

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Lek. wet. Katarzyna Alicja Miazga

Parametry przydatne w ocenie zmian
powysiłkowych u psów rasy whippet
w treningu sportowym

Parameters useful in the assessment of exercise-related changes
in Whippet dogs training for sports

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem: prof. dr hab. Anny Cywińskiej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych

Promotor pomocniczy: dr Jacek Wilczak
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Nauk Fizjologicznych

Warszawa, 2024

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że, spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis promotora pracy

Oświadczenie autora pracy

Świadoma odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa.

Oświadczam, że przedstawiona praca nie była wcześniej podstawą procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną. Przyjmuję do wiadomości, że praca doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data Podpis autora pracy

Źródła finansowania

Opisane w poniższej pracy badania, zostały sfinansowane z następujących źródeł:

1. Dotacja podmiotowa z Ministerstwa Edukacji i Nauki na finansowanie w latach 2021-2023 kosztów związanych z utrzymaniem aparatury naukowo-badawczej/stanowiska badawczego pn.: „Pracownia Epidemiologii Weterynaryjnej”, Decyzja Nr 16/491568/SPUB/SP/2021, z 15.10.2021.
2. Grant 2021/05/X/NZ4/00771 przyznany przez Narodowe Centrum Nauki, kierownik projektu dr Karolina Barszcz.

Podziękowania

*Szczególne podziękowania składam prof. dr hab. Annie Cywińskiej, za opiekę naukową,
motywację i wsparcie oraz cierpliwość*

Dziękuję dr Jackowi Wilczakowi, za wszystkie cenne uwagi i pomoc

Dziękuję również wszystkim współautorom prac, a w szczególności

dr hab. Oldze Szaluś-Jordanow prof. SGGW,

prof. dr hab. Michałowi Czopowiczowi,

dr Agacie Moroz-Fik

i dr Aleksandrze Tomkowicz

Dziękuję moim bliskim, rodzinie i przyjaciołom, za wsparcie i miłość

Streszczenie

Tytuł pracy: Parametry przydatne w ocenie zmian powysiłkowych u psów rasy whippet w treningu sportowym.

Wraz ze wzrostem popularności psów rasy whippet w Polsce, rośnie liczba psów sportowych uprawiających wyczynowo wyścigi terenowe za wabikiem (ang. coursing). Do tej pory nie opracowano jednak metod oceny przygotowania treningowego psów trenujących tę dyscyplinę. Celem przeprowadzonych badań było określenie możliwości wykorzystania parametrów oznaczanych rutynowo u koni wyczynowych do oceny zmian powysiłkowych i postępów treningowych u whippetów trenujących coursing. Ponadto, poszukiwano nowych parametrów, które mogą być przydatne w ocenie wydolności i przystosowania whippetów do wysiłku. Badaniami objęto whippetów regularnie trenujące coursing oraz whippetów, nieuprawiające tego sportu. Podczas sesji treningowych, w których psy goniły wabik w linii prostej oraz po torze coursingowym, wykazano przydatność pomiaru stężenia kwasu mlekowego we krwi do oceny wytrenowania psów i intensywności wysiłku. Wykazano, że w obrazie morfologicznym krwi zachodzą podobne jak u ludzi i koni wyczynowych zamiany spowodowane wysiłkiem. Potwierdzono, że testy wysiłkowe oparte na zmianach we krwi stosowane u koni wyczynowych są odpowiednie również dla psów rasy whippet i mogą być interpretowane w ten sam sposób. Niektóre parametry, takie jak pomiar liczby uderzeń serca/minutę z użyciem stetoskopu okazały się nieprzydatne. Poszukując nowych parametrów, zmieniających się pod wpływem treningu, przeprowadzono analizę profilu metabolomicznego krwi psów trenujących i nietrenujących, która wykazała istotne różnice pomiędzy grupami, dotyczące przede wszystkim profilu triglicerydów, co może okazać się przydatne przy planowaniu i analizowaniu diety tych psów. Przeprowadzono również badanie okulistyczne psów trenujących, które pozwoliło określić rodzaj, częstość występowania chorób narządu wzroku. Zmiany okulistyczne nie miały jednak istotnego wpływu na osiągnięte przez psy wyniki podczas zawodów.

Słowa kluczowe: whippet, coursing, badania wysiłkowe, zmiany powysiłkowe, kwas mlekowy, metabolomika, zmiany okulistyczne

Summary

Title: Parameters useful in the assessment of exercise-related changes in Whippet dogs training for sports

With the increasing popularity of Whippet dogs in Poland, the number of dogs practicing coursing on professional level is growing. So far, no tests have been developed to evaluate the sport level of dogs practicing this discipline. The aim of the thesis was to determine the possibility of using parameters routinely measured in performance horses to assess the exercise-related changes and training progress in coursing Whippets. In addition, new parameters were searched for to be considered as useful in assessing the performance and adaptation of Whippets to exercise. The research included Whippets that regularly practiced coursing and Whippets that did not practice this sport. During a training session, when the dogs chased the lure in a straight line, as well as on a coursing track, the usefulness of measuring the concentration of lactic acid in the blood for assessing the dogs' training level and exercise intensity was demonstrated. It has been shown that hematological changes caused by exercise are similar to those observed in humans and performance horses. It has been proved that blood-based exercise tests designed for performance horses are suitable also for Whippets and can be interpreted the same way. Some parameters, such as measuring the number of heartbeats/minute using a stethoscope, turned out to be unhelpful. Searching for new parameters that change under the influence of training was based on the analysis of the blood metabolomic profile in training and non-training dogs. The analysis has shown significant differences between the groups, mainly regarding the triglyceride profile, which may prove useful when planning and analyzing the diet of these dogs. An ophthalmological examination of training dogs was also carried out, which allowed to determine the type and frequency of eye disorders. Ocular pathologies defined in training dogs did not significantly affect the dogs' results during competitions.

Key words: Whippet, lure-coursing, exercise tests, post-exercise changes, blood lactate, metabolomics, ophthalmology

Spis treści

Streszczenie.....	9
Summary.....	11
Wykaz skrótów.....	14
Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	15
1. Wstęp.....	17
1.1 Whippet - historia i charakterystyka rasy	17
1.2 Whippet - fizjologia i zdrowie	18
1.3 Terenowe wyścigi chartów - coursing: historia, zasady, sędziowanie i oceny, trening	19
1.4 Adaptacja treningowa i zmiany powysiłkowe	23
1.4.1 Źródła energii dla mięśni w czasie wysiłku	23
1.4.2 Kwas mlekowy (mleczan) jako wskaźnik poziomu wytrenowania	25
1.4.3 Zmiany w obrazie hematologicznym powodowane wysiłkiem.....	26
1.4.5. Zmiany metabolomiczne powodowane wysiłkiem.....	28
1.4.6. Testy wysiłkowe u ludzi i zwierząt.....	30
2. Cele pracy	32
3. Materiały i metody	33
4. Omówienie najważniejszych wyników i dyskusja.....	38
4.1. Ocena przydatności badań nieinwazyjnych w testach wysiłkowych u whippetów ...	38
4.2 Ocena przydatności parametrów hematologicznych oraz stężenia kwasu mlekowego w terenowych testach wysiłkowych u whippetów	39
4.3 Opracowanie terenowych testów wysiłkowych optymalnych dla whippetów.	41
4.4 Analiza wpływu treningu na profil metabolomiczny whippetów.....	43
4.5 Ocena przydatności badania okulistycznego do wykrycia patologii mających wpływ na przebieg treningu i osiągnięte wyniki sportowe.	45
6. Wnioski	47
7. Piśmiennictwo.....	48
8. Publikacje wchodzące w skład dysertacji i oświadczenia współautorów	57

Wykaz skrótów

ADP – adenozylo-5'-difosforan

ATP – adenozynotrifosforan

BARF (*biologically appropriate raw food/ bones and raw food*) – model żywienia zwierząt, oparty na surowym mięsie i kościach, uzupełnionych odpowiednimi dodatkami i suplementami

BOAS (*brachycephalic obstructive airway syndrome*) – syndrom ras brachycefalicznych

CK – kinaza keratynowa

ECVO (*European College of Veterinary Ophthalmologists*) – Europejskie Kolegium Okulistów Weterynaryjnych

FC (*fold change*) – bezwzględna wielokrotność zmian

FCI (*Fédération Cynologique Internationale*) – Międzynarodowa Federacja Kynologiczna

GGT – gamma-glutamyl-transferaza

HCT- hematokryt

HR (*heart rate*) – liczba uderzeń serca na minutę

IQR- przedział międzykwartyłowy

LA (*lactic acid*) – kwas mlekowy/mleczan

MCV (*mean corpuscular volume*) – średnia objętość krwinki czerwonej

MS – spektrometria mas

NMR – spektroskopia magnetyczna rezonansu jądrowego

P50 – ciśnienie parcjalne tlenu, przy którym hemoglobina wysycona jest tlenem w 50%

PRA (*progressive retinal atrophy*) – postępujący zanik siatkówki

RBC (*red blood cells*) - eryocyty

T3 - trijodotyronina

T4 – tetrajodotyronina/ tyroksyna

TG – triglicerydy

WBC (*white blood cells*)– leukocyty

VCO₂ – objętość wydychanego dwutlenku węgla

VD (*vitreous degeneration*) – zwyrodnienie ciała szklanego

VHS (*vertebral heart size*) – współczynnik pomiaru wielkości serca względem kręgów piersiowych

VO₂ – objętość wdychanego tlenu

VO_{2max} – pułap tlenowy

Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Badania zostały przedstawione w spójnym tematycznie zbiorze artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych i stanowią integralną część manuskryptu:

1. Exercise-induced Haematological and Blood Lactate Changes in Whippets Training for Lure Coursing. **Miazga K.**, Szaluś-Jordanow O., Czopowicz M., Żmigrodzka M., Witkowska-Piłaszewicz O., Moroz-Fik A., Mickiewicz M., Wilczak J., Cywińska A. J Vet Res. 2023; 67(1):139-146.
IF: 1.8 , punktacja MNiSW: 140
2. Metabolomic analysis indicated changes in triacylglycerols' levels as a result of training in Whippet dogs. **Miazga K.**, Kopczyńska K., Szaluś-Jordanow O., Moroz-Fik A., Wilczak J., Barszcz K, Cywińska A. Sci Rep. 2023; 13(1):18223
IF: 4.379, punktacja MNiSW: 140
3. Ocular abnormalities in Whippets practicing lure coursing in Poland. **Miazga K.**, Tomkowicz A., Wilczak J., Cywińska A. Pol J Vet Sci. 2024; 27(1) 5-12.
IF: 0.8, punktacja MNiSW: 100

Suma IF: 6,979

Suma punktów MNiSW: 380

Kopie powyższych publikacji wraz z oświadczeniami współautorów znajdują się w załączeniu.

1. Wstęp

1.1 Whippet - historia i charakterystyka rasy

Psy rasy whippet angielski należą do grupy chartów, grupa 10 wg Międzynarodowej Federacji Kynologicznej (FCI - *fr. Fédération Cynologique Internationale*). Ich historia zaczęła się w XIX wieku w Wielkiej Brytanii, a więc znacznie później niż innych przedstawicieli tej grupy, znanych już w starożytnym Egipcie i Cesarstwie Rzymskim. Rasa powstała na użytek brytyjskich górników i robotników, którzy potrzebowali szybkich i zwinnych psów myśliwskich, których ofiarami były głównie gryzonie i lisy. Idealne w tej sytuacji okazało się połączenie psów rasy greyhound z miejscowymi terierami. Uzyskano tym samym średnich rozmiarów psy, łączące atletyczność budowy i przystosowanie do biegu, jednocześnie tańsze w utrzymaniu od swoich większych kuzynów, którzy byli ponadto zarezerwowani dla elit i wyższych sfer. Stopniowo zaczęto wykorzystywać pierwsze whippetów nie tylko do pracy, ale i dla rozrywki, m.in. polowań na króliki na otwartych przestrzeniach, jak i na zamkniętym ringu. W XX wieku związki kynologiczne w kolejnych państwach zaczęły uznawać whippetów jako rasę i prezentować ją na swoich wystawach. Pierwszy miot whippetów w Polsce przyszedł na świat w 1967 roku, a obecnie nasz kraj uznawany jest za jednego z największych eksporterów szceniąt tej rasy na świecie.

Według międzynarodowego wzorca rasy FCI, chart angielski whippet reprezentuje harmonijne połączenie mocy mięśni z gracją oraz elegancją sylwetki. Ważne jest zachowanie odpowiednich proporcji, bez przejawów przesady w budowie ciała (Fot. 1 i 2). Charakteryzuje je niezbyt szeroki front, długi szeroki i zwarty grzbiet, bardzo pojemna klatka piersiowa, silne muskularne łądźwie i ogon zazwyczaj lekko zawinięty pod brzuchem, jedynie w ruchu zagięty ku górze, ale nigdy powyżej linii grzbietu. Reasumując, jest to rasa stworzona do szybkiego biegu i pracy polegającej na polowaniu na zwierzęta, głównie na otwartych przestrzeniach. Wzorcowa wysokość w kłębie to dla suk 44-47cm, a dla psów 47-51cm. Masa ciała nie jest określona w standardzie rasy, zazwyczaj waha się między 10 a 15 kg. Wzorzec dopuszcza wszelkie rodzaje umaszczenia, zarówno jednolite jak i barwne [<https://www.zkwp.pl/wzorcowe/162.pdf>].

Właściciele whippetów przypisują swoim psom „dwa oblicza”. Z jednej strony są to psy o sportowej sylwetce, stworzone do biegu, z drugiej są bardzo wrażliwe i delikatne, skore do głaskania i pieszczot. Sprawia to, że sprawdzają się jako psy rodzinne i dobrze odnajdują się nawet w niewielkim mieszkaniu, o ile zapewni im się odpowiednią ilość

aktywności fizycznej. Psy tej rasy osiągają dobre wyniki w dyscyplinach kynologicznych takich jak coursing, flyball czy dogfrisbee. Krótka sierść nie wymaga strzyżenia, jednak w połączeniu z małą ilością tkanki tłuszczowej, nie zapewnia utrzymania odpowiedniej temperatury ciała w zimnych porach roku.

Fot. 1 i 2. Portret whippetta oraz zdjęcie wykonane z boku, ukazujące cechy opisane w podrozdziale 1.1. Fot. Aleksandra Kotowska, udostępniono za zgodą autorki.



1.2 Whippety - fizjologia i zdrowie

Wśród cech fizjologicznych typowych dla chartów wyróżnić można wyższe wartości parametrów erytrogramu: liczbę erytrocytów oraz wartość hematokrytu, wyższe stężenia kreatyniny i troponiny, aktywności enzymów wątrobowych oraz wyższy współczynnik filtracji kłębuszkowej. Niższe natomiast są wartości parametrów takich jak liczba leukocytów, neutrofilii, płytek krwi oraz stężenia haptoglobiny, globulin oraz tetrajodotyroniny/tyroksyny (T4) i trijodotyroniny (T3) [Zaldívar-López i et al. 2011; Uhríková et al. 2013]. Ponadto u whippetów normy wymiarów rzutu serca w obrazie radiologicznym klatki piersiowej (wg. Buchmana), wyrażone odniesieniem do liczby kręgów piersiowych (VHS, *ang. -vertebral heart size*) są wyższe od norm wymiarów serca dla innych ras psów. Różnica ta wpływa na wartości charakteryzujące elementy zapisu

echokardiograficznego, które często wykraczają poza zakres uznawany za prawidłowy dla innych ras psów [Bavegems et al. 2007]. Głęboka klatka piersiowa i minimalna ilość tkanki tłuszczowej sprawia, że psy tej rasy wymagają szczególnej uwagi w przypadku znieczulenia. Ponadto opisuje się u nich upośledzone mechanizmy biotransformacji leków w wątrobie, co może prowadzić do wydłużenia czasu wybudzania po zastosowaniu leków takich jak barbiturany i tiobarbiturany [Bell et al. 2013].

Rasa ta uznawana jest za cieszącą się dobrym zdrowiem, a lista chorób dziedzicznych nie jest długa. Zalicza się do nich dysplazję stawów biodrowych, zwichnięcie rzepki, dysplazję stawów łokciowych oraz przerost mięśni szkieletowych. Inne, rzadziej spotykane choroby to m.in. alergiczne zapalenie skóry, zwyrodnienie ciała szklistego, zaćma, zwichnięcie soczewki [Bell et al. 2013].

1.3 Terenowe wyścigi chartów - coursing: historia, zasady, sędziowanie i oceny, trening

Historia

Charty wykorzystywano do polowań już w czasach starożytnych. Coursing jako specyficzna forma wyścigów terenowych rozwinął się w Anglii w XVIII wieku. Ze względu na szybkość i precyzję jaką wykazywały się charty, rozpoczęły się dyskusje o dobrostanie ich ofiar, które nie miały w konfrontacji z nimi praktycznie żadnych szans. Ponadto, podczas pościgu na otwartych przestrzeniach, psy bardzo często ulegały kontuzjom, np. po kontakcie z drucianymi ogrodzeniami wokół pastwisk. Dlatego też, chcąc dalej zachować ich wrodzony talent do pogoni, w latach 70-tych XX wieku, postanowiono żywą zwierzynę zamienić na sztuczny wabik (ang. *artificial lure*), a wyścigi przeprowadzać na bezpiecznym terenie. Obecnie w wielu krajach, w tym także w Polsce, polowanie z chartami jest zabronione, a dyscyplina, jaką jest coursing, została uznana przez wiele federacji kynologicznych na całym świecie.

Zasady

Do startów uprawione są wszystkie rasy psów z grupy 10 FCI, wśród których wyróżnia się:

1. Charty długowłose
2. Charty szorstkowłose
3. Charty krótkowłose
 - **Whippet**

Ponadto psy należące do grupy 5 FCI (pies faraona, cirneco dell'Etna, podenco z Ibizy i podenco kanaryjski) mogą zostać zgłoszone na zawody do konkretnych klas.

Zasady, m.in. dystans na jakim odbywają się zawody, liczba psów startujących w jednym biegu, różnią się dla poszczególnych, wyżej wymienionych ras. W przypadku whippetów minimalny wiek od jakiego pies może startować w zawodach to skończone 15 miesięcy, zaś górna granica wieku to 8 lat do końca danego sezonu wyścigowego. Ponadto pies musi być wpisany do księgi rodowodowej lub księgi wstępnej uznawanej przez FCI oraz posiadać ważną licencję wyścigową z adnotacją o klasie, w której startuje. Aby uzyskać licencję, pies musi odpowiednio się zaprezentować i otrzymać pozytywną ocenę podczas imprezy, na której przeprowadzane są biegi licencyjne. O licencję mogą starać się właściciele whippetów, które ukończyły 12 miesięcy. Najważniejszym kryterium ocenianym przez sędziów jest zainteresowanie wyłącznie wabikiem i brak jakiegokolwiek agresji względem innych startujących jednocześnie psów. W przypadku biegów licencyjnych, prędkość uzyskiwana przez psa nie jest oceniana. Szybkość jest jedną ze składowych oceny sędziowskiej dopiero podczas biegów na oficjalnych zawodach.

Zawody składają się z dwóch biegów – eliminacyjnego i finałowego. Przedstawiciele tej samej rasy biegają razem. Do biegu eliminacyjnego psy dobierane są w pary losowo, zaś w biegu finałowym biegną w myśl zasady „najlepszy z najlepszym”, bazując na wynikach uzyskanych podczas pierwszego biegu.

Idealnym terenem dla przeprowadzenia zawodów coursingowych są duże łąki lub lekko pagórkowate tereny i zbocza o niewielkim kącie nachylenia. Naturalne przeszkody takie jak drzewa i krzewy są dozwolone, jednak jedynie wtedy, gdy są dobrze widoczne i nie stwarzają zagrożenia dla psów. Podłoże nie może być kamieniste ani zbyt śliskie, a wysokość trawy nie może przekraczać 10 cm. Niezwykle istotne jest, aby linka, na której rozciągnięty jest wabik była solidnie przymocowana do podłoża i nie stwarzała niebezpieczeństwa dla rozpędzonych psów. Trasa biegu finałowego musi różnić się od tej dla biegu eliminacyjnego. W biegu startują dwa psy, które są wypuszczane z ręki przewodnika. Każdy pies ma na sobie specjalny i dopasowany czaprak, który nie może utrudniać mu poruszania się (Fot.3). Ponadto psy - zawodnicy startują w kagańcach, co pozwala uchronić wabik przed zniszczeniem na mecie oraz ustrzec przed urazami na wypadek niekontrolowanej agresji psów względem siebie. Ważne, żeby były one wykonane z bezpiecznego tworzywa (np. drut stalowy, plastik) i dobrze dopasowane do głowy psa [http://www.wyscigi.zkwp.pl/wp-content/uploads/2022/02/20220216_REGULAMIN-FCI-2022-ostaeczna-wersja-polska-z-word.pdf].

Fot. 3. Whippet w trakcie pogoni za wabikiem. Fot. Anna Tereszkievicz, udostępniono za zgodą autorki.



Sędziowanie i oceny

Ocena w zawodach coursingowych nie jest ilościowa a jakościowa (Tab. 1). Oznacza to, że tempo w jakim pokonany został tor oraz miejsce na mecie, choć istotne, nie gwarantują zwycięstwa w danym biegu. Sędziowie oceniają start psów na podstawie 5 kryteriów, mogąc za każde z nich przyznać maksymalnie 5 punktów, czyli łącznie 25 punktów. Psy wykazujące jakąkolwiek agresję zostają zdyskwalifikowane. Ujemne punkty przyznawane są za spóźnienie się na linię startu oraz za puszczenie psa przed sygnałem startowym od sędziego.

Tab. 1. Kryteria oceny psów podczas zawodów coursingowych.

Kryterium	Opis
Zręczność	Zwrotność psa powodowana ruchem wabika, pokonywanie przeszkód, zdolność do szybkiej zmiany kierunku podczas biegu, sposób dopadania wabika.
Szybkość	Tempo i wydajność pokonywania dystansu od momentu reakcji na pojawienie się wabika, pozycja przyjmowana podczas biegu.
Wytrzymałość	Zdolność do zachowania dobrej kondycji fizycznej do końca biegu, będąca składową sił fizycznych i psychicznych.
Podążanie za wabikiem (ang. <i>follow</i>)	Podążanie za wabikiem w sposób charakterystyczny dla rasy; podążanie za wabikiem przez cały bieg, z próbami podjęcia go w trakcie, energiczne próby pochwylenia wabika podczas pościgu, podążanie za wabikiem bez prób przewidywania w jakim kierunku będzie zmierzał
Zaciętość	Na starcie: koncentracja na wabiku Podczas biegu: Napieranie na wabik, pokonywanie przeszkód bez zawahania W fazie chwytania wabika: chwytanie w pełnej szybkości, rzucenie się na wabik wślizgiem, usiłowanie pochwylenia wabika nawet gdy ten został złapany wcześniej przez konkurenta.

Trening

Sposób w jaki przeprowadzane są treningi coursingowe nie jest uregulowany przez Związek Kynologiczny. Oznacza to, że właściciele psów sami decydują o tym w jakim wieku rozpocząć treningi i jak będą one przebiegały. Trening sportowy zaczyna się najczęściej po ukończeniu przez psa 6-ciu miesięcy. W Polsce istnieje kilka klubów zrzeszających psich zawodników i ich opiekunów. Wspólne treningi polegają najczęściej na pogoni za wabikiem w linii prostej lub po torze przypominającym trasę na zawodach, w

kilku powtórzeniach. Biegi takie przeprowadzane są na różnych podłożach (m.in. trawa, piach), co pozwala psom przygotować się na różnego rodzaju warunki. Bieg za wabikiem imitujący start w zawodach stanowi jednak jedynie niewielką część przygotowania do startów. Duża uwaga przykładana jest do prawidłowego przygotowania fizycznego psów. Odpowiednio zaplanowana i przeprowadzona rozgrzewka oraz uspokojenie i rozluźnienie (cool-down) po biegu pozwalają uniknąć kontuzji i zadbać o zdrowie, co pozwala na dłuższą i bardziej owocną karierę sportową. Ponieważ whippetów – zawodnicy/sportowcy pozostają jednocześnie domowymi pupilami swoich właścicieli, w przeciwieństwie np. do greyhoundów startujących w wyścigach torowych, duża część pracy nad kondycją i przygotowaniem do startów prowadzona jest przez właścicieli w domu. Ponadto, dla wielu whippetów coursing to nie jedyna dyscyplina sportu jaką uprawiają, często idzie ona w parze z flyball'em czy dog frisbee.

1.4 Adaptacja treningowa i zmiany powysiłkowe

1.4.1 Źródła energii dla mięśni w czasie wysiłku

Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje włókien mięśniowych budujących mięśnie poprzecznie prążkowane – typ I czyli włókna wolno kurczliwe (białe) i typ II, czyli szybko kurczliwe (czerwone). Kolory odpowiadają zawartości miozyny nadającej czerwone zabarwienie, której zawartość w poszczególnych rodzajach włókien jest różna. Wśród włókien szybkościowych wyodrębnia się dwa podtypy – IIa (tlenowo-glikolityczne) i IIb (beztlenowe). U psów wyróżniono ponadto jeszcze jeden typ włókien szybko kurczliwych, nazywany „type II dog” lub „type II x”, który swoją charakterystyką najbardziej przypomina włókna typu IIb [Lattore et al. 1993; Toniolo et al. 2007; van Boom et al. 2023]. Poszczególne typy włókien wykazują różną odporność na zmęczenie, którą można scharakteryzować w następujący sposób $IIx < IIb < IIa < I$ [Lattore et al. 1993; Acevedo i Riverio 2006]. Proporcja typów włókien różni się zarówno dla poszczególnych grup mięśni jak i pomiędzy poszczególnymi osobnikami, w zależności od trybu życia lub w przypadku sportowców, charakterystyki uprawianej dyscypliny. U osobników trenujących sporty szybkościowe (np. sprint, biegi krótkodystansowe) przeważają włókna szybko kurczliwe (białe), zaś w sportach wytrzymałościowych lub długodystansowych (np. biegi długodystansowe) przeważają włókna wolno kurczliwe (czerwone) [Toniolo et al. 2007].

Źródłem energii dla kurczących się mięśni jest rozpad cząsteczki adenozynotrifosforanu (ATP). Niewielka ilość tego substratu zgromadzona jest w mięśniach

i wystarcza na około 2 sekundy wysiłku. Kolejnym, również magazynowanym w mięśniach, związkem wysokoenergetycznym jest fosfokreatyna, której rozpad dostarcza ATP na kolejne 10-15 sekund pracy mięśni [Barclay 2017]. Po tym czasie, aktywowane są kolejne reakcje mające na celu zapewnienie odpowiedniej ilości ATP dla dalszej pracy włókien mięśniowych. Pierwszą zachodzącą reakcją jest glikoliza beztlenowa dla której głównym substratem jest glikogen, polisacharyd zbudowany z glukozy. Dzięki rozpadowi glikogenu przy udziale adenozyno-5'-difosforanu (ADP) powstają 3 cząsteczki ATP i 2 cząsteczki mleczanu. Beztlenowe uzyskiwanie energii dla mięśni trwa przez około 60 sekund ich pracy. Potem uruchamiany zostaje proces tlenowy, jakim jest fosforylacja oksydacyjna. Substratem dla tego procesu nie jest już glikogen, a glukoza, która zmagazynowana jest w mięśniach, wątrobie lub jest wchłaniana w jelitach z treści pokarmowej. W przypadku dłuższego trwającego wysiłku (od kilku minut do godzin), drugim po glukozie substratem stają się również tłuszcze, przede wszystkim triglicerydy z tkanki mięśniowej lub zmagazynowane w tkance tłuszczowej. Procesy fosforylacji oksydacyjnej są znacznie wydajniejsze niż glikoliza, gdyż z jednej cząsteczki glukozy powstaje 36 cząsteczek ATP, zaś z jednej cząsteczki palmitynianu powstaje ich aż 120 [Hargreaves 2020; Rabinowitz i Enerbäck 2020]. Procesy tlenowe wymagają jednak więcej czasu, dlatego nie mogą być jedynym źródłem energii, gdy potrzebna jest szybka i intensywna aktywność mięśni.

Utlenianie węglowodanów, szczególnie glikogenu mięśniowego, dominuje przy wyższych intensywnościach ćwiczeń, podczas gdy utlenianie tłuszczów jest ważniejsze przy wysiłku o niższych intensywnościach. Utlenianie glikogenu mięśniowego i kwasów tłuszczowych pochodzących z zapasów zgromadzonych w mięśniach jest największe na wczesnych etapach ćwiczeń i zmniejsza się wraz z wydłużaniem czasu trwania wysiłku, zbiegając się z postępującym wzrostem wychwytu i utleniania glukozy i kwasów tłuszczowych w mięśniach. Wzrostowi wychwytu glukozy przez mięśnie towarzyszy zwiększenie produkcji glukozy w wątrobie zarówno w wyniku glukoneogenezy jak i glikogenolizy. Przy długotrwałym wysiłku, produkcja glukozy w wątrobie może nie nadążać za wychwytem glukozy przez mięśnie, powodując w ten sposób hipoglikemię. Zapobiec jej można poprzez przyjmowanie węglowodanów, najlepiej łatwo przyswajalnych, co pozwala szybko uzupełnić niedobory glukozy [Evans et al. 2019; Hargreaves et al. 2020; Rabinowitz i Enerbäck 2020].

1.4.2 Kwas mlekowy (mleczan) jako wskaźnik poziomu wytrenowania

Kwas mlekowy jest obok ATP jednym z produktów glikolizy zachodzącej w pracujących mięśniach poprzecznie prążkowanych, ale też w komórkach mięśnia sercowego i mózgu. Występuje w postaci dwóch izomerów, które powstają z pirogronianu w wyniku beztlenowego metabolizmu glukozy, przy udziale specyficznej dehydrogenazy mleczanowej. Cząsteczki kwasu mlekowego w fizjologicznym pH krwi dysocjują do zasad anionowych (mleczanów) i protonów. Dlatego też w literaturze spotkać się można z dwoma terminami stosowanymi zamiennie – kwas mlekowy lub mleczan (LA). Dzięki wytwarzaniu kwasu mlekowego mięsień może chwilowo osiągnąć moc przekraczającą maksymalną wydajność układu krążenia lub układu oddechowego, jednak gromadzenie się tego związku szybko zmusza do przerwania wysiłku, gdyż ulega on chwilowej kumulacji w tkance mięśniowej, prowadząc do zmiany pH otoczenia na kwaśne, co odbierane jest przez organizm jako ból i zmęczenie [Li et al. 2022]. Stopniowo większość kwasu mlekowego transportowana jest z krwią do wątroby, gdzie wchodzi w cykl Krebsa lub wykorzystywana jest w procesie glukoneogenezy (cykl Cori). Powstała w ten sposób glukoza może ponownie zostać przetransportowana do mięśni i być wykorzystana do zachodzących tam procesów energetycznych. Pozostała część mleczanu (około 20-30%) wydalana jest przez nerki. W zdrowym organizmie, po 2 godzinach od zakończenia wysiłku, powstały kwas mlekowy nie powinien już znajdować się w mięśniach. Tak zwane „zakwasy” czyli ból mięśni kolejnego dnia po wysiłku są mylnie kojarzone z kwasem mlekowym. To nie on odpowiada za uczucie dyskomfortu, a mikro urazy włókien mięśniowych i powstały wokół nich miejscowy stan zapalny tkanek po wysiłku [Goodwin et al. 2007; Rabinowitz i Enerbäck 2020].

Określenie stężenia mleczanów we krwi używane jest w medycynie i medycynie weterynaryjnej do stwierdzenia lub wykluczenia stanu kwasicy mleczanowej, której najczęstszą przyczyną jest zmniejszona podaż tlenu do komórek na skutek działania różnych czynników powodujących hipoksję. Za prawidłowe wartości stężenia mleczanu we krwi zdrowych klinicznie psów uznaje się w wartości w zakresie 0,3-2,5 mmol/l. W przypadku stężenia w granicach 3-5 mmol/l nasilenie hipoperfuzji, czyli zmniejszenie przepływu krwi przez tkanki, określa się jako łagodne, 5-7mmol/l jako średnie zaś >7 mmol/l jako stan ciężki. Do określenia stężenia mleczanów posłużyć może krew jak i płyny ustrojowe. Interpretacja uzyskanego wyniku zależy od rodzaju badanego płynu i gatunku zwierzęcia [Kalwas et al. 2011].

Stężenie kwasu mlekowego jest szeroko wykorzystywane do określenia stopnia wytrenowania w wystandaryzowanych procedurach, określanych jako testy wysiłkowe

[Svedahl i MacIntosh 2003; Beneke et al. 2011]. Badania przeprowadzone z udziałem bardzo licznych grup ludzi - sportowców wykazały, że u większości z nich próg przemian beztlenowych pojawia się przy obciążeniu odpowiadającym stężeniu 4 mmol/l kwasu mlekowego we krwi. Chociaż wiadomo, że wartości progu przemian beztlenowych są zróżnicowane indywidualnie, to jednak najczęściej przyjmuje się wartość progu mleczanowego/beztlenowego wynosi 4 mmol/l. [Svedahl i MacIntosh 2003; Poole et al. 2021]. Po przekroczeniu progu mleczanowego, kwas mlekowy zaczyna się gromadzić we krwi, a jego stężenie szybko wzrasta. Okazuje się, że intensywność wysiłku, przy której następuje wzrost stężenia mleczanu we krwi do poziomu 4 mmol/l (intensywność progowa), ulega istotnym zmianom pod wpływem treningu wytrzymałościowego [Ghosh 2004]. Moment w jakim stężenie mleczanu osiąga wartości progowe, przesuwają się w czasie wraz ze wzrostem poziomu wytrenowania zawodnika. Oznacza to, że im organizm lepiej jest przygotowany do wysiłku, tym później stężenie mleczanu w jego krwi osiągnie wartość progową. Monitorowanie stężenia mleczanu po zakończonym wysiłku pozwala określić zdolności regeneracyjne organizmu i szybkość powrotu do równowagi (homeostazy) [Goodwin et al. 2007].

Badania wydolnościowe oparte na pomiarach stężenia kwasu mlekowego są wykonywane nie tylko u ludzi, ale też u zwierząt. Najdokładniej przebadanym w tym zakresie gatunkiem są konie wyczynowe. Mnogość konkurencji jeździeckich oraz rozmiar zwierząt będących obiektem badań pozwala na uzyskanie dużej ilości materiału i przeprowadzenie wielu doświadczeń. Pozwoliło to na opracowanie różnych schematów badania wysiłkowego odpowiednich dla rodzaju wysiłku w zależności od uprawianej konkurencji [Jawor et al. 2007; Piccione et al. 2010]. U psów, kwas mlekowy również wykorzystywany jest do określenia poziomu wytrenowania i szybkości regeneracji dla różnych rodzajów wysiłku fizycznego. Badanie to wykorzystuje się u ras psów takich jak labrador retriever, greyhound, border collie, jack russel terier i pudel miniaturowy [Ferasin i Marcora 2009; Baltzer et al. 2012; Pellegrino et al. 2018], jednak dotychczas badania w tym zakresie nie były prowadzone u whippetów.

1.4.3 Zmiany w obrazie hematologicznym powodowane wysiłkiem

Wysiłek wywołuje w organizmie szereg zmian mających umożliwić organizmowi właściwą, optymalną reakcję. Przebieg i nasilenie tych zmian zależne są od wielu zmiennych, takich jak rodzaj wysiłku, czas jego trwania, intensywność oraz stopień wytrenowania danego osobnika. W weterynarii szczególne znaczenie ma znaczna

różnorodność gatunkowa, rasowa i osobnicza. Zmiany w obrazie hematologicznym mają dwójaki charakter – zmiany adaptacyjne wtórne do regularnego treningu, stwierdzone w spoczynku oraz istotne zmiany wywołane konkretnym rodzajem wysiłku, możliwe do określenia w niedługim czasie po jego zakończeniu.

Wzrost wartości parametrów czerwonych krwinek takich jak liczba erytrocytów (RBC), hematokryt (HCT), stężenie hemoglobiny (HGB) jest stwierdzany niezależnie od gatunku. Przyczyną tego zjawiska jest intensyfikacja pracy mięśni, a co za tym idzie, zwiększenie ich zapotrzebowania na tlen. Hipoksja prowadzi do skurczu śledziony i wyrzutu zmagazynowanej w niej puli erytrocytów do krwioobiegu. Zjawisko to opisywane jest między innymi u ludzi, koni, psów i ssaków morskich [Hsia et al. 2017]. Zwiększona liczba czerwonych krwinek bogatych w wiążącą tlen hemoglobinę, pozwala na dostarczenie większej ilości tlenu do kurczących się mięśni. W przypadku osobników trenujących regularnie bądź wyczynowo, już spoczynkowe wartości parametrów czerwonych krwinek są wyższe niż u osobników nietrenujących. Jest to związane ze zwiększoną aktywnością erytropoetyny, która stymuluje erythropoezę w szpiku kostnym [Mairbäurl 2013]. Ponadto, u niektórych sportowców obserwuje się powiększenie śledziony w spoczynku [Holmström et al. 2021].

Warto zwrócić uwagę na wspomniane wcześniej (rozdział 1.2) różnice pomiędzy chartami i innymi rasami psów, dotyczące wartości parametrów czerwonych krwinek. Wartości parametrów erytrogramu w spoczynku u tych psów, nawet jeśli nie uprawiają regularnie żadnego sportu, są i tak wyższe niż u przedstawicieli innych ras [Uhríková et al. 2013]. Odpowiada to niższym wartościom P50, czyli ciśnienia parcjalnego tlenu, przy którym hemoglobina wysyciona jest nim w 50%. Oznacza to, że hemoglobina ma większe powinowactwo do tlenu niż u psów innych ras. Ponadto czas życia erytrocytów jest u chartów krótszy w porównaniu z innymi psami, co jest spójne z wynikami badań u ludzi - zawodowych sportowców, których erytrocyty żyją około 70, podczas gdy u mniej aktywnych ludzi żyją średnio 120 dni. Dodatkowo, u greyhoundów opisuje się naturalnie większą śledzionę [Zaldívar-López et al. 2011]. Trudno więc nie zgodzić się ze stwierdzeniem, że charty to urodzeni sportowcy, którzy są naturalnie wyposażeni w narzędzia i mechanizmy pozwalające na dużą aktywność fizyczną.

Liczba leukocytów (WBC) również rośnie po wysiłku, z nasileniem częściowo zależnym od jego rodzaju. Jest to związane z wyrzutem adrenaliny i lub/kortyzolu, który uwalnia marginalną pulę białych krwinek do puli krążącej [Sand et al. 2013].

1.4.5. Zmiany metabolomiczne powodowane wysiłkiem

Metabolomika to dziedzina nauki zajmująca się analizą metabolitów, czyli związków o masie cząsteczkowej <1500 Daltonów, w komórkach i tkankach. Jej głównym celem jest identyfikacja i analiza zmian ilościowych metabolitów pierwotnych i wtórnych. Pozwala to na zrozumienie mechanizmów i określenie przebiegu procesów na poziomie pojedynczych komórek oraz całego organizmu na podstawie badania markerów chemicznych, powstających podczas różnych procesów w komórkach. Do badania metabolomu wykorzystywane są dwie metody analityczne – spektrometria mas (MS) lub spektroskopia magnetyczna rezonansu jądrowego (NMR). Do analizy metabolomicznej mogą służyć między innymi surowica, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, a także tkanki po odpowiednim przygotowaniu. Metabolomika będąca stosunkową młodą dziedziną nauki, dynamicznie się rozwija. Wykorzystywana jest w wielu dziedzinach nauki, w tym w żywieniu, diagnostyce klinicznej, tworzeniu leków i badaniu ich skuteczności.

Pozwala identyfikować nieznane do tej pory mechanizmy molekularne i lepiej rozumieć patofizjologię chorób. Jest również przydatnym narzędziem do dokładniejszego diagnozowania stanów patologicznych i oceny skuteczności leczenia, przyczyniając się w ten sposób do poprawy zdrowia i dobrostanu ludzi oraz zwierząt [Clish 2015; Johnson et al. 2016; Aderemi et al. 2021]. Dzięki rozwojowi metabolomiki rozwijać zaczęła się tzw. medycyna spersonalizowana, polegająca na analizie metabolomu konkretnego pacjenta i na tej podstawie dobierania najskuteczniejszych metod terapii. W przypadku medycyny weterynaryjnej, przeprowadzone do tej pory badania metabolomiczne skupiają się głównie na określeniu profilu metabolomicznego w konkretnych jednostkach chorobowych lub znalezieniu markerów metabolomicznych pozwalających na diagnostykę chorób takich jak nowotwory, cukrzyca, otyłość, dysbioza jelitowa i inne [Carlos et al. 2020].

Badanie metabolomu znajduje coraz szersze zastosowanie w analizie zmian zachodzących w organizmie również na skutek wysiłku fizycznego. Powstałe w związku z tym pojęcie „sportomika” (ang. *sportomics*) oznacza zastosowanie nowych dziedzin, tzw. „-omicznych” tj. metabolomika, proteomika, transkryptomika i genomika, w połączeniu z szeroko do tej pory stosowanymi metodami analitycznymi [Bongiovanni et al. 2019]. Analiza może mieć charakter ukierunkowany (ang. *targeted analysis*) lub nieukierunkowany (ang. *untargeted analysis*). Analizy ukierunkowane służą do wykrywania metabolitów związanych z konkretnymi procesami i szlakami biologicznymi będącymi obiektem zainteresowania. Metabolomika nieukierunkowana, inaczej zwana odkrywczą, wykorzystuje szeroką gamę technik zbierania danych analitycznych i pomiarów. Pozwala

więc odkryć nowe metabolity lub zmiany stężeń metabolitów w różnych stanach, np. konkretnych jednostkach chorobowych, a w przypadku sportowców, rodzajach wysiłku fizycznego. W kontekście wysiłku fizycznego badano dotychczas biomarkery stresu oksydacyjnego, stan uszkodzenia mięśni czy deficyt energetyczny. Uzyskanym u ludzi wynikiom przypisuje się znaczenie w opracowaniu metod zapobiegania kontuzjom i poprawienia osiągniętych przez sportowców wyników. Pozwalają również dokładniej monitorować wpływ różnych czynników, np. diety, na osiągnięcia sportowe. Jest to bardzo dobre narzędzie uzupełniające wykorzystywane do tej pory tradycyjne metody badawcze, a w przyszłości może być wykorzystane do oceny potencjału sportowca, określenia podatności danego organizmu na obrażenia, a nawet do określenia predyspozycji danej osoby/zwierzęcia do rodzaju wysiłku fizycznego, a nawet konkretnej dyscypliny sportu [Bongiovanni et al. 2019; Kelly et al. 2020].

Opisywane zmiany zachodzące w metabolomie na skutek wysiłku fizycznego zależą od wielu zmiennych, takich jak rodzaj wysiłku, jego czas trwania, intensywność oraz od cech badanej grupy. Prowadzone dotychczas badania dotyczyły głównie ludzi, zarówno zawodowych sportowców, jak i osób uprawiających sport sporadycznie. W doświadczeniach prowadzonych u osób zdrowych uprawiających sport wyróżnia się trzy kategorie. Pierwsza z nich, to określenie jakie zmiany metabolomiczne zachodzą na skutek różnych form wysiłku, np. biegania, pływania czy treningu siłowego. Zauważalne zmiany dotyczyły związków należących do następujących grup i szlaków metabolicznych: tlenki amin, aminokwasy, węglowodany, lipidy, nukleotydy, ksenobiotyki, witaminy i kofaktory, związki należące do szlaków energetycznych [Chorell et al. 2012; Kelly et al. 2020]. Druga kategoria to porównanie osób regularnie uprawiających sport i osób prowadzących spokojny, siedzący tryb życia. Najwięcej zmian obserwowano tu w grupie związków lipidowych [Kelly et al. 2020]. Ostatnia kategoria to porównanie zawodowych sportowców uprawiających różne dyscypliny sportu, w tej grupie najistotniejsze różnice dotyczyły aminokwasów, ksenobiotyków i lipidów [Al-Khelaifi et al. 2018].

Metabolomika w weterynarii jest dziedziną stosunkowo nową, do tej pory opisanych zostało niewiele badań nad wpływem wysiłku na metabolom zwierząt. Dotychczas badania nad wpływem wysiłku na profil metabolomiczny prowadzono u koni, a ich wyniki przyczyniają się do lepszego zrozumienia zmian związanych z treningiem u tego gatunku [Klein et al. 2021]. Zdecydowana większość doświadczeń prowadzonych u psów, skupia się na określeniu nowych markerów przydatnych w jak najwcześniejszym wykrywaniu

rożnych jednostek chorobowych [Carlos et al. 2020]. U psów trenujących nie prowadzono dotychczas żadnych badań metabolomicznych.

1.4.6. Testy wysiłkowe u ludzi i zwierząt

Istnieje wiele rodzajów testów wysiłkowych przeznaczonych dla ludzi. Wykonywane są zarówno u sportowców, celem określenia ich wydolności i poziomu wytrenowania, jak i u osób chorych lub podejrzewanych o choroby, najczęściej układu oddechowego i krwionośnego [Weismann i Zeballos 2001]. Testy można podzielić na dwie główne kategorie – testy stacjonarne i testy terenowe. Testy stacjonarne lub inaczej kliniczne, odbywają się w pomieszczeniu, a badana osoba podejmuje aktywność na bieżni, rowerze stacjonarnym lub ergometrze. W czasie takiego badania istnieje możliwość badania wielu parametrów, między innymi: wydolności, wyrażonej jako moc (w watach według układu SI), tętna, zapisu EKG, ciśnienia krwi, objętości pobieranego tlenu (VO_2), pułapu tlenowego (VO_{2max}), objętości wydychanego dwutlenku węgla (VCO_2), liczby oddechów na minutę czy współczynnika oddechowego (RQ) [Löllgen i Leyk 2018]. Możliwość śledzenia tak licznych parametrów wiąże się z koniecznością wykorzystania specjalistycznego sprzętu i umieszczeniu wielu rodzajów czujników na badanej osobie. Dodatkowym, wymagającym próbki krwi parametrem mierzonym zarówno podczas klinicznych testów wysiłkowych jak i testów wydolnościowych sportowców, jest stężenie mleczanu we krwi. Moment wysiłku, powyżej którego przekroczony zostaje próg mleczanowy jest lepszym wskaźnikiem wydolności, niż wartość pułapu tlenowego i lepszym wskaźnikiem poziomu intensywności wysiłku dla organizmu, niż pomiar tętna [Goodwin et al., 2007]. Testy terenowe są najczęściej przeprowadzane u zawodowych sportowców, a ich przebieg oraz badane zmienne uzależnione są od charakterystyki dyscypliny [Anderson et al. 2014; Kowalska et al. 2019].

Testy wysiłkowe prowadzane u koni również mają charakter stacjonarny lub terenowy. Badania stacjonarne przeprowadzane są na specjalnie przystosowanej dla koni bieżni. Zwierzęta, zanim zostaną poddane badaniu, muszą być stopniowo oswojone z bieżnią, nauczyć się poruszania się na niej w różnych chodach oraz z podłączonym sprzętem monitorującym parametry zmieniające się podczas wysiłku. W takich warunkach, przy odpowiednim przygotowaniu konia do badania, istnieje możliwość zbadania licznych zmiennych, tak jak u ludzi podczas badań na rowerze stacjonarnym, ergometrze czy bieżni. Warunki badania są bardziej stabilne niż w badaniach terenowych, gdzie wpływ na ich przebieg ma więcej zmiennych, m.in. podłoże, jeździec czy warunki pogodowe [Muunsters

et al. 2014; de Maré et al. 2017]. Badania stacjonarne przeprowadzane są najczęściej w celach naukowych, ze względu na koszty bieżni, czas jaki należy poświęcić na przygotowanie konia do badania oraz ryzyko ewentualnego wypadku podczas przeprowadzania badania [Franklin et al. 2010]. W związku tym, w medycynie sportowej koni, częściej przeprowadzane są testy terenowe. Są one oczywiście dostosowane do rodzaju wysiłku, np. skoków przez przeszkody, wyścigów czy ujeżdżenia. Do parametrów najczęściej monitorowanych w czasie terenowych prób wysiłkowych zaliczyć można prędkość z jaką pokonywany jest konkretny dystans, pułap tlenowy, tętno, stężenie mleczanu, zapis EKG oraz parametry morfologiczne i biochemiczne krwi [Allen et al. 2016]. Możliwa do przeprowadzenia jest również ocena pracy górnych dróg oddechowych, polegająca na wprowadzeniu końcówki endoskopu przez nozdrza w okolice gardła. Pozwala to na obserwację pracy krtani i nagłośni podczas aktywności fizycznej [de Mare et al. 2017].

Badania wysiłkowe opisane u psów również odbywały się w warunkach zamkniętych, przy użyciu bieżni lub w terenie. Badanych jest jednak znacznie mniej parametrów niż w przypadku ludzi i koni i są to najczęściej: tętno, temperatura ciała, stężenie glukozy i mleczanu w krwi oraz parametry morfologiczne krwi. Dotychczas opisano badania u m.in. u psów policyjnych różnych ras (owczarki niemieckie i belgijskie), nieuprawiających sportów psów rasy beagle oraz psów ras brachycefalicznych [Alves et al. 2012; Piccione et al. 2012; Riggs et al. 2018; Söderlund et al. 2023; Türkcü et al. 2023]. W przypadku psów, istotna jest duża różnorodność ras, a co za tym idzie również rozmiarów i budowy, co może przysporzyć trudności w przeprowadzeniu badania na bieżni. Testy wysiłkowe wykorzystywane są również do badań nad konkretnymi jednostkami chorobowymi i do monitorowania lub wykrywania u ras predysponowanych do ich wystąpienia. Przykładem może być monitorowanie pracy serca przy użyciu aparatu Holter, u psów rasy bokser biegających po schodach. Test ten był użyty do zbadania częstości występowania kardiomiopatii arytmogenicznej u przedstawicieli tej rasy [Agarwal et al. 2022]. Inny przykład to obserwacja występowania i nasilenia objawów w syndromie ras brachycefalicznych (ang. BOAS- brachycephalic obstructive airway syndrome) u psów takich ras jak mopsy, buldogi francuskie i buldogi angielskie [Riggs et al. 2018; Türkcü et al. 2023]. W nielicznych badaniach dotyczących stopnia wytrenowania uwzględniono dotychczas m.in. owczarki niemieckie, owczarki belgijskie, doberman, greyhoundy, labradory i beagle, a najistotniejszymi parametrami przydatnymi do oceny zmian powysiłkowych okazały się parametry czerwonokrwinkowe (RBC i HCT) i stężenie mleczanu we krwi [Alves et al. 2012; Piccione et al. 2012; Pellegrino et al. 2018; Söderlund et al. 2023].

2. Cele pracy

W związku z brakiem danych na temat zmian wywołanych wysiłkiem u rasy whippet angielski oraz sygnalizowaniem przez właścicieli potrzeby opracowania testów wysiłkowych przeznaczonych dla tej rasy, celem pracy było zbadanie wpływu wysiłku na wartości parametrów możliwych do oceny w badaniach o małej inwazyjności oraz próba opracowania schematu terenowego testu wysiłkowego dla psów rasy whippet. Ponadto, biorąc pod uwagę specyfikę dyscypliny coursing poszukiwano nowych parametrów, które mogą być przydatne do oceny trenujących psów.

Szczegółowe cele badań:

1. Ocena przydatności badań nieinwazyjnych (zmiany wartości tętna, prędkość pokonywania odcinków) w terenowych testach wysiłkowych u whippetów.
2. Ocena przydatności parametrów hematologicznych oraz stężeń kwasu mlekowego w terenowych testach wysiłkowych u whippetów.
3. Opracowanie optymalnego schematu terenowych testów wysiłkowych dla whippetów.
4. Analiza wpływu treningu na profil metabolomiczny whippetów.
5. Ocena przydatności badania okulistycznego do wykrycia patologii mających wpływ na przebieg treningu i osiągnięte wyniki sportowe.

3. Materiały i metody

Badane psy

Badaniami objęto 70 psów rasy whippet angielski. Przed przystąpieniem do badania właściciele psów wypełniali ankietę dotyczącą ich whippetów, modelu żywienia oraz programu treningowego jaki stosują (Ryc. 1).

51 psów trenowało regularnie coursing, a 19 badanych psów nie uprawiało tej dyscypliny (Tab. 2). Wszystkie psy pochodziły z hodowli FCI, krajowych i zagranicznych i były zarejestrowane w Związku Kynologicznym w Polsce. W trakcie przeprowadzanych badań wszystkie zwierzęta były zdrowe, a właściciele wyrażali dobrowolnie zgodę na udział ich psów w badaniu.

Ryc.1. Ankieta dla właścicieli whippetów trenujących coursing, biorących udział w badaniach.



Badanie whippetów SGGW

ANKIETA

Imię i nazwisko właściciela:

Adres e-mail:

Rodowodowe imię psa:

Nazwa hodowli:

„Linia hodowlana”:

wystawowa

hodowlana

Płeć:

pies

suka

Kastracja:

tak

nie

Wiek:

Masa ciała:

Od kiedy pies jest w treningu:

Intensywność treningu:

2x w tygodniu

3x w tygodniu

4x w tygodniu

Inny schemat:

Uprawiane dyscypliny:

coursing wyścigi torowe flyball frisbee

inne:

Opisz krótko treningi (dystans, ilość sprintów itp.):

Opisz krótko przebieg rozgrzewki przed biegiem:

Data ostatniego badania krwi:

Kontuzje przez ostatnie pół roku:

Przyjmowane leki przez ostatnie 2 tygodnie:

Czy pies przyjmuje hormony tarczycy?

nie tak

Jeśli tak, to jaki preparat i w jakiej dawce:

Czy pies przyjmuje suplementy diety?

nie tak

Jeśli tak, to jakie:

Na jakiej diecie jest pies?

Karma sucha karma mokra karma mieszana

BARF Inna

Jeśli inna, to jaka?

Tab. 2. Charakterystyka whippetów biorących udział w badaniach.

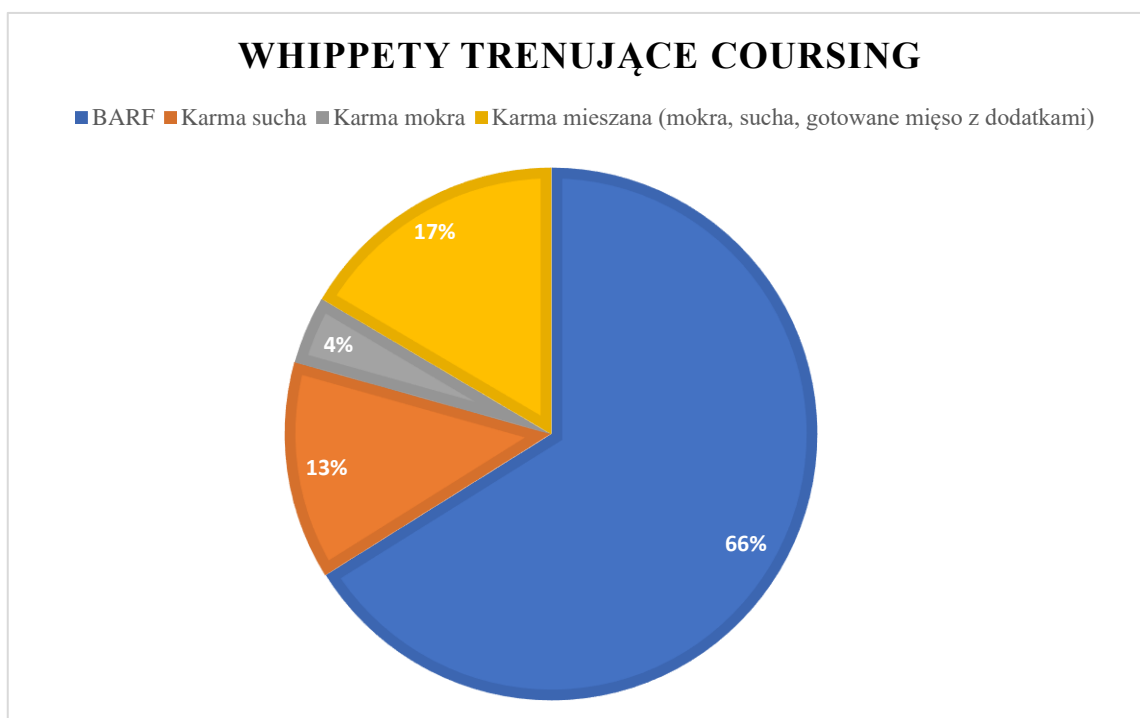
CECHA	WHIPPETY TRENUJĄCE (n-51)		WHIPPETY NIETRENUJĄCE (n-19)	
	Płeć	M – 63%		M – 58%
	MEDIANA (IQR)	ZAKRES	MEDIANA (IQR)	ZAKRES
Wiek [lata]	1.7 (1.4-5)	0.9 – 11	3 (2-3.9)	0.9-7.5

n – ilość psów; M – pies; F- suka; IQR- przedział międzykwartylowy

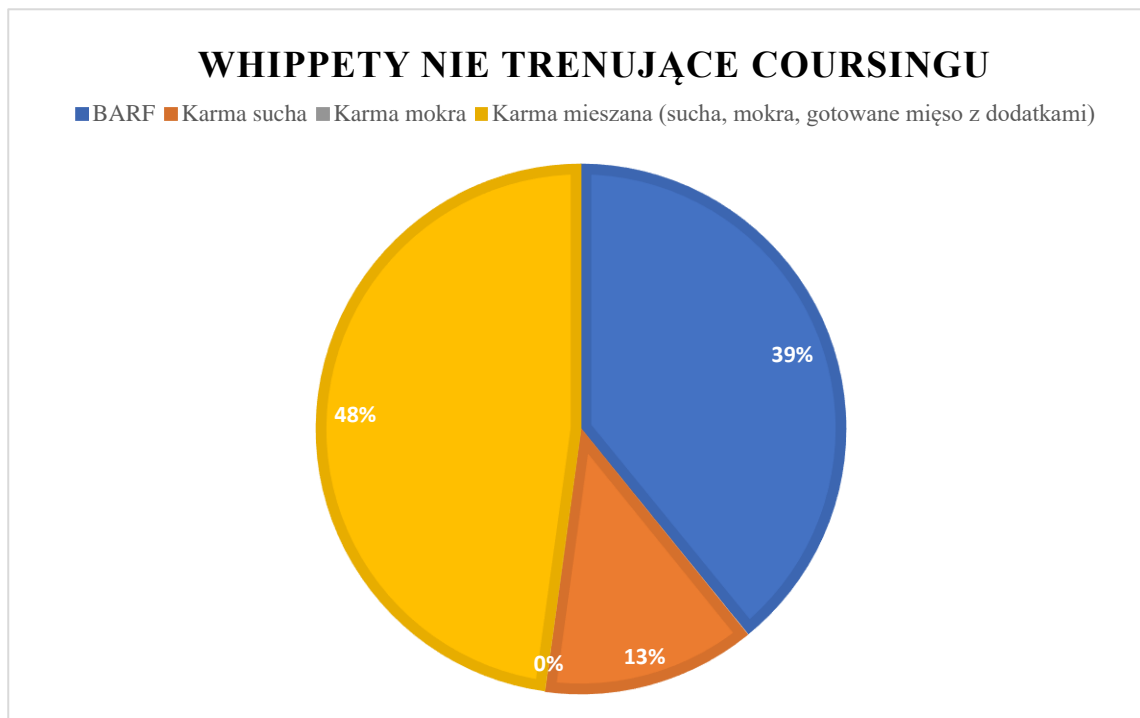
Żywnienie

Nie istnieją jednoznaczne wytyczne dotyczące żywienia psów trenujących coursing. Każdy z psów mieszkał na stałe ze swoimi właścicielami, co wiązało się z wyraźnymi różnicami w diecie. Inaczej jest w przypadku greyhoundów utrzymywanych do biegów torowych. Takie psy żyją w boksach, podobnie jak konie wyścigowe i ich żywienie i sposób utrzymania jest znacznie bardziej ujednolicony. W ankietach wypełnianych przez właścicieli (Ryc. 1) w podpunkcie o żywieniu, poproszono o zaznaczenie jednej z czterech odpowiedzi: BARF (*ang. Biologically Appropriate Raw Food* lub *Bones and Raw Food*), karma sucha, karma mokra lub karma mieszana (mokra, sucha, gotowana). BARF to cieszący się w ostatnich latach dużą popularnością model żywienia, oparty na surowym mięsie i kościach, uzupełnionych odpowiednimi dodatkami i suplementami. Ryciny 2 i 3 przedstawiają rozkład procentowy uzyskanych odpowiedzi. Właściciele badanych psów żywionych dietą BARF opierali się na wytycznych [FEDIAF Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, European Pet Food 2021] i korzystali z porad tego samego dietetyka, dlatego uznano, że psy żywione BARF stanowiły grupę jednolitą dietetycznie.

Ryc. 2. Metody żywienia psów trenujących coursing.



Ryc. 3. Metody żywienia psów nie trenujących coursingu.



Trening

Każdy z trenujących psów, mieszkał na stałe ze swoim właścicielem. Oznacza to, podobnie jak w przypadku żywienia, że plany treningowe poszczególnych psów różniły się od siebie. W ramach członkostwa w klubie sportowym dla whippetów trenujących coursing, właściciele uczestniczyli w szkoleniach prowadzonych przez zoofizjoterapeutów jak i znawców rasy i na tej podstawie dostosowywali plan treningowy do możliwości swoich jak i psa. Schematy treningowe stosowane u badanych psów były podawane przez właścicieli w ankietach. Przykładowe programy treningowe stosowane w przygotowaniu badanych whippetów do zawodów coursingowych:

- 2x w tygodniu flyball, 2x w tygodniu wabik
- 1x w tygodniu wabik
- 3x w tygodniu bieg przy rowerze, 2x w tygodniu spaceru wysiłkowe, swobodny bieg, wabik 2x w miesiącu
- 3-4 x w tygodniu trening biegowy
- 2x w tygodniu wabik, 2x w tygodniu frisbee, wabik 2-3x w miesiącu

Przykładowe schematy rozgrzewki przeprowadzane przez właścicieli badanych whippetów przed startem:

- 10 min spaceru, 5 min. sprintu za zabawką, 2 min. rozciągania
- 7x sprint za zabawką, 2 min truchtu
- 5-10 rzutów frisbee, zabawa z drugim psem, szarpanie z wabikiem

Wykonane badania

Badania krwi wykonano u 43 psów. W zależności od rodzaju zaplanowanego doświadczenia, próbki krwi pobierany były w pomieszczeniu lub podczas badań terenowych. Krew pobierano z żyły odpromieniowej lub odpiszczelowej do probówek zawierających antykoagulanty (EDTA, heparyna) i do probówek bez antykoagulantów w celu uzyskania surowicy. Badanie okulistyczne, podczas którego każdy pies przeszedł pełne badanie oftalmologiczne wykonano u 45 psów.

4. Omówienie najważniejszych wyników i dyskusja

4.1. Ocena przydatności badań nieinwazyjnych w testach wysiłkowych u whippetów

U psów biorących udział w sesji treningowej na torze coursingowym przeprowadzony został dwukrotny pomiar liczby uderzeń serca na minutę – tuż przed startem oraz zaraz po dobiegnięciu do mety. Pomiar przeprowadzono poprzez osłuchiwanie klatki piersiowej każdego psa przez minutę, a wynik wyrażono liczbą uderzeń serca na minutę (Tab. 3.).

Tab. 3. Wartość pomiaru liczby uderzeń serca/minutę u psów na linii startu i po przekroczeniu linii mety po biegu po coursingu.

KOLEJNOŚĆ STARTU	TĘTNO NA STARCIE [liczba uderzeń serca/min.]	TĘTNO NA MECIE [liczba uderzeń serca/min.]
1.	208	212
2.	220	188
3.	200	192
4.	140	212
5.	132	136
6.	160	152
7.	200	198
8.	128	136
9.	164	148
10.	160	196
11.	208	164
12.	208	190
13.	136	192
14.	256	180

U ponad połowy psów wartości okazały się wyższe na linii startu niż po zakończeniu biegu. Wynikało to prawdopodobnie z dużej ekscytacji przed biegiem, co potwierdzała obserwacja zachowania psów na linii startu. Podobnych obserwacji dokonano u koni

wścigowych, których tętno rosło stopniowo podczas drogi do boksów startowych [Mukai et al. 2007]. W związku tym, badanie to uznano za niemiarodajne. Pomiar wykonany na trzech etapach – na linii startu, w czasie biegu i na linii mety, prawdopodobnie byłby bardziej wiarygodny. Przeprowadzenie takich pomiarów wymagałoby jednak umieszczenia odpowiedniej aparatury do pomiaru tętna, np. pulsometru na ciele psa. U koni sportowych przeprowadza się takie badania zarówno na bieżni jak i podczas pracy. [Frippiat et al. 2021; Kapteijn et al. 2022]. U wyżłów, labradorów i retrieverów aparaturę typu Holter stosowano do badań wysiłkowych na bieżni [Shull et al. 2021]. W badaniach w ramach niniejszej pracy wykonywano jednak wyłącznie próby terenowe, które pozwalały na bezpieczną analizę wysiłku przy dużych prędkościach w naturalnych warunkach. Zastosowanie aparatury typu Holter nie byłoby w takich warunkach obojętne ze względu na mniejsze rozmiary i masę ciała whippetów niż np. labradorów, co sprawia, że aparatura stanowiłaby istotne obciążenie podczas biegu z dużą prędkością. Zastosowanie takiej aparatury w warunkach terenowych mogłoby być niebezpieczne, dlatego odstąpiono od takiego badania.

Biorąc pod uwagę specyfikę dyscypliny (zgodnie z opisem w rozdziale 1.3), pomiary prędkości na całej trasie biegu nie są miarodajne. W ocenie na zawodach mają znaczenie elementy opisowe, a więc ocena jest również jakościowa, a pies, który jako pierwszy dopadnie do wabika na mecie, niekoniecznie będzie zwycięzcą danego biegu. Ponadto w czasie zawodów lina, na której przemieszcza się wabik zawiera zakręty, często bardzo ostre. Oznacza to, że psy nie biegną przez cały czas w linii prostej, a niejednokrotnie zatrzymują się na zakręcie, gdy zgubią wabik z oczu. Pomiar prędkości od startu do mety nie odzwierciedla zatem przygotowania psów do zawodów.

4.2 Ocena przydatności parametrów hematologicznych oraz stężenia kwasu mlekowego w terenowych testach wysiłkowych u whippetów

W celu określenia wpływu wysiłku jakim jest coursing na organizm psów rasy whippet, porównano wartości parametrów hematologicznych u psów w spoczynku oraz po dwóch rodzajach wysiłku. Pierwszy z nich, to typowy trening w jakim brały udział psy, czyli bieg za wabikiem w linii prostej. Drugi bieg przeprowadzony został na torze coursingowym, imitującym ten, po jakim psy biegają podczas oficjalnych zawodów, składającym się z linii prostych jak i zakrętów. W obu przypadkach dystans jaki pokonywały psy wynosił 400m. Wyniki wykazały, że parametry hematologiczne, takie jak RBC, HCT oraz WBC wzrosły po obu rodzajach wysiłku. Nie odnotowano jednak istotnych różnic pomiędzy sesją treningową po prostej a sesją treningową po torze coursingowym. Stwierdzone zmiany

wynikają z typowych dla wysiłku szybkościowego zjawisk: skurczu śledziony powodującego uwolnienie erytrocytów (a zatem wzrost RBC i HCT) oraz uwolnienie puli marginalnej leukocytów (a zatem wzrost WBC) pod wpływem wyrzutu adrenaliny. Są one istotne dla potwierdzenia obciążenia wysiłkowego podczas treningu, jednak nie pozwalają na ocenę stopnia obciążenia.

Zmiany parametrów czerwonych krwinek były podobne do stwierdzonych u greyhoundów po biegu na 400 m w linii prostej, kiedy RBC, HGB i HCT wzrosły odpowiednio o 11%, 7% i 10% [Rose i Bloomberg 1987]. U badanych w niniejszej pracy whippetów procentowy wzrost był bardzo podobny, jednak nieco wyższy po biegu po prostej (13%, 11% i 14%) niż dla biegu po torze coursingowym (9%, 13% i 12%). Zdecydowanie większe zmiany stwierdzono u koni trenujących polo, gdzie RBC uległo zwiększeniu o 49%, HGB o 45%, a HCT o 51% [Zobba et al. 2011]. Zmiany u whippetów były jednak wyraźne i istotne statystycznie.

Badanie progu mleczanowego pozwala oceniać sprawność sportowców. U ludzi uprawiających różne dyscypliny sportu badanie to wykonuje się głównie w celu określenia poziomu wytrenowania zawodników [Ghosh 2004]. U koni parametr ten jest wykorzystywany do oceny wytrenowania w różnych konkurencjach, najczęściej u koni wyścigowych, ale też tych trenujących skoki przez przeszkody czy ujeżdżenie [Piccione et al. 2010; Hassan et al. 2015].

Wzoruując się na badaniach wysiłkowych opracowanych dla koni wyczynowych zbadano stężenie mleczanu we krwi whippetów w różnych punktach czasowych po wysiłku i porównano różnice pomiędzy pomiarami dla dwóch opisanych wcześniej rodzajów wysiłku. Podczas treningu stężenie kwasu mlekowego oznaczano po rozgrzewce, bezpośrednio po biegu, a następnie 15 min i 30 min po zakończonym wysiłku. Pomiary wykonane bezpośrednio po obu rodzajach biegu wykazały wartości LA znacznie przekraczające próg mleczanowy, podczas gdy po 30 minutach wartość ta spadała do granicy progu mleczanowego. Pomiary stężenia LA po 15 minutach, wykonane po biegu treningowym w linii prostej, były niższe niż zaraz po biegu, jednak wciąż powyżej progu mleczanowego. Po przeprowadzonej przez właścicieli rozgrzewce u żadnego z badanych psów próg ten nie został przekroczony.

Pomiary stężenia kwasu mlekowego nie są wykorzystywane w sportach kynologicznych tak szeroko jak w przypadku konkurencji jeździeckich. Przeprowadzone w niniejszej pracy badanie jest pierwszym wykonanym u trenujących whippetów. Dotychczas wykonano podobne badania u labradorów, u których stopniowo zwiększano natężenie

wysiłku na bieżni, jednak nie osiągnięto przekroczenia progu mleczanowego, choć u niektórych psów widoczna była istotna różnica pomiędzy wynikami spoczynkowymi i powysiłkowymi [Ferasin i Marcora 2009]. U psów trenujących agility stwierdzono wyraźny wzrost stężenia LA po zakończonym biegu, zwłaszcza u zaawansowanych psich zawodników [Baltzer et al. 2012]. U greyhoundów po biegu na dystansie 100 m w pogoni za przynętą RBC i LA we krwi pozostawały podwyższone przez 10 minut po biegu, a stężenie LA po wysiłku przekroczyło próg 4 mmol/l [Pellegrino et al. 2018]. U whippetów badanych w niniejszej pracy wartość LA wahała się od 5 do 16 mmol/l bezpośrednio po wysiłku. Biorąc pod uwagę, że poziom wytrenowania psów różnił się nawet według subiektywnej oceny ich właścicieli, powysiłkowy wzrost stężenia LA odpowiadał poziomowi wytrenowania. Wysiłek podczas treningu był dla psów odpowiedni, co potwierdza spadek LA poniżej 4 mmol/l u wszystkich psów po 30 minutach regeneracji po przekroczeniu progu zaraz po biegu. Czas i zakres zmian potwierdzają, że stężenie kwasu mlekowego jest właściwym parametrem pozwalającym ocenić obciążenie wysiłkowe oraz regenerację organizmu whippetów trenujących coursing.

Dokładny opis oraz wyniki przeprowadzonych analiz znajdują się w publikacji: Exercise-induced Haematological and Blood Lactate Changes in Whippets Training for Lure Coursing. **Miazga K.**, Szaluś-Jordanow O., Czopowicz M., Żmigrodzka M., Witkowska-Piłaszewicz O., Moroz-Fik A., Mickiewicz M., Wilczak J., Cywińska A. J Vet Res. 2023; 67(1):139-146.

4.3 Opracowanie terenowych testów wysiłkowych optymalnych dla whippetów.

W pierwszym doświadczeniu, w pracy wymienionej powyżej, badano stężenie mleczanu bezpośrednio po wysiłku, w celu określenia czy i w jakim zakresie przekroczony został próg mleczanowy oraz 15 i 30 minut po zakończeniu biegu w celu oceny regeneracji. Wybór punktów czasowych był podyktowany schematem badań u koni wyczynowych, gdzie pomiar restytucyjny (regeneracyjny) jest wykonywany 30 minut po wysiłku oraz badaniem u greyhoundów, gdzie pomiar wykonywano 10 minut po zakończeniu wysiłku [Pellegrino et al. 2018]. Stężenie mleczanu u badanych w niniejszej pracy whippetów po 15 min od zakończeniu wysiłku, było średnio dwukrotnie wyższe od przedziału referencyjnego, co wskazuje, że czas ten był zbyt krótki na regenerację po przekroczeniu progu mleczanowego. Dlatego podczas biegu po torze coursingowym zrezygnowano z tego pomiaru i określono stężenie kwasu mlekowego dwukrotnie - zaraz po zakończeniu wysiłku

oraz po 30 minutach i ten czas jest najbardziej odpowiedni do oceny regeneracji. Po obu rodzajach aktywności, stężenie kwasu mlekowego zmniejszyło się w ciągu 30 minut po biegu o 9-11 mmol/l. Ponadto oznaczano stężenie kwasu mlekowego zaraz po rozgrzewce, jeszcze przed biegiem. Stężenie kwasu mlekowego po rozgrzewce nie przekroczyło progu mleczanowego u żadnego z badanych psów. Oznacza to, że przeprowadzana przez właścicieli rozgrzewka była prawidłowa i nie stanowiła obciążenia treningowego.

Wyniki doświadczeń potwierdziły, że schemat badań wysiłkowych opracowanych dla koni wyścigowych ma zastosowanie u whippetów trenujących coursing. Psy tej rasy są średnich rozmiarów i część z nich ma nerwowy temperament, zwłaszcza w atmosferze rywalizacji podczas zawodów, dlatego zarówno liczba próbek krwi i jej ilość muszą być ograniczone. Pobranie krwi dwukrotnie – zaraz po wysiłku oraz 30 min później, nie stanowi istotnego obciążenia dla organizmu psa. Wyniki wskazują również, że bieg za wabikiem po prostej był dla psów bardziej wymagający niż bieg po torze coursignowym, co jest zgodne z założeniami planu treningowego. Nie było to zaskakujące, gdyż trening polegał na szybkim i równym biegu po prostej, podczas gdy na zawodach psy nie biegają równomiernie, lecz zwalniają na zakrętach lub gdy tracą wabik z oczu. Oba rodzaje wysiłku treningowego stanowiły istotne obciążenie wysiłkowe, nie były jednak nadmiernym obciążeniem, co potwierdza fakt przekroczenia progu mleczanowego natychmiast po biegu i powrotu do poziomu poniżej 4 mmol/l 30 minut później. Pomiar LA bezpośrednio po wysiłku i 30 minut później można zatem zalecić jako metodę potwierdzenia czy program opracowany przez trenera jest optymalny dla danego psa. Sesja treningowa, podczas której psy biegną za wabikiem w linii prostej, jest większym obciążeniem dla organizmu niż bieg po torze w czasie zawodów i stanowi właściwą metodę adaptacji do wzrastających obciążeń. Monitorowanie stężenia kwasu mlekowego podczas sesji treningowych może być pomocne w ocenie przygotowania psa do zawodów, monitorowania postępów treningowych oraz dostosowania treningu do konkretnego psiego zawodnika i uzyskania optymalnych efektów w czasie zawodów.

Dokładny opis oraz wyniki przeprowadzonych analiz znajdują się w publikacji: Exercise-induced Haematological and Blood Lactate Changes in Whippets Training for Lure Coursing. **Miazga K.**, Szaluś-Jordanow O., Czopowicz M., Żmigrodzka M., Witkowska-Piłaszewicz O., Moroz-Fik A., Mickiewicz M., Wilczak J., Cywińska A. J Vet Res. 2023; 67(1):139-146.

4.4 Analiza wpływu treningu na profil metabolomiczny whippetów.

Poszukując innych parametrów, które mogą być przydatne do oceny zmian powysiłkowych u whippetów, przeprowadzono analizę profilu metabolomicznego psów trenujących (16 psów) i nietrenujących (9 psów). W celu ujednoczenia obu grup badawczych, wybrano tylko psy żywione w taki sam sposób, dietą BARF. Do badań wykorzystano materiał pobrany od psów w spoczynku. Użyty test pozwolił na oznaczenie stężeń 630 metabolitów i 232 wskaźników metabolizmu (ang. *metabolism indicators*). Różnice pomiędzy badanymi grupami określano na podstawie istotności statystycznej ($p < 0,05$), oraz bezwzględnej wielokrotności zmian (FC – ang. *fold change*) powyżej 1,5. Warunki te spełniło 48 metabolitów oraz 18 wskaźników metabolizmu. Aż 33 spośród 48 metabolitów należało do grupy triglicerydów. Dwadzieścia z nich osiągnęło wyższe stężenie u psów trenujących, podczas gdy pozostałe 13 triglicerydów miało wyższe stężenie u psów nie trenujących. Triglicerydy zostały opisane wg wzoru TG(x:y_n:m) gdzie „x” oznacza ilość atomów węgla, „y” oznacza ilość wiązań podwójnych w reszcie kwasu tłuszczowego w pozycji *sn-1*, „n” to całkowita ilość atomów węgla, „m” całkowita ilość wiązań podwójnych w resztach kwasów tłuszczowych w pozycji *sn-2* i *sn-3*. U psów regularnie trenujących coursing dominowały średnio łańcuchowe triglicerydy z TG 16:1, TG 17:1 i TG 18:1, podczas gdy u psów nietrenujących wyższe stężenia odnotowano dla TG 20:2/3 i TG 18:2/3. Zaobserwowano także zależność dotyczącą stężeń triglicerydów zawierających 18 atomów węgla w pozycji *sn-1*, ponieważ 10 z nich TG(18:0_30:1), TG(18:1_30:0), TG(18:1_30:1), TG(18:1_33:0), TG(18:1_33:1), TG(18:1_34:1), TG(18:1_35:2), TG(18:1_36:1), TG(18:1_36:2) i TG(18:2_35:1) było wyższe u psów trenujących, a 6 z nich: TG(18:1_38:7), TG(18:2_36:5), TG(18:2_38:5), TG(18:2_38:6), TG(18:3_38:5) oraz TG(18:3_38:6) było wyższe dla psów z drugiej grupy.

Do czterech głównych endogennych źródeł energii podczas wysiłku zalicza się glukozę będącą produktem glikogenolizy w wątrobie, wolne kwasy tłuszczowe uwalnianie z tkanki tłuszczowej oraz będące efektem hydrolizy TG, glikogen mięśniowy i triglicerydy wewnątrzkomórkowe. Endogenne triglicerydy stanowią największą rezerwę energii, która u ludzi jest aż 60 razy większa niż ilość energii zmagazynowanej w glikogenie [Muscella et al. 2020]. Z tłuszczu otrzymywane jest więcej energii (8,5 kcal/g) niż z białek i węglowodanów (3,5 kcal/g). Psy w większym stopniu niż ludzie korzystają z energii z kwasów tłuszczowych, a podczas długotrwałej pracy przy umiarkowanej intensywności nadal produkują energię z utleniania tłuszczów [Wakshlag i Shmalberg 2014; Zoran 2021].

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono wyższe stężenia a co za tym idzie dostępność w osoczu triglicerydów bogatych w średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które są wykorzystywane jako źródło energii podczas wysiłku. Niestety nie udało się wskazać konkretnych metabolitów jako wskaźników wydolności, ponieważ jedynie trzy triglicerydy były skorelowane z punktami rankingowymi uzyskanymi przez psy podczas zawodów, a korelacja nie była wysoka.

Uzyskane wyniki stanowią pierwszą opublikowaną analizę wpływu wysiłku na metabolom psów. Wykazano, że powysiłkowe zmiany u whippetów, związane z regularnym treningiem coursingu, dotyczą przede wszystkim triglicerydów. Sugeruje to, że adaptacja treningowa jest związana ze zwiększeniem możliwości wykorzystania wolnych kwasów tłuszczowych, jako źródła energii w czasie biegu. Niektóre uzyskane wyniki, jak np. stężenia triglicerydów o takiej samej ilości atomów węgla, dają podłoże do przeprowadzenia dalszych analiz w tym zakresie.

Przeprowadzono również analizę parametrów morfologicznych oraz biochemicznych krwi dla obu grup badanych psów. Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach parametrów czerwonych, u wszystkich mieściły się w górnych granicach normy, co jest cechą typową dla chartów [Zaldívar-López et al. 2011]. Wśród parametrów biochemicznych istotnie różniła się aktywność kinazy kreatynowej (CK), która była wyższa u psów trenujących. Wynika to najprawdopodobniej z regularnych treningów, które skutkują zwiększeniem masy mięśniowej. Poza CK, wyższe w tej grupie były aktywności gamma-glutamylotransferazy (GGT) i lipazy. U ludzi potwierdzono, że aktywność lipazy lipoproteinowej znacznie wzrasta po wysiłku fizycznym [Horowitz i Klein 2000; Muscella et al. 2020]. Zjawisko podwyższenia aktywności GGT po intensywnym treningu opisywano również u koni jako nieprzystosowanie do treningu związane ze stresem oksydacyjnym [Mann et al. 2022]. Jednak biorąc pod uwagę różnice w metabolizmie psów i koni, trudno przypuszczać, że taki sam mechanizm ma miejsce u psów, a zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Dokładny opis oraz wyniki przeprowadzonych analiz znajdują się w publikacji: Metabolomic analysis indicated changes in triacylglycerols' levels as a result of training in Whippet dogs. **Miazga K.**, Koczyńska K., Szaluś-Jordanow O., Moroz-Fik A., Wilczak J., Barszcz K, Cywińska A. Sci Rep. 2023; 13(1):18223.

4.5 Ocena przydatności badania okulistycznego do wykrycia patologii mających wpływ na przebieg treningu i osiągnięte wyniki sportowe.

Charty, w odróżnieniu od innych psów myśliwskich, polują głównie przy użyciu wzroku, a nie węchu. Umiejętność śledzenia i podążania za uciekającą na otwartej przestrzeni zwierzyną jest wykorzystywana przez charty, w tym whippetów, podczas zawodów coursingowych. Pogoń za wabikiem wymaga dokładnej jego obserwacji, a jedną ze składowych końcowej noty jest właśnie ocena podążania za uciekającym wabikiem. Dlatego zdecydowano się na przeprowadzenie dokładnego badania okulistycznego u whippetów trenujących coursing oraz ocenę czy ewentualne choroby oczu mają wpływ na osiągnięte przez psy wyniki w czasie zawodów. Dodatkowo, badanie wzroku nie jest wymagane przez Polski Związek Kynologiczny ani zagraniczne oddziały FCI przed dopuszczeniem psów tej rasy do rozrodu, stąd dane na temat wad narządu wzroku u tej rasy w Polsce nie są obszerne. Badaniem objęto 45 psów regularnie trenujących coursing i startujących w zawodach na poziomie krajowym i międzynarodowym. U każdego psa przeprowadzono pełne badanie okulistyczne, obejmujące ocenę reakcji na odruch grożenia, reakcję źrenic na światło, odruch oślepienia, badanie biomikroskopowe przed i po rozszerzeniu źrenic, badanie dna oka metodą oftalmoskopii pośredniej oraz stan refrakcji za pomocą retinoskopii pasmowej. U 53,3% psów stwierdzono obecność patologii, z których najczęstszą (20%) stanowiło zwyrodnienie ciała szklanego (ang. *vitreous degeneration* - VD). Średnia wieku psów, u których stwierdzono to zaburzenie wynosiła 5 lat, co koresponduje z badaniami opisującymi związek występowania VD z wiekiem psów [Krishnan et al. 2020]. Każdy kolejny rok życia psa zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia VD o 24%. W badaniu przeprowadzonym u greyhoundów które zakończyły karierę sportową w biegach torowych, VD stwierdzono u 31% psów w wieku 3-5 lat [Lynch 2007]. Inne wykryte zmiany obejmowały zaćmę, nukleosklerozę (stwardnienie jądra soczewki), retinopatię, zanik tęczówki, złogi barwnikowe w przedniej torebce soczewki, torbiel błony naczyniowej oka, blizny rogówki i siatkówki oraz ciało obce rogówki. Cztery spośród nich: VD, zaćma, zanik tęczówki i retinopatia, są wymienione wśród ośmiu schorzeń na liście ECVO (European College of Veterinary Ophthalmologists), które są lub podejrzewa się, że są dziedziczne [ECVO Manual]. U trzech psów opisano retinopatię, której objawy obejmowały zmiany w postaci punktowych białych przebarwień, widocznych podczas badania dna oka. Właściciele psów z największym nasileniem tych zmian sugerowali łagodne zaburzenia widzenia u swoich psów. Wśród badanych psów nie

stwierdzono opisywanego w literaturze dotyczącej whippetów postępującego zaniku siatkówki (ang. *progressive retinal atrophy* – PRA) [Somma et al. 2017]. U wszystkich przebadanych psów wykazano emmotropię, co oznacza, że ich oczy były wolne od wad refrakcji. Do najczęstszych wad refrakcji zalicza się dalekowzroczność i krótkowzroczność. Analiza punktów rankingowych otrzymanych przez psy podczas zawodów krajowych, nie wykazała jednak istotnych statystycznie różnic w wynikach sportowych psów z zaburzeniami okulistycznymi w porównaniu do psów, u których nie stwierdzono zmian okulistycznych. Wydaje się zatem, że zaobserwowane w czasie badania zmiany nie wpływają negatywnie na wyniki sportowe whippetów trenujących coursing. Należy jednak mieć na uwadze, że część zmian może postępować, a zdecydowana większość psów biorących udział w badaniu była młoda (najstarszy pies miał 7,5 roku). Dlatego warto jest monitorować postęp opisanych zmian jak i ich ewentualny wpływ na rezultaty sportowe.

Dokładny opis oraz wyniki przeprowadzonych analiz znajdują się w publikacji:

Ocular abnormalities in Whippets practicing lure coursing in Poland. **Miazga K.**, Tomkiewicz A., Wilczak J., Cywińska A. Pol J Vet Sci. 2024; 27(1) 5-12.

6. Wnioski

1. Zmiany parametrów czerwonych u psów rasy whippet są przydatne do potwierdzenia obciążenia wysiłkowego podczas treningu szybkościowego, jednak nie pozwalają na ocenę stopnia obciążenia. Ocenę stopnia obciążenia oraz wytrenowania psa umożliwia analiza zmian stężeń kwasu mlekowego we krwi. Pomiar liczby uderzeń serca na minutę metodą osłuchiwania klatki piersiowej przed i po wysiłku nie jest przydatny do oceny obciążenia wysiłkowego ani przygotowania treningowego psów rasy whippet.

2. Optymalnym dla psów rasy whippet schematem terenowego testu wysiłkowego jest badanie stężenia kwasu mlekowego we krwi bezpośrednio po biegu po prostej (ocena przekroczenia progu mleczanowego) oraz 30 minut po zakończeniu biegu (ocena regeneracji).

3. Regularny trening powoduje zmiany metaboliczne dotyczące przede wszystkim stężenia konkretnych frakcji triglicerydów we krwi. Prawdopodobnie są to zmiany adaptacyjne umożliwiające efektywniejsze wykorzystanie wolnych kwasów tłuszczowych jako źródła energii podczas wysiłku.

4. Choroby narządu wzroku dotyczą znacznej części whippetów startujących w zawodach w dyscyplinie coursing. U przebadanych psów wykazano, iż pozostają one bez wpływu na osiągnięte przez psy wyniki sportowe. W związku z młodym wiekiem badanych zwierząt, warto przeprowadzać badania kontrolne w celu oceny progresji zmian i ich ewentualnego wpływu na wyniki sportowe.

7. Piśmiennictwo

Acevedo L.M., Rivero J.L. New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes. *Cell Tissue Res.* 2006; 323(2):283-303.

Aderemi A.V., Ayeleso A.O., Oyedapo O.O., Mukwevho E. Metabolomics: A Scoping Review of Its Role as a Tool for Disease Biomarker Discovery in Selected Non-Communicable Diseases. *Metabolites.* 2021 Jun 25;11(7):418.

Agarwal D., Côté E., O'Sullivan L., Meurs K.M., Steiner J. Investigation of the cardiac effects of exercise testing on apparently healthy Boxer dogs. *J Vet Intern Med.* 2023 Sep-Oct;37(5):1667-1678.

Allen K. J., van Erck-Westergren E., Franklin S. H. Exercise testing in the equine athlete. *Equine Vet Educ.* 2015; 28(2), 89–98.

Al-Khelaifi F., Diboun I., Donati F, Botrè F., Alsayrafi M., Georgakopoulos C., Suhre K., Yousri N.A., Elrayess M.A. A pilot study comparing the metabolic profiles of elite-level athletes from different sporting disciplines. *Sports Med Open.* 2018; 4(1):2.

Alves J., Santos A., Brites, P., Ferreira-Dias G. Evaluation of physical fitness in police dogs using an incremental exercise test. *Comp Exerc Physiol.* 2012; 8(3-4), 219–226.

Anderson M., Hopkins W., Roberts A., Pyne D. Ability of test measures to predict competitive performance in elite swimmers. *J Sports Sci.* 2008; 26(2):123-30.

Baltzer W.I., Firshman A.M., Stang B., Warnock J.J., Gorman E., McKenzie E.C. The effect of agility exercise on eicosanoid excretion, oxidant status, and plasma lactate in dogs. *BMC Vet Res.* 2012; 8:249.

Barclay C.J. Energy demand and supply in human skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2017; 38(2):143-155.

Bavegems V., Duchateau L., Sys S.U., De Rick A. Echocardiographic reference values in whippets. *Vet Radiol Ultrasound.* 2007; 48(3):230-8.

Bell J.S, Cavanagh K.E., Tilley L.P., Smith F.W.K., Rasy psów i kotów - przewodnik weterynaryjny. Charakterystyki ras, predylekcje do chorób, wskazania diagnostyczne i terapeutyczne. 2013. Wydawnictwo Galaktyka, ISBN: 978-83-7579-288-1 strony : 472-475.

Beneke R., Leithäuser R.M., Ochentel O. Blood lactate diagnostics in exercise testing and training. *Int J Sports Physiol Perform.* 2011; 6(1):8-24.

Bongiovanni T., Pintus R., Dessì A., Noto A., Sardo S., Finco G., Corsello G., Fanos V. Sportomics: metabolomics applied to sports. The new revolution? *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019; 23(24):11011-11019.

Carlos G., Dos Santos F.P., Fröhlich P.E. Canine metabolomics advances. *Metabolomics.* 2020; 16(2):16.

Chorell E., Svensson M.B., Moritz T., Antti H. Physical fitness level is reflected by alterations in the human plasma metabolome. *Mol Biosyst.* 2012; 8(4):1187-96.

Clish C.B. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2015; 1(1):a000588.

della Torre P.K., Kirby A.C., Church D.B., Malik R. Echocardiographic measurements in greyhounds, whippets, and Italian greyhounds--dogs with a similar conformation but different size. *Aust Vet J.* 2000; 78(1):49-55.

ECVO Manual: Breeds, 2021 <https://www.ecvo.eu/media/whippet.pdf>

Evans P.L., McMillin S.L., Weyrauch L.A., Witzak C.A. Regulation of Skeletal Muscle Glucose Transport and Glucose Metabolism by Exercise Training. *Nutrients.* 2019; 11, 2432.

FEDIAF Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, European Pet Food - <https://europeanpetfood.org/self-regulation/nutritional-guidelines>

Ferasin L., Marcora S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B*. 2009; 179(7):839-45.

Franklin S.H., Barakzai S.Z., Couroucé-Malblanc A., Dixon P., Nankervis K.J., Perkins J.D., Roberts C.A., Vanerck-Westergren E., Allen K.J. Investigation of the incidence and type of injuries associated with high-speed treadmill exercise testing. *Equine Vet J Suppl*. 2010; (38):70-5.

Frippiat T., van Beckhoven C., Moysé E., Art T. Accuracy of a heart rate monitor for calculating heart rate variability parameters in exercising horses. *J Equine Vet Sci*. 2021; 104:103716.

Ghosh A.K. Anaerobic threshold: its concept and role in endurance sport. *Malays J Med Sci*. 2004; 11(1):24-36.

Goodwin M.L., Harris J.E., Hernández A., Gladden L.B. Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians. *J Diabetes Sci Technol*. 2007; 1(4):558-69.

Hargreaves M., Spriet L.L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat Metab*. 2020; 2(9):817-828. Erratum in: *Nat Metab*. 2020 Sep 10.

Hassan H.Y., Aly M.A., Elseady Y.M., Nayel M.A., Elsify A.M., Salama A.A., Hassan M.S., Elbarody E.F., Kamar A.B. The Effect of Race in The Clinical, Hematological and Biochemical Biomarkers in Thoroughbred Horses. *Alex J Vet Sci* 2015, 46, 161–169,

Holmström P.K., Karlsson Ö., Lindblom H., McGawley K., Schagatay E.K. Enhanced splenic volume and contraction in elite endurance athletes. *J Appl Physiol*. 2021; 131(2):474-486.

Horowitz J.F., Klein S. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(2 Suppl):558S-63S.

Hsia C.C., Johnson R.L. Jr, Dane D.M., Wu E.Y., Estrera A.S., Wagner H.E., Wagner P.D. The canine spleen in oxygen transport: gas exchange and hemodynamic responses to splenectomy. *J Appl Physiol* (1985). 2007;103(5):1496-505.

Jawor P., Stefaniak T., Borkowski J., Przewoźny M., Wierzbicki H., Swagemakers J-H. Przydatność wybranych parametrów krwi w monitorowaniu prawidłowości treningu koni dyscypliny skoków przez przeszkody. *Med Weter* 2007; 63(2), 213-218.

Johnson C., Ivanisevic J., Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; 17, 451–459.

Kalwas M., Winnicka A., Degórski A. Przydatność badania stężenia mleczanów we krwi obwodowej i płynach z jam ciała małych zwierząt. *Życie Wet*. 2011; 86(1), 27-32.

Kaptein C.M., Frippiat T., van Beckhoven C., van Lith H.A., Endenburg N., Vermetten E., Rodenburg T.B. Measuring heart rate variability using a heart rate monitor in horses (*Equus caballus*) during groundwork. *Front Vet Sci*. 2022; 9:939534.

Kelly R.S., Kelly M.P., Kelly P. Metabolomics, physical activity, exercise and health: A review of the current evidence. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020; 1866(12):165936.

Klein D.J., Anthony T.G., McKeever K.H. Metabolomics in equine sport and exercise. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2021; 105(1):140-148.

Kowalska M., Fehlau M., Cymerys M., Guzik P. A thousand words about running fitness tests. *J Med Sci*. 2019; 88(3), 184-191.

Krishnan H., Diehl K., Stefanovski D., Aguirre G.D. Vitreous degeneration and associated ocular abnormalities in the dog. *Vet Ophthalmol.* 2020; 23(2):219-224.

Latorre R., Gil F., Vázquez J.M., Moreno F., Mascarello F., Ramirez G. Skeletal muscle fibre types in the dog. *J Anat.* 1993; 182 (Pt 3)(Pt 3):329-37.

Li X., Yang Y., Zhang B., Lin X., Fu X., An Y., Zou Y., Wang J.X., Wang Z., Yu T. Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Sep 1;7(1):305. doi: 10.1038/s41392-022-01151-3. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7(1):372.

Löllgen H., Leyk D. Exercise Testing in Sports Medicine. *Dtsch Arztebl Int.* 2018; 115(24):409-416.

Lynch G.L. Ophthalmic examination findings in a group of retired racing Greyhounds. *Vet Ophthalmol.* 2007; (6):363-7.

Mann S., Ramsay J.D., Wakshlag J.J., Stokol T., Reed S., Divers T.J. Investigating the pathogenesis of high-serum gamma-glutamyl transferase activity in Thoroughbred racehorses: A series of case-control studies. *Equine Vet J.* 2022; 54(1):39-51.

Mairbäurl H. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Front Physiol.* 2013; 4:332.

Maré L., Boshuizen B., Plancke L., De Bruijn M., Delesalle C. Standardized exercise tests in horses: Current situation and future perspectives. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 2017; 86.

Mukai K., Takahashi T., Eto D., Ohmura H., Tsubone H., Hiraga A. Heart Rates and Blood Lactate Response in Thoroughbred Horses during a Race. *J Equine Sci.* 2007; 18(4): 153-160.

Munsters C.C., van Iwaarden A., van Weeren R., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M. Exercise testing in Warmblood sport horses under field conditions. *Vet J.* 2014; 202(1):11-9.

Muscella A., Stefano E., Lunetti P., Capobianco L., Marsigliante S. The Regulation of Fat Metabolism During Aerobic Exercise. *Biomolecules.* 2020; 10(12):1699.

Pellegrino F.J., Risso A., Vaquero P.G., Corrada Y.A. Physiological parameter values in greyhounds before and after high-intensity exercise. *Open Vet J.* 2018;8(1):64-67.

Piccione G., Casella S., Panzera M., Gianetto C., Fazio F. Effect of Moderate Treadmill Exercise on Some Physiological Parameters in Untrained Beagle Dogs. *Exp Anim.* 2012; 61(5), 511–515.

Piccione G., Messina V., Casella S., Gianetto C., Caola G.: Blood lactate levels during exercise in athletic horses. *Comp Clin Pathol* 2010, 19, 535–539,

Poole D.C., Rossiter H.B., Brooks G.A., Gladden L.B. The anaerobic threshold: 50+ years of controversy. *J Physiol.* 2021; 599(3):737-767.

Rabinowitz J.D., Enerbäck S. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat Metab.* 2020; 2(7):566-571.

Riggs J., Liu N.C., Sutton D.R., Sargan D., Ladlow JF. Validation of exercise testing and laryngeal auscultation for grading brachycephalic obstructive airway syndrome in pugs, French bulldogs, and English bulldogs by using whole-body barometric plethysmography. *Vet Surg.* 2019; 48(4):488-496.

Rose R.J., Bloomberg M.S. Responses to sprint exercise in the greyhound: effects on hematology, serum biochemistry and muscle metabolites. *Res Vet Sci* 1989, 47, 212–218.

Sand K.L., Flatebo T., Andersen M.B., Maghazachi AA. Effects of exercise on leukocytosis and blood hemostasis in 800 healthy young females and males. *World J Exp Med.* 2013; 3(1):11-20.

Shephard R.J. Responses of the human spleen to exercise. *J Sports Sci.* 2016;34(10):929-36.

Shull S.A., Rich S.K., Gillette R.L., Manfredi J.M. Heart Rate Changes Before, During, and After Treadmill Walking Exercise in Normal Dogs. *Front Vet Sci.* 2021; 8:641871.

Somma A.T., Moreno J.C.D., Sato M.T, Rodrigues B.D., Bacellar-Galdino M., Occelli L.M., Petersen-Jones S.M., Montiani-Ferreira F. Characterization of a novel form of progressive retinal atrophy in Whippet dogs: a clinical, electroretinographic, and breeding study. *Vet Ophthalmol.* 2017; 20(5):450-459.

Söderlund E.E., Kyröläinen H., Laitinen-Vapaavuori O.M., Hyytiäinen H.K. Proposed Protocol for Field Testing of Endurance Fitness of Young Labrador Retrievers. *Methods Protoc.* 2023; 6(4):61.

Svedahl K., MacIntosh B.R. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. *Can J Appl Physiol.* 2003; 28(2):299-323.

Toniolo L., Maccatrozzo L., Patruno M., Pavan E., Caliaro F., Rossi R., Rinaldi C., Canepari M., Reggiani C., Mascarello F. Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(5):C1915-26.

Türkcü J.D., Meller S., Wiegel P.S., Nolte I., Volk H.A. Evaluation of the Submaximal Treadmill-Based Fitness Test in Six Brachycephalic Breeds-A Follow-Up Study. *Animals (Basel).* 2023; 13(21):3413.

Uhríková I., Lačňáková A., Tandlerová K., Kuchařová V., Řeháková K., Jánová E., Doubek J. Haematological and biochemical variations among eight sighthound breeds. *Aust Vet J.* 2013; 91(11):452-9.

van Boom K.M., Schoeman J.P., Steyl J.C.A., Kohn T.A. Fiber type and metabolic characteristics of skeletal muscle in 16 breeds of domestic dogs. *Anat Rec (Hoboken).* 2023; 306(10):2572-2586.

Wakshlag J., Shmalberg J. Nutrition for working and service dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2014; 44(4):719-40,

Weisman I.M., Zeballos R.J. Clinical exercise testing. *Clin Chest Med.* 2001; 22(4):679-701.

Zaldívar-López S., Marín L.M., Iazbik M.C., Westendorf-Stingle N., Hensley S., Couto C.G. Clinical pathology of greyhounds and other sighthounds. *Vet Clin Pathol.* 2011;40:414–425.

Zobba R., Ardu M., Niccolini S., Cubeddu F., Dimauro C., Bonelli P., Dedola C., Visco S., Pinna Pargaglia M.L. Physical, Hematological and Biochemical Responses to Acute Intense Exercise in Polo Horses. *J Equine Vet Sci* 2011, 31, 542–548.

Zoran D.L. Nutrition of Working Dogs: Feeding for Optimal Performance and Health. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2021; 51(4):803-819.

Związek Kynologiczny w Polsce – Międzynarodowy Regulamin Torowych i Terenowych Wyścigów Chartów FCI - http://www.wyscigi.zkwp.pl/wp-content/uploads/2022/02/20220216_REGULAMIN-FCI-2022-ostaeczna-wersja-polska-z-word.pdf.

Związek Kynologiczny w Polsce, wzorce ras - <https://www.zkwp.pl/wzorce/162.pdf>.

Exercise-induced haematological and blood lactate changes in whippets training for lure coursing

Katarzyna Miazga¹✉, Olga Szaluś-Jordanow², Michał Czopowicz³,
 Magdalena Żmigrodzka¹, Olga Witkowska-Piłaszewicz⁴, Agata Moroz-Fik³,
 Marcin Mickiewicz³, Jacek Wilczak⁵, Anna Cywińska⁶

¹Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, ²Department of Small Animal Diseases with Clinic,

³Division of Veterinary Epidemiology and Economics, ⁴Department of Large Animal Diseases and Clinic,

⁵Department of Physiology, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-776 Warsaw, Poland

⁶Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 87-100 Toruń, Poland

kmiazga.vet@gmail.com

Received: July 13, 2022

Accepted: February 14, 2023

Abstract

Introduction: Whippets are traditionally trained to compete in lure coursing. While in humans and horses, training is routinely monitored by special tests, this is not carried out in the training of whippets. The aim of this study was to check if laboratory tests designed for racehorses could be useful in monitoring whippets training for lure coursing. **Material and Methods:** Blood samples were taken from 14 whippets at several time points: before exercise (including warm-up), immediately after, 15 min after and 30 min after exercise sessions of straight 400 m runs (T) and coursing (C). Routine haematological values and lactate concentrations (LA) were measured. **Results:** White blood cell count, red blood cell count, haemoglobin concentration and haematocrit increased significantly in both types of exertion, and no differences between the types were observed. The LA measured immediately after the run were increased, but there was no significant difference between the types of session (T and C). After both types of activity, LA decreased within 30 min post run by 9–11 mmol/L. Lactate concentrations were significantly higher 30 min after the T sessions than after the C sessions. **Conclusion:** The results confirmed that typical exercise-induced changes occurred in whippets training for lure coursing; however, the scale of changes was different to that in horses. The sampling scheme used in racehorses can be applied to whippets and can be useful as a laboratory tool for monitoring their training.

Keywords: exercise physiology, haematology, lactic acid, lure coursing, sighthounds.

Introduction

Coursing was traditionally a canine activity involving the pursuit of other animals. Today, it has become a no-victim sport in race form and found popularity in many countries. The races take place on open, grassy terrain which is as flat as possible. The lure is placed on a line stretched close to the ground, arranged in a track. Unlike greyhound track runs, the coursing track does not follow a regular oval, but it consists of straight lines as well as turns. The distance ranges between 250 and 900 m depending on the rank of the competition and the breed of the competing dogs. Whippets are known as the fastest accelerating breed and one which can quickly change direction. They are also solo hunters eager to take the lure as quickly as possible (8). Thus, they constitute an ideal breed for lure coursing.

The competing dogs are trained to increase their speed, agility and endurance, in order to meet all judging criteria; however, the first two are the most important since the competitions demand anaerobic exertion. Training programmes usually draw on the trainers' experience and respond to general indications, but exercise tests with objective benchmark values that can be used for the evaluation of individual dogs are still lacking. Such tests have been widely described and used on human athletes of various disciplines. In the case of animals, horses have undeniably been best investigated in this respect (5, 6, 15, 16, 20, 29, 33). One of the parameters most frequently tested during speed exercise tests on humans and horses is the lactic acid (lactate) concentration (LA). Lactate is a metabolite produced from pyruvate in anaerobic fermentation during exercise. When energy is needed rapidly, glycogen is

broken down anaerobically into lactate. When the rate of lactate production exceeds the rate of its removal, its concentration increases markedly, which can be detected by blood LA measurements (21). The duration of exercise that can be undertaken when using glycogen alone as the energy source is limited due to the muscle fatigue related to acidification.

Blood LA measurements are widely used to assess the level of fitness in sport horses (3, 5, 29). Speed exercise tests are based on the evaluation of the time it takes for LA to reach the level of 4 mmol/L (the anaerobic threshold) (17). Studies have shown that a lactate-guided conditioning programme can significantly enhance performance and that LA, along with basic haematology, can be used to determine fitness in different types of exercise; it follows that the optimised enhancement is attained partly through the most reliable determination of fitness, and therefore the right preparation of the test and the correct sampling are crucial (5, 29). Exercise tests have been performed and changes in blood count before and after exercise have been reported for greyhounds, but not for whippets (19, 22). Therefore, the aim of this study was to determine the changes in haematological parameters and blood LA in whippets at various exercise sessions.

Material and Methods

Dogs. Fourteen privately owned whippets living with their owners in domestic conditions were enrolled in the study. They were 12 males (2 neutered) and 2 intact females, aged from 11 months to 5.5 years with a mean (SD – standard deviation) age of 2.6 (1.3) years, and weighing from 11.0 to 19.2 kg with a mean (SD) weight of 14.2 (2.4) kg. All dogs were active lure-coursing competitors at different levels of training. The movement and general condition of each dog were assessed as they walked in a straight line on a leash in the owner's hand. Each owner filled in a questionnaire about the dog with questions regarding nutrition, dietary supplements, vaccination and health history. All tests were performed as part of routine health examinations and at the owners' requests, and thus, according to the European Directive EU/2010/63 (7) and Polish regulations regarding experiments on animals (12), there was no need for the approval of the Ethical Committee for the described procedures. These qualified as non-experimental clinical veterinary practices, excluded from the directive.

Exercise sessions. A speed-training session (training – T) and a run that mimics competitions (coursing – C) were investigated. Both sessions, T and C, were conducted outdoors on a grassy meadow in the morning hours. The distance in both cases was 400 m; however, during the T session the lure was moving in a straight line, while in the C session the track was designed with turns as well as straights, in a similar manner to competition courses. The dogs ran in pairs selected by the trainer based on previous experience and performance. Each dog was dressed in a coursing

blanket and had a muzzle. The owner started the run on their own initiative. Before the run, each dog was put through an individual warm-up by its owner, consisting mainly of run-ups after a frisbee or ball, stretching and tricks.

Blood analyses. Blood samples were collected at rest and after exercise at time points selected in reference to exercise tests performed on racehorses. The number of blood samples collected from each dog depended on the dog's size, what was possible without impacting the dog's welfare, and the owner's preference. Samples for haematology were obtained at rest and immediately after the runs in both session types. Samples for blood LA testing were taken as follows: in the T session immediately after, 15 min after and 30 min after the run, and in the C session immediately after and 30 min after. Blood LA was also measured immediately after the warm-up before the C session. Blood was collected from the cephalic or saphenous vein into a 2 mL tube with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and a plain tube using a 0.7 mm (22G) needle. Lactic acid concentration was measured in blood from the plain tubes immediately after collection using hand-held analysers (Accusport; Roche, Mannheim, Germany). All samples were stored in a cooled container and within 4 h the researchers' laboratory took the following haematological measurements from blood from the EDTA tubes: red blood cell count (RBC), haemoglobin concentration (HGB), haematocrit (HCT), white blood cell count (WBC), and platelet count (PLT). The plain tubes were centrifuged and the serum was used to evaluate the biochemical profile. For haematological and biochemical measurements, published reference intervals (RI) were used (31) while the RI for LA ranged from 1.2 to 3.1 mmol/L (27).

Statistical analysis. The normality of the data distribution was confirmed using the Shapiro–Wilk test. Numerical variables were presented as the arithmetic mean, SD, and range, or as the arithmetic mean, 95% confidence interval (CI 95%) and measurements of individual dogs in figures. Haematological measurements and LA were compared in the 14 whippets between time points and types of exertion using the paired Student's *t*-test with Bonferroni correction for multiple comparisons. Comparisons between three time points were made using the repeated-measure analysis of variance with Dunnett's post-hoc test. All tests were two-tailed. A significance level (α) was set at 0.05. The analysis was performed in TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

Results

Haematology. Significant increases were noted in WBC, RBC, HGB and HCT after both C and T compared to the baseline; however, they remained within the RI. There were no significant differences between the two types of exertion (Table 1). The PLT count increased significantly after the T session but not after the C session. As a result, PLT was significantly higher

after the T session than after the C session (Table 1). The WBC increased significantly after both sessions, with no differences between the session types (Table 1).

Biochemistry. The biochemistry results, tested at rest, were within the RI. Relevant data is presented in supplementary Table 1 associated with this article.

Lactate concentrations. In the T session, the LA measured immediately after the run significantly exceeded the upper reference limit, doing so even sixfold, and then decreased to values slightly below and above the upper RI. The decrease was significant between both 0 and 15 min post run concentrations ($P < 0.001$) and 15 and 30 min post run concentrations ($P < 0.001$) (Fig. 1). The results in blood collected 15 min after the end of the exercise were on average twofold higher than the reference interval, indicating that this time had been too short for recovery after the

LA threshold was exceeded. Therefore, we decided to abandon measuring LA 15 min after the run in the C session. Instead, we measured LA immediately after the warm-up and the concentrations were below the upper RI in all dogs but one (Fig. 2). Immediately after the C session, LA concentrations increased significantly to more than 10 mmol/L on average and reverted to normal after 30 min of recovery.

When comparing both types of exercise, the LA measured immediately after the run were significantly higher than the baseline and did not differ significantly between the C and T sessions ($P = 0.249$) (Fig. 2). The values decreased significantly within 30 min after both types of activity by approximately 9–11 mmol/L on average ($P < 0.001$ for both types of exercise) (Table 2). However, 30 min after the run, LA were significantly higher after the T session compared to the concentrations after the C session ($P = 0.002$) (Fig. 3).

Table 1. Change in haematological measurements after two types of session – training (T) and coursing (C)

Blood parameter	Reference interval	Baseline	After T session	Baseline vs T P-value ^a	After C session	Baseline vs C P-value ^a	T vs C P-value
WBC (g/L)	6.0–16.5	5.4 ± 0.9 (4.1–7.4)	7.8 ± 2.1 (5.1–11.4)	0.002*	7.27 ± 0.94 (5.8–8.6)	<0.001*	0.999
RBC (T/L)	5.5–8.5	7.5 ± 0.9 (4.8–8.3)	8.5 ± 0.5 (7.6–9.7)	0.001*	8.18 ± 0.51 (7.2–9.0)	0.039*	0.149
HGB (mmol/L)	7.5–11.3	11.5 ± 1.4 (7.4–13.0)	12.9 ± 0.7 (11.9–14.6)	0.010*	13.1 ± 0.8 (12.1–14.4)	0.007*	0.482
HCT (L/L)	0.37–0.55	0.54 ± 0.06 (0.35–0.61)	0.62 ± 0.03 (0.57–0.70)	0.001*	0.6 ± 0.03 (0.6–0.7)	0.009*	0.696
PLT (g/L)	200–580	216.4 ± 26.2 (174–281)	243.9 ± 32.8 (193–294)	0.028*	211.4 ± 16.2 (188–242)	0.999	0.002*

^a – paired Student's *t*-test P with Bonferroni correction for three comparisons; * – Significant at $\alpha = 0.05$; WBC – white blood cell count; RBC – red blood cell count; HGB – haemoglobin concentration; HCT – haematocrit; PLT – platelet

Table 2. Changes in mean lactate concentrations (mmol/L) after two types of session – training (T) and coursing (C)

Type of effort	Lactate concentration (mmol/L)		Mean difference ± SD (CI 95%)	Immediately after vs 30 min after, P-value
	Immediately after session	30 min after session		
T session	13.6 ± 3.2 (7.7–18.2)	3.1 ± 0.9 (1.3–5.2)	10.5 ± 2.7 (8.5, 12.6)	<0.001
C session	10.7 ± 3.1 (4.8–15.0)	1.8 ± 1.1 (0.1–3.8)	8.9 ± 3.3 (6.4, 11.5)	<0.001
Mean difference ± SD (CI 95%)	2.9 ± 5.4 (–1.2, 7.1)	1.4 ± 1.1 (0.5, 2.2)		
T vs C, P-value	0.2	0.002*		

SD – standard deviation; CI 95% – 95% confidence interval; ^a – paired Student's *t*-test P with Bonferroni correction for four comparisons; * – significant at $\alpha = 0.05$

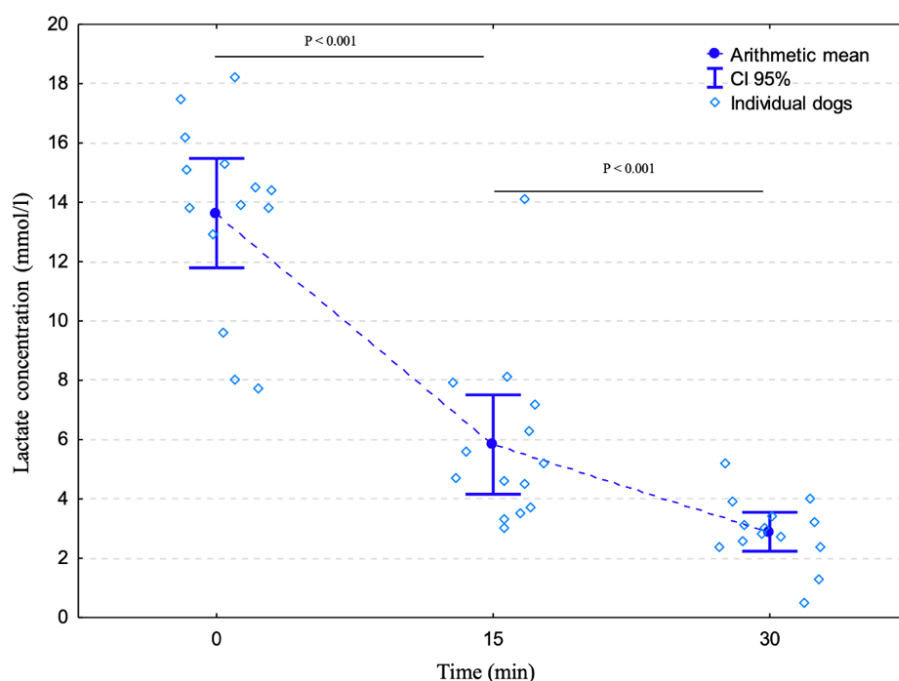


Fig. 1. Change in lactate concentration (mmol/L) after the training (T) session measured immediately after (0), 15 min after and 30 min after the exertion

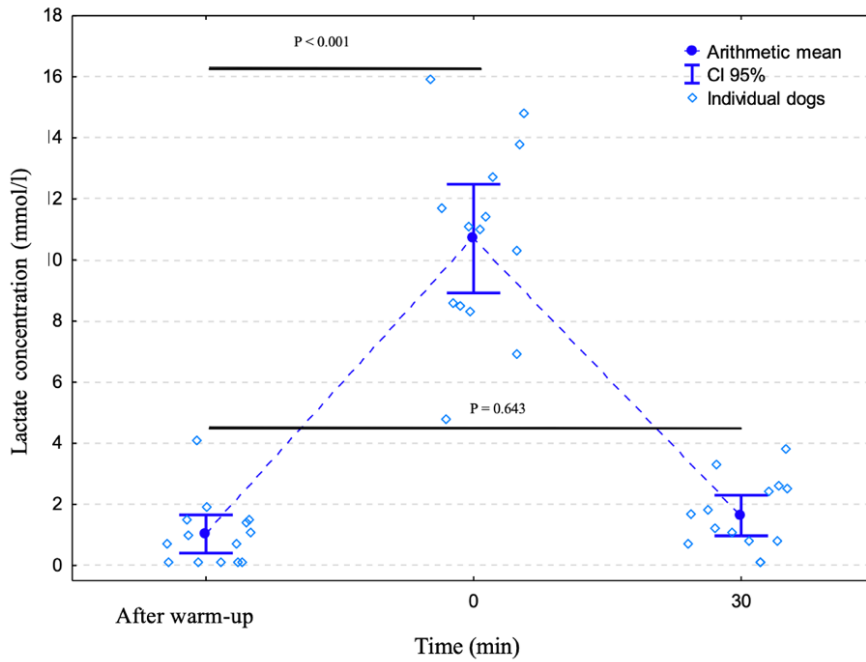


Fig. 2. Change in lactate concentration (mmol/L) after the exercise (C) session measured after the warm up, immediately after, and 30 min after the exertion

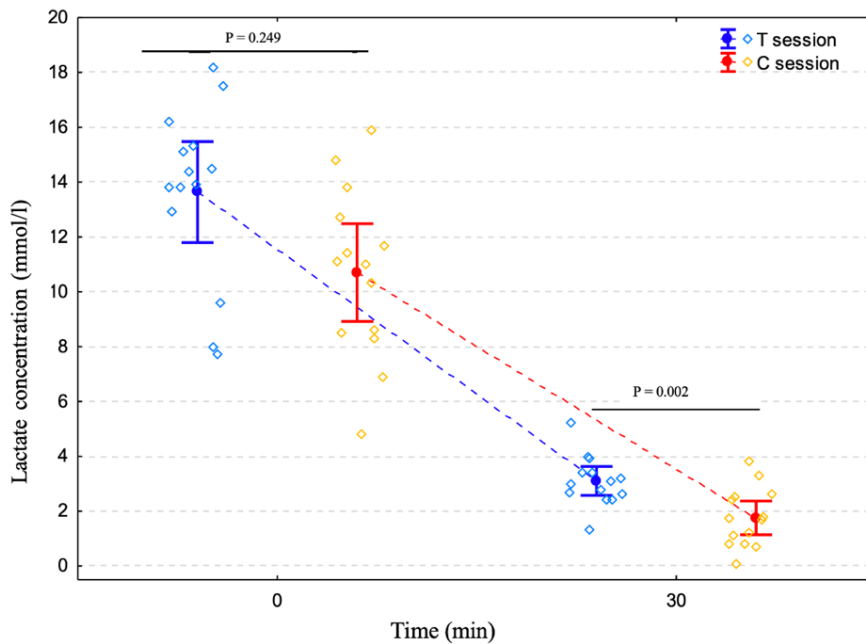


Fig. 3. Change in lactate concentration (mmol/L) after two types of exertion (a training (T) session and a coursing (C) session) presented as the arithmetic mean (dot), 95% confidence interval (whiskers) and measurements of individual dogs (diamonds)

Discussion

Our study shows that basic haematological measurements and LA significantly increase after lure coursing in whippets, but that LA reverts to normal within 30 min of the end of a run. The detected changes are in general consistent with those previously reported in humans and horses (16, 23). The resting values of the haematological parameters in the dogs examined in our study were at the upper limit or in excess of the

published RI (31). This is in line with earlier haematology results typical for sighthounds (19, 28, 30, 32). Several explanations of this phenomenon have been given in the literature regarding hounds, but whippets have not been discussed extensively. It has been indicated that the natural adaptation to running leads to higher oxygen demands in muscles during exercise and thus more effective oxygen transport in the blood is required. However, other findings suggest that training and racing are not primarily responsible for

differences in haematological values between adult greyhounds and other breeds (25, 32). Investigations by Shiel *et al.* (25) of the potential impact of age and sex on blood component proportions in young greyhounds before the start of regular training revealed that HCT, HGB, and RBC correlated positively with age, and haematological values typical for adults were reached by 9–10 months of age. In the case of the whippets examined in our study, the youngest one was 11 months old, so according to the results of Shiel *et al.* (25), the blood of all dogs should have already yielded values typical of adult dogs.

The differences in routinely measured erythrogram parameters in greyhounds correspond to lower haemoglobin P_{50} values (the oxygen tension at which haemoglobin is 50% saturated), meaning that haemoglobin has a higher affinity for oxygen than it does in dogs of other breeds. Moreover, at approximately 54 days (18), the RBC lifespan in greyhounds is significantly shorter than it is in other breeds. This transience has been suggested to result from differences in membrane structure and preferential splenic sequestration effected by the reportedly larger spleens of greyhounds (32). These features contribute to the excellent predisposition to exercise in greyhounds, which has been expected also in whippets.

In our study erythrogram parameters increased significantly after exertion, regardless of its type, which is consistent with previous reports regarding racing greyhounds (22). In the investigated greyhounds, RBC, HGB and HCT increased after 400 m runs by 11%, 7% and 10%, respectively (22). In the whippets examined in our study, the increases were similar, but slightly higher after the straight run (the T session): 13%, 11% and 14% for RBC, HGB and HCT, respectively. After the C session, the results had a slightly different pattern to that in the greyhounds referred to previously: 9%, 13% and 12% increased, respectively. The differences between the types of exertion examined in our study were not significant at the group level, but are worth mentioning as an indicator for blood analyses in individual dogs. The exercise-induced erythrogram increases are well known in sportsmen and sport horses and result from the splenic contraction leading to the release of stored erythrocytes into the circulation (33) and are manifested by high RBC, HGB and HCT values. The rises might also be supported by exercise-induced fluid shifts as well as splenic contraction. The parameters listed above reverted to the baseline within one hour of the end of exercise (33). Comparing the increases in the values of haematological parameters after exercise in horses with the values obtained in the whippets examined in our study, it is clear that their percentages were not as high as in, for example, polo horses (33), where RBC increased by 49%, HCT by 51% and HGB by 45%, but still the changes we observed are visible and statistically significant.

Platelets are not commonly counted in an exercise test. Greyhounds' baseline PLT seemed to be below the commonly accepted RI in previous research (1, 19, 30);

however, it was not confirmed in the whippets examined in our study. Although the changes noted in our study were statistically significant, the results may have been materially affected by the mechanisms involved in the variations in PLT counts. Hence, we postulate that PLTs are not useful in the evaluation of exercise-induced changes in whippets just as they are not in horses (24).

The WBC increased significantly after the T and C sessions regardless of the type of exertion. In greyhounds, an increase in WBC by 36% was observed after dogs chased the lure over a distance of 400 m (22). The increases observed in our study were by 42% after T sessions and 34% after C sessions. In performance horses, leukocytosis is frequently observed after various types of exercise (4, 15) and its level depends on the nature of the exertion. In endurance horses competing over 162 km, the increase in WBC was 68% (4), while in thoroughbreds racing over 1,600 m the difference was 26% (13). Two mechanisms have been widely accepted for this phenomenon: adrenaline release and cortisol release stimulated by sustained exertion. Adrenaline stimulates the release of both mono- and polymorphonuclear cells from the marginal pool and the release of leucocytes such as RBC from the spleen. Additionally, the release from bone marrow and efferent lymphatics occurs and contributes to leukocytosis (14). The short duration of the dogs' exercise in our study causes us to suspect that adrenaline is responsible for leukocytosis. In humans, cortisol is involved in acute leukocytosis in low-volume, high-load exercise, but this is not the case in high-volume, medium-load exercise (26). This corresponds to the types of exercise the whippets examined in our study were given, where the intensity was high over a short period of time. It is also worth mentioning that baseline leukocyte studies with different breeds of sighthounds showed values below the RI in greyhounds and whippets (25, 32), but we did not observe this phenomenon. It is likely to correspond mainly to the lower neutrophil count. In a high percentage of greyhounds, "grey" or "vacuolated" eosinophils are found and some analysers are suspected of not correctly detecting them (11).

Coursing competitions demand exertion for attaining speed, which is anaerobic exertion, and therefore we hypothesised that training tailored to such competitions would produce similar exercise-induced changes to those known to occur in racehorses (13, 20, 16). Blood LA relative to exercise intensity is a relevant marker for exercise performance. The anaerobic threshold falls at a particular point in the range of exercise intensity and denotes the point below which there is an increased contribution of energy associated with metabolic acidosis and consequently respiratory compensation (10). The aerobic–anaerobic LA threshold is supposed to identify the maximal intensity of exercise at which blood lactate production and clearance are in balance. In humans it has been established at 4 mmol/L. Exercise intensity above this level will require a greater contribution by anaerobic metabolism in order to obtain

energy. The lactate threshold concept is used to assess fitness in athletes. It has been widely tested in humans participating in different kinds of disciplines, mainly to determine the training level (10). In horses, this parameter is used to examine horses used in different disciplines, most commonly racing thoroughbreds, but also show-jumping and dressage horses. Special tests, named standardised exercise tests, were designed to match the nature of each discipline (6). In canine sports, such standardised methods for testing exercise capacity have not been evaluated. Nevertheless, some research has been done in dogs: in Labrador retrievers undergoing an incremental treadmill test, the LA threshold of 4 mmol/L was not exceeded; however, in some dogs a relevant difference between the resting and post-exercise results was visible (9). Agility testing induced a significant LA increase immediately after the exercise, especially in advanced competitors (2). While monitoring LA changes in sled dogs entering training, it was noted that LA measured 5 min after training decreased over a nine-week training programme, indicating progress (3). Between week 0 and week 9, the decrease in post-exercise LA reached 47%. However, the type of exercise differed from the one performed by sighthounds, because sled racing is an example of endurance sport. Greyhounds sprinting over a 100 m distance while chasing a lure showed very promising results in terms of efficiency. The RBC and blood LA remained elevated 10 min after the run, indicating the high intensity of the exertion. Moreover, the LA concentration after the exercise exceeded the 4 mmol/L threshold, suggesting a predominant anaerobic metabolism during the exercise (19). In the whippets examined in our study, LA ranged between 5 and 16 mmol/L immediately after exercise. Given that the dogs' training levels varied according to their owners' judgement, it is likely that the LA corresponded to the training level. However, verification of this hypothesis requires further studies. Most importantly, the exertion was tolerable. This was demonstrated by the LA falling below 4 mmol/L in all dogs after 30 min of recovery following the crossing of the lactic acid threshold during the runs. Post-exercise LA did not differ between types of exercise. The T session, which was examined first, showed that although LA decreased after 15 min, the threshold was still exceeded at that time, and the subsequent decrease (after 30 min) was more pronounced. We suppose that, similarly to how it is for sport horses, this is a better time point to evaluate the recovery in whippets.

Whippets are small and sometimes anxious, so the number of blood samples and the amount of blood collected must be limited. Therefore, we decided not to take blood more than twice after exercise. We think that collecting blood immediately after and 30 min after exercise is optimal. In the case of measurements taken 30 min post exercise, differences were visible as higher haematological parameter values after the T session than the C session. This indicates that running in a straight line is more exhausting for dogs than coursing

competition simulation. It may be related to the specificity of the effort. The T session was an uninterrupted sprint in a straight line with maximal speed, while the C session imitated the chase after the lure, and although the latter was a fast run, it also consisted of changes in pace, *e.g.* in corners. Overall, the lactate threshold was exceeded in all dogs, but dropped below 4.1 mmol/L after 30 min, showing a good level of dog training. The results also indicate that the straight run (T session) was more demanding of the dogs than the competition (C session), which is in line with the assumptions of the training plan. We expected this result, as the training consisted of a fast and steady straight run, while in competitions dogs do not run steadily, but slow down on turns or when they lose the lure. We can also say that the warm-up given by the owners was at an appropriate level, because the lactate threshold was not exceeded and thus there was no muscle fatigue before the actual exercise. If owners are not sure whether they provide a proper warm-up, measuring LA can be helpful. For the dogs included in our study, both types of training exertion were taxing but appropriate, as the lactate threshold was exceeded immediately after running and returned to below 4 mmol/L 30 min later. Thus, LA measurement can be recommended as a laboratory method to confirm if the programme designed by the trainer is optimal for the dogs.

The main limitation of our study was the non-uniformity of the conditions provided by the keepers of the dogs tested. Each whippet lived with its owner and led a different lifestyle to the others including its diet and daily exercise routine. In the case of greyhounds, the group is more unified as the dogs are kept in the manner in which racehorses are kept. Another constraint was the limited possibility of blood collection due to the size of the dogs. Thus, we had to limit the number of blood samples taken during one session to three.

This study is the first to describe exercise-induced changes in basic blood parameters in whippets. Three main conclusions may be drawn: the first is that the schedule of LA and haematological measurements used in racehorses is applicable to whippets training for lure coursing, and the second is that exercise-induced changes were significantly different between the types of exertion at the group level only in terms of LA concentration 30 min afterwards, but that some other differences are likely and should be taken into consideration when analysing individual dogs. The last conclusion is that since collecting blood from whippets is difficult and stressful, testing LA immediately after exercise and after a 30-minute recovery period is to be recommended.

Conflict of Interests Statement: The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Financial Disclosure Statement: This study did not receive any external funding.

Animal Rights Statement: All tests were carried out as part of routine health examination at the owners' request and thus, according to the European Directive EU/2010/63 and Polish regulations regarding experiments on animals (Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes), there was no need for the approval of the Ethical Committee for the described procedures, qualified as non-experimental clinical veterinary practices and thereby excluded from the scope of the directive.

Acknowledgements: The authors would like to thank "Za Wabikiem" lure-coursing team members, both the dogs' owners and the coach, Jacek Staśkiewicz, for participating in the above study.

References

- Angle C.T., Wakshlag J.J., Gillette R.L., Stokol S., Geske S., Adkins T.O., Gregor C.: Hematologic, serum biochemical and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high-intensity exercise in sled dogs. *Vet Clin Pathol* 2009, 38, 370–374, doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00122.x.
- Baltzer W.L., Firshman A.M., Stang B., Warnock J.J., Groman E., McKanzie E.C.: The effect of agility exercise on eicosanoid excretion, oxidant status and plasma lactate in dogs. *BMC Vet Res* 2012, 8, 249, doi: 10.1186/1746-6148-8-249.
- Banse H.E., Sides R.H., Ruby B.C., Bayly W.M.: Effects of endurance training on VO₂max and submaximal blood lactate concentrations in untrained sled dogs. *Equine Comp Exerc Physiol* 2007, 4, 89–94, doi: 10.1017/S1478061507811455.
- Cywińska A., Wyszynska Z., Górecka R., Szarska E., Witkowski L., Dziekan P., Winnicka A., Schollenberger A.: The effect of the 162 km endurance ride on equine peripheral blood neutrophil and lymphocyte functions. *Pol J Vet Sci* 2010, 13, 279–285.
- Davie A.L., Evans D.J.: Blood Lactate Responses to Submaximal Field Exercise Test in Thoroughbred Horses. *Vet J* 2000, 159, 252–258, doi: 10.1053/tvjl.1999.0420.
- De Bruijn C.M., Houterman W., Ploeg M., Ducro B., Boshuizen B., Goethals K., Verdegaal E.-L., Delesalle C.: Monitoring training response in young Friesian dressage horses using two different standardized exercise tests (SETs). *BMC Vet Res* 2017, 13, 49, doi: 10.1186/s12917-017-0969-8.
- European Parliament and Council of the European Union: Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *OJEU L276*, 53, 20/10/2010, 33–79.
- Fédération Cynologique Internationale: FCI Regulations for International Sighthound Racing and Lure Coursing Events, FCI International Guidelines for Lure Coursing Judges. <https://www.fci.be/en/Sighthound-Races-Coursing-69.html>.
- Ferasin L., Samuele M.: Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B* 2007, 179, 839–845, doi: 10.1007/s00360-009-0367-z.
- Ghosh A.K.: Anaerobic threshold: its concept and role in endurance sport. *Malays J Med Sci* 2004, 11, 24–36.
- Giori L., Gironi S., Scarpa P., Anselmi A., Gualtieri M., Paltrinieri S.: Grey eosinophils in sighthounds: frequency in 3 breeds and comparison of eosinophil counts determined manually and with 2 hematology analyzers. *Vet Clin Pathol* 2011, 40, 475–483, doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00357.x.
- Government of the Republic of Poland: Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, art 1.2 (5) (Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes, art 1, paragraph 2, point 5 – in Polish), *Dz U* 22.06.2018. poz 1207 z późn. zm.. (Official Journal of Laws 2018, 22/06/2018, item 1201 as amended).
- Hassan H.Y., Aly M.A., Elseady Y.M., Nayel M.A., Elsayfi A.M., Salama A.A., Hassan M.S., Elbarody E.F., Kamar A.B.: The Effect of Race in The Clinical, Hematological and Biochemical Biomarkers in Thoroughbred Horses. *Alex J Vet Sci* 2015, 46, 161–169, doi: 10.5455/ajvs.190592.
- Iversen P.O., Stokland A., Rolstad B., Benestad H.B.: Adrenaline-induced leukocytosis: recruitment of blood cells from rat spleen, bone marrow and lymphatics. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 2004, 68, 219–227, doi: 10.1007/BF00376770.
- Krumrych W.: Effect of a standard physical exercise of horses on the values of selected clinical and hematological indices. *Med Weter* 2009, 65, 399–403.
- Lee Y.-W., Shim S.-T., Song H.-E., Hwang H.-S., Seo J.-P., Lee K.-K.: The Correlation of Racing Performance with Pre-race Blood Values in Thoroughbred Horses. *J Vet Clin* 2018, 35, 190–194, doi: 10.17555/jvc.2018.10.35.5.190.
- Lindner A., Mosen H., Kissenbeck S., Fuhrmann H., Sallmann H.: Effect of blood lactate-guided conditioning of horses with exercises of differing durations and intensities on heart rate and biochemical blood variables. *J Anim Sci* 2009, 87, 3211–3217, doi: 10.2527/jas.2009-2001.
- Novinger M.S., Sullivan P.S., McDonald T.P.: Determination of the lifespan of erythrocytes from greyhounds, using an *in vitro* biotinylation technique. *Am J Vet Res* 1996, 57, 739–742.
- Pellegrino F.J., Risso A., Vaquero P.G., Corrada Y.A.: Physiological parameter values in greyhounds before and after high-intensity exercise. *Open Vet J* 2018, 8, 64–67, doi: 10.4314/ovj.v8i1.11.
- Piccione G., Messina V., Casella S., Gianetto C., Caola G.: Blood lactate levels during exercise in athletic horses. *Comp Clin Pathol* 2010, 19, 535–539, doi: 10.1007/s00580-010-0965-x.
- Rabinowitz J.D., Enerback S.: Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat Metab* 2020, 2, 566–571, doi: 10.1038/s42255-020-0243-4.
- Rose R.J., Bloomberg M.S.: Responses to sprint exercise in the greyhound: effects on hematology, serum biochemistry and muscle metabolites. *Res Vet Sci* 1989, 47, 212–218.
- Santiago J.M., Almeida F.Q., Silva L.L.F., Miranda A.C.T., Azevedo J.F., Oliveira C.A.A., Carrilho S.S.: Hematology and serum biochemistry of event horses in training (in Portuguese). *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013, 65, 383–392, doi: 10.1590/S0102-09352013000200013.
- Satué K., Gardón J.C., Muñoz A.: Interpretation of Platelets in the Horse. *J Hematol Res* 2017, 4, 19–25, doi: 10.12974/2312-5411.2017.04.3.
- Shiel R.E., Brennan S.F., O'Rourke L.G., McCullough M., Mooney C.T.: Hematologic values in young pretraining healthy greyhounds. *Vet Clin Pathol* 2007, 36, 274–277, doi: 10.1111/j.1939-165x.2007.tb00223.x.
- Stenholm J.K., Walker S., Paulsen G., Häkkinen K., Kraemer W.J., Hämmäläinen M., Vuolteenaho K., Moilanen E., Mero A.A.: Cortisol is related to acute leukocytosis in maximal but non hypertrophic dynamic resistance exercise. *Int J Exerc Sci Conf Proc* 2013, 10, 24. <https://digitalcommons.wku.edu/ijesab/vol10/iss1/24>.
- Stevenson C.K., Kidney B.A., Duke T., Snead E.C., Jackson M.L.: Evaluation of the Accutrend for lactate measurement in dogs. *Vet Clin Pathol* 2007, 36, 261–266, doi: 10.1111/j.1939-165X.2007.tb00221.x.
- Sullivan P.S., Evans H.L., McDonald T.P.: Platelet concentration and hemoglobin function in greyhounds. *J Am Vet Med Assoc* 1994, 15, 838–841.
- Trilk J.L., Lindner A.J., Greene H.M., Alberghina D., Wickler S.J.: A lactate-guided conditioning programme to improve endurance performance. *Equine Vet J Suppl* 2002, 34, 122–125, doi: 10.1111/j.2042-3306.2002.tb05403x.
- Uhríková I., Lačňáková A., Tandlerová K., Kuchařová V., Řeháková K., Jánová E., Doubek J.: Haematological and

- biochemical variations among eight sighthound breeds. *Aust Vet J* 2013, 91, 452–459, doi: 10.1111/avj.12117.
31. Winnicka A.: *Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii (Reference values for basic veterinarian laboratory assays – in Polish)* Wydanie VII, Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2021, p.108.
32. Zaldivar-López S., Marín L.M., Iazbik M.C., Westendorf-Stingle N., Hensley S., Couto C.G.: Clinical pathology of greyhounds and other sighthounds. *Vet Clin Pathol* 2011, 40, 414–425, doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00360.x.
33. Zobba R., Ardu M., Niccolini S., Cubeddu F., Dimauro C., Bonelli P., Dedola C., Visco S., Pinna Parpaglia M.L.: Physical, Hematological and Biochemical Responses to Acute Intense Exercise in Polo Horses. *J Equine Vet Sci* 2011, 31, 542–548, doi: 10.1016/j.jevs.2011.03.010.



OPEN

Metabolomic analysis indicated changes in triacylglycerols' levels as a result of training in Whippet dogs

Katarzyna Miazga^{1,2}, Klaudia Kopczyńska³, Olga Szaluś-Jordanow⁴, Agata Moroz-Fik⁵, Jacek Wilczak⁶, Karolina Barszcz⁷✉ & Anna Cywińska⁸✉

Regular physical effort produces metabolic changes manifested as adaptation to exercise and increasing performance. In humans these changes have been characterized at metabolome level as depending on the discipline. However, all sports involve some level of changes in protein, carbohydrate and lipid metabolism. Recently, also performance horses have been subjected to metabolic analyses, but similar studies were lacking in sports dogs. In this study we performed the metabolomic analysis in plasma of Whippet dogs regularly trained and competing in coursing events, and untrained dogs of the same breed, fed with the same diet. We have also compared the hematological and blood biochemical results in these two groups of dogs. Basic blood tests indicated that enzymes related to lipid metabolism (lipase and gamma-glutamyltransferase) differed considerably between the groups. Metabolomic analysis of plasma confirmed the metabolic shift expressed as the differences in triacylglycerols levels between training and non-training dogs, aimed at improving the use of fatty acids as a source of energy during exertion. Surprisingly, other classes of metabolites were only hardly changed when comparing training and non-training Whippets.

Physical effort causes a number of changes in the body aimed at providing the necessary energy and maintaining homeostasis at the same time. Metabolomics is a field of science that allows to track and monitor these changes in more accurate way than previously used research methods. Large variety of different metabolites can be monitored, which is very valuable when focusing on interactions during exercise or nutritional interventions¹. Metabolites are defined as low molecular weight (< 1500 Daltons) chemical substrates, intermediates, or end products of enzyme-mediated reactions².

Metabolomics is a quickly growing field in veterinary medicine. In dogs, a large part of the published research focuses on variability of the metabolome in different disease entities and the search for metabolites that could be markers for these diseases³⁻⁶. Several canine diseases have been evaluated with some promise for potential biomarker and/or disease mechanism discovery⁵. It has also been proven in humans that undertaking various types of physical activity produces changes in metabolic profiles. In the case of human athletes, it has been confirmed that different types of exercise affect the metabolic pathways of compounds from various groups, including lipids, amino acids, and carbohydrates^{1,7}. A word “sportomics” was created and it means the application of metabolomics in sports to investigate the metabolic effects of physical exercises on individuals, regardless of whether they are

¹Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159C, 02-776 Warsaw, Poland. ²Municipal Zoological Garden in Warsaw, Ratuszowa 1/3, 03-461 Warsaw, Poland. ³Department of Functional and Organic Food, Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences, 02-776 Warsaw, Poland. ⁴Department of Small Animal Diseases with Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159C, 02-776 Warsaw, Poland. ⁵Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159C, 02-776 Warsaw, Poland. ⁶Department of Physiology, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159C, 02-776 Warsaw, Poland. ⁷Department of Morphological Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159C, 02-776 Warsaw, Poland. ⁸Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Torun, Lwowska 1, 87-100, Torun, Poland. ✉email: karolina_barszcz@sggw.edu.pl; anna_cywinska@weterynaria.pl

professional athletes or not⁸. Several metabolomic studies in humans have been published in this field^{7,9–11}, but according to the author's knowledge, no such research in dogs have been published.

Certain canine breeds practice sports of various disciplines. The oldest and most traditional canine discipline is racing dedicated for hounds, and currently a wide variety of race types have been created for certain breeds among hounds. Lure-coursing has been specially created for sighthounds, mainly Whippets to test their congenital chasing and hunting skills. Dogs chase a mechanized plastic lure in a grassy and open area. In contrast to the typical greyhound track racing, here the route is variable and consists of both straight lines and curves.

Numerous scientific reports confirm that in the body of dogs subjected to exercise, noticeable changes take place, characteristic for a specific type of exercise. Biochemical analysis of sighthounds' blood after exercise, regardless of whether they chased a live prey or artificial lure, presented changes in the lactate (LA) level typical for anaerobic exercise in humans and horses¹². It has also been reported that basic hematology parameters—red blood cells count (RBC), hematocrit (HCT) and hemoglobin concentration (HGB), are higher in racing Greyhounds compared to non-runners of other breeds¹³. Moreover, it has been proved that erythrogram parameters increase after exercise in Whippet dogs¹⁴. Knowing these outcomes, we decided to check if exercise-related changes are reflected by metabolomic changes in Whippets practicing lure-coursing. Thus, in the current study we investigated changes in metabolome of Whippet dogs trained for lure-coursing, compared to the same breed dogs that do not practice any sport training. Additionally, we compared basic hematological and blood biochemical profiles to check if routinely used reference values are accurate also for Whippets practicing regular sport training.

Results

The study groups of training and non-training dogs (Table 1) did not differ significantly in terms of age and body weight.

Hematology and blood biochemistry

Most hematological and biochemical parameters remained within normal ranges for canine species recommended by the laboratory. In 5 training dogs WBC values were slightly below the reference range, but no other abnormalities were detected, so it was treated as normal for these individuals. Alike, due to these values the median value for WBC was significantly lower in training dogs, however, fold change (FC_{median}) was below 1.5, so it was not interpreted as important. There were no significant differences in other hematological parameters between the groups (Table 2, Supplementary Table S1). The levels of several biochemical parameters: TP, ALB, GGT, CK, lipase, fructosamine differed significantly, being still within reference values, however, FC_{median} values were above 1.5 only for GGT and lipase (Table 3, Supplementary Table S2).

Metabolites and metabolism indicators

Six hundred thirty metabolites (listed in the Methods section) and 232 metabolism indicators were tested. One hundred fifty seven metabolites (29 acylcarnitines, 1 alkaloid, 6 aminoacids related, 6 bile acids, 5 biogenic amines, 3 carboxylic acids, 7 ceramides, 2 cholesterol esters, 37 diacylglycerols, 8 dihydroceramides, 5 fatty acids, 14 glycerophospholipids, 3 hormones, 1 indole derivative, 1 nucleobase related, 29 triacylglycerols) were excluded from further analyses due to being out of the limit of detection (LOD), 35 out of 232 metabolism indicators were rejected from further analyses for the same reason. In total, 670 compounds were subjected to further analyses (Supplementary Table S3a and b).

Ninety eight metabolites (Fig. 1) and 32 metabolism indicators differed significantly ($p < 0.05$) between groups. The criterion of absolute FC_{median} above 1.5 was fulfilled by 70 metabolites (Fig. 2) and 38 metabolism indicators,

	Training dogs	Non-training dogs	<i>p</i>
Number of animals	n = 16	n = 9	–
Sex	14 males (4 of them neutered), 2 females	4 males, 5 females	–
Age	3 (2–3.5) years	1.5 (1.5–3.6) years	0.559
Body weight	14.25 (13–14) kg	14.0 (12–14.5) kg	0.276

Table 1. Study population. Age and body weight are given as medians (IQR range).

Blood parameter	Reference interval	Training (n = 16)		Non-training (n = 9)		Training vs non-training <i>p</i> -value*	FC
		Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range		
WBC (G/l)	6.0–12.0	5.7 (4.75–6)	(3.7–7.4)	6.4 (6.2–7.3)	(5.1–8.6)	0.002	1.123
RBC (T/l)	5.5–8.0	7.68 (7.4–8.0)	(5.0–9.1)	7.47 (7.3–7.6)	(6.3–7.9)	0.152	–1.028
HGB (mmol/l)	7.45–11.17	11.8 (11.1–12.4)	(7.4–13.8)	11.4 (11.2–12)	(10.1–12.5)	0.579	–1.035
HCT (l/l)	0.37–0.55	0.55 (0.52–0.58)	(0.37–0.63)	0.53 (0.52–0.56)	(0.47–0.59)	0.579	–1.038

Table 2. Basic hematology results of training and non-training Whippets at rest. *Significant at $\alpha = 0.05$. WBC—white blood cells, RBC—red blood cells, HGB—hemoglobin, HCT—hematocrit, FC—fold change.

Blood parameter	Reference interval	Training (n = 16)		Non-training (n = 9)		Training versus non-training p-value*	FC
		Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range		
GGT (U/l)	5–25	8 (6–10.5)	(5–22)	5 (5–5.5)	(5–6)	0.006	1.6
CK (U/l)	5–467	135.5 (127.25–140.25)	(103–174)	99 (72–100)	(70–108)	0.003	1.369
TRI (mg/dl)	17.7–115.1	32 (27.5–44.25)	(20–59)	37 (33–40)	(29–41)	0.621	–1.156
Lipase (U/l)	0–135	32.5 (24–48.5)	(18–134)	11 (10–14)	(11–16)	0.001	2.955
TP (g/l)	55–75	56 (55.5–58)	(52–58)	59.5 (57–62.25)	(57–63)	0.003	–1.063
ALB (g/l)	29–43	32 (31.5–33)	(30–34)	36.5 (35.75–37)	(24–38)	0.001	–1.16
Fructosamine (μmol/l)	225–365	331.27 ± 26.99	(288–366)	250.80 ± 29.02	(225–289)	0.004	1.32

Table 3. Selected biochemistry results of training and non-training Whippets at rest. *Significant at $\alpha = 0.05$. GGT—gamma-glutamyltransferase, CK—creatin kinase, TRI—triglycerides, TP—total protein, ALB—albumins, FC—fold change.

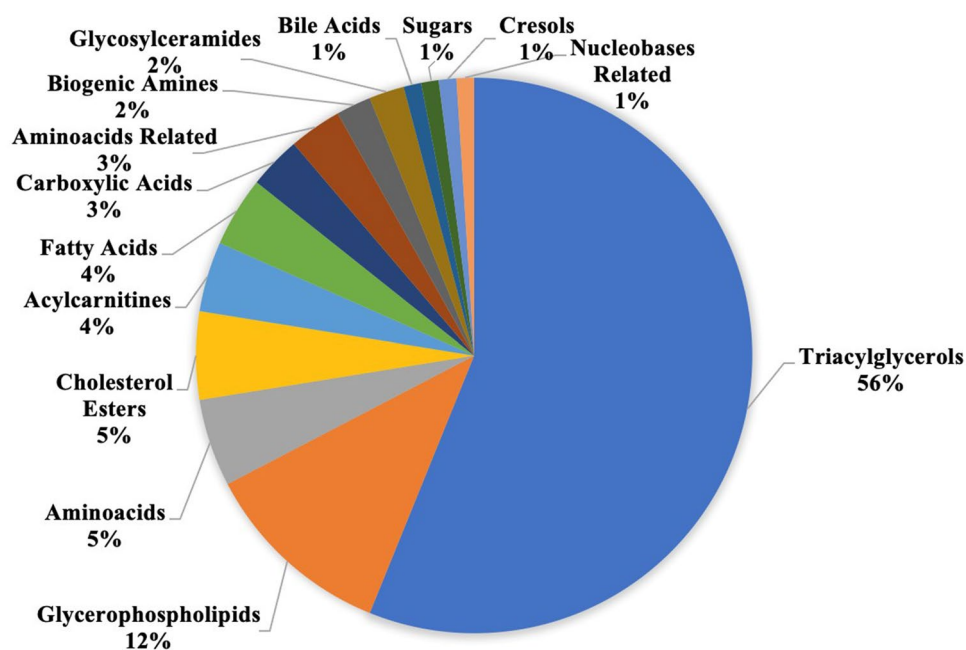


Figure 1. Classes of metabolites that differed significantly between training and non-training Whippets.

being higher or lower in the training dogs. Both criteria: significance and absolute FC_{median} above 1.5 were fulfilled by 48 metabolites (3 free fatty acids, 1 acylcarnitine, 1 aminoacids related, 1 bile acid, 1 biogenic amine, 1 carboxylic acid, 2 cholesterol esters, 1 cresol, 2 glycerophospholipids, 1 glycosylceramide, 1 nucleobases related and 33 triacylglycerols—TGs) and 18 metabolism indicators, including 7 newborn screening traits (deficiencies) designed for tests in humans. The remained 11 included: sum of betaine related metabolites, cystine synthesis, p-cresol-SO₄ synthesis, sum of VLCFA-CEs, ratio of DGs to TGs, ratio of DHA to EPA, sum of MUFAs, sum of PUFAs, PLA2 activity (3), ratio of TGs to FAs, sum of purines and sum of saturated TGs (Supplementary Tables S4 and S5).

Thirty three triacylglycerols (Fig. 3) that fulfilled both criteria: differed significantly between groups, and absolute FC_{median} above 1.5 contained from 14 to 20 carbon atoms residues at *sn*-1 position. In the training group the concentrations of TGs containing 16 and 17 carbon residues in this position were higher than in non-training dogs. The concentrations of TGs with longer chains, containing 20 carbon atoms, except TG(20:3_32:0) were higher in the non-training group. An interesting trend has been noticed for 18 carbon residues, the concentrations of TG(18:0_30:1), TG(18:1_30:0), TG(18:1_30:1), TG(18:1_33:0), TG(18:1_33:1), TG(18:1_34:1), TG(18:1_35:2), TG(18:1_36:1), TG(18:1_36:2) and TG(18:2_35:1) were higher in training dogs, while the concentrations of TG(18:1_38:7), TG(18:2_36:5), TG(18:2_38:5), TG(18:2_38:6), TG(18:3_38:5), and TG(18:3_38:6) were higher in the non-training group. The highest concentrations (in both groups) were noted for TG(18:1_34:1) and TG(18:1_36:2), both being higher in training dogs.

Hierarchical clustering of the metabolites and metabolism indicators that fulfilled both above-mentioned criteria indicated the similarities and dissimilarities among variables, as shown at the dendrogram (Fig. 4). The most similar are the variables that are linked by the branches at the smallest height. The closest relation was found between TMCA and Hex2Cer(d 18:1/26:0). The triacylglycerols TG (20:3_34:1) to TG (14:0_34:1) were

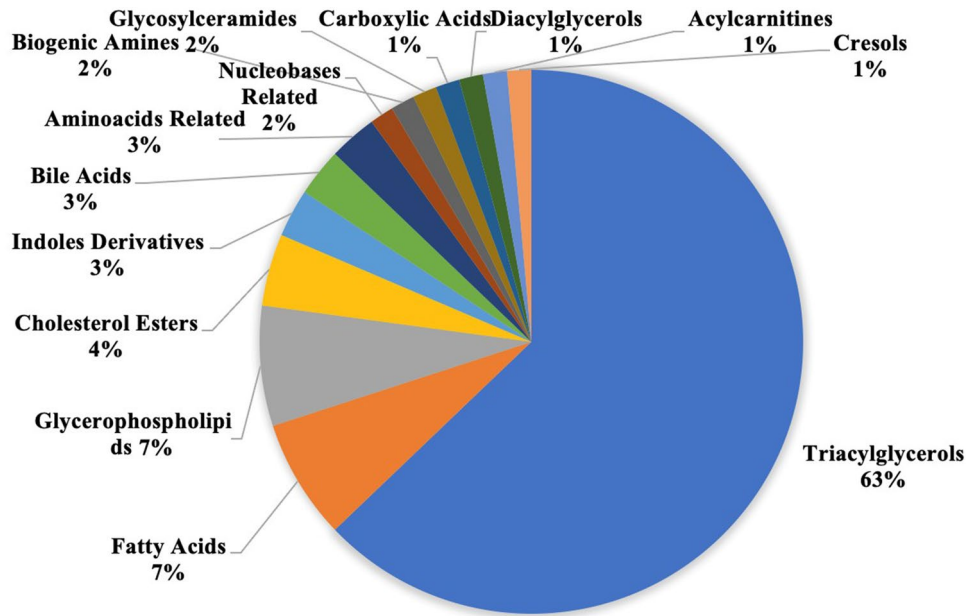


Figure 2. Classes of metabolites with absolute magnitude of difference between training and non-training dogs exceeding 1.5.

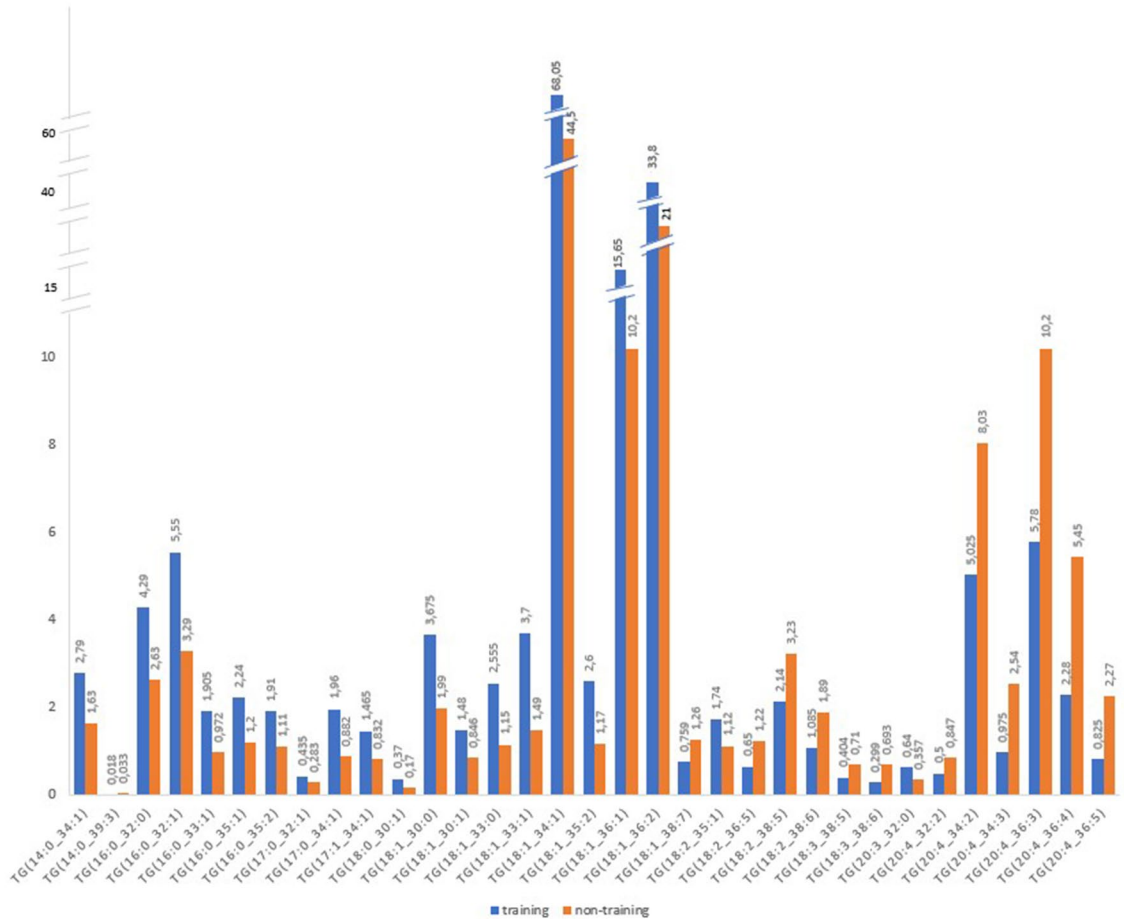


Figure 3. The concentrations of TGs that significantly differed between training and non-training dogs and the absolute FC_{median} was above 1.5.

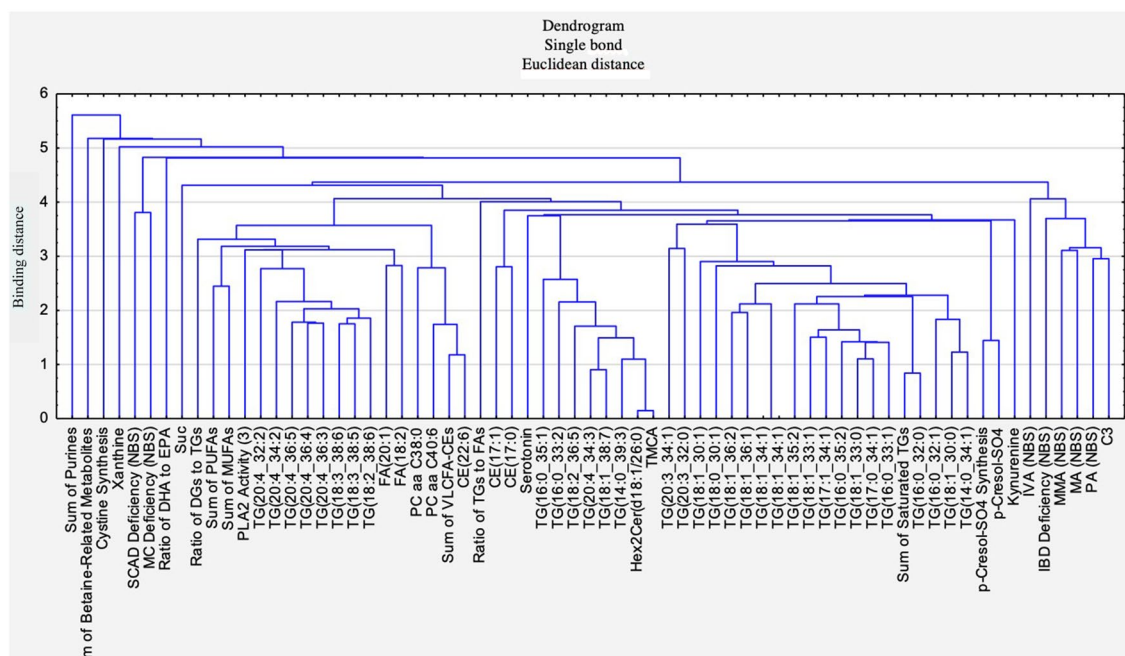


Figure 4. Dendrogram of the hierarchical cluster analysis of metabolites and metabolism indicators that differed significantly between training and non-training dogs and the absolute FC_{median} was above 1.5. The height of branches that link the variables represent similarities (lower located branches) and dissimilarities (higher located branches) among variables.

relatively close to each other, while another group: IVA(NBS) to C3 of rather dissimilar variables is far from other variables. All TGs were quite similar to one another, with the closest relations among TG(18:1_33:0), TG(17:0_34:1), TG(18:1_33:1), TG(16:0_35:2), TG(16:0_33:1) and TG(17:1_34:1). Sum of purines appears as the most different from other variables, as it is linked at the largest height. Subsequent inherently unique variables are Sum of Betaine-Related Metabolites, Cystine Synthesis and Xanthine.

Significant Spearman rank correlations with the ranking points obtained by dogs in the competitions were identified for 3 variables: TG(16:0_35:2), TG(17:1_34:1) and TG(18:1_33:0), all correlations were negative and only moderate (Supplementary Table S4).

Discussion

This study is the first complex analysis of the changes in blood metabolic profile in the dogs subjected to regular sport training. The study design involved analyzing routine blood tests and metabolomic profile which gives much deeper insight into metabolic processes. The groups were selected to exclude the effect of the factors other than sport activity, mainly the diet, which could have affected the metabolism. 'Biologically Approved Raw Food' also called 'Bone and Raw Food' (BARF) is the most popular diet, favored by the owners and recommended for sports dogs. It generally consists of muscle meat, offal (organs), raw bone, fresh vegetables and fruit, and other healthy additives. It can be prepared at home or bought commercially. It is rich in saturated fats, so can affect metabolic parameters, i.e., concentrations of saturated triacylglycerols (triglycerides, TGs)¹⁵. That is why only dogs fed with homemade but unified BARF have been selected to ensure that the groups are as homogenous as possible, so the results can be understood as related to regular training. The food was prepared according to FEDIAF guidelines¹⁶ (as described in the Methods section). We have expected that similarly to humans and horses¹⁷ regular training produces changes related to energy metabolites at protein, carbohydrate and lipid levels and we wished to characterize them at metabolomic level and additionally, to check if any changes can be detected in the routine blood tests. The metabolomic analyses clearly indicated that training-related changes manifest mainly in the triacylglycerols profile and hardly in other profiles, and they are not pronounced in routine tests. We postulate that training-related metabolic shift in TGs profile improves the use of fatty acids as a source of energy during exertion.

Some significant differences between training and non-training dogs were revealed by routine hematological and blood biochemical tests, but the parameters remained within the reference ranges recommended by the laboratory in both groups, except for few individuals. Parameters describing red blood cells (RBC, HGB, HCT) did not differ significantly between training and non-training groups, and were rather in the upper limits of norms, which is a feature previously described and typical for Greyhounds and other sighthounds^{13,18}. Thus, upper limits of ranges for canine species are recommended for these breeds but there is no need to use more specific values related to training.

Among blood biochemical parameters, creatine kinase (CK) is considered as the most important value related to training due to the fact that CK is the best indicator of striated muscle damage and most of its activity is in skeletal muscle^{19,20}. The increase in plasma CK activity in dogs results from its leakage through the cell membrane

and therefore, is evident in all conditions associated with muscle inflammation, necrosis, or degeneration but also after exhausting training²¹. Greyhounds have slightly higher CK activity than non-Greyhounds because of larger muscle mass²². In the dogs tested in this study, all CK results were within reference range and there was a significant difference between the training and non-training group in favour of the former. This is most likely due to regular training resulting in the increased muscle mass. However, FC_{median} was below 1.5, so this difference, although statistically significant, should not be ranked as important and meaningful.

Two biochemical parameters, lipase and gamma-glutamyltransferase activities, fulfilled both criteria FC_{median} above 1.5 and significant difference between training and non-training dogs. Lipase activity was almost 3 times higher in training dogs. In humans, it has been confirmed that the muscle lipoprotein lipase (LPL) increases significantly after exercise. This fact is related to the increased uptake of circulating triglycerides during exercise, which are either utilized immediately or used for restoration of muscle lipid stores after the end of exercise^{23,24}. This is in line with our results indicating higher serum lipase levels in dogs that were in training compared to those that did not train actively. Although triglyceride concentrations in baseline biochemistry were not significantly different, metabolomic analysis clearly indicated the differences in TGs profiles between training and non-training dogs.

In case of GGT, high individual variations have been observed (from 5 to 22 U/L), however all of them were within the reference values. Serum GGT is derived from biliary epithelium, renal tubular epithelium, and pancreatic acinar cells²⁵ and in the dogs truly elevated GGT levels together with elevated ALP indicate hepatic diseases but have not been discussed in the context of exercise. In humans, GGT increases acutely after exercise, but regular aerobic training has been shown to decrease GGT levels and the role of GGT in exercise has been linked to its role in glutathione metabolism, counteracting oxidative stress and supporting cells repair²⁶. In racehorses, moderate increases in GGT levels, called "GGT syndrome", occur in some horses as a result of intensive training and is considered as a marker of maladaptation to training related to oxidative stress²⁷. Due to the metabolic differences between horses and dogs it is hard to consider higher GGT level in training dogs as similar phenomenon, but this issue requires further research.

Total protein and albumin concentrations were lower in training dogs, which corresponds to lower total protein, albumin and globulin concentrations previously reported in Greyhounds and being suggested as related to plasma volume expansion associated with chronic conditioning and training¹³. Fructosamine is used to assess the average blood glucose concentration over the preceding 2–3 weeks. Although higher in training group, it remained within reference ranges, and reflected the temporary changes that may have had multiple reasons (including excitement related to training).

Metabolomic analysis clearly indicated that the training related metabolic changes involved primarily TGs' levels. This class represented the majority (33 out of 48) of metabolites that significantly differed between groups, and the magnitude of change indicated by absolute FC_{median} above 1.5 confirmed their importance. They were also close to each other as indicated by hierarchical cluster analysis, with the closest relation among medium chain TGs with 16, 17 and 18 carbon atoms in *sn-1* position and 33, 34 and 35 carbon atoms in *sn-2* and *sn-3* positions. TGs are glycerides in which glycerol is esterified with 3 fatty acid groups. In the metabolomic data in our study they are described by the pattern TG(x:y_n:m) in which the number of carbon atoms (x) and double bonds (y) in the fatty acid residues at *sn-1* position and the total number of carbon atoms (n) and total number of double bonds (m) in the fatty acid residues at the positions *sn-2* and *sn-3* are given²⁸.

Higher concentrations of TGs, primarily containing medium chain, having 16, 17 and 18 (with one double bond) carbon atoms at *sn-1* position (Fig. 3, Supplementary table S4) in training dogs seem to be related to the metabolic shift towards the increased availability of fatty acids as a source of energy used during training (repeated exercise).

During exercise, there are four major endogenous sources of energy: plasma glucose derived from liver glycogenolysis, free fatty acids (FFAs) released from adipose tissue lipolysis and from the hydrolysis of TG in very low-density lipoproteins (VLDL-TG), muscle glycogen and intramyocellular triacylglycerols (IMTGs) available within the skeletal muscle fibers. Endogenous TGs represent the largest energy reserve in the body, in humans it is over 60 times greater than the amount of energy stored in glycogen²⁴. There are three pathways of TG biosynthesis, two of which take place in the liver and adipose tissue, and one in the intestines. Fats taken in with food are digested and undergo numerous transformations, requiring various enzymes, so as to be stored as cytoplasmic lipid droplets in all cell types of the body²⁹. At rest FFAs released from adipose tissue surpass the quantity of FFAs oxidized in the skeletal muscle, most of the FFAs are re-esterified into liver TGs²³. When fatty acids are required by other tissues for energy or other purposes, they are released from the triacylglycerols by the sequential actions of three cytosolic enzymes²⁹. The use of fatty acids as fuel requires hydrolysis of triacylglycerols (i.e., lipolysis) from adipose tissue, muscle, and plasma and the delivery of the released fatty acids to skeletal muscle mitochondria for oxidation²³. Fat-based energy is twice as high (9 kcal/g, in the dogs 8.5 kcal/g) as the one based on protein or carbohydrates (4 kcal/g, in the dogs 3.5 kcal/g). Dogs even more than humans rely on free fatty acids for energy generation. In contrast to humans that use carbohydrate loading to increase stamina, in dogs exhaustion is not correlated to glycogen depletion. Dogs, during long lasting work at moderate intensity, continue to produce energy from fat oxidation^{30,31}. Free fatty acids undergo beta oxidation to generate energy in the form of ATP in the post-absorption period. The length of the fatty acid chain plays the most important role in the amount of net energy gained, which is important during aerobic exercise. Medium- and short-chain fatty acids are more effectively oxidized, resulting in a higher thermogenic effect. On the other hand, long-chain fatty acids undergo oxidation less willingly and the amount of energy is lower than in the case of short- and medium-chain fatty acids. This is due, among other factors, to the need of activation of long-chain fatty acids before their oxidation, and the use of these compounds also as substrates for the formation of important biologically active molecules, such as eicosanoids. In addition, long-chain fatty acids, which constitute the majority of FFA derived from the diet or released from adipose tissue, unlike short- and medium-chain fatty acids, cannot pass directly through the

mitochondrial membranes, but thanks to palmitoylcarnitine transferase 1 (CPT1) they are converted into fatty acylcarnitine derivatives³². The training-related metabolic changes detected in our study dealt with the composition of TGs in blood. In the dogs subjected to regular training, medium chain TGs predominated with the 16, 17 and 18 (with one double bond) carbon atoms residues in *sn-1* position, in contrast to non-training dogs, in which the residues containing 20 or 18 (but with 2 or 3 double bonds) carbon atoms predominated in this position. Thus, higher concentrations of TGs rich in medium chain fatty acids in the plasma of training dogs confirm that they are better available and preferentially used by dogs in the post-absorption period as the primary source of energy. The fact that different TGs predominated in the groups explains also that the concentration of TGs detected by routine blood biochemistry did not differ between training and non-training dogs. Unfortunately, only 3 TGs correlated with the ranking points and the correlations were only moderate. Thus, currently none of the tested metabolites could be proposed as an indicator of dog's performance.

The interesting trend of TGs with 18 carbon atoms is worth mentioning. TG(18:0_30:1) to TG(18:1_38:7) were higher in the training group while TG(18:2_36:5) to TG(18:3_38:6) were lower. The changes in the concentrations of TGs with 18 carbon atoms have been reported in humans, however, the experimental design was different and involved the changes resulting from two handball games for 30 min with 10 min interval. It has been shown that the plasma levels of stearate (18:0) decreased, and oleate (18:1) and linoleate (18:2) increased, resulting in an increase of the ratio of unsaturated to saturated fatty acids³³. This is in line with the findings in obese humans with impaired insulin sensitivity that had higher concentrations of stearic acid (18:0) and lower proportion of oleic (18:1) and linoleic (18:2) acids, giving a lower ratio of unsaturated to saturated fatty acids in skeletal muscle TGs—in comparison to non-obese individuals³⁴. Mougios et al.³³ assumed that in handball players the shift in blood TGs reflected the stimulation of releasing TGs from the liver during exercise which can overcome the hydrolysis of TG in muscles. They postulated, that the observed shift towards unsaturated fatty acids may be associated with aerobic exercise and diet rich in unsaturated fatty acids. Other study showed that in trained runners intramyocellular TGs provide a substantial portion of fatty acids fuel consumed during high intensity exercise, however there is still not enough data regarding the role of TG fatty acids to provide energy at rest or during exercise³⁵.

We suspect that higher levels of some TGs in training dogs show their adaptation to intense running, as the source of needed energy is easily accessible from the blood. Still, the question that needs to be answered is: why some TGs concentrations are higher and some are lower when comparing trained to non-trained dogs? The obtained results give perspective and hope for determining the parameters that can be markers helping to set the training level of the organism and its adaptation to physical effort. However, further research is required to confirm this hypothesis. Metabolites belonging to other classes, representing other metabolic pathways, were only single among significantly different variables, which indicated that protein and carbohydrate metabolism were not markedly changed by the training. This fact is supported also by the relations among metabolites shown by hierarchical cluster analysis.

Interestingly, some metabolism indicators were significantly different between training and non-training groups with absolute FC_{median} above 1.5. Newborn screening (NBS) indicators reflect NBS traits mainly such as the deficiencies in enzymes that can produce certain inherited disorders in humans. This interpretation of metabolism indicators cannot be directly applied to dogs, but the differences between training and non-training dogs may suggest the role of genetic background related to the enzymes in the predisposition to the training. Training dogs usually originate from "sport lines" which are selected by the owners interested in subjecting their dogs to sport training and competitions, but the breeding of "sport lines" is based on the history of dogs and no specific genetic markers have been proposed. Our results may suggest that further research on the role of genetic predispositions may involve the genes related to certain enzymes.

The main limitation of this study is the small group of dogs, particularly the non-training ones. Moreover, training dogs took part in the competitions, which vary in terms of terrain and weather conditions, so the total exercise load was not the same for all dogs. BARF diet was prepared by the owner according to common recommendations; however, some minor differences may also have occurred. We did our best to select as homogenous groups as possible, but some differences certainly existed.

According to the authors' knowledge, this is the first study covering a wide panel of metabolites in Whippet dogs, including the dogs in regular training. The results clearly indicated that in this homogenous group training produced changes mainly in TGs' levels and other classes of metabolites were hardly changed. The detection of changes that seem aimed at more effective use of fatty acids as a source of energy during exertion can help in better understanding the possibilities of dietary interventions in dogs in regular training.

Methods

Twenty-five adult Whippet dogs aged from 11 months to 5.5 years were enrolled in the study. The dogs were divided into two groups depending on whether they practiced lure coursing or not (Table 1) and these groups were compared. There were 16 dogs (14 males, including 4 neutered ones, and 2 females) that were in regular training and were competing in national and international coursing competitions. In addition to coursing training, consisting mainly of sprints in a straight line, each of the dogs practiced interval and endurance training with its owner, e.g., running by the bike, frisbee or flyball. During the sport events they competed against one another, regardless of their sex and age. The dogs were officially ranked due to the number of starts in the season and the places, so that better and worse competitors were indicated, 6 dogs were included into the ranking list but not ranked due to disqualifications and lack of enough competitions completed. The group of non-training dogs consisted of 9 dogs (4 males and 5 females) and apart from daily activities (e.g., walking, fetching toys) they did not practice any canine sport. All 25 dogs lived with their owners in domestic conditions. All dogs were fed with BARF ('Biologically Approved Raw Food' also called 'Bone and Raw Food') with addition of dietary supplements,

such as vitamins and trace elements necessary for proper functioning of the body. When preparing meals for their dogs, the owners followed the recommendations of the guidelines of the European Pet Food Industry Federation (FEDIAF)¹⁶ and checked the designed diet with the same canine dietician. BARF diet consisted of 75% muscle meat, 5% offal (organs), 10% raw bone, 5% fresh vegetables and fruit, and 5% other healthy additives. The exact composition of the diet depended on the dogs' and owners' preferences but fulfilled FEDIAF criteria. As all dogs were considered adults, the amount of protein and fat based on MER (Maintenance Energy Requirements) of 110 kcal/kg was 45 g of protein and 13.75 g of fat (unit per 1000 kcal of metabolizable energy—ME). At the time of blood sampling, all dogs were clinically healthy, as confirmed by routine veterinary examination. The dogs were sampled at rest, all were fasted before blood sampling (8 h without food and 2 h without water). During the sampling the dogs were handled by their owners to minimize stress, as recommended by the Ethical Committee guidelines. Blood was collected indoors from either cephalic or saphenous vein using 0,8 mm needle into 1 ml plastic tubes coated with EDTA (for hematological analyses), heparin (for metabolomic analyses) and dry tubes coated with clotting factor (for blood biochemistry). Heparin tubes were centrifuged within 30 min after collection, at 2500 × g for 10 min, next the plasma was harvested and stored at –80 °C.

All the procedures of blood sampling were performed as part of routine health examination, on the owners' request and thus, according to the European directive EU/2010/63 and Polish regulations regarding experiments in animal³⁶ there was no need for the approval of Ethical Committee for the described procedures, qualified as non-experimental clinical veterinary practices, excluded from the directive.

Blood analyses

Within 4 h blood from EDTA tubes was tested using an automated hematology analyzer (Abacus, UK), in a laboratory for the following hematological measurements: white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), medium cell volume (MCV), medium cell hemoglobin (MCH), medium cell hemoglobin concentration (MCHC), red blood cell distribution width (RDW), platelets (PLT). The plain tubes were centrifuged, and the serum was used to evaluate biochemical profile consisting of the following parameters: alkaline phosphatase (ALP), glucose, creatinine, urea, total protein (TP), total bilirubin (TBIL), globulins (GLOB), albumins (ALB), gamma-glutamyltransferase (GGT), calcium (Ca), phosphorus (P), potassium (K), sodium (Na), magnesium (Mg), chloride (Cl), cholesterol, lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), triglycerides (TRI), amylase, lipase and fructosamine. For hematological and biochemical measurements reference intervals (RI) of the laboratory were used and compared to normal values for canine species³⁷.

Metabolomic analyses

Concentration of endogenous metabolites belonging to 23 classes (acylcarnitines, alkaloids, aminoacids, amino oxides, aminoacids related, bile acids, biogenic amines, carboxylic acids, ceramides, cholesterol esters, cresols, diacylglycerols, dihydroceramides fatty acids, glycerophospholipids, glycosylceramides, hormones, indoles and derivatives, nucleobases and related, sphingolipids, sugars, triacylglycerols, vitamins & cofactors) was determined by mass spectrometry using a commercial MetaboINDICATOR™: MxP® Quant 500 Kit (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria). The kit is designed to measure concentration of 630 metabolites: 40 acylcarnitines, 1 alkaloid, 1 amine oxides, 20 aminoacids, 30 aminoacids related, 14 bile acids, 9 biogenic amines, 7 carboxylic acids, 28 ceramides, 22 cholesterol esters, 1 cresol, 44 diacylglycerols, 8 dihydroceramides, 12 fatty acids, 90 glycerophospholipids, 34 glycosylceramides, 4 hormones, 4 indoles and derivatives, 2 nucleobases and related, 15 sphingolipids, 1 sugars, 242 triacylglycerols, 1 vitamin & cofactors. Moreover, 232 metabolism indicators, meaning predefined biologically metabolite sums and ratios, were measured.

Briefly, a 96-well based sample preparation device was used to quantitatively analyze the metabolite profile in the samples. This device consisted of inserts that had been impregnated with internal standards, and a predefined sample amount was added to the inserts. Next, a phenyl isothiocyanate (PITC) solution was added to derive some of the analytes, and after the derivatization had been completed, the target analytes were extracted using an organic solvent, followed by a dilution step. The obtained extracts then were analyzed by LC–MS/MS (small molecules, bile acids, and free fatty acids) and FIA-MS/MS (lipid classes including acylcarnitines and hexoses) methods, using multiple reaction monitoring to detect the analytes. Data items were quantified using appropriate mass spectrometry software (Sciex Analyst) and imported into Biocrates. MetIDQ software (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria) for further analysis¹⁵. The analysis was run in Fraunhofer-Institute for Toxicology and Experimental Medicine ITEM in Hannover, Germany, in March 2022. Concentrations of all metabolites were calculated in μM ($\mu\text{mol/L}$) and were normalized with respect to internal quality control samples. Individual limit of detection (LOD) was calculated for each metabolite. In total, concentration of 630 metabolites was measured, of which 157 results were rejected due to being beyond LOD.

Statistical analysis

The significance of the differences between the concentrations of metabolites in training and non-training groups was checked by Mann–Whitney U test. The same test was applied to evaluate the significance of the differences in hematological and blood biochemistry parameters between the examined groups. $P < 0.05$ was considered as significant.

To evaluate possible importance of the differences in metabolites concentrations between training and non-training dogs fold change ($\text{FC}_{\text{median}}$) based on medians was calculated according to previously described formula:

$$\text{FC}_{\text{median}} = \text{Me}_1/\text{Me}_0 \text{ if } \text{Me}_1 > \text{Me}_0 \text{ or } \text{FC}_{\text{median}} = -\text{Me}_0/\text{Me}_1 \text{ if } \text{Me}_1 < \text{Me}_0$$

where Me_0 and Me_1 are medians for training and non-training groups, respectively³⁸. The values higher than absolute cut-off 1.5 were treated as possibly important.

To investigate the relations among the metabolites and metabolism indicators, the variables that differed significantly between groups and the absolute FC_{median} which exceeded 1.5 were standardized and subjected to the single linkage hierarchical clustering with Euclidean distance.

To evaluate the relations between ranking points and metabolites concentrations Spearman R correlations were calculated. Data are presented as the median (Me), interquartile range (IQR) and range. Statistica 13.3.0 (TIBCO) was used for the calculations.

Data availability

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

Received: 23 February 2023; Accepted: 20 October 2023

Published online: 25 October 2023

References

1. Lv, Z., Gong, Z. G. & Xu, Y. J. Research in the field of exercise and metabolomics: A bibliometric and visual analysis. *Metabolites* **12**, 542 (2022).
2. Belhaj, M. R., Lawler, N. G. & Hoffman, N. J. Metabolomics and lipidomics: Expanding the molecular landscape of exercise biology. *Metabolites* **11**, 151 (2021).
3. Krasztel, M. M. *et al.* Correlation between metabolomic profile constituents and feline pancreatic lipase immunoreactivity. *J. Vet. Intern. Med.* **36**, 473–481 (2022).
4. Muñoz-Prieto, A. *et al.* Evaluation of changes in metabolites of saliva in canine obesity using a targeted metabolomic approach. *Animals* **11**, 2501 (2021).
5. Carlos, G., Paulo dos Santos, F. & Fröhlich, P. E. Canine metabolomics advances. *Metabolomics* **16**, 16 (2022).
6. Milczarek, M. *et al.* Metabolomic profile of adult Saanen goats infected with small ruminant lentivirus. *Small Rumin. Res.* **170**, 12–18 (2019).
7. Kelly, R. S., Kelly, M. P. & Kelly, P. Metabolomics, physical activity, exercise and health: A review of the current evidence. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **12**, 165936 (2020).
8. Bongiovanni, T. *et al.* Sportomics: Metabolomics applied to sports. The new revolution?. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**, 11011–11019 (2019).
9. Duft, R. G., Castro, A., Chacon-Mikahil, M. P. T. & Cavaglieri, C. R. Metabolomics and exercise: Possibilities and perspectives. *Motriz Rev. Educ. Fis.* **23**, e101634 (2017).
10. Morville, T., Sahl, R. E., Moritz, T., Helge, J. W. & Clemmensen, C. Plasma metabolome profiling of resistance exercise and endurance exercise in humans. *Cell Rep.* **33**, 108554 (2020).
11. Cai, M. *et al.* Blood metabolomics analysis identifies differential serum metabolites in elite and sub-elite swimmers. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.858869> (2022).
12. Pellegrino, F. J., Rizzo, A., Vaquero, P. G. & Corrada, Y. A. Physiological parameter values in greyhounds before and after high-intensity exercise. *Open Vet J.* **8**, 64–67 (2018).
13. Zaldívar-López, S. *et al.* Clinical pathology of greyhounds and other sighthounds. *Vet. Clin. Pathol.* **40**, 414–425 (2011).
14. Miazga, K. *et al.* Exercise-induced haematological and blood lactate changes in Whippets training for lure coursing. *J. Vet. Res.* **67**, 139–146 (2023).
15. Alexopolus, A. S. *et al.* Triacylglycerides: Emerging targets in diabetes care? Review of moderate hipetriglyceridemia in diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **19**, 13 (2019).
16. FEDIAF Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, *European Pet Food* <https://europetfood.org/wpcontent/uploads/2022/03/Updated-Nutritional-Guidelines.pdf> (2021).
17. Ohmura, H. *et al.* Metabolomic analysis of skeletal muscle before and after strenuous exercise to fatigue. *Sci. Rep.* **11**, 11261 (2021).
18. Uhrkova, I. *et al.* Haematological and biochemical variations among eight sighthound breeds. *Aust. Vet. J.* **91**, 453–459 (2013).
19. Baird, M. F., Graham, S. M., Baker, J. S. & Bickerstaff, G. F. Creatine kinase and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *J. Nutr. Metab.* <https://doi.org/10.1155/2012/960363> (2012).
20. Koch, A. J., Pereira, R. & Machado, M. The creatine kinase response to resistance exercise. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* **14**, 68–77 (2014).
21. Spinella, G. *et al.* Clinical evaluation of creatine kinase and aspartate aminotransferase for monitoring muscle effort in working dogs in different simulated fieldworks. *Animals* **11**, 1879 (2021).
22. Dunlop, M. M. *et al.* Determination of serum biochemistry reference intervals in a large sample of adult greyhounds. *J. Small Anim. Pract.* **52**, 4–10 (2011).
23. Horowitz, J. F. & Klein, S. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 558S–563S (2000).
24. Muscella, A., Stefano, E., Lunetti, P., Capobianco, L. & Marsigliante, S. The regulation of fat metabolism during aerobic exercise. *Biomolecules* **10**, 1699 (2021).
25. Brennan, P. N., Dillon, J. F. & Tapper, E. B. Gamma-glutamyl transferase – and old dog with new tricks?. *Liver Int.* **42**, 9–15 (2021).
26. Fragala, M. S. *et al.* Associations of aerobic and strength exercise with clinical laboratory test values. *Plos One* **12**, e0180840 (2017).
27. Mann, S. *et al.* Investigating the pathogenesis of high-serum gamma-glutamyl transferase activity in Thoroughbred racehorses: A series of case-control studies. *Equine Vet. J.* **54**, 39–51 (2022).
28. Czopowicz, M. *et al.* Profile of serum lipid metabolites of one-week-old goat kids depending on the type of rearing. *BMC Vet. Res.* **16**, 346 (2020).
29. Christie, W. W. Triacylglycerols: 2. Biosynthesis and Metabolism. *The Lipid Web* https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/simple/tag2/index.htm (2023).
30. Zoran, D. L. Nutrition of working dogs: Optimal performance and health. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim.* **51**, 803–819 (2021).
31. Wakshlag, J. & Shmalberg, J. Nutrition for working and service dogs. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim.* **44**, 719–740 (2014).
32. Meienberg, F. *et al.* The effect of exercise on intramyocellular acetylcarnitine (AcCtn) concentration in adult growth hormone deficiency (GHD). *Sci. Rep.* **9**, 19431 (2019).
33. Mougiou, V., Kotzamanidis, C., Koutsari, C. & Atsopardis, S. Exercise-induced changes in the concentration of individual fatty acids and triacylglycerols in human plasma. *Metabolism* **44**, 681–688 (1995).
34. Manco, M. *et al.* Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. *Metabolism* **49**, 220–224 (2000).
35. Jensen, M. D. Fate of fatty acids at rest and during exercise: regulatory mechanisms. *Acta Physiol. Scand.* **178**, 385–390 (2003).
36. Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes, art 1.2 (5), Dz.U.2018.0.1207.
37. Winnicka A. *Reference values of basic laboratory measurements in veterinary* [in Polish], 108, (SGGW, 2021).

38. Vinaixa, M. *et al.* Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *Trac-trend Anal. Chem.* **78**, 23–35 (2015).

Acknowledgements

This research was funded in part by National Science Centre, Poland (Grant number 2021/05/X/NZ4/00771). For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission.

Author contributions

Conceived and designed the study—K.M., O.S.J., K.B., A.C. Collected the data—K.M., O.S.J., A.M.F. Performed the analysis—K.M., K.K., J.W., A.C. Wrote the paper—K.M., K.K., J.W., A.C. Funding acquisition—K.B.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45546-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.B. or A.C.

Reprints and permissions information is available at 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) 2023

DOI 10.24425/pjvs.2024.149328

Original article

Ocular abnormalities in Whippets practicing lure coursing in Poland

K. Miazga^{1,2}, A. Tomkowicz³, J. Wilczak⁴, A. Cywińska⁵

¹ Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland

² Municipal Zoological Garden in Warsaw, Ratuszowa 1/3, 03-461 Warsaw, Poland

³ Veterinary Ophthalmology Center “EyeVet”, Chałupnicza 67, 51-503 Wrocław, Poland

⁴ Department of Physiology, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland

⁵ Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Torun, Lwowska 1, 87-100, Torun, Poland

Correspondence to: A. Cywińska, e-mail: anna_cywinska@wetrynaria.pl, tel.: +48 501136300

Abstract

Coursing is a canine sport discipline invented for sighthounds. The dogs chase the mechanically operated lure on an open area at the track that consists of straight lines as well as turns. Thus, the dogs must rely mainly on their sight in order to chase the lure and to compete.

Whippets are the most popular sighthound breed in Poland and more and more dogs practice lure coursing on professional level. Several ocular disorders are known or presumed to be inherited in Whippets, so we decided to check how often they occur amongst competing dogs and if they have any impact on the results during competitions.

Forty-five regularly competing Whippets underwent complete ophthalmic examination, including evaluation of menace response, pupillary light reflex and dazzle reflex, biomicroscopic examination conducted before and after dilating pupils with topical tropicamide and fundus examination with indirect ophthalmoscopy. Refractive state of each eye was assessed via streak retinoscopy.

Ocular abnormalities were identified in 24 dogs (53.3%). The most common finding was vitreous degeneration identified in 9 dogs (20%), five dogs presented multiple lesions. There were no statistically significant differences regarding sex, age, and ranking points between the dogs with and without lesions.

However, some of the identified lesions are likely to progress, so we postulate that the ophthalmological examination should receive more attention in sport Whippets, to check if it has any impact on competing dogs at more advanced age.

Keywords: lure coursing, ophthalmology, ocular disorders, Whippets



Introduction

English Whippets represent the group of sight-hounds and are one of the most popular breeds from this group. Poland is recognized as the biggest Whippet exporter all over the world. By the end of December 2022 there were 168 Whippet kennels registered as active by the Polish Kennel Club (Hodowle – Whippet w Polsce 2022). Sight-hounds rely on their sight and speed rather than scent and endurance while hunting. Nowadays hunting with sight-hounds is forbidden in many countries, including Poland (Act of 13 October 1995 on hunting law) and has been replaced by sport competitions. Coursing has traditionally meant a canine activity involving the pursuit of other animals. Today, it has become a sport where live bait is replaced by an artificial lure. Races take place on an open, grassy, and possibly flat area. The lure is placed on a line stretched close to the ground, arranged in a track, consisting of lines and turns. Whippets are known to be ideal for lure coursing as they are the fastest accelerating breed. They are solo hunters willing to take the lure as quickly as possible. An ophthalmological examination is not compulsory for introducing dogs for breeding purposes hence there is not much data of ocular diseases in this breed. However, on the basis of published data, several ocular disorders have been listed by the European College of Veterinary Ophthalmologists (ECVO) as known or presumed to be inherited (ECVO Manual: Breeds 2021). The ECVO list includes: cataract (familial predisposition), progressive retinal atrophy – PRA (in case of night blindness – suspected autosomal recessive and in case of vision deficits in dim light and retinal thinning – autosomal recessive), multifocal retinopathy (X-linked suspected) and collie eye anomaly in long-haired Whippets – CEA (autosomal, recessive, polygenic, NHEJ1 - related). Inheritance of disorders such as chronic superficial keratitis, corneal dystrophy, iris atrophy, vitreous degeneration are still unknown (ECVO Manual: Breeds 2021). The impact of the diseases listed above on vision may vary, depending on the origin of the disease, the degree of its advancement and the treatment undertaken or not at the appropriate time. For example, progressive retinal atrophy leads to blindness, chronic superficial keratitis may lead to chronic loss of vision if not treated, while iris atrophy and vitreous degeneration are not sight threatening. Progressive retinal atrophy described in Whippets by Somma et al. (2016) leads to severe vision deficits in affected dogs. Studies conducted on dogs training agility have shown that dogs with jumping issues are more likely to have visual disorders than normal jumping dogs and these disorders affect their results during competitions (Day et al. 2015). The authors showed that dogs with myopia,

astigmatism, and anisometropia had jumping problems. Dogs with hyperopia did not have problems, and emmetropes and strabismics were evenly divided between good and poor jumpers. However, this study focused only on refractive state of the eyes. Another study conducted on working dogs in Brasil showed that even though a considerable number of ophthalmic abnormalities and refractive errors (54% of examined dogs) were found, work performance was good with no signs of impairment (de Oliveira et al. 2020). Knowing that dogs training for coursing rely mainly on their sight, we decided to check the prevalence of ocular diseases that occur in actively training dogs and whether they have an impact on the results achieved during coursing competitions.

Materials and Methods

The study group consisted of 45 Whippets, 26 males and 19 females, from 11 months to 7.5 years old, the median age was 4 years (IQR range 4-5). All dogs were regularly trained and took an active part in coursing competitions and were officially ranked in the Polish Cup (Coursing Polish Cup Results 2021) by the points obtained in the competitions. Whippets underwent complete ophthalmic examination, including evaluation of menace response, pupillary light reflex and dazzle reflex, biomicroscopic examination (KOWA SL-15 Portable Slit Lamp, Kowa) was conducted before and after dilating pupils with topical tropicamide (Tropicamidum WZF 0.5%, Polfa Warszawa). Fundus examination was completed with indirect ophthalmoscopy (Omega 500 Binocular indirect ophthalmoscope, Heine) using 30D condensing lens (Volk). Fundus photographs were taken in some dogs by use of ClearView Fundus Camera (Optibrand). Refractive state of each eye was assessed via streak retinoscopy (Beta 200, Heine). Dogs were considered ametropic (myopic or hyperopic) when the mean refractive state exceeded ± 0.5 diopter (D). The dogs with and without ocular lesions were compared regarding the age, sex and ranking points using Mann-Whitney U Test (Statistica 13, TIBCO). Ophthalmological examination performed as a part of routine health examination, on the owners' request and thus, according to the European directive EU/2010/63 and Polish regulations there was no need for the approval of the Ethics Committee for the described procedures, qualified as non-experimental clinical veterinary practices, excluded from the directive (Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes).

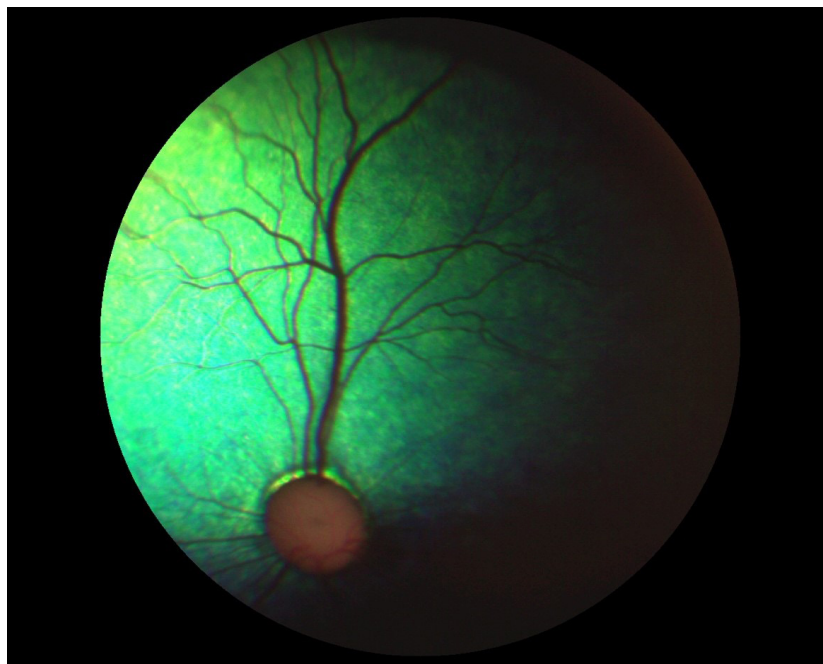


Fig. 1. Normal ocular fundus in a Whippet dog. Visible hyperreflective zone around the optic nerve disc.

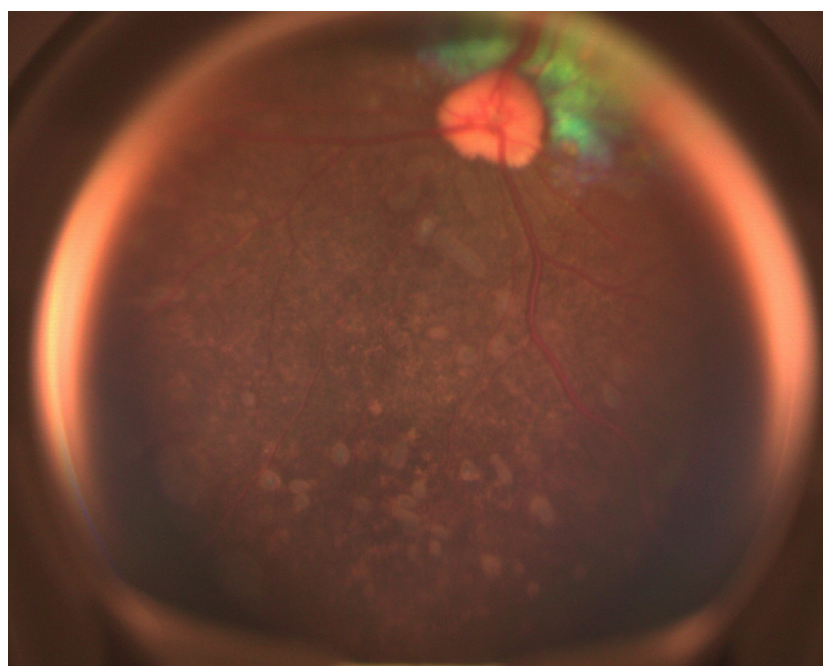


Fig. 2. Depigmentation of the non-tapetal fundus in a dog with retinopathy.

Results

The population examined in this study covered 30% (45 out of 161 ranked dogs) of sport Whippets in Poland, so constitutes the representative population. Twenty one (46.3%) had no ocular lesions (Fig. 1). Ocular abnormalities were identified in 24 dogs (53.3%), 16 males and 8 females, median age was 4 years (4-6). There were no statistically significant differences regarding sex ($p=0.282$), age ($p=0.15$)

and ranking points ($p=0.138$) between the dogs with and without lesions.

The most common finding was vitreous degeneration, identified in 9 dogs (20%), in 6 of them in both eyes and in 3 of them only in the left eye. Other detected lesions involved cataract (suture tips, fiberglass and suture tips, pulverulent, nuclear), nucleosclerosis, retinopathy (Figs. 2, 3a and b), iris atrophy, anterior lens capsule pigment deposits, uveal cyst, corneal foreign body (Fig. 4), corneal scar and retinal scar (Fig. 5). Five dogs

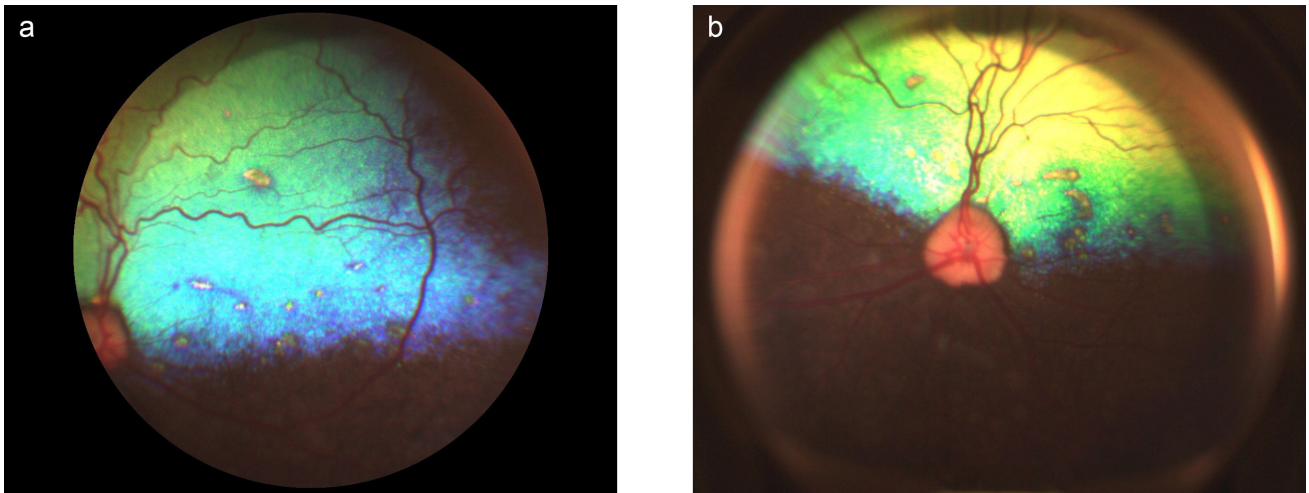


Fig. 3a, b. Multiple lesions in the tapetum fundus in a dog with retinopathy.

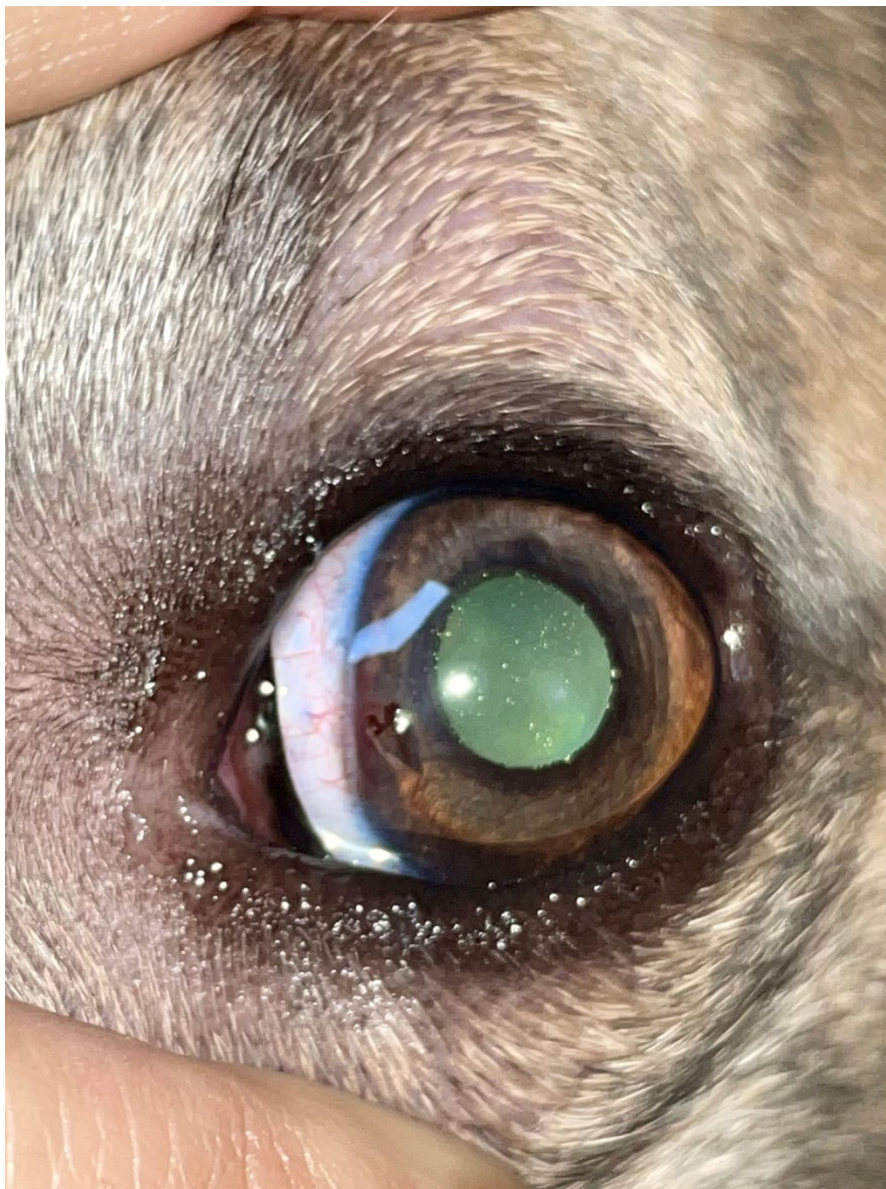


Fig. 4. Corneal foreign body in a Whippet dog.

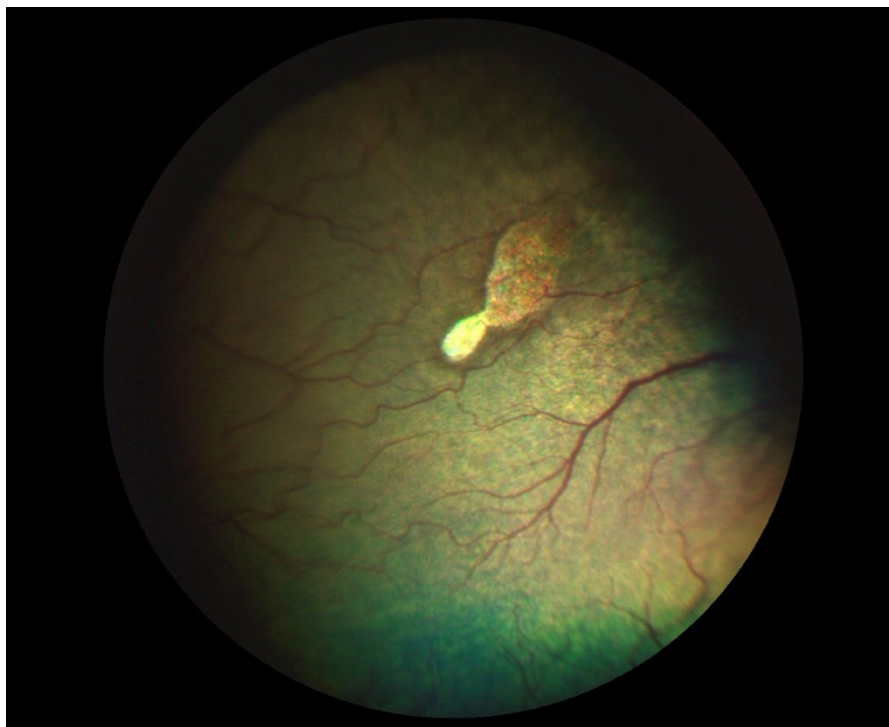


Fig. 5. Retinal scar in a Whippet dog.

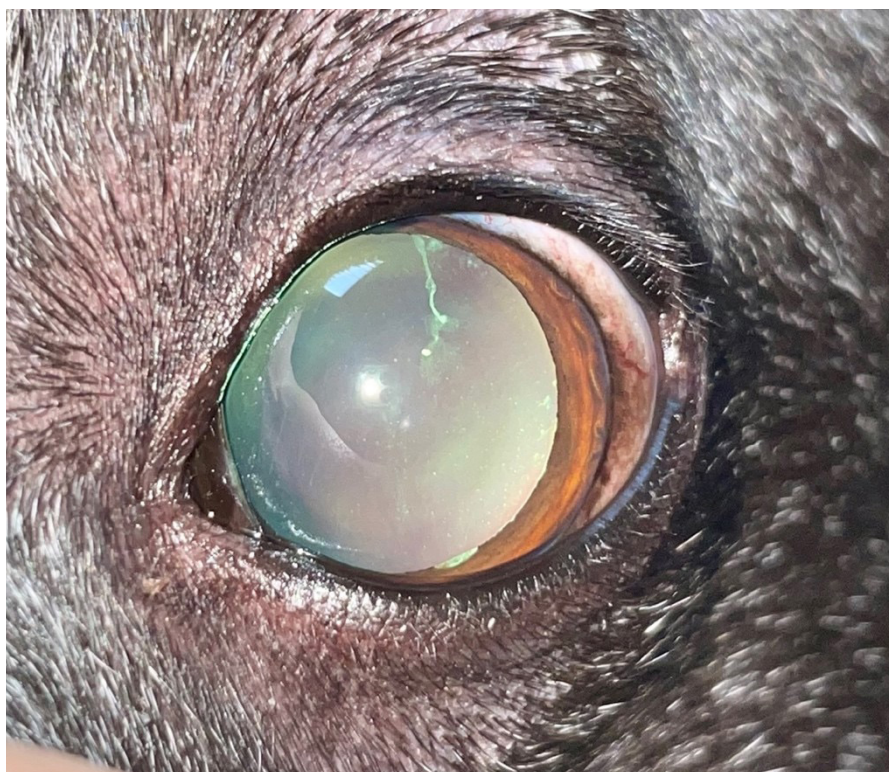


Fig. 6. Vitreous material in the anterior chamber of the eye in a Whippet dog.

presented multiple lesions in at least one eye (Table 1). All defined lesions are listed in Table 2.

Discussion

This is the first study describing the occurrence of ocular lesions in Whippets involved in regular training and competitions. In Poland, despite the popularity of

Table 1. Dogs with multiple lesions.

ID	Age	Sex	Lesions in the right eye	Lesions in the left eye
9	4	F	Pulverulent cataract; vitreous degeneration	Pulverulent cataract; vitreous degeneration
12	6	M	Fiberglass and suture tips cataracts; vitreous degeneration	Fiberglass and suture tips cataracts; vitreous degeneration
27	6	F	Vitreous degeneration	Vitreous degeneration, uveal cyst floating in vitreous chamber, vitreous material in anterior chamber of the eye (Fig. 6)
29	7.5	M	Vitreous degeneration, iris atrophy, nucleosclerosis	Vitreous degeneration, iris atrophy, nucleosclerosis
32	3	F	ALC pigment deposits	ALC pigment deposits, nuclear cataract

ID – identification number of the dog, F – female, M – male, ALC – anterior lens capsule

Table 2. Abnormalities found in the examined dogs.

Abnormality	Number of right eyes affected	Number of left eyes affected	Total number of dogs affected	Median age of dogs (IQR range)
Vitreous degeneration	6	9	9	5 (5-6)
Cataract	Suture tips	3	6	4 (4-5.5)
	Fiberglass and suture tips	1		
	Pulverulent	1		
	Nuclear	0		
Nucleosclerosis	3	3	3	7.17 (7.17-7.25)
Retinopathy (Fig. 2, 3a and 3b)	2	3	3	4 (4-4.5)
Iris atrophy	1	3	3	4 (4-4.875)
ALC pigment deposits	1	2	2	2.75 (2.75-2.67)
Uveal cyst	0	1	1	6
Corneal foreign body (Fig.4)	0	1	1	1.5
Corneal scar	0	1	1	1
Retinal scar (Fig. 5)	0	1	1	1.17

The age is given in years, as median (IQR – InterQuartile Range) if more than one dogs were affected, ALC – anterior lens capsule

this breed, only 161 dogs were officially ranked as sport competitors in 2021 season, thus we have examined the representative population. Ocular abnormalities were diagnosed in 53.3% of the study population, which is very similar to the prevalence (54%) reported by de Olivera et al. (2020) in working dogs in Brasil. Although the tendency that the lesions occur more likely in older dogs and the dogs with lesions have worse sport results can be suspected, in our study these differences were not significant. This lack of differences seems to be related to the fact that the sport carrier of the dogs is limited, so none of the dogs examined in this study was older than 7.5 years and that is why the group was more homogenous regarding the age than groups examined in other ophthalmological studies (Guandalini et al. 2017, Balicki et al. 2021, Palmer et al. 2021, Crasta et al. 2022, Karamatic et al. 2022). Although median ranking points were lower in the dogs with ocular lesions, the difference was not significant

since many other factors (fitness and physical performance) are important for the result. There were dogs without lesions but with poor sport results and dogs with ocular abnormalities and very good results.

In this study we have identified 4 types of abnormalities: vitreous degeneration, cataract, iris atrophy and retinopathy, listed among 8 disorders presented in ECVO section as known or presumed to be inherited in Whippets. Additionally, we have identified senile nucleosclerosis, one uveal cyst, and coincidental corneal foreign body and scars (corneal and retinal). The most common type of ocular anomaly was vitreous degeneration (VD). Vitreous body is a colorless gel containing mainly water – 99% and the remained 1% is formed from collagen fiber, hyaluronic acid and glycosaminoglycans. It removes toxic metabolites from the posterior segment of the eye, protects lens from oxidative damage and is responsible for nutrients diffusion. Changes of its molecular composition result in

degeneration. There are few types of VD described e.g., liquefaction also called syneresis or formation of vitreous floaters, asteroid hyalosis or synchysis scintillans (Bishop et al. 2004). Although VD is a common finding, in recent retrospective study conducted on 1569 whippets, the incidence of it was low, reaching only 5% (Krishnan et al. 2019). In our study vitreous anomalies were found in 20% of dogs. Six dogs had syneresis, 2 syneresis that result in vitreous material in anterior chamber and one dog had extensive vitreous attachment to posterior lens capsule causing marked opacity (Fig. 6). Average age of Whippets with VD was 5 years which corresponds with the study of Krishnan et al. (2019), where authors show a relationship between age and VD. With every 1-year age period there is a 24% higher likelihood of VD development. Similar conclusions can be drawn from a study of 100 retired racing Greyhounds, where 31% of dogs presented with VD (Lynch 2007). Interestingly, although the previously reported prevalence of VD in Whippets was only 5% (Krishnan et al. 2019), in Italian Greyhound which have the same genetic clad as Whippets, it was much higher – 30.5% in Krishnan et al. (2019) study and 46.7% according to Guandalini et al. (2017). In the earlier American project, that enrolled 352 Whippets, the prevalence of VD was 13.6% (Vitreous Degeneration in Whippets 2021) and the authors planned to examine the dogs annually to follow the progression and the outcome of the disease. Kirshanan et al. (2019) study found also a not significant association between cataracts and VD, 2 whippets had lens luxation and none of the dogs had retinal detachment or glaucoma. According to ECVO manual, VD in Whippets can cause secondary glaucoma, lens luxation and retinal detachment (ECVO Manual: Breeds 2021). ECVO manual, however, does not report the prevalence of VD among Whippets and defines the inheritance as unknown. In our study the prevalence of VD was high in comparison to other studies (Krishnan et al. 2019, Vitreous Degeneration in Whippets 2021). However, we have examined only the purebred dogs that regularly trained and competed. Taking into account the fact that 1452 dogs were registered as purebred in 2021, but only selected lines are used for sport activities, the high prevalence of VD in the studied population might have additionally contributed to the hereditary nature of the disease. In Italian Greyhounds the genetic background of VD has already been identified as associated with chromosomal region indicating a recessive disease at the canine chromosome 17 (Kaukonen and Lohi 2018). Four of 9 VD dogs in our study had other ocular anomalies. One had iris atrophy and nucleosclerosis, one had uveal cyst floating in the vitreous chamber and two had cataracts (pulverulent cataract and fiberglass and suture tips cataracts,

respectively). Except of those 2 cases, cataract was diagnosed in 4 other dogs, and it was pulverulent, suture tip and nuclear cataract. These findings do not correspond to ECVO manual where information about equatorial and posterior subcapsular cataract were noted in Whippets. Third most common affected part of the eye in our study was the retina. One dog had a local area of tapetal hyperreflectivity with visible pigment accumulation in the center. Those changes indicate inactive chorioretinitis and if they are small, they are of no visual significance. In 3 dogs there were multifocal small white areas in tapetal fundus. Owners of the dog with most numerous changes have reported vision problems – what indicates not only anatomical but functional problem of the retina with such a change. All 3 dogs with nonspecific retinal changes required further investigation. In Whippets two types of progressive retinal atrophy (PRA) described. One in which hyper reflection around the optic nerve is the first ophthalmological sign and total blindness occurs at the age of 5 years. The second, described by Somma et al. (2016) happens in younger dogs. Clinical signs are visible in few month-old dogs, starting from mild vascular attenuation in the retina and progress to advanced retinal degeneration at the age of 24-36 months. Very young, 1 to 6-month-old, affected dogs exhibited oscillatory nystagmus, which is less apparent with age. Interestingly multiple small retinal bullae were present in 5–8-month-old dogs and they also as nystagmus are less apparent with age (Somma et al. 2016). None of dogs in our study had ophthalmological signs corresponding with PRA. As there is no genetic test for PRA available in Whippets, it is possible that affected individuals were present in the study but have not shown clinical sign yet. Other pathologies seen in the study were iris atrophy and pigment on anterior lens capsule (ALC). Iris atrophy was found in 3 dogs with mean age of 4 years. That indicates rather genetic base than senile changes. Senile changes in the lens (nucleosclerosis) were observed in 2 cases. Coincidental finding was corneal foreign body (Fig. 4). Owners observed excessive tearing and squinting in this eye, but as clinical signs resolved, they did not decide to get a veterinary consult. Corneal foreign bodies are mostly found in young, active dogs, so 1.5-year-old Whippet perfectly fits to those description (Pont et al. 2015). A piece of plant was removed in local anesthesia and meds for corneal ulcers were prescribed.

All dogs examined in this study were emmetropic, so the eyes were free of refractive error. It means that the optic with no accommodation - without the tension of the ciliary muscles – is able to focus light rays exactly on the retina. The most common refractive disorders are myopia and hyperopia. Most dogs are emme-

tropic which corresponds with our study. All of dogs fit to the range $-0.5D$ to $+0.5D$. Predisposition of refractive errors is described in different breeds. Some of them have tendency to be myopic e.g. Miniature Schnauzers or Rottweilers others to be hyperopia, e.g. Bouvier des Flandres or Alaskan Malamute (Murphy et al. 1997, Kubai et al. 2008). Brazilian working dogs described by de Oliveira et al. (2020) tended to be myopic, except for guided dogs (Retrievers) and tracking dogs (Belgian Malinois, Bloodhound and German Shepherd) who were rather emmetropic. The main limitations of this study were the small group (although representative for the sport population) and the fact that only one examination was performed, so there were no data regarding the progression of the disease. Since more than half of the examined population presented ocular abnormalities, we can postulate that ophthalmological examination in sport Whippets should receive more attention. In conclusion, ophthalmic abnormalities are common among Whippets practicing coursing. At the same time, it seems that noted ocular disorders do not negatively affect the results achieved by the dogs during coursing competitions. Nevertheless, it is worth performing further research on a larger group of dogs to confirm this hypothesis.

References

- Act of 15 January **2015** on the protection of animals used for scientific or educational purposes, art 1.2 (5), Dz.U.2018.0.1207 <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20150000266/U/D20150266Lj.pdf> (Accessed on 3 February 2023)
- Act of 13 October **1995** on hunting law, Dz. U. 1995 Nr 147 poz. 713 <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU19951470713/U/D19950713Lj.pdf> (Accessed on 3 February 2023)
- Balicki I, Goleman M, Balicka A (2021) Ocular Abnormalities in Polish Hunting Dogs. *Plos One* 5; 16(11): e0258636
- Bishop PN, Holmes DF, Kadler KE, Mcleod D, Bos KJ (2014) Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 45: 1041-1046
- Coursing Polish Cup Results, **2021** <https://coursing24.eu/cupResultsPublic/2> (Accessed on 5 January 2023).
- Crasta M, Arteaga K, Barachetti L, Guandalini A (2022) A multicenter retrospective evaluation of the prevalence of known and presumed hereditary eye diseases in Lagotto Romagnolo dog breed within a referral population in Italy (2012-2020). *Vet Ophthalmol* 25: 426-433
- Day G, Powers M, Gyes N, Plummer L (2015) Visual Disorders in Agility Dogs with Jumping Problems. <http://www.awesomepaws.us/wp-content/uploads/2015/04/canine-vision-project.pdf> (Accessed on 3 February 2023)
- de Oliveira JK, Bortolini M, Schaller M, Schuchmann RK, Moore BA, Montiani-Ferreira F (2020) The ophthalmic health and refractive state of working dogs in South Brazil. *Open Vet J* 10: 22-30.
- ECVO Manual: Breeds, **2021** <https://www.ecvo.eu/media/whippet.pdf> (Accessed on 3 February 2023)
- FCI International Guidelines for Lure Coursing Judges. www.fci.be (Accessed on 3 February 2023)
- Guandalini A, Di Girolamo N, Corvi R, Santillo D, Andreani V, Pinzo B (2017) Epidemiology of ocular disorders presumed to be inherited in three small Italian dog breeds in Italy. *Vet Ophthalmol* 21: 524-529.
- Hodowle – Whippet w Polsce (2022) <http://www.whippet.topcharty.net/hodowle.php> (Accessed on 11 November 2022)
- Karamatic S, Goode R, Bageswaran N, Willet CE, Samaha G, Ferguson R, Mazrier H, Wade CM (2022) Genome-Wide Association Analysis for Chronic Superficial Keratitis in the Australian Racing Greyhound. *Genes* 13: 1328.
- Kaukonen M, Lohi H (2018) Clinical and Genetic Characterization of Canine Vitreous Degeneration. ARVO Annual Meeting, Honolulu, Hawaii. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59: 6042.
- Krishnan H, Diehl K, Stefanovski D, Aguirre GD (2019) Vitreous degeneration and associated ocular abnormalities in the dog. *Vet Ophthalmol* 23: 219-224.
- Kubai MA, Bentley E, Miller PE, Mutti DO, Murphy CJ (2008) Refractive states of eyes and association between ametropia and breed in dogs. *Amer J Vet Res* 69: 946-951.
- Lynch GL (2007) Ophthalmic examination findings in a group of retired racing Greyhounds. *Vet Ophthalmol* 10: 363-367.
- Murphy CJ, Zodnik K, Mannis MJ (1997) Myopia and Refractive Error in Dogs. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 33: 2459-2463.
- Palmer SV, Gomes FE, McArt JA (2021) Ophthalmic disorders in a referral population of seven breeds of brachycephalic dogs: 970 cases (2008-2017). *J Am Vet Med Assoc* 259: 1318-1324.
- Pont TR, Matas Riera M, Newton R, Donaldson D (2016) Corneal and anterior segment foreign body trauma in dogs: a review of 218 cases. *Vet Ophthalmol* 19: 386-397.
- Somma AT, Moreno JC, Sato MT, Rodrigues BD, Bacellar-Galdino M, Occelli LM, Petersen-Jones SM, Montiani-Ferreira F (2017) Characterization of a novel form of progressive retinal atrophy in Whippet dogs: a clinical, electroretinographic, and breeding study. *Vet Ophthalmol* 20: 450-459.
- Vitreous Degeneration in Whippets (2021) <https://www.akcchf.org/research/research-portfolio/0011.html> (Accessed on 9 January 2023)

Title of manuscript: Exercise-induced haematological and blood lactate changes in whippets practicing training for lure- coursing

Author/Authors: Katarzyna Miazga, Olga Szaluś-Jordanow, Michał Czopowicz, Magdalena Żmigrodzka, Olga Witkowska-Piłaszewicz, Agata Moroz-Fik, Marcin Mickiewicz, Jacek Wilczak, Anna Cywińska

Author's Contribution to the Article

Please list all authors of this work and a brief description of how they each contributed towards your submission (e.g. conception or design of the work, the acquisition, analysis, or interpretation of data, etc):

Author(s) name	Contribution to the manuscript	(%)
Katarzyna Miazga	Designed the study, collected data, analysed data, wrote the manuscript	65
Olga Szaluś-Jordanow	Designed the study, collected data	6
Michał Czopowicz	Performed analysis, analysed data, wrote the manuscript	8
Magdalena Żmigrodzka	Contributed to the study design, collected data	6
Olga Witkowska-Piłaszewicz	Contributed to the study design, Collected data	4
Agata Moroz-Fik	Collected data	1
Marcin Mickiewicz	Collected data	1
Jacek Wilczak	Supervised the project	1
Anna Cywińska	Designed of the study, collected data, analysed data, wrote the manuscript	8

Ułobymie
Miazga
dw - m
25.09.2023
Zmigrodzka
Witkowska-Piłaszewicz
25.09.23
Moroz-Fik
Mickiewicz
M
Anna Cywińska

„Ghostwriting” and „Guest Authorship” Statements

I, Katarzyna Miazga, declare that „ghostwriting” (i.e. the exclusion of qualified individuals from inclusion as authors or contributors) and „guest authorship” (i.e. the inclusion as authors of individuals who do not qualify as such) do not take place according to the recommendations of Ministry of Science and Higher Education (MNiSW) concerning preventing from „ghostwriting” and „guest authorship”.

„Financial Disclosure” Statement

The source of funding of research and the article were:

- University/Institute/Employer funds
- Research/Project grant
- Own funds of author/authors
- Other

Author (s) name

Date

Signature

Katarzyna Miazga

23.02.2023

U. Miazga

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt.

Metabolomic analysis indicated changes in triacylglycerols' levels as a result of training in Whippet dogs. Miazga K., Kopczyńska K., Szaluś-Jordanow O., Moroz-Fik A., Wilczak J., Barszcz K., Cywińska A. Sci Rep. 2023; 13(1):18223

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Data i podpis współautora
Katarzyna Miazga	65	27.02.2024 Katarzyna Miazga
Klaudia Kopczyńska	6	27.02.2024 Klaudia Kopczyńska
Olga Szaluś-Jordanow	7	21.02.24 Olga Szaluś-Jordanow
Agata Moroz-Fik	1	28.02.24 Moroz-Fik
Jacek Wilczak	7	20.03.2024 Jacek Wilczak
Karolina Barszcz	7	27.02.2024 Karolina Barszcz
Anna Cywińska	7	Anna Cywińska 20.03.24.

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt.

Ocular abnormalities in Whippets practicing lure coursing in Poland. Miazga K.,

Tomkowicz A., Cywińska A., Wilczak J., Pol J Vet Sci. 2024; 27(1) 5-12.

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Data i podpis współautora
Katarzyna Miazga	65	12.03.2024 Katarzyna Miazga
Aleksandra Tomkowicz	25	Tomkowi 12/03/2024
Jacek Wilczak	1	Wilczak 20.03.24
Anna Cywińska	9	Anna Cywińska 20.03.24