiego wysiłku fizycznego, jakim jest udział w zawodach, dochodzi do pobudzenia odpowiedzi ostrej fazy u młodych niedoświadczonych koni rajdowych w trakcie ich pierwszego sezonu treningowego. Proces ten charakteryzuje się wzrostem stężenia surowiczego amyloidu A (SAA), będącego głównym białkiem ostrej fazy u koni. Tym samym udowodniono, że analiza zmiany stężenia SAA po wysiłku, może być wykorzystywana w monitorowaniu treningu i przygotowania do startu w zawodach u młodych koni. Dodatkowym walorem pracy był bardzo długi czas (7 miesięcy) monitorowania grupy młodych koni. Do tej pory wszystkie badania dotyczące rajdów długodystansowych, skupiały się na porównaniu jednorazowego ciężkiego wysiłku fizycznego, przeważnie tylko oceniając zaawansowane treningowo konie.

Ponadto udowodniono, że wraz z postępowaniem treningowym dochodzi do spadku stężenia cytokin prozapalnych i kreowania się „stanu przeciwzapalnego”. Wykazano także, że w badaniach nad wpływem wysiłku fizycznego na układ odpornościowy, pomiary stężenia cytokin w surowicy lepiej obrazują stan organizmu sportowca, niż ekspresja mRNA w komórkach krwi, ponieważ produkcja cytokin zachodzi głównie w mięśniach szkieletowych,

których pobranie do badań jest zbyt inwazyjne i może prowadzić do przerywania treningów. Potwierdzono, że koń mimo że różni się w wielu aspektach od człowieka (np. metabolizm, obciążenia treningowe), to może być zwierzęciem modelowym dla oceny adaptacji układu odpornościowego w przebiegu regularnego treningu wytrzymałościowego, otwierając tym samym nowe perspektywy badawcze w wyborze zwierząt modelowych.

Wyniki badań opublikowano w czasopismach zagranicznych w postaci jednej pracy przeglądowej i dwóch oryginalnych:

Witkowska-Piłaszewicz O., Żmigrodzka M., Winnicka A., Miśkiewicz A., Strzelec K., Cywińska A. Serum amyloid A in equine health and disease. *Equine Vet. J.* 2019, 51,293-298. **IF 2,4; MNiSW 200**

Witkowska-Piłaszewicz O., Bąska 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 (Basel).* 2019, 9. E616. doi: 10.3390/ani9090616. **IF 2,3; pkt. MNiSW 100**

Witkowska-Piłaszewicz O., Bąska P., Czopowicz M., Żmigrodzka M., Szczepaniak J., Szarska E., Winnicka A., Cywińska A. Changes in serum amyloid A (SAA) concentration in Arabian endurance horses during first training season. *Animals*, 2019, 9, E330. **IF 2,3; pkt. MNiSW 100**

Praca doktorska w 2020 roku została nagrodzona I nagrodą przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych.

Od 2017 roku realizuję grant **PRELUDIUM 13 nr 2017/25/N/NZ6/02750** „Wpływ klenbuterolu na układ immunologiczny koni wyścigowych” (2018- 2021) przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego jestem **kierownikiem**. W ramach projektu zbadany został wpływ klenbuterolu na układ immunologiczny koni wyścigowych. Klenbuterol – adrenomimetyk - jest lekiem stosowanym w leczeniu chorób układu oddechowego koni, jednakże jest on popularny także w kulturystyce oraz w sportach wyczynowych, z uwagi na działanie lipolityczne. Z tego powodu bywa używany bez konsultacji lekarskiej przez osoby chcące stracić na wadze (tzw. chemiczna liposukcja), co jednak może być niebezpieczne dla zdrowia człowieka, przez wzgląd na liczne działania niepożądane tego leku. Korzystne działanie klenbuterolu, obejmuje hamowanie reakcji zapalnej (możliwość zastosowania

terapeutycznego w zapaleniu opon mózgowych u ludzi). Jednak piśmiennictwo medyczne nadal pozostawia wiele niewiadomych na temat wpływu tego leku na komórki odpornościowe.

W badaniu wykazano, że klenbuterol ma działanie pro- i przeciwzapalne w zależności od dawki i stopnia wytrenowania konia. Uzyskane wyniki pozwoliły na uzyskanie nowatorskich danych w dziedzinie immunologii klinicznej i mogą być przydatne zarówno w weterynarii, jak i medycynie człowieka. Rozszerzyły także warsztat badawczy, dotyczący oceny wpływu powszechnie stosowanych leków na aktywność układu odpornościowego koni, o metody dotychczas rzadko wykorzystywane u tego gatunku. Co więcej, badania nad klenbuterolem, mogą być też przydatne w planowaniu kolejnych badań i doprowadzić do opracowania nowych wskazań do stosowania tego leku. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w artykule:

Witkowska-Piłaszewicz, O., Pingwara, R., Szczepaniak, J., Winnicka, A. Effect of the Clenbuterol— β 2-Adrenergic Receptor Agonist on the Peripheral Blood Mononuclear Cells Proliferation, Phenotype, Functions, and Reactive Oxygen Species Production in Race Horses In Vitro. Cells, 2021, 10, 936. <https://doi.org/10.3390/cells10040936>; IF 5-letni 5,27; IF 4,36; pkt. MEiN 140

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji i założeń badania, ocenie klinicznej zwierząt, pobraniu krwi, optymalizacji i prowadzeniu hodowli komórkowych, wykonywaniu testów cytometrycznych oraz ELISA, interpretacji wyników, doborze i analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu (rola wiodąca), przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją.

W 2016-2019 roku byłam **głównym wykonawcą** grantu promotorskiego **KNOW nr 500 07 023100 D00100-01** pt. „Ocena roli powysiłkowej reakcji ostrej fazy w adaptacji treningowej koni arabskich trenowanych do wyścigów i rajdów długodystansowych” (kierownik - prof. A. Cywińska). W 2018 r. zostałam **kierownikiem grantu** wewnętrznego dla młodych naukowców SGGW 2018/19 nr 505-10-023700-Q00385-99 pt. „Przeciwzapalne właściwości wysiłku fizycznego u koni trenowanych do rajdów długodystansowych”. Byłam też **kierownikiem grantu** dla Młodych Naukowców Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Ocena fenotypu i funkcjonalności monocytów u koni sportowych” (2019 r.). W 2018 r. byłam **wykonawcą** w zadaniu badawczym MINIATURA 1 DEC. 2017/01/X/NZ5/01481 „Ocena wpływu mikropęcherzyków płytkowych na komórki

układu odpornościowego u psów z chorobą nowotworową” (kierownik zadania badawczego: dr Magdalena Żmigrodzka). W 2020 r. byłam **wykonawcą** w zadaniu badawczym MINIATURA 3 DEC.2019/03/X/NZ9/01759 pt. „Nieinwazyjna ocena przebiegu ciąży u dzikich koniowatych - badania wstępne na modelu Konika Polskiego (*Equus calallus gmelini* Antonius)”, przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (kierownik zadania badawczego: dr inż. Małgorzata Maśko).

Współpracuję również z gospodarką i firmami zagranicznymi. Od 2020 roku jestem **wykonawcą** w dużym grantie POIR.01.01.01-00-1001/20 "Innowacyjny system treningowy dla koni oparty na synergii unikatowych rozwiązań technicznych wspomaganych systemem IT przy wykorzystaniu algorytmów SI" 2020-2022 (ok. 15 mln PLN) przyznanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (Beneficjent: TECHNOHORSE Sp. z o.o.) oraz **wykonawcą** (bad. cytometryczne) w projekcie “Effect of COMPETITIVE EXCLUSION (CE) product BROILACT® (Orion, Finland) on growth performance, meat quality and development of specific and non-specific parameters of serological response in broilers – experimental farm study” nr 70/CIiTT/2020.

Moje osiągnięcia już w czasach studenckich zostały nagrodzone **3-krotnie przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** oraz **5-krotnie przez Jego Magnificencje Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**. Po ukończeniu doktoratu w 2020 r. zostałam ponownie nagrodzona **Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego**, jako młody naukowiec.

Potwierdzeniem uznania moich osiągnięć badawczych, jest fakt, że mimo stosunkowo krótkiej kariery naukowej, otrzymuję do recenzji wiele artykułów dotyczących fizjologii i patologii koni, ze szczególnym uwzględnieniem immunologii i wpływu wysiłku, z renomowanych zagranicznych czasopism. Do tej pory wykonałam ponad 20 recenzji dla takich czasopism, jak Journal of Clinical Medicine, International Journal of Molecular Sciences, PlosOne, Genes, Agriculture, czy Animals. Moja praca, jako recenzenta została doceniona i w 2020 zaproszono mnie do **komisji recenzentów (Reviewing Board)** ostatniego z wymienionych czasopism (IF 2,32; MNIŚW 100). Jestem też **edytorem** specjalnego wydania “The Participation of Epithelial Cells in the Immune Response” w tym samym czasopiśmie.

Dotychczasowe wyniki badań prezentowałam na ponad **20 konferencjach krajowych** oraz **zagranicznych** (Austria, Australia, Węgry, Dania, Czechy, Niemcy, Szwajcaria, Tajlandia), gdzie w większości prac byłam pierwszym autorem. Ponadto wiele prac było wyróżnianych i nagradzanych. W 2019 r., jako jedna z 5 doktorantów z całego świata

wyłosiłam dwa referaty na 19th International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnostics, w Tajlandii, w tym jeden dotyczący badań prowadzonych we współpracy z Uniwersytetem w Kentucky. Moja działalność naukowa, jest dostrzegana na arenie międzynarodowej, co potwierdza fakt, że otrzymałam zaproszenie by wygłosić wykład na Światowym Kongresie Stowarzyszenia Lekarzy Weterynaryjnej (World Veterinary Association Congress) w Tajwanie w 2021 r., ale z powodu sytuacji epidemiologicznej został on przesunięty na 2023 r.

Moje zainteresowania i prace badawcze dotyczą również zagadnień związanych z chorobami nowotworowymi. Od 2018 r. współpracuję z zespołem dr hab. Marty Grodzik, prof. SGGW z Katedry Nanobiotechnologii Instytutu Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, biorąc udział w badaniach nad wpływem płatków grafenu i jego pochodnych na komórki glejaka wielopostaciowego. Glejak wielopostaciowy stanowi 12-15% wszystkich guzów mózgu u ludzi, jest guzem o najwyższym stopniu złośliwości. Terapia przy obecnym stanie wiedzy medycznej jest nieskuteczna, z tego względu zalicza się ten nowotwór do terminalnych.

Badania oceny szlaków apoptotycznych zależnych od kaspaz i mitochondriów, żywotności, aktywności metabolicznej, potencjału błony mitochondrialnej i cyklu komórkowego, miały na celu porównanie działania przeciwnowotworowego grafenu o różnej zawartości tlenu w terapii glejaka z użyciem linii U87. Udowodniono, że z płatków grafenu to zredukowane tlenki mają jedno z najsilniejszych działań przeciwnowotworowych ze wszystkich odmian grafenu. Badania zostały kontynuowane i wykazano, że zredukowane tlenki grafenu modulują ekspresję receptorów komórkowych i genów, zależnych od napięcia kanałów jonowych glejaka wielopostaciowego. Udowodniono, że skuteczność w terapii przeciwnowotworowej jest związana z obecnością grup funkcyjnych zawierających tlen i chmur elektronowych. Uzyskane wyniki zawarto w następujących publikacjach:

*Szczepaniak J., Strojny B., Chwalibog E.S., Jaworski S., Jagiello J., Winkowska M., Szmidt M., Wierzbicki M., Sosnowska M., Balaban J., Winnicka A., Lipinska L., **Witkowska-Pilaszewicz O.**, Grodzik M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, pii: E3939. IF 4,18; MNiSW 30*

*Szczepaniak, J., Jagiello, J., Wierzbicki, M., Nowak, D., Sobczyk-Guzenda, A., Sosnowska, M., Jaworski, S., Daniluk, K., Szmidt, M., **Witkowska-Pilaszewicz, O.**, Strojny-Cieslak, B., Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and*

Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 515. Doi:10.3390/ijms22020515. IF 4,55; MNiSW 140

Mój udział w powstawaniu prac polegał na wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych, walidacji oraz pomocy w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Biorę także udział w badaniach związanych z biologią nowotworów u psów. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe to zróżnicowana populacja submikronowych struktur uwalnianych z komórek w warunkach fizjologicznych i patologicznych. W ostatnim dziesięcioleciu rola mikropęcherzyków różnego pochodzenia komórkowego, jako potencjalnych markerów diagnostycznych, czy prognostycznych w chorobie nowotworowej jest intensywnie badana. W badaniu wykonanym pod kierownictwem dr Magdaleny Żmigrodzkiej udowodniono, że oszacowanie liczby pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia płytkowego i leukocytarnego, może być użytecznym markerem biologicznym u psów z chorobą nowotworową.

Żmigrodzka M., Witkowska-Piłaszewicz O., Rzepecka A., Cywińska A., Jagielski D., Winnicka A. Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer—A Preliminary Study. Animals 2019, 9: 575, doi: 10.3390/ani9080575; IF 1,83 MNiSW 100

Żmigrodzka, M., Witkowska-Piłaszewicz, O., Winnicka, A. Platelets Extracellular Vesicles as Regulators of Cancer Progression-An Updated Perspective. Int J Mol Sci. 2020, 15, 5195. doi: 10.3390/ijms21155195. IF 4,55; MNiSW 140

Mój udział w powstawaniu prac polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji i założeń badania, ocenie klinicznej zwierząt, pobraniu krwi, interpretacji wyników, przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Podsumowanie dorobku naukowego na podstawie analizy bibliometrycznej:

Rodzaj pracy naukowej	przed uzyskaniem stopnia doktora	po uzyskaniu stopnia doktora	suma
Liczba publikacji w czasopismach z listy MNiSW (lub A do 2019r.)	10	9	19
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy ministerialnej (lub B do 2019r)	12	2	14
Współczynniki IF (5-letni IF)	26,28 (27,4)	31,8 (32,54) (w tym osiągnięcie 9,64)	58,08 (59,94)
Liczba punktów wg MNiSW	801	1155 (w tym osiągnięcie 340)	1956
Baza	Web of Science Core Collection	Scopus Prewiew	
Liczba cytowań (bez samocytowań)	57 (51)	79	
H-index	4	6	

*stan na dzień 20.04.2021r.

Olga Witkowska-Pitaneira
(podpis wnioskodawcy)
20.04.2021r.