

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Medicina Veterinaria

Weterynaria

6(2) 2007



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Medicina Veterinaria*

Miroslav Baran (Koszyce, Słowacja), Ryszard Bobowiec (Lublin),
Carlos Castrillo (Saragossa, Hiszpania), Andrzej Depta (Olsztyn),
Øystein Sjaastad (Oslo, Norwegia), Jacek Szczawiński (Warszawa),
Wojciech Zawadzki (Wrocław) – przewodniczący,
Agnieszka Kwiatkowska (Wrocław) – sekretarz

Korekta
Janina Szydłowska

Łamanie
Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644-0676

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2007

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel./fax (071) 328–12–77
e-mail: wyd@ozi.ar.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 300 + 16 egz. Ark. druk. 5,5
Drukarnia: F.P.H. „ELMA”

POZIOM AMINOKWASÓW EGZOGENNYCH W ŚCIANIE JELITA CIENKIEGO, WĄTROBIE I OSOCZU KRWI KURCZĄT PO ZASTOSOWANIU WITAMIN ROZPUSZCZALNYCH W WODZIE

Barbara Badzian

Akademia Rolnicza w Lublinie

Streszczenie. Celem pracy było wykazanie wpływu witamin rozpuszczalnych w wodzie: B₁, B₂, B₆, C, kwasu foliowego, kwasu pantotenowego, kwasu nikotynowego, biotyny, cholicy na poziom aminokwasów egzogennych w ścianie jelita cienkiego, wątrobie i osoczu krwi kurcząt. Badania przeprowadzono na 160 kurczętach brojlerach, rasy Hybro G w wieku 2-4 miesięcy. Wchłanianie aminokwasów określano metodą perfuzjowanej pętli jelitowej *in vivo*. Przez pętlę przepuszczano płyn fizjologiczny {30 min, (10 ml/min)}, do którego dodawano aminokwasy egzogenne, takie jak: L-treoninę, L-walinę, L-metioninę, L-izoleucynę, L-leucynę, L-feniloalaninę, L-histydynę, L-lizynę oraz poszczególne witaminy rozpuszczalne w wodzie osobno lub łącznie. Następnie oznaczano poziom aminokwasów w ścianie jelita, wątrobie i osoczu krwi metodą chromatografii kolumnowej za pomocą aparatu Amino Acid Analyzer T 339 M. Tkanki przed oznaczeniami poddawano hydrolizie kwaśnej.

Badania wykazały, że witaminy rozpuszczalne w wodzie wywierają niewątpliwy wpływ na wchłanianie aminokwasów egzogennych z przewodu pokarmowego u kurcząt. W ścianie kieszonki jelitowej największe zmiany obserwowano po zastosowaniu witaminy B₆, najslabsze działały: biotyna, kwas foliowy i kwas pantotenowy. W wątrobie każda z zastosowanych witamin osobno, ale także łącznie powodowała znaczne podniesienie poziomu badanych aminokwasów. W osoczu obserwowano podwyższoną zawartość aminokwasów po użyciu witamin rozpuszczalnych w wodzie podanych łącznie oraz po witaminach B₆ kwasie pantotenowym i biotynie.

Słowa kluczowe: wchłanianie, witaminy rozpuszczalne w wodzie, aminokwasy egzogenne, kurczęta

WSTĘP

Wchłanianie aminokwasów w jelicie odbywa się na drodze transportu czynnego, zachodzącego przeciwko gradientowi stężeń, który prowadzi do nagromadzenia się aminokwasów w enterocytach, skąd na drodze dyfuzji biernej lub zgodnie z gradientem stężeń przedostają się one do płynów ustrojowych [Gazzola i in. 1980, King i in. 1981, Sklan i in. 2000]. W błonie jelitowej istnieje szereg mechanizmów transportujących aminokwasy. Niektóre z nich do transportu wymagają sodu (aminokwasy obojętne, jak na przykład: treonina, metionina, walina, izoleucyna, leucyna, fenyloalanina), inne współzawodniczą między sobą o przerośnik (lizyna, arginina) [Ferruzza i in. 1997]. Źródłem energii dla pompy sodowej jest ATP, który stanowi siłę napędową transportu czynnego [Branson i in. 1994, Brosnan 2003, Gonzales i in. 1996, Konturek 1976].

Inną grupę związków niezbędnych dla życia stanowią witaminy zarówno rozpuszczalne w wodzie, jak i rozpuszczalne w tłuszczach. Do grupy rozpuszczalnych w wodzie należą witaminy: B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, kwas pantotenowy, kwas foliowy, kwas nikotynowy, biotyna, cholina. Spełniają one szereg istotnych funkcji w organizmie, biorąc udział w wielu przemianach biochemicznych we wszystkich tkankach ustroju [Bender 1989, Chapman-Smith i in. 1999, Flynn i in. 2003, Herbert 1999, Nat. Acad. Press 1998, Lechowski i in. 1995, Madej i in. 2000, Manroe 2000]. Organizmy wyższe syntetyzują w przewodzie pokarmowym niektóre witaminy, ale w przypadku rozpuszczalnych w wodzie tylko niewielkie ich ilości są magazynowane w ustroju, w związku z czym muszą być stale dostarczane z pokarmem. Ich niedobór jest bardzo niekorzystnym stanem dla organizmu, objawiającym się zaburzoną funkcjonalnością różnych narządów [Flynn i in. 2003, Haslam i in. 1998, Madej i in. 2000, Mahmood i in. 1984, Turczynowski i in. 2000]. Wchłanianie witamin rozpuszczalnych w wodzie zależy od wielkości ich cząsteczek. Niskocząsteczkowe witaminy, takie jak C i B₆, wchłaniają się szybko w jelicie na drodze dyfuzji biernej. Witamina B₂ wchłania się przy udziale przerośnika, na drodze dyfuzji lub transportu czynnego. Kwas foliowy i cholina wchłaniają się w zależności od ich stężeń, przy niskim odbywa się to na drodze transportu czynnego, przy wysokim – dyfuzji biernej. Do wchłaniania kwasu nikotynowego niezbędny jest z kolei sód i energia [Chatterjee i in. 1999, Fenstermacher i in. 1986, Heard i in. 1986, Mason i in. 1988, Stein i in. 1994, Szymański 1998].

Pomiędzy wieloma aminokwasami a witaminami istnieją różne zależności metaboliczne, na przykład między tryptofanem i kwasem nikotynowym, metioniną i choliną. Witamina B₆ bierze z kolei udział w metabolizmie treoniny i tryptofanu, biotyna uczestniczy w rozkładzie izoleucyny i leucyny [Baker i in. 1999, Pisulewski i in. 2002]. Pomiędzy samymi aminokwasami dochodzi także do pewnych interakcji, między innymi konkurencji o przerośnik lub wpływ jednych na absorpcję innych. Metionina i leucyna stymulują transport lizyny i argininy, izoleucyna natomiast obniża absorpcję waliny, treoniny i histydyny. Wzrost koncentracji metioniny podnosi wchłanianie lizyny i argininy, leucyna działa zaś odwrotnie na wchłanianie lizyny i argininy. Glicyna i alanina obniżają wchłanianie metioniny, natomiast te trzy aminokwasy zastosowane łącznie obniżają absorpcję histydyny. Z wcześniejszych doniesień wynika, że podawanie łączne witamin B₁, B₂, B₆, C powodowało wzrost wchłaniania waliny, lizyny i metioniny [Annegers 1969, Baker i in. 1999, Baker i in. 2002, Buraczewska 1981, Nagórna-Stasiak i in. 1997, Pisulewski i in. 2002, Shibata i in. 1995].

CEL PRACY

Celem pracy było określenie poziomu aminokwasów egzogennych, takich jak: treonina, walina, metionina, izoleucyna, leucyna, fenyloalanina, histydyna i lizyna w ścianie jelita cienkiego, wątrobie i osoczu krwi kurcząt, po wykonaniu pętli perfuzyjnej jelita cienkiego i przepuszczenia przez nią witamin rozpuszczalnych w wodzie. Zarówno aminokwasy, jak i witaminy są niezbędnymi do życia i prawidłowego funkcjonowania organizmu składnikami pokarmowymi, a ich wzajemne zależności we wchłanianiu nie są do końca poznane. Dlatego też w niniejszej pracy próbowano określić, czy i jak witaminy mogą wpływać na wchłanianie aminokwasów egzogennych w przewodzie pokarmowym.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 160 kurczętach brojlerach, w wieku 2-4 miesięcy, obu płci rasy Hybro G, pochodzących z fermi drobiu w Mełgwi koło Lublina. Kurczęta utrzymywano w standardowych warunkach hodowlanych ze stałym dostępem do paszy i wody. Ptaki karmione były przez cały okres doświadczenia mieszanką DKA grower (Agropol). Wchłanianie aminokwasów z jelita cienkiego badano *in vivo* metodą perfuzjowanej pętli jelitowej [Gardner 1978, Gonzales i in. 1996, Nys i in. 1982]. W celu wykonania pętli jelitowej kurczęta usypiano Vetbutalem (Biowet Puławy) w dawce 0,5-1,0 ml, który był podawany dootrzewnowo i pozwalał na uzyskanie stanu uśpienia w początkowej fazie doświadczenia, polegającej na otwarciu jamy brzusznej i wyosobnieniu 10-centymetrowego odcinka jelita czczego (poczynając od około 20 cm za pętlą dwunastniczą). Wyosobniony odcinek jelita był nadal połączony z krezką jelitową, co pozwalało na uzyskanie prawidłowego ukrwienia. Do obu końców wyosobnionej pętli jelitowej zakładano dwie kaniule gumowe, a następnie umieszczano ją ponownie w jamie brzusznej, co zapewniało utrzymanie odpowiedniej temperatury i wilgotności jelita. W dalszej części doświadczenia kurczęta pozostawały w stanie lekkiej narkozy. Następnie przez tak wyosobniony odcinek jelita przepuszczano 30 ml płynu fizjologicznego (0,9% NaCl) o temperaturze 39 °C za pomocą pompy perystaltycznej firmy Zalimp PP 2B-15 z szybkością 10 ml/minutę przez okres 30 minut [Stein i in. 1994, Szymański 1998]. Do płynu dodano aminokwasy egzogenne: L-treoninę, L-walinę, L-metioninę, L-izoleucynę, L-leucynę, L-fenyloalaninę, L-histydynę, L-lizynę. Do doświadczenia użyto aminokwasów cz.d.a. (Merck). Aminokwasy były podawane łącznie w następujących ilościach:

L-treonina	20 mg/30 ml płynu = 0,67g/l
L-walina	20 mg/30 ml płynu = 0,67g/l
L-metionina	10 mg/30 ml płynu = 0,33g/l
L-izoleucyna	20 mg/30 ml płynu = 0,67g/l
L-leucyna	40 mg/30 ml płynu = 1,33g/l
L-fenyloalanina	20 mg/30 ml płynu = 0,67g/l
L-histydyna	10 mg/30 ml płynu = 0,33g/l
L-lizyna	30 mg/30 ml płynu = 1,00g/l
Łącznie	170 mg/ 30 ml płynu =5,70g/l

W drugiej serii doświadczeń do roztworu zawierającego aminokwasy dodawano łącznie lub oddzielnie witaminy rozpuszczalne w wodzie, takie jak: witaminę B₁, witaminę B₂, witaminę B₆, witaminę C, kwas foliowy, kwas nikotynowy, kwas pantotenowy, biotynę i cholinę w ilości 100 mg/l. W doświadczeniu użyto witamin cz.d.a. (Sigma). Po zakończeniu doświadczenia i pobraniu krwi do probówek z heparyną kurczęta uśmiercano przez dekapitację. Do dalszych badań pobierano odcinek jelita cienkiego z pętli jelitowej i wątrobę. Krew wirowano i do dalszych oznaczeń wykorzystywano osocze.

Przygotowanie tkanek do oznaczeń

W uzyskanym podczas doświadczenia materiale oznaczano poziom aminokwasów egzogennych. Tkanki były poddawane hydrolizie kwaśnej według Davies i Thomas [Davies i in. 1973]. Po umieszczeniu próby (wątroba 150 mg, jelito 180 mg, osocze 1,0 ml) w 20 ml ampułkach szklanych zalewano ją 6N kwasem solnym (HCl), a następnie wysycano azotem. Hydrolizę przeprowadzano przez 20 godzin w temp. 110 °C. Zawartość ampułek po hydrolizie schładzano do temperatury pokojowej, a po otwarciu sączono przez lejek G-5. Przesącz uzupełniano w kolbie miarowej wodą destylowaną do 50 ml. Następnie pobierano 4 ml hydrolizatu, dodawano 1,0 ml standardu wewnętrznego norleucyny (5µmol/ml) i odparowywano w wyparce próżniowej w temp. 50 °C.

W celu oznaczenia aminokwasów siarkowych proces hydrolizy tkanek prowadzono według Schramm i Moor [Schramm i in. 1954]. Metioninę utleniało do sulfonu metioniny stosując kwas nadmanganowy, który uzyskiwano odmierzając do jednej probówki 30% wodę utlenioną, do drugiej 99,9% kwas mrówkowy. Płyny ogrzewano do 50 °C, mieszano i po upływie 3 minut chłodzono do temperatury pokojowej. Tak otrzymanym kwasem nadmanganowym zalewano próbę, którą następnie przetrzymywano przez 12 godzin w temperaturze -10 °C. Po tym czasie próbę zalewano 1,0 ml 40% kwasu bromowodorowego (HBr), mieszano i następnie całość przenoszono do kolbki i zagęszczano na wyparce próżniowej w temp. 50 °C do uzyskania mazistej pozostałości, którą przemywano 2,0 ml wody destylowanej i ponownie odparowywano. Suchą pozostałość przemywano 6N HCl, przenoszono do ampułki o pojemności 20 ml i hydrolizowano przez 20 godzin w temperaturze 110 °C. W tak przygotowanych hydrolizatach metodą chromatograficzną oznaczano zawartość poszczególnych aminokwasów.

Stężenie aminokwasów w ścianie pętli jelitowej, wątrobie i osoczu oznaczano metodą chromatografii kolumnowej za pomocą aparatu Amino Acid Analyzer T 339 M (Microtechna Praha) na kolumnie o długości 35 cm i średnicy 5 mm [Bertolt i in. 2000, Tessari i in. 1996]. Wypełnienie kolumny stanowiła silnie kwasowo-kationowa żywica jonitowa w postaci drobnych perełek. Czas analizy wynosił 135 minut. Dla uwzględnienia różnic statystycznych wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta programu Statistica (wersja 6:0).

WYNIKI I Dyskusja

Zawartość aminokwasów egzogennych w ścianie jelita cienkiego po zastosowaniu witamin rozpuszczalnych w wodzie w ilości 100 mg/l

Po zastosowaniu witaminy B₁ obserwowano w ścianie jelita wyższy poziom: treoniny, waliny, metioniny i izoleucyny (tab. 1). Po witaminie B₂ ilość aminokwasów egzogennych w ścianie jelita kurczą grupy doświadczalnej wzrosła w przypadku treoniny, waliny, leucyny i są to zmiany istotne statystycznie (tab. 1). Po witaminie B₆ wzrastał poziom treoniny, waliny, izoleucyny i leucyny, zaś zawartość pozostałych badanych aminokwasów była niższa niż w grupie kontrolnej (tab. 1). Ilość aminokwasów w ścianie jelita po użyciu witaminy C wzrosła w stosunku do grupy kontrolnej w przypadku treoniny, waliny, izoleucyny i leucyny. Poziom pozostałych aminokwasów był zaś niższy niż w grupie kontrolnej (tab. 1). Zastosowanie biotyny podniosło poziom trzech badanych aminokwasów w ścianie jelita grupy doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną, to jest: treoniny i była to różnica statystycznie istotna, natomiast waliny i izoleucyny bez różnic potwierdzonych statystycznie (tab. 1). Po użyciu cholinyl nastąpił wzrost ilości treoniny, waliny, izoleucyny i leucyny. Zawartość pozostałych aminokwasów w grupie doświadczalnej była niższa niż w grupie kontrolnej (tab. 1). Zawartość badanych aminokwasów w ścianie jelita po zastosowaniu kwasu foliowego była niższa w porównaniu z grupą kontrolną w każdym przypadku (tab. 1). Zastosowanie kwasu pantotenowego spowodowało podniesienie poziomu treoniny, waliny, metioniny, izoleucyny i leucyny. Niższy poziom aminokwasów w porównaniu z grupą kontrolną wystąpił w przypadku fenyloalaniny, histydyny i lizyny i były to zmiany istotne statystycznie (tab. 1). Zawartość badanych aminokwasów w ścianie jelita po podaniu kwasu nikotynowego wzrosła najwyraźniej w porównaniu z grupą kontrolną w przypadku waliny i metioniny, nieznacznie zaś w odniesieniu do treoniny i izoleucyny (tab. 1). Witaminy rozpuszczalne w wodzie zastosowane łącznie spowodowały ewidentny wzrost ilości treoniny, waliny, metioniny, izoleucyny, fenyloalaniny i były to zmiany statystycznie istotne. Poziom pozostałych badanych aminokwasów był także wyższy niż w grupie kontrolnej, ale nie wykazywał zmian statystycznie istotnych (tab. 1). Łączne podanie witamin rozpuszczalnych w wodzie wraz z aminokwasami spowodowało, że w ścianie jelita było w sumie więcej aminokwasów niż po przepływie ich samych (tab. 1).

Zawartość aminokwasów egzogennych w wątrobie po zastosowaniu witamin rozpuszczalnych w wodzie w ilości 100 mg/l

Stwierdzono znaczne zmiany w poziomie aminokwasów egzogennych w wątrobie po zastosowaniu witamin rozpuszczalnych w wodzie. Ilość wszystkich badanych aminokwasów była wyraźnie wyższa niż w grupie kontrolnej, w żadnym przypadku nie obserwowano niższej ich zawartości. Najbardziej podatnym aminokwasem, którego ilość w wątrobie po zastosowaniu witamin znacznie wzrosła, była leucyna. W przypadku histydyny zastosowanie witamin B₁ i B₆ nie zmieniło jej zawartości (była identyczna jak w grupie kontrolnej), podobnie zmianie nie ulegał poziom treoniny po podaniu kwasu nikotynowego (tab. 2).

Tabela 1. Zawartość (%) aminokwasów w ścianie jelita cienkiego po zastosowaniu witamin rozpuszczalnych w wodzie w ilości 100 mg/l
 Table 1. Amino acids contents (%) in the wall intestine after application water soluble vitamins

AMINOKWAS AMINO ACID	Kontrola Control	Wit. B ₁ Thiamin	Wit. B ₂ Riboflavin	Wit. B ₆ Pyridoxine	Wit. C Vitamin C	Biotyna Biotin	Cholina Cholin	Kwas foliowy Folic acid	Kwas pantoteno- wy Panthotenic acid	Kwas nikotynowy Nicotine acid	Witaminy łącznie Vitamins together
L-Treonina L-Threonine	4,0 ± 0,2*	5,2 ± 0,1*	6,7 ± 0,2*	5,0 ± 0,1*	5,2 ± 0,1*	4,7 ± 0,2*	5,5 ± 0,2*	3,3 ± 0,2*	4,7 ± 0,3*	4,1 ± 0,2	4,9 ± 0,2*
L-Walina L-Valine	2,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,1*	3,5 ± 0,1*	3,5 ± 0,1*	3,0 ± 0,2	3,6 ± 0,2*	2,1 ± 0,1*	3,3 ± 0,2	4,5 ± 0,2*	3,5 ± 0,3*
L-Metionina L-Methionine	3,5 ± 0,2*	4,8 ± 0,1*	3,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1*	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1*	2,0 ± 0,2*	4,8 ± 0,3*	4,9 ± 0,3*	4,5 ± 0,1*
L-Izoleucyna L-Isoleucine	2,2 ± 0,2*	2,9 ± 0,2*	2,4 ± 0,1	3,7 ± 0,2*	2,5 ± 0,3	2,3 ± 0,1	2,8 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,8 ± 0,2*	2,5 ± 0,2	3,9 ± 0,2*
L-Leucyna L-Leucine	6,9 ± 0,3	6,1 ± 0,1	8,6 ± 0,2*	7,4 ± 0,1*	7,5 ± 0,2*	6,6 ± 0,3	8,2 ± 0,3*	5,4 ± 0,1*	7,5 ± 0,4*	6,2 ± 0,1	7,1 ± 0,1
L-Fenylalanina L-Phenylalanine	4,6 ± 0,2	3,4 ± 0,2*	4,4 ± 0,1	4,1 ± 0,2	3,2 ± 0,2*	3,3 ± 0,1*	4,3 ± 0,3	2,1 ± 0,1*	3,5 ± 0,2*	3,0 ± 0,1*	5,0 ± 0,3*
L-Histydyna L-Histidine	3,8 ± 0,1	2,1 ± 0,2*	2,9 ± 0,2	2,0 ± 0,1*	1,9 ± 0,3*	1,9 ± 0,2*	3,0 ± 0,2*	1,8 ± 0,2*	2,9 ± 0,1*	2,3 ± 0,2*	4,2 ± 0,2
L-Lizyna L-Lysine	6,4 ± 0,2*	4,4 ± 0,1*	5,5 ± 0,1	4,5 ± 0,4	4,9 ± 0,2	4,6 ± 0,2*	6,0 ± 0,4	3,5 ± 0,1*	4,8 ± 0,1*	3,7 ± 0,3*	6,6 ± 0,1
SUMA AMOUNT	34,2	32,3	37,8	32,4	31,7	29,5	35,6	22,1	34,3	31,2	39,7

* zaznaczone różnice są statystycznie istotne przy p≤0,05
 statistically significant different at p≤0,05

Tabela 2. Zawartość (%) aminokwasów egzogennych w wątrobie po zastosowaniu witamin rozpuszczalnych w wodzie w ilości 100 mg/l
 Table 2. Amino acids contents (%) in liver after application water soluble vitamins

AMINOKWAS AMINO ACID	Kontrola Control	Wit. B ₁ Thiamin	Wit. B ₂ Riboflavin	Wit. B ₆ Pyridoxin	Wit. C Vitamin C	Biotyna Biotin	Cholina Cholin	Kwas foliowy Folic acid	Kwas pantotenowy Panthotenic acid	Kwas nikotynowy Nicotinic acid	Witamina łącznie Vitamins together
L-Treonina L-Threonine	3,3 ± 0,2*	5,1 ± 0,2*	4,3 ± 0,2*	4,7 ± 0,2*	3,8 ± 0,2*	5,5 ± 0,2*	5,8 ± 0,2*	5,2 ± 0,2*	3,9 ± 0,2*	3,3 ± 0,3	5,9 ± 0,3*
L-Walina L-Valine	1,8 ± 0,1*	3,9 ± 0,2*	3,5 ± 0,1*	3,8 ± 0,2*	3,1 ± 0,1*	4,9 ± 0,2*	4,9 ± 0,2*	4,9 ± 0,2*	3,6 ± 0,2*	3,1 ± 0,2*	4,5 ± 0,2*
L-Metionina L-Methionine	2,2 ± 0,2*	3,3 ± 0,2*	2,6 ± 0,2	3,9 ± 0,2*	2,7 ± 0,1	3,3 ± 0,1*	2,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1*	2,7 ± 0,3	3,1 ± 0,2*	4,7 ± 0,2*
L-Izoleucyna L-Isoleucine	1,2 ± 0,3*	2,8 ± 0,2*	2,8 ± 0,2*	3,4 ± 0,1*	2,7 ± 0,2*	3,4 ± 0,1*	3,8 ± 0,2*	4,0 ± 0,2*	2,9 ± 0,1*	2,8 ± 0,2*	3,4 ± 0,3*
L-Leucyna L-Leucine	4,8 ± 0,4*	7,8 ± 0,2*	7,6 ± 0,3*	7,1 ± 0,2*	7,2 ± 0,2*	9,5 ± 0,2*	9,5 ± 0,1*	8,7 ± 0,2*	7,7 ± 0,2*	7,1 ± 0,2*	10,3 ± 0,3*
L-Fenylalanina L-Phenylalanine	2,8 ± 0,2*	3,3 ± 0,3	3,9 ± 0,2*	3,7 ± 0,2*	3,7 ± 0,1*	5,4 ± 0,2*	4,6 ± 0,2*	4,1 ± 0,1*	4,1 ± 0,3*	3,9 ± 0,3*	4,8 ± 0,2*
L-Histydyna L-Histidine	1,9 ± 0,1*	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,3	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1	2,8 ± 0,2*	2,9 ± 0,2*	3,0 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*	2,9 ± 0,1*
L-Lizyna L-Lysine	3,6 ± 0,3*	4,3 ± 0,1*	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,2	5,7 ± 0,3*	6,8 ± 0,1*	6,3 ± 0,2*	5,2 ± 0,2*	5,3 ± 0,2*	5,1 ± 0,3*	6,8 ± 0,3*
SUMA AMOUNT	21,6	32,4	31,2	32,7	31,2	41,6	40,3	38,6	32,9	31,1	43,3

* zaznaczone różnice są statystycznie istotne przy p ≤ 0,05 (n=6)
 statistically significant different at p ≤ 0,05

Tabela 3. Zawartość (%) aminokwasów w osoczu po zastosowaniu witamin rozpuszczalnych w wodzie w ilości 100 mg/l
 Table 3. Amino acids contents (%) in blood serum after application water soluble vitamins

AMINOKWAS AMINO ACID	Kontrola Control	Wit. B ₁ Thiamin	Wit. B ₂ Riboflavin	Wit. B ₆ Pyridox- ine	Wit. C Vitamin C	Kwas foliowy Folic acid	Kwas panto- tenowy Panthotenic acid	Kwas nikotynowy Nicotine acid	Biotyna Biotin	Cholina Cholin	Witaminy łącznie Vitamins together
L-Treonina											
L-Threonine	2,4 ± 0,3	1,9 ± 0,2	3,5 ± 0,4*	3,3 ± 0,3*	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,3	3,9 ± 0,2*	3,6 ± 0,1*	3,9 ± 0,1*	2,9 ± 0,4*	3,8 ± 0,3*
L-Valina											
L-Valine	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,3	2,1 ± 0,2*	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,4*	1,6 ± 0,4*	1,8 ± 0,2*	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2
L-Metionina											
L-Methionine	0,7 ± 0,3*	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2*	0,8 ± 0,3	3,6 ± 0,2*
L-Izoleucyna											
L-Isoleucine	0,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2*	0,9 ± 0,3	1,2 ± 0,3*	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,3*	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,4*
L-Leucyna											
L-Leucine	2,8 ± 0,2*	2,7 ± 0,3	4,2 ± 0,4*	9,7 ± 0,4*	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,3	4,2 ± 0,1*	4,9 ± 0,3*	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,4	5,8 ± 0,2*
L-Fenylalanina											
L-Phenylalanine	1,8 ± 0,2*	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2*	2,8 ± 0,2*	2,6 ± 0,2*	3,7 ± 0,4*	4,4 ± 0,4*	2,9 ± 0,4*	1,9 ± 0,2	3,4 ± 0,3*
L-Histydyna											
L-Histidine	0,9 ± 0,1*	1,5 ± 0,4*	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,2*	1,8 ± 0,2*	1,7 ± 0,5*	2,0 ± 0,3*	3,0 ± 0,3*	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,4	2,6 ± 0,2*
L-Lizyna											
L-Lysine	1,7 ± 0,3*	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,3	3,4 ± 0,2*	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,3	3,3 ± 0,3*	3,4 ± 0,4*	2,1 ± 0,4*	1,7 ± 0,2	4,0 ± 0,1*
SUMA											
AMOUNT	12,1	14,2	16,3	25,4	14,8	13,6	20,8	22,4	17,3	13,5	25,7

* zaznaczone różnice są statystycznie istotne przy $p \leq 0,05$ (n=6)
 statistically significant different at $p \leq 0,05$

Zawartość aminokwasów egzogennych w osoczu po zastosowaniu witamin rozpuszczalnych w wodzie w ilości 100 mg/l

Po zastosowaniu witaminy B₁ w osoczu kurcząt grupy doświadczalnej wzrósł istotnie statystycznie poziom izoleucyny i histydyny (tab. 3). Zastosowanie witaminy B₂ spowodowało zwiększenie ilości dwóch badanych aminokwasów: treoniny i leucyny. Zawartość pozostałych aminokwasów, jeśli nawet wzrosła, nie była statystycznie istotna (tab. 3). Witamina B₆ powodowała wzrost poziomu wszystkich badanych aminokwasów i były to zmiany statystycznie istotne, z wyjątkiem metioniny (tab. 3). Po zastosowaniu witaminy C w osoczu kurcząt grupy doświadczalnej wzrosła statystycznie ilość fenyloalaniny i histydyny. Poziom pozostałych badanych aminokwasów nie ulegał istotnym zmianom (tab. 3). Biotyna zastosowana w doświadczeniu spowodowała podwyższenie ilości: treoniny, waliny, metioniny oraz fenyloalaniny i lizyny (tab. 3). Zastosowanie choline spowodowało tylko w jednym przypadku ewidentne zwiększenie ilości aminokwasu w osoczu i była nim treonina. Poziom lizyny oraz leucyny był taki sam jak w grupie kontrolnej. Zawartość pozostałych badanych aminokwasów była niższa u kurcząt grupy doświadczalnej (tab. 3). Kwas foliowy spowodował wyraźne podniesienie poziomu fenyloalaniny i histydyny (tab. 3). Po zastosowaniu kwasu pantotenowego wzrosła w osoczu kurcząt grupy doświadczalnej ilość wszystkich aminokwasów badanych z wyjątkiem metioniny, która była taka sama jak w grupie kontrolnej (tab. 3). Kwas nikotynowy zastosowany w doświadczeniu przyczynił się do podwyższenia ilości: treoniny, waliny, leucyny, izoleucyny, fenyloalaniny, histydyny i lizyny (tab. 3). Zastosowanie łączne witamin rozpuszczalnych w wodzie spowodowało podwyższenie poziomu w osoczu kurcząt grupy doświadczalnej wszystkich aminokwasów z wyjątkiem waliny (tab. 3). Podanie wszystkich witamin razem z aminokwasami powodowało podniesienie ich łącznej zawartości w osoczu krwi kurcząt (tab. 3).

PODSUMOWANIE

Wcześniejsze doniesienia literaturowe sugerowały, że witaminy wywierają wpływ na wchłanianie pewnych aminokwasów [Buraczewska 1981, Fenstermacher i in. 1986, Nagórna-Stasiak i in. 1997]. Z racji tego, że w paszach dla zwierząt, zwłaszcza dla drobiu, witaminy rozpuszczalne w wodzie występują łącznie [Baker i in. 1999, Flynn i in. 2003, Herbert i in. 1999], najistotniejsze było właśnie wykazanie ich wspólnego wpływu na zmiany poziomu aminokwasów egzogennych w jelicie cienkim, wątrobie i osoczu krwi kurcząt.

Badania obejmowały oznaczanie poziomu wchłaniania aminokwasów w ścianie jelita oraz ich zawartość w wątrobie i osoczu krwi kurcząt. Łączne zastosowanie witamin rozpuszczalnych w wodzie powodowało wyraźne podniesienie poziomu wszystkich badanych aminokwasów zarówno w ścianie jelita cienkiego, wątrobie, jak i osoczu krwi. Przy stosowaniu oddzielnych poszczególnych witamin zawartość niektórych aminokwasów nie ulegała zmianie w grupie doświadczalnej. Jedynie w wątrobie każda z zastosowanych witamin podnosiła poziom badanych aminokwasów. W odniesieniu do poziomu aminokwasów w osoczu krwi nie był on zależny od ich koncentracji w płynie perfuzyjnym przepływającym przez jelito, dlatego też wartości te nie mogą być miernikiem ilości aminokwasów wchłoniętych z pętli jelitowej. Aminokwasy w trakcie 30-minutowego przepływu przez pętlę jelitową wchłaniały się cały czas, a próbki krwi

dotyczyły tylko określonego momentu w czasie przepływu. Niemniej jednak największy wpływ na wzrost zawartości aminokwasów w osoczu wystąpił po łącznym użyciu witamin rozpuszczalnych w wodzie. Efektem tego był wyższy poziom wszystkich badanych aminokwasów w osoczu, z wyjątkiem waliny. Zwiększony poziom pojedynczych aminokwasów w osoczu obserwowano także po stosowaniu witaminy B₂, B₆, kwasu pantotenowego, kwasu nikotynowego i biotyny.

PIŚMIENNICTWO

- Annegers J.H., 1969. Intestinal absorption of amino acids in the dog. *Am. J. Physiol.* 216(1):1-4.
- Baker D.H., Edwards H.M., Strunk C.S., Emmert J.L., Peter Ch.M., Mavromichalis J., Parr T.M., 1999. Single versus multiple deficiencies of methionine, zinc, riboflavin, vitamin B₆ and choline elicit surprising growth responses in young chicks. *J. Nutr.* 129(10):2239-2245.
- Baker D.H., Batal A.B., Parr T.M., Augspurger N.R., Parsons C.M., 2002. Ideal ratio (relative to lysine) of tryptophan, threonine, isoleucine and valine for chicks during the second and third weeks posthatch. *Poult. Sci.* 81:485-494.
- Bender D.A., 1989. Vitamin B₆ requirements and recommendations. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43:289-309.
- Bertolo R.F.P., Pencharz P.B., Ball R.O., 2000. Organ and plasma amino acid concentrations are profoundly different in piglets fed identical diets via gastric, central venous or portal venous routes. *J. Nutr.* 130(5):1261-1266.
- Branson W.R., Harrison G.J., Harrison L.R., 1994. *Avian Medicine Principles and Application* Wingers Publishing.
- Brosnan J.T., 2003. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J. Nutr.* 133(6):2068S-2072S.
- Buraczewska L., 1981. Absorption of amino acids in different parts of the small intestine in growing pigs. *Acta Physiol. Pol.* 32(4):429-436.
- Chapman-Smith A., Cronan J.E., 1999. Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J. Nutr.* 129(2):477-484.
- Chatterjee N.S., Kumar Ch.K., Ortiz A., Rubin S.A., Said H., 1999. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am. J. Physiol.* 277(4):C605-C613.
- Davies M.G., Thomas A., 1973. *J.J. Agric. Food Agric.* 24, 1525.
- Fenstermacher D.K., Rose R.C., 1986. Absorption of pantothenic acid in rat and chick intestine. *Am. J. Physiol.* 250(2):G155-160.
- Ferruzza S., Ranaldi G., Di Girolamo M., Sambuy Y., 1997. The efflux of lysine from the basolateral membrane of human cultured intestinal Cells (Caco-2) occurs by different mechanisms depending on the extracellular availability of amino acids. *J. Nutr.* 127(6):1183-1190.
- Flynn A., Moreiras O., Stehle P., Fletcher R.J., Muller D.J., Rolland V., 2003. Vitamins and minerals: A model for safe addition to foods. *Eur. J. Nutr.* 42:118-130.
- Gardner M.L., 1978. Amino acid and peptide absorption from partial digest of proteins in isolated rat small intestine. *J. Physiol.* 284(1):83-104.
- Gazzola G.C., Asta V.D., Guidotti G.G., 1980. The transport of neutral amino acids in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 253(3):929-936.
- Gonzales E., Vinardell M.P., 1996. Ontogenic development of proline intestinal transport in the domestic fowl. *Br. Poult. Sci.* 37(2):383-394.
- Haslam N., Probert C.S., 1998. An audit of the investigation and treatment of folic acid deficiency. *J. R. Soc. Med.* 91:72-73.

- Heard G.S., Anrison E.F., 1986. Gastrointestinal absorption of vitamin B₆ in the chicken (*Gallus domesticus*). J. Nutr. 116:107-120.
- Herbert V. Folic Acid. In: Shiks M., Olson J., Ross A.C., ed., 1999. Nutrition in health and disease. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Institute of Medicine Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin and choline. National Academy Press. Washington DC, 1998.
- King J.S., Sepulveda F.V., Smith M.W., 1981. Cellular distribution of neutral and basic amino acid transport systems in rabbit ileal mucosa. J. Physiol. 319(1):355-368.
- Konturek S., 1976. Fizjologia układu trawiennego. PZWL, Warszawa,
- Lechowski J., Nagórna-Stasiak B., 1995. Witamina C u drobiu domowego. Med. Wet. 51(4): 216-218.
- Madej E., Grzęda M., 2000. Właściwości, niedobór i zakres zastosowań witaminy C w leczeniu zwierząt. Med. Wet. 56(10): 627-631.
- Mahmood S., Dani H.M., Mahmood A., 1984. Effect of dietary thiamin deficiency on intestinal functions in rats. Am. J. Clin. Nutr. 40(2):226-234.
- Manroe M.M., 2000. Effect of physical activity on thiamine, riboflavin and vitamin B₆ requirements. Am. J. Clin. Nutr. 72 (2):598-606.
- Mason J.B., Selhub J., 1988. Folate binding protein and the absorption of folic acid in the small intestine of the suckling rat. Am. J. Clin. Nutr. 48(3):620-625.
- Nagórna-Stasiak B., Lechowski J., Kowalczyk M., 1997. Wpływ witamin na wchłanianie aminokwasów egzogennych u kurcząt. Med. Wet. 53(9):509-511.
- Nys Y., Mongin P., 1982. Transport of electrolytes and water in the upper jejunum of the fowl in vivo perfusion. Pflugers Arch. 392:251-256.
- Pisulewski P.M., Pysz M., 2002. Zapotrzebowanie człowieka na aminokwasy i współczesne poglądy na skład białka wzorcowego. Żyw. Człow. i Metabolizm XXIX, 4:268-277.
- Schramm F., Moor S. J., 1954. Biochem. 59, 33.
- Shibata K., Mushiage M., Kondo T. Hayakawa T., Tsuge H., 1995. Effects of vitamin B₆ deficiency on the conversion ratio of tryptophan to niacin. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:2060-2063.
- Sklan D., Noy Y., 2000. Hydrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. Poult. Sci. 79:1306-1310.
- Stein J., Daniel H., Whang E., Wenzel U., Hahn A., Rehner G., 1994. Rapid postabsorptive metabolism of nicotinic acid in rat small intestine may affect transport by metabolic trapping. J. Nutr. 124:61-66.
- Szymański A., 1998. New aspects in the study of the mechanism of intestinal absorption of thiamine in rats. Acta Physiol. Pol. 39:5-6.
- Tessari P., Zanetti M., Barazzoni R., Vettore M., Michielan F., 1996. Mechanism of postprandial protein accretion in human skeletal muscle. J. Clin. Invest. 98(6):1361-1370.
- Turczynowski W., Szczepanik A.M., Kłęk S., 2000. Leczenie żywieniowe a układ odpornościowy. Przegląd Lek. 57(1):36-40.

**THE LEVEL OF EXOGENOUS AMINO ACIDS
IN INTESTINE WALL, LIVER
AND BLOOD SERUM AFTER APPLICATION
OF WATER SOLUBLE VITAMINS IN CHICKENS**

Abstract. The aim of the study was to examine the influence of water soluble vitamins such as: thiamin, riboflavin, pyridoxine, vitamin C, folic acid, panthotenic acid, nicotine acid, biotin and cholin on the level of amino acids in wall intestine, liver and blood serum in chickens. Tests were done on 160 alive broiler chicken, breed Hybro G (age 2-4 months). The absorption of amino acids was determined by the method of perfused loops of small intestine. Saline including amino acids such as: L-threonine, L-valine, L-methionine, L-lysine, L-histidine, L-phenylalanine, L-leucine, L-isoleucine and water soluble vitamins in dose 100mg/l was passed through the loops. Next, level of amino acids was measured by the method of liquid chromatography. The experiment demonstrated, that water soluble vitamins undoubtedly influenced exogenous amino acid on absorption from entrails in chickens. In the wall intestine the highest level was observed after application vitamin B₆, the least reaction was after biotin, folic acid and panthotenic acid. All amino acids reacted on application vitamins in the liver. In the blood serum was observed high value amino acids after application vitamins use together and after vitamin B₆, panthotenic acid and biotin.

Key words: absorption, water soluble vitamins, exogenous amino acids, chicken

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.06.2007

WYBRANE WSKAŹNIKI BIOCHEMICZNE I HEMATOLOGICZNE ORAZ CZĘSTOTLIWOŚĆ SKURCZÓW SERCA U KONI RASY KŁUSAK FRANCUSKI W KOLEJNYCH ETAPACH TRENINGU

Witold Kędzierski, Sylwester Kowalik, Iwona Janczarek
Akademia Rolnicza w Lublinie

Streszczenie. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu treningu wyścigowego na wielkość wybranych wskaźników biochemicznych krwi i częstotliwość skurczów serca (HR) u kłusaków w wieku poniżej dwóch lat, w porównaniu z końmi starszymi. Obserwacją objęto 39 koni rasy kłusak francuski w wieku od ok. 21 miesięcy do 6 lat, podzielonych na 3 grupy wiekowe. Podczas badań konie pokonywały kłusem dystans ok. 15 km ze średnią prędkością $4,0-6,2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Krew do badań pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej trzykrotnie: w spoczynku, tuż po powrocie koni z toru i 30 minut później. We krwi pełnej oznaczano stężenie hemoglobiny (Hb) i kwasu mlekowego (LA), a w osoczu poziom glukozy (Glc), glicerolu, wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), kwasu moczowego (UA) i białka całkowitego (Bc) oraz aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Prędkość (V) i HR rejestrowano przy użyciu telemetrycznych urządzeń typu Polar.

W grupie najmłodszych koni odnotowano najniższe stężenie Hb we krwi i najwyższe Glc w osoczu krwi pobieranej w spoczynku, największe z obserwowanych wzrosty poziomu Bc i LDH podczas treningów, a także przedłużone utrzymywanie się podwyższonych wartości Hb, Bc i LDH po wysiłku. W kolejnych grupach kłusaków stężenie Hb we krwi oznaczane w spoczynku było istotnie wyższe niż w grupie roczniaków. Stężenie glicerolu i WKT w osoczu oznaczane po wysiłku u koni trzyletnich i starszych było istotnie niższe niż w grupie najmłodszych zwierząt. Organizm koni w wieku poniżej dwóch lat nie był w pełni przygotowany do obciążeń związanych z prowadzonym treningiem.

Słowa kluczowe: trening, kłusaki, wskaźniki biochemiczne

WSTĘP

Trening młodych koni ma na celu pobudzenie rozwoju poszczególnych narządów i tkanek w kierunku wykształcenia cech najbardziej pożądaných dla danej rasy i rodzaju użytkowania, dlatego dąży się do wczesnego wdrażania źrebiąt do pracy [Eto i in. 2003]. Konie rasy czystej krwi arabskiej rozpoczynają ćwiczenia ruchowe jako dwulatki, a konie pełnej krwi angielskiej już w wieku 17-18 miesięcy powinny regularnie trenować na torach wyścigowych. Wyniki badań Dzierżęckiej i in. [2005] wskazują, że odsetek źrebiąt tej rasy, które osiągnęły dojrzałość somatyczną i szkieletową w wieku 18-20 miesięcy, nie przekracza 16% populacji. Jeszcze wcześniej, bo w wieku 15 miesięcy, wdrażane są do pracy w zaprzęgu kłusaki rasy Standardbred. W dostępnej literaturze brak jest kompleksowego opracowania oddziaływania długotrwałego treningu na metabolizm koni młodszych niż dwuletnie [Krzywanek i in. 1996]. Wiadomo jednak, że wiek koni istotnie wpływa na tempo przemiany materii i wartość oznaczanych parametrów [Kędzierski i Podolak 2002, Krumrych 2003]. Stąd podjęto próbę określenia wpływu treningu na organizm możliwie najmłodszych koni i w tym celu objęto badaniami źrebięta rasy kłusak francuski. Przygotowanie koni tej rasy do udziału w wyścigach znacznie różni się od treningu koni pełnej krwi. Podczas zaprawy młode kłusaki zaprzęgane są do lekkiego wózka zwanego sulkami i poruszają się wyłącznie kłusem po płaskim, piaszczystym torze. Trenują codziennie, z czasem zwiększa się tylko wielkość obciążeń. Sezon startowy trwa cały rok, więc brak tu okresu roztrenowania w zimie i fazowego przygotowywania do pierwszych startów w okresie wiosenno-letnim.

Kłusaki trafiły do Polski dzięki nawiązaniu współpracy z Towarzystwem Wspomagania Hodowli Konia Francuskiego (SECF). Krajowi trenerzy i hodowcy zyskali możliwość dzierżawienia, trenowania i wystawiania w gonitwach koni hodowli francuskiej. Zwierzęta tej rasy są mocno zbudowane, o wysokości w kłębie ok. 160-168 cm, odznaczają się łagodnym charakterem, odpornością i długowiecznością, co zapewne pozwoli na ich wielostronne użytkowanie po zakończeniu kariery na torach.

Po raz pierwszy w Polsce oficjalną gonitwę kłusaków rozegrano 10 października 2004 roku na Wrocławskim Torze Wyścigów Konnych. Podczas tego rodzaju wyścigu zaprzęgi rywalizują ze sobą poruszając się wyłącznie kłusem. Zmagania na torze służą przede wszystkim wyselekcjonowaniu najlepszych koni w obrębie danej rasy. Poza tym wyścigi kłusaków są bardzo widowiskowe, głównie dzięki niezwyklej dynamice ruchu koni osiągających na finiszu prędkość $16,7 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ($60 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$), a najlepsi powożący zyskują sławę i uwielbienie widzów. W Europie ten rodzaj wyścigów jest bardziej popularny niż wyścigi rozgrywane w galopie. We Włoszech i Norwegii hoduje się więcej kłusaków niż koni pełnej krwi, we Francji rozgrywa się rocznie ponad 10 tys. gonitw w zaprzęgach. Jest to również prężna dziedzina gospodarki, dająca tylko we Francji zatrudnienie kilkuset tysiącom osób [Sekwerda 2005]. Można sądzić, że liczba tych koni w kraju także będzie szybko rosła, a wyścigi zaprzęgów staną się równie popularne, jak w krajach Europy Zachodniej. W roku 2006 rozegrano na partynickim torze już 23 gonitwy kłusaków, stale rośnie także pula nagród.

Celem przedstawionych badań jest określenie wpływu treningu na wielkość wybranych parametrów biochemicznych krwi i częstotliwość skurczów serca u tzw. „roczniaków” w porównaniu z „dwulatkami” i końmi starszymi.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w centrum treningowym w woj. zachodniopomorskim, prowadzącym hodowlę i trening kłusaków startujących głównie w gonitwach organizowanych w krajach skandynawskich. Próby wysiłkowe przeprowadzono u 39 koni rasy kłusak francuski podzielonych na 3 grupy wiekowe: grupa 1-19 źrebiąt (7 ogierków i 12 klaczek) w wieku 21 ± 2 miesięcy, trenowanych od 4-6 miesięcy, grupa 2-12 koni dwuletnich (3 ogiery, 4 wałachy i 5 klaczy), w treningu od ok. 18 miesięcy, grupa 3 – konie trzyletnie i starsze, mające za sobą kilka sezonów startowych (3 ogiery, 3 wałachy, 2 klacze).

Przed rozpoczęciem badań zwierzęta przebywały w centrum treningowym przynajmniej od 6 miesięcy. Codziennie lub co drugi dzień, w zależności od warunków zewnętrznych, konie zaprzęgnięte do sulek pracowały w kłusie na piaszczystym podłożu przez ok. 45 minut ze średnią prędkością w granicach $4,0-6,2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Po powrocie z toru konie wyprzęgano, myto strumieniem ciepłej wody i pozostawiano w boksach. W dniach wolnych od treningów zwierzęta przebywały na wybiegach. Podczas prowadzonych badań trening przebiegał podobnie do opisanego powyżej, dystans i prędkości dla poszczególnych zaprzęgów dobierano zgodnie z zaleceniami trenera. Warunki pogodowe w dniach badań przedstawiały się następująco: pochmurno z przejaśnieniami, prędkość wiatru $2-3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, temp. powietrza ok. $+4^\circ\text{C}$, wilgotność 45-55%

Częstotliwość uderzeń serca (HR) rejestrowano przy użyciu telemetrycznych urządzeń typu Polar S810 i S610, zaś do pomiaru prędkości sulek (V) wykorzystano Polar S725 z sensorem prędkości w zestawie, co pozwalało na kontrolowanie zmian wielkości tych parametrów podczas całej sesji treningowej. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci średnich wielkości HR i V osiągniętych podczas sesji treningowej na torze.

Krew do badań pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej trzykrotnie: w spoczynku (S), tuż po powrocie koni z toru (T) i 30 minut później (O). We krwi pełnej oznaczano stężenie hemoglobiny (Hb) metodą cyjanmethemoglobinową i kwasu mlekowego (LA) kuwetowym testem enzymatycznym firmy Dr Lange (Berlin, Niemcy). W osoczu uzyskanym po odwirowaniu krwi pobieranej do próbek zawierających EDTA oznaczano stężenie glukozy (Glc), białka całkowitego (Bc), kwasu moczowego (UA) i aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) testami firmy Cormay (Lublin, Polska), oraz poziom glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) stosując zestawy diagnostyczne firm Boehringer-Manheim (Darmstadt, Niemcy) oraz Roche (Mannheim, Niemcy).

Wyniki badań poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu t-Studenta i analizy wariancji na różnicach i przedstawiono w postaci średnich i odchyleń standardowych ($\bar{x} \pm s$) (Microsoft Excel XP).

WYNIKI

Średnie wartości V i HR osiągniętych podczas treningu na torze oraz stężenia LA we krwi pobieranej tuż po wysiłku przedstawiono w tabeli 1.

Średnie wartości HR wahały się w zakresie od 124 uderzeń $\cdot\text{min}^{-1}$ w grupie 1 do 131 uderzeń $\cdot\text{min}^{-1}$ w grupie 3 i były wysoce skorelowane ze średnią V uzyskiwaną podczas treningu na torze ($r=0,775$). Ponadto wartości HR i LA były najniższe w grupie koni najmłodszych, przy zbliżonej V ruchu.

Tabela 1. Średnia pomiarów prędkości (V) kłusaków i częstotliwości uderzeń serca (HR) podczas sesji treningowej oraz stężenie kwasu mlekowego (LA) we krwi pobieranej tuż po zakończeniu wysiłku ($x \pm s$)

Table 1. Mean speed (V) and heart rate (HR) determined during the training session of trotters, and lactic acid level in blood sampled after the end of effort ($x \pm s$)

Wskaźnik Parameter	Grupy koni – The groups of horses		
	roczniaki yearlings n=19	dwulatki two-year-old n=12	konie trzyletnie i starsze three-year-old and older n=8
V (m·s ⁻¹)	4,9 ± 0,5	5,2 ± 0,3	5,3 ± 0,6
HR (sk. min ⁻¹)	124 ± 17 ^a	127 ± 19 ^{ab}	131 ± 17 ^b
LA (mmol·l ⁻¹)	0,91 ± 0,20 ^a	1,23 ± 0,22 ^b	1,22 ± 0,27 ^b

^{a,b} – średnie oznaczone różnymi literami porównywane w poziomie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

^{a,b} – means in rows with different superscripts differ at $p \leq 0.05$

Stężenie Hb we krwi oraz Glc, glicerolu, WKT, UA, Bc i aktywność LDH w osoczu krwi zamieszczono w tabeli 2.

Stężenie Hb we krwi koni w grupie 1 oznaczane w spoczynku wynosiło 6,36 mmol·l⁻¹. W kolejnych grupach wiekowych wartość tego parametru istotnie wzrosła, osiągając poziom 8,08 mmol·l⁻¹ u koni trzyletnich i starszych. We wszystkich grupach badanych koni poziom Hb we krwi oznaczany tuż po wysiłku istotnie wzrastał, w porównaniu do wartości oznaczanych w spoczynku. W grupie roczniaków stwierdzono przedłużone utrzymywanie się podwyższonego poziomu Hb we krwi po 30 minutach odpoczynku.

Poziom Glc oznaczany w spoczynku w osoczu krwi najmłodszych koni był istotnie wyższy niż w grupach 2 i 3 i wynosił 6,32 mmol·l⁻¹.

Obserwowano istotny wzrost stężenia glicerolu w osoczu krwi po wysiłku, ustępujący w czasie 30 minut odpoczynku. Wartości tego wskaźnika oznaczane tuż po treningu w grupie koni najstarszych były istotnie niższe niż odnotowane w grupach koni młodszych.

Stężenie WKT w osoczu także istotnie wzrastało po każdym wysiłku, po czym wolno obniżało się nie osiągając wartości wyjściowych 30 minut po zakończeniu sesji treningowej. W tym czasie jego stężenie badane w grupie koni trzyletnich i starszych było jednak istotnie niższe niż w grupach 1 i 2. Współczynnik korelacji dla wartości WKT i glicerolu uzyskanych tuż po wysiłku wynosił 0,789.

Poziom UA w osoczu krwi kłusaków w grupach 1-3 wzrastał po każdej sesji treningowej i obniżał się w ciągu 30 minut odpoczynku.

Stężenie Bc osocza krwi oznaczane w spoczynku w grupie 1 było istotnie niższe niż w grupie 2. W grupie najmłodszych kłusaków wysiłek powodował wzrost wartości tego parametru, utrzymujący się jeszcze 30 minut później. U koni dwuletnich obserwowano wzrost poziomu Bc w osoczu jedynie tuż po zakończeniu sesji treningowej.

Aktywność LDH w osoczu krwi oznaczana w spoczynku istotnie różniła się w kolejnych grupach kłusaków, przyjmując najwyższe wartości u najmłodszych zwierząt i najwyższe u koni trzyletnich i starszych. Wysiłek prowadził do wzrostu aktywności LDH w porównaniu do wartości spoczynkowych we wszystkich badanych grupach. W ciągu 30 minut odpoczynku wartość tego parametru utrzymywała się na podwyższonym poziomie.

Tabela 2. Średnie stężenie hemoglobiny (Hb) we krwi oraz glukozy (Glc), glicerolu, wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), kwasu moczowego (UA), białka całkowitego (Bc) i aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w osoczu podczas sesji treningowej kłusaków ($x \pm s$)

Table 2. Mean level of hemoglobin (Hb), glucose (Glc), glycerol, free fatty acids (FFA), uric acid (UA), total plasma proteins (tPP) and lactate dehydrogenase (LDH) during the training session of trotters ($x \pm s$)

Wskaźnik Parameter	próbka probe	Grupy koni – The groups of horses		
		roczniaki yearlings n=19	dwulatki two-year-old n=12	konie trzyletnie i starsze three-year-old and older n=8
Hb (mmol·l ⁻¹)	S	6,36 ± 0,59 ^a	7,06 ± 0,58 ^b	8,12 ± 0,98 ^c
	T	8,36 ± 0,62* ^a	9,13 ± 0,59* ^b	9,54 ± 0,99* ^b
	O	6,75 ± 0,59* ^a	7,14 ± 0,52 ^{ab}	7,75 ± 1,00 ^b
Glc (mmol·l ⁻¹)	S	6,32 ± 0,70 ^a	5,80 ± 0,51 ^b	5,74 ± 0,45 ^b
	T	6,36 ± 0,70 ^a	5,55 ± 0,64 ^b	6,00 ± 0,78 ^b
	O	6,52 ± 0,68	5,71 ± 0,74 ^b	5,72 ± 0,62 ^b
Glicerol Glycerol (mmol·l ⁻¹)	S	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02
	T	0,15 ± 0,06* ^a	0,17 ± 0,04*	0,11 ± 0,08* ^b
	O	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
WKT FFA (mmol·l ⁻¹)	S	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02
	T	0,42 ± 0,24*	0,49 ± 0,18*	0,35 ± 0,19*
	O	0,16 ± 0,08* ^a	0,28 ± 0,12*	0,07 ± 0,06* ^b
UA (μmol·l ⁻¹)	S	18,1 ± 5,66	20,5 ± 5,75	22,1 ± 9,71
	T	29,5 ± 7,35*	29,8 ± 8,75*	30,6 ± 18,4*
	O	20,4 ± 8,84	25,0 ± 7,90	27,4 ± 16,7
Bc tPP (g·l ⁻¹)	S	61,8 ± 5,1 ^a	64,6 ± 3,1 ^b	63,8 ± 3,3 ^{ab}
	T	64,9 ± 7,1*	67,0 ± 3,6*	65,3 ± 3,0
	O	63,9 ± 4,9*	66,2 ± 3,3	63,7 ± 2,8
LDH (U·l ⁻¹)	S	629 ± 123 ^a	530 ± 91 ^b	407 ± 89 ^c
	T	711 ± 132* ^a	605 ± 102* ^b	465 ± 131* ^c
	O	690 ± 117* ^a	565 ± 69 ^b	440 ± 113 ^c

S – próbki pobierane w spoczynku, T – po zakończeniu treningu, O – po 30 min odpoczynku,

* – wartości istotnie wyższe od uzyskanych w spoczynku,

^{a,b,c} – średnie oznaczone różnymi literami porównywane w poziomie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

S – samples taken at rest, T – immediately after the training, O – after 30 min rest,

* – the values statistically higher than determined at rest,

^{a,b,c} – means in rows with different superscripts differ at $p \leq 0,05$

Wielkość powysiłkowych zmian oznaczanych parametrów porównywano także za pomocą analizy wariancji na różnicach. Statystycznie istotne różnice między wartościami $\Delta T-S$ oraz $\Delta O-S$ w poszczególnych grupach wiekowych znaleziono jedynie dla pięciu wskaźników: Hb, glicerolu, WKT, Bc i LDH, co przedstawiono w tabeli 3. Zakres powysiłkowych zmian przedstawionych parametrów był istotnie wyższy w grupie roczniaków, w porównaniu z grupą koni trzyletnich i starszych.

Tabela 3. Porównanie wielkości istotnych statystycznie zmian stężenia oznaczanych parametrów krwi kłusaków w poszczególnych grupach wiekowych ($x \pm s$)Table 3. Comparison of the statistically significant changes in the levels of parameters determined in blood of trotters divided into the groups according to age ($x \pm s$)

Wskaźnik Parameter	różnica change	Grupy koni – The groups of horses		
		roczniaki yearlings n=19	dwulatki two-year-old n=12	konie trzyletnie i starsze three-year-old and older n=8
Hb ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	$\Delta\text{T-S}$	$2,00 \pm 0,78^a$	$2,07 \pm 0,62^a$	$1,42 \pm 0,59^b$
	$\Delta\text{O-S}$	$0,39 \pm 0,78^a$	$0,08 \pm 0,31^{ab}$	$-0,37 \pm 0,54^b$
Bc tPP ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	$\Delta\text{T-S}$	$3,10 \pm 4,86^a$	$2,39 \pm 2,44^{ab}$	$1,46 \pm 2,14^b$
	$\Delta\text{O-S}$	$2,11 \pm 3,27^a$	$1,62 \pm 2,48^{ab}$	$-0,06 \pm 1,36^b$
LDH ($\text{U}\cdot\text{l}^{-1}$)	$\Delta\text{T-S}$	82 ± 48^a	75 ± 34^{ab}	58 ± 29^b
	$\Delta\text{O-S}$	61 ± 42^a	35 ± 45^{ab}	33 ± 26^b
Glicerol Glycerol ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	$\Delta\text{T-S}$	$0,14 \pm 0,06^a$	$0,15 \pm 0,05^a$	$0,09 \pm 0,07^b$
WKT FFA ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	$\Delta\text{O-S}$	$0,15 \pm 0,08^a$	$0,27 \pm 0,13^a$	$0,05 \pm 0,05^b$

$\Delta\text{T-S}$ – różnice między wartościami uzyskanymi w próbkach pobranych po wysiłku i w spoczynku, $\Delta\text{O-S}$ – różnice między wartościami uzyskanymi w próbkach pobranych 30 minut po wysiłku i w spoczynku,

^{a,b} – średnie oznaczone różnymi literami porównywane w poziomie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

$\Delta\text{T-S}$ – differences between levels evaluated after exercise and at rest, $\Delta\text{O-S}$ – differences between levels evaluated 30 minutes after exercise and at rest,

^{a,b} – means in rows with different superscripts differ at $p \leq 0,05$

DYSKUSJA

Oznaczanie HR i stężenia LA we krwi jest często stosowane w monitorowaniu przebiegu treningu, wzrost wartości tych wskaźników jest proporcjonalny do natężenia wysiłku, może też odzwierciedlać stopień przygotowania organizmu konia do wykonywania intensywnej pracy [Guhl i in. 1996, Kaproń i in. 1999, Kędzierski 2005, Leleu i in. 2005, Roneus i in. 1994]. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że w kolejnych etapach treningu stosowano obciążenia proporcjonalne do aktualnej kondycji badanych koni.

Poziom Hb we krwi w poszczególnych grupach zwierząt był uzależniony od wieku badanych kłusaków. U źrebiąt w grupie 1 był najniższy i wynosił $6,36 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, to jest mniej niż minimalna wartość zakresu fizjologicznego przyjętego ogółem dla koni, mieszczącego się w granicach $6,8-11,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [Krumrych 2003]. Dla źrebiąt w wieku 8-18 miesięcy przyjmuje się za fizjologiczne niższe wartości ($7,3 \pm 1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), ponadto badania przeprowadzono w okresie zimowym, kiedy poziom Hb jest znacznie niższy niż w miesiącach letnich [Krumrych 2003]. Wzrost spoczynkowych wartości stężenia Hb we krwi w kolejnych etapach treningu, występujący w badanych grupach kłusaków, obserwowano także u koni innych ras [Gill 2003, Stopyra 2004]. Natomiast w badaniach własnych prowadzonych u koni rasy arabskiej poziom Hb oznaczany w spoczynku utrzymywał się na stałym poziomie podczas sezonu startowego i nie był związany z wiekiem i stopniem wytrenowania obserwowanych zwierząt [Kędzierski

i Podolak 2002, Podolak i in. 2004]. Badania prowadzone podczas zawodów WKKW wykazały, że konie odznaczające się wysokim poziomem Hb w spoczynku były lepiej przygotowane do wysiłku [Szarska 1994]. Na tej podstawie można stwierdzić, że wielomiesięczny trening wywierał korzystny wpływ na organizm młodych kłusaków, prowadząc do stopniowego wzrostu poziomu Hb we krwi.

We wszystkich badanych grupach koni wysiłek powodował istotny wzrost stężenia Hb we krwi, w porównaniu do wartości uzyskanych w spoczynku. Wzrost wielkości tego wskaźnika jest proporcjonalny do intensywności wysiłku i nie jest związany ze stopniem wytrenowania badanych zwierząt [Kędziński i Podolak 2002, Munoz i in. 1998, Stopyra 2004]. Natomiast szybkość powrotu poziomu Hb do wartości spoczynkowych jest odzwierciedleniem stopnia przygotowania organizmu konia do intensywnego wysiłku [Szarska 1994]. Stwierdzony w prezentowanej pracy podwyższony poziom Hb we krwi roczniaków oznaczany 30 minut po zakończeniu wysiłku wskazuje, iż grupa tych koni nie była jeszcze w pełni przygotowana do stosowanych obciążeń treningowych.

Poziom Glc oznaczany w spoczynku w osoczu krwi koni w grupach 2 i 3 mieścił się w zakresie wartości referencyjnych, wynoszących 3,5-6,0 mmol·l⁻¹ [Krumrych 2003], natomiast w grupie najmłodszych zwierząt był znacznie wyższy i wynosił 6,32 mmol·l⁻¹. Podwyższone spoczynkowe stężenie Glc w osoczu krwi koni występuje często w pierwszej fazie treningu wyścigowego [Kędziński i Podolak 2002, Kędziński i Podolak 2001, Podolak i in. 2004]. Porównując średnie spoczynkowe wartości tego parametru w kolejnych grupach badanych kłusaków można dostrzec obniżanie się stężenia Glc w osoczu postępujące z wiekiem koni. Podobną tendencję obserwowali także Gill [2003] i Malinowski [2002].

Wysiłek stosowany podczas badań wywoływał istotny wzrost stężenia glicerolu w osoczu krwi. Wartości uzyskane tuż po zakończeniu treningu były wyższe w grupach koni młodszych w porównaniu z kłusakami trzyletnimi i starszymi. Źródłem tego związku w organizmie jest rozpad cząsteczek triacylogliceroli (TG) zmagazynowanych w tkance tłuszczowej, jak i krążących we krwi. W czasie wysiłku glicerol nie jest metabolizowany, jego stężenie w osoczu krwi odzwierciedla natężenie procesu lipolizy [Poso i in. 1989]. Podczas rozpadu TG uwalniane są także WKT, które mogą być wykorzystywane przez pracujące mięśnie w procesach energetycznych.

W osoczu krwi badanych koni obserwowano istotny wzrost stężenia WKT po treningu, w porównaniu do wartości oznaczanych w spoczynku. Okres odpoczynku trwający 30 minut nie pozwalał na powrót wielkości tego parametru do wartości wyjściowych. Poziom WKT w osoczu oznaczany tuż po wysiłku był istotnie skorelowany ze stężeniem glicerolu ($r=0,789$). Może to świadczyć o niewielkim wykorzystaniu przez mięśnie krążących we krwi WKT jako źródła energii. Wyniki prac innych autorów wskazują, że WKT są zużywane przez mięśnie podczas wysiłku o maksymalnej intensywności [Warren i in. 1999].

Poziom UA w osoczu krwi kłusaków wzrastał po każdej sesji treningowej i obniżał się w ciągu 30 minut odpoczynku. Związek ten powstaje w pracujących mięśniach jako produkt rozpadu ATP. W pracach, w których kłusaki rasy Standardbred poddano testom wysiłkowym, wykazano, że wzrost stężenia UA koreluje ze wzrostem stężenia LA we krwi, ponadto UA dłużej niż LA utrzymuje się na podwyższonym poziomie w okresie restytucji [Essen-Gustavsson i in. 1999, Evans i in. 2002]. Wzrost poziomu UA po wysiłku obserwowany w prezentowanych badaniach wskazuje, że zastosowany rodzaj

treningu jedynie w nieznacznym stopniu prowadził do rozpadu mięśniowych zasobów nukleotydów purynowych.

Stężenie Bc w osoczu krwi ulegało pod wpływem wysiłku istotnym zmianom w grupie najmłodszych zwierząt, u dwulatków wpływ ten zaznaczał się jedynie tuż po treningu, a w grupie koni najstarszych nie obserwowano zmian wielkości tego wskaźnika. U koni sportowych oznaczanie stężenia Bc w osoczu krwi dostarcza informacji o stopniu odwodnienia organizmu [Szarska 1994]. U koni wyścigowych wartości spoczynkowe tego parametru są istotnie niższe niż u koni trenowanych do rajdów, skoków lub WKKW [Szarska 2002]. U koni w grupie 1 okres 30 minut odpoczynku okazał się niewystarczający na powrót poziomu białka do wartości spoczynkowych. Duży wzrost stężenia białka w osoczu podczas prób wysiłkowych, jak i utrzymywanie się tego wzrostu po zakończeniu pracy świadczą o dużym zmęczeniu organizmu [Szarska 2002]. W badaniach koni arabskich nie obserwowano utrzymywania się podwyższonego stężenia Bc w osoczu krwi po 30 minutach odpoczynku, nawet podczas intensywnie prowadzonego treningu [Podolak i in. 2004].

Aktywność LDH oznaczana w spoczynku obniżała się wraz z wiekiem badanych koni. Podobną zależność opisano u koni rasy arabskiej [Kędzierski i Przychodzeń 2002]. Każdorazowy wysiłek powodował wzrost aktywności LDH, utrzymujący się przez kolejne 30 minut, przy czym zakres tych zmian obniżał się wraz z wiekiem badanych kłusaków. Wielkość powysiłkowych zmian aktywności LDH obserwowana w niniejszych badaniach jest porównywalna z wynikami uzyskanymi u koni innych ras [Kędzierski i Przychodzeń 2002, Munoz i in. 2002, Stopyra 2004].

PODSUMOWANIE

Wyniki pomiaru HR i LA uzyskane podczas sesji treningowej wskazują, iż intensywność stosowanego wysiłku nie zwiększała udziału glikolizy beztlenowej w procesie uzyskiwania energii.

Kłusaki w wieku poniżej dwóch lat charakteryzowały się niskim stężeniem Hb we krwi i wysokim Glc w osoczu krwi pobranej w spoczynku. Wysiłek powodował u tych zwierząt najwyższy z obserwowanych wzrost poziomu Bc i LDH, a także przedłużone utrzymywanie się podwyższonych wartości Hb, Bc i LDH w czasie 30 minut po zakończeniu sesji treningowej. Organizm tych koni nie był w pełni przygotowany do obciążeń związanych z prowadzonym treningiem.

Uzyskanie niższych wartości glicerolu i WKT po wysiłku w grupie koni trzyletnich i starszych w porównaniu z wynikami badań roczniaków odzwierciedla proces dostosowywania się organizmu do obciążeń treningowych. Wzrost spoczynkowych wartości Hb we krwi wraz z wiekiem badanych zwierząt także przemawia za stwierdzeniem, że zastosowany trening pozytywnie wpłynął na ich wydolność fizyczną.

PIŚMIENICTWO

- Dzierżęcka M., Wąsowski A., Kobryń H., 2005. Czas kostnienia chrząstki nasadowej dalszej kości promieniowej koni pełnej krwi angielskiej jako kryterium oceny dojrzałości kośćca. *Med. Wet.* 61 (10), 1190-1192.
- Essen-Gustavsson B., Gottlieb-Vedi M., Lindholm A., 1999. Muscle adenine nucleotide degradation during submaximal treadmill exercise to fatigue. *Equine Vet. J. Suppl.* 30, 298-302.
- Eto D., Yamano S., Kasashima Y., Sugiura T., Nasu T., Tokuriki M., Miyata H., 2003. Effect of controlled exercise on middle gluteal muscle fibre composition in Thoroughbred foals. *Equine Vet. J.* 35, 676-680.
- Evans D.L., Priddle T.L., Davie A.J., 2002. Plasma lactate and uric acid responses to racing in pacing Standardbreds and relationships with performance. *Equine Vet. J. Suppl.* 34, 131-134.
- Gill J., 2003. *Fizjologia konia. Tom 1.* Wydawnictwo „SPORT”, Warszawa, 159-186.
- Guhl A., Lindner A. and Von Wittke P., 1996. Use of the relationship between blood lactate and running speed to determine the exercise intensity of horses. *Vet. Rec.* 139, 108-110.
- Kaproń M., Janczarek I., Kaproń H., 1999. Korelacje między dystansem i tempem galopu przygotowawczego a wskaźnikami zaawansowania treningowego koni wyścigowych. *Mat. Symp. Aktualne kierunki hodowli i użytkowania koni w Europie.* 17-19. 09. 1999, Kraków, 350-353.
- Kędzierski W., 2005. Wpływ intensywnego wysiłku na wybrane wskaźniki hematologiczne i biochemiczne krwi koni rasy arabskiej. *Acta Sci. Pol., Med. Vet.* 4 (1), 113-119.
- Kędzierski W., Podolak M., 2001. Zmiany metaboliczne u koni w procesie ujeżdżania. *Med. Wet.* 57, 207-209.
- Kędzierski W., Podolak M., 2002. Wpływ treningu koni rasy arabskiej na poziom parametrów biochemicznych związanych z gospodarką węglowodanowo-lipidową. *Med. Wet.* 58, 788-791.
- Kędzierski W., Przychodzeń M., 2002. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w osoczu krwi koni rasy arabskiej w różnych fazach treningu. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 1, 107-112.
- Krumrych W., 2003. Wskaźniki laboratoryjne krwi koni – wartości referencyjne i interpretacja. PIWet Puławy.
- Krzywanek H., Mohr E., Mill J., Scharpenack M., 1996. Changes of serum enzymes, lactate and hemoglobin concentrations in the blood of young trotting horses due to training exertion. *Zentralbl. Veterinarmed.* A, 43, 345-352.
- Leleu C., Cortel C., Couroue-Malblanc A., 2005. Relationships between physiological variables and race performance in French Standardbred trotters. *Vet. Rec.* 156, 339-342.
- Malinowski K., Betros C.L., Flora L., Kearns C.F., McKeever K.H., 2002. Effect of training on age related changes in plasma insulin and glucose. *Equine Vet. J. Suppl.* 34, 147-153.
- Munoz A., Riber C., Santisteban R., Lucas R.G. and Castejon F.M., 2002. Effect of training duration and exercise on blood-borne substrates, plasma lactate and enzyme concentrations in Andalusian, Anglo-Arabian and Arabian breeds. *Equine Vet. J. Suppl.* 34, 245-251.
- Munoz A., Santisteban R., Rubio M. D., Aguera E. I., Escribano B. M., Castejon F. M., 1998. Locomotor, cardiocirculatory and metabolic adaptations to training in Andalusian and Anglo-Arabian horses. *Res. Vet. Sci.* 66, 25-31.
- Podolak M., Kędzierski W., Janczarek I., 2004. Wpływ intensywnego treningu na poziom wybranych parametrów biochemicznych krwi i liczbę tętna u koni rasy arabskiej. *Med. Wet.* 60, 403-406.
- Poso A.R., Viljanen-Tarifa E., Soveri T. and Oksanen H.E., 1989. Exercise-induced transient hyperlipidemia in the racehorse. *J. Vet. Med. A,* 36, 603-611.
- Roneus N., Essen-Gustavsson B., Lindholm A., Eriksson Y., 1994. Plasma lactate response to submaximal and maximal exercise tests with training, and its relationship to performance and muscle characteristics in standardbred trotters. *Equine Vet. J.* 26, 117-121.

- Sakwerda M., 2005. Kłusaki – sukcesy entuzjastów. *Koń Polski* 13, 14-16.
- Stopyra A., 2004. Wskaźniki gospodarki tlenowej i aktywność wybranych enzymów surowicy krwi koni w warunkach ekstremalnego wysiłku. *Med. Wet.* 58, 543-548.
- Szarska E., 1994. Ocena wydolności koni podczas zawodów konkurencji WKKW. *Med. Wet.* 50, 274-276.
- Szarska E., 2002. Wykorzystanie badań diagnostycznych krwi do oceny stanu zdrowia i zaawansowania treningowego koni wyczynowych. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Warren L.K., Lewrance L.M., Thompson K.N., 1999. The influence of betaine on untrained and trained horses exercising to fatigue. *J. Anim. Sci.* 77, 677-684.

CHOSEN BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL BLOOD PARAMETERS AND HEART RATES OF YOUNG TROTTERS IN CONSECUTIVE PHASES OF TRAINING

Abstract. The aim of this work was to evaluate the effects of the race training of young trotters on their heart rates (HR) and the levels of chosen blood parameters. 39 Standardbred horses 1.5 – 6 years old divided into three age groups were investigated. During the research, horses trotted on the distance of 15 km with the mean speed of 4.0 – 6.2 m·s⁻¹. Three jugular venous blood samples were taken for each horse: at rest, just after the end of training session and 30 minutes later. Hemoglobin (Hb) and lactic acid (LA) blood concentrations were determined as well as plasma level of glucose (Glc), glycerol, free fatty acids (FFA), uric acid (UA), total plasma proteins (tPP) and activity of lactate dehydrogenase (LDH). Speed and HR during the training session were recorded by a Polar speed and heart-rate telemeters.

In the group of the youngest horses the lowest blood Hb concentration and the highest plasma Glc level were determined at rest. In this group, the highest increase of tPP and LDH was observed during the training sessions. Moreover, the values of Hb, tPP and LDH remained elevated after exercise. In groups of two-year-old and older trotters, the resting blood Hb level was higher than in the group of yearlings. Plasma glycerol and FFA values determined after exercise in three-year-old and older horses were lower than in groups of two-year-old and younger foals. The applied training process had a beneficial influence on the fitness of the investigated horses.

Key words: training, trotters, biochemical indices

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.06.2007

CHANGES IN OESTROGENS AND PROGESTERONE SECRETION UNDER THE INFLUENCE OF ACUTE STRESS - LIKE CONCENTRATIONS OF CORTISOL BY PORCINE GRANULOSA CELLS *IN VITRO*

Urszula Kosior-Korzecka, Marcin Kalinowski, Ryszard Bobowiec
Agricultural University in Lublin, Poland

Abstract. It is widely agreed that only the severe and prolonged exposure to stressors, connected with significant and long-term increment in plasma cortisol concentration can suppress reproduction in female pigs. Therefore, the aim of the present study was to check the effect of acute stress-like concentrations of cortisol on oestrogens (17 β -oestradiol – E-2, oestrone – E-1) and progesterone (P-4) secretion by porcine granulosa cells isolated from 6-7 mm in diameter ovarian follicles. The granulosa cells were cultured in serum free – DMEM/F 12 medium (1:1) supplemented with testosterone (10^{-7} M/l) and gentamicin (20 μ g/ml) without cortisol (control) or with $2,8 \times 10^{-7}$, 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} mM/l of cortisol, respectively. After 6 and 12 h of the culture, medium was collected to analyse the concentration of secreted E-2, E-1 and P-4 by HPLC method. Oestrogen and progesterone secretion was expressed as a quantity of hormone, which was released to 1 ml of culture medium by about 5×10^5 granulosa cells during 6 and 12 h, respectively. The proliferation of cells was estimated using MTT test. The obtained results show that cortisol, independently of the used concentration ($2,8 \times 10^{-7}$ – $2,8 \times 10^{-4}$ M/l) caused the significant ($P \leq 0.05$) suppression in E-2 and E-1 secretion from porcine granulosa cells *in vitro*, both after 6 and 12 h of culture. Indeed, the effect of cortisol on progesterone secretion from porcine granulosa cells was dependent on the used dose. Contrary to oestrogens, the increment in P-4 secretion under the influence of $2,8 \times 10^{-7}$ – $2,8 \times 10^{-5}$ M/l of cortisol was observed. There was found very high positive correlation between P-4 and cortisol dose in this range ($r=0.81$ after 6h, $r=0.72$ after 12 h). However, the highest dose of cortisol ($2,8 \times 10^{-4}$ M/l) caused the drop in P-4 secretion (23.45 ± 1.18 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/12 h) in comparison to control (40.63 ± 2.85 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/12 h).

Key words: granulosa cells *in vitro*, cortisol, 17 β -oestradiol, oestrone, progesterone, sow

INTRODUCTION

It is widely agreed that stress can impair reproduction in pigs [Turner et al. 2005, Varley et al. 1994]. However, according to many authors, only the severe and prolonged exposure to stressors, connected with significant and long-term increment in plasma cortisol concentration can suppress reproduction in female pigs [Turner et al. 2005]. Conversely, there were not found the relationship between acute or repeated acute elevation of cortisol during the follicular phase and the disruption of reproduction in the female pigs. There are even some reports relative to stimulatory influence of acute stress on reproduction, like advancement of the onset of puberty in pigs [Turner et al. 2005, Turner et al. 2002]. It is also known that increase in cortisol level in the physiological range is in positive correlation with oestrogen synthesis due to enhancement of P450 activity [Wood and Saoud 1997] and lowering of IGFBP production in granulosa cells. However, even if increase in cortisol level caused by acute stress do not produce the significant and general reproductive disorders, it can change the secretion of individual reproductive hormones. Despite of numerous studies, it is not clear what is the local influence of high, typical for acute stress doses of cortisol on ovarian oestrogen and progesterone secretion from porcine granulosa cells [Chamberlain and Spicer 2001, Viveiros and Liptrap 1995, Wood and Saoud 1997].

Therefore, the aim of the present study was to check the effect of acute stress-like concentrations of cortisol on oestrogens and progesterone secretion by granulosa cells isolated from ovarian follicles of sows during the late follicular phase of the oestrous cycle.

MATERIALS AND METHODS

The ovaries were obtained from the 5 – 6 years old cyclic (n=12) sows, weighting on an average 283.5 ± 21.7 kg, during the late follicular phase of the oestrous cycle. They were collected into Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)/F 12 (1:1) contained 0.1% of BSA. The granulosa cells were isolated from 6-7 mm in diameter ovarian follicles, plated at density of 5×10^5 cells per well on 24-well plates and cultured in serum free – DMEM/F 12 medium (1:1) supplemented with testosterone (10^{-7} M/l) and gentamicin (20 µg/ml) [Khalid et al. 2001, Sasson et al. 2002] without cortisol (control) or with $2,8 \times 10^{-7}$, 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} mM/l of cortisol, respectively. The proliferation of cells was estimated using MTT test. After 6 and 12 h of the culture with cortisol, medium was collected to determine the concentration of secreted oestrogens (17β-oestradiol – E-2, oestrone – E-1) and progesterone (P-4). Steroids were analysed by HPLC (high pressure liquid chromatography) method (Beckman, Gold System, USA). The analysis employed a reverse-phase analytical column (250 x 4 mm, 5 µm, LiChrospher 100, Merck, Germany). The mobile phase, consisting of 0.25% ortho-phosphoric acid and acetonitrile, was pumped at 0.8 ml/min (125 SM, Beckman) [Kosior-Korzecka and Bobowiec 2003]. The separation of hormones was performed in a gradient of acetonitrile (40-100 % in 20 min). The UV detection at 220 nm (DAD 168, Beckman) was used. Oestrogen and progesterone secretion was expressed as a quantity of hormone, which was released to 1 ml of culture medium by about 5×10^5 granulosa cells during 6 and 12 h, respectively. The whole experiment was three times repeated.

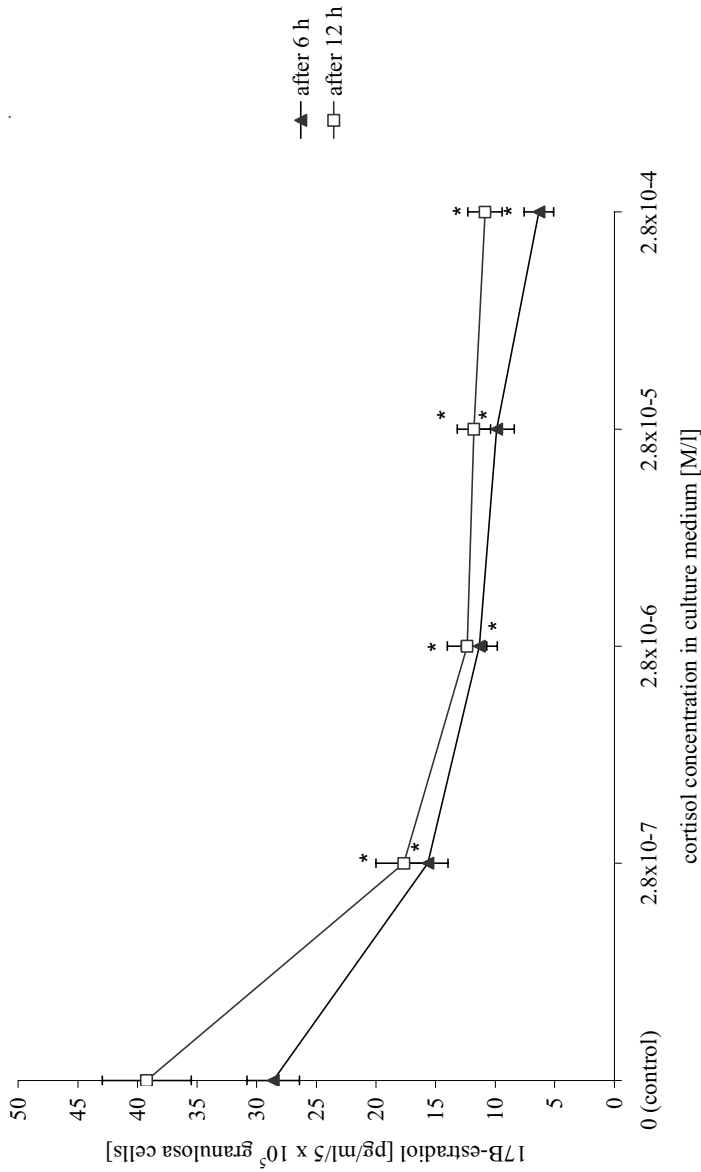
Statistical analysis of the obtained results was performed using Statistica 5.0 PL. Results are expressed as a mean and standard deviation ($x \pm SD$).

RESULTS

Effect of cortisol on 17 β -oestradiol (E-2) secretion. Cortisol, independently of the used concentration (2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-4} M/l) caused the significant ($P \leq 0.05$) suppression in E-2 secretion from porcine granulosa cells *in vitro*, both after 6 and 12 h of culture (Fig. 1, Fig. 4). The highest dose of cortisol (2.8×10^{-4} M/l) decreased E-2 secretion to the values 6.35 ± 0.49 and 10.85 ± 0.87 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/ 6 and 12 h, respectively, in comparison to the control (28.60 ± 1.47 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/ 6 h and 39.23 ± 2.19 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/12 h). The high negative correlation between the quantity of secreted E-2 and the used dose of cortisol was found ($r = -0.56$ after 6 h; $r = -0.52$ after 12 h).

Effect of cortisol on oestrone (E-1) secretion. Cortisol (2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-4} M/l) produced the marked ($P \leq 0.05$) decrease in E-1 secretion in comparison to the control (Fig. 2, Fig. 4). The most significant drop in E-1 was found in a case of the highest dose of cortisol - 2.8×10^{-4} M/l. In this condition secretion of E-1 reached the values 3.98 ± 0.50 and 5.82 ± 0.67 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/ 6 and 12 h, respectively, whereas in the control 23.00 ± 2.40 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/ 6 h and 23.32 ± 2.62 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/12 h.

Effect of cortisol on progesterone (P-4) secretion. The effect of cortisol on progesterone secretion from porcine granulosa cells was dose-dependent. Contrary to oestrogens, the increment in P-4 secretion under the influence of 2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-5} M/l cortisol was observed (Fig. 3, Fig. 4). There was found very high positive correlation between P-4 and cortisol dose in this range ($r = 0.81$ after 6h, $r = 0.72$ after 12 h). However, the highest dose of cortisol (2.8×10^{-4}) M/l caused the marked drop in P-4 secretion (29.95 ± 1.19 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/ 6 h and 23.45 ± 1.18 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/12 h, respectively) in comparison to control (31.80 ± 1.39 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/ 6 h and 40.63 ± 2.85 pg/ml/ 5×10^5 granulosa cells/12 h, respectively).

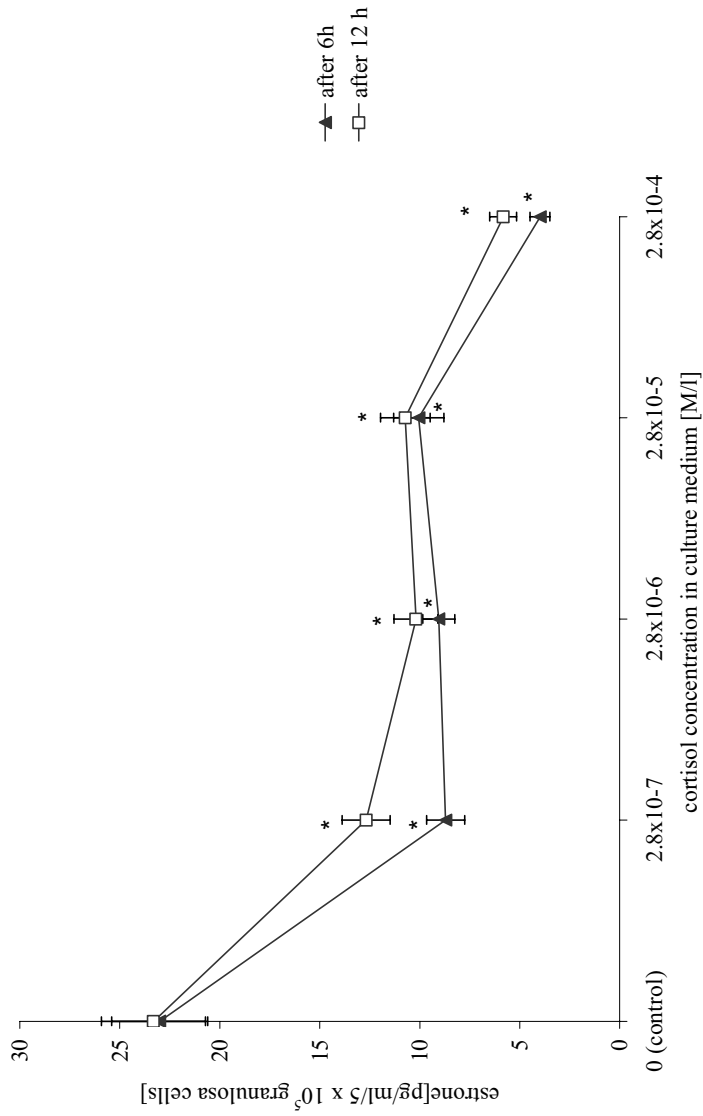


* – significant difference ($P \leq 0.05$) in comparison to control

* – różnica istotna statystycznie ($P \leq 0.05$) w porównaniu do kontroli

Fig. 1. The effect of cortisol in concentration 2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-4} M/l on 17β -oestradiol secretion by porcine granulosa cells isolated from 6–7 mm of diameter ovarian follicles

Ryc. 1. Wpływ kortyzolu w stężeniu 2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-4} M/l na wydzielanie 17β -estradolu przez komórki ziarniste macior wyizolowane z pęcherzyków jajnikowych o średnicy 6–7 mm

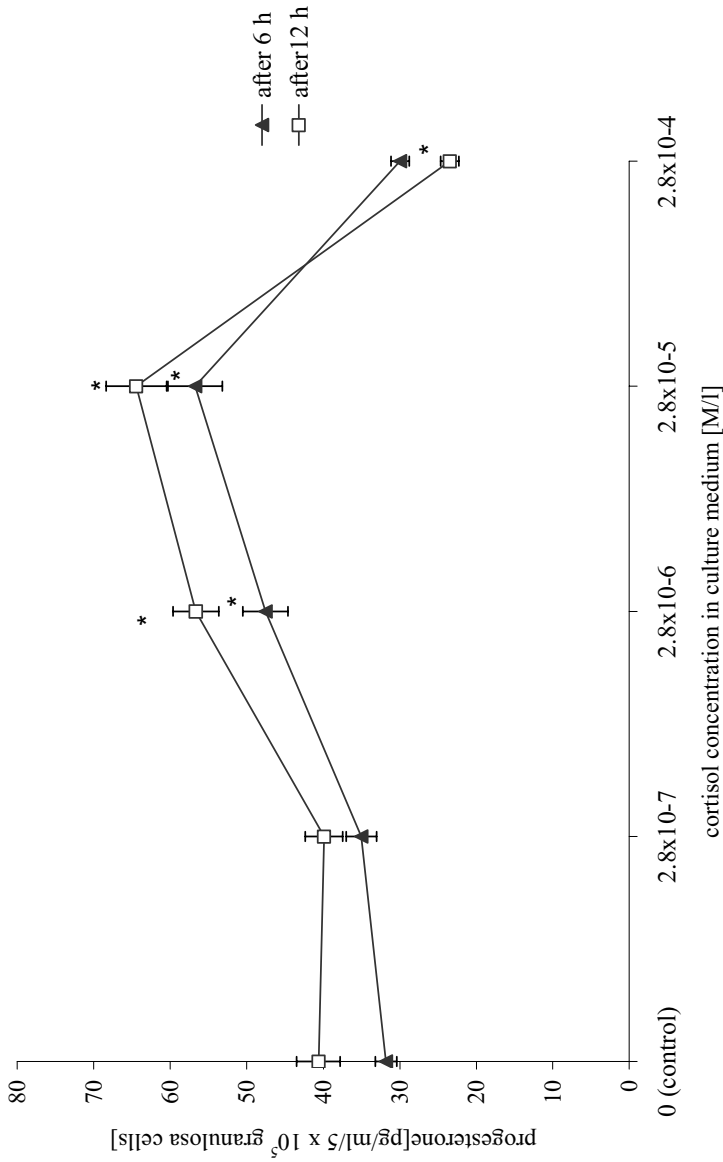


* – significant difference ($P \leq 0.05$) in comparison to control

* – różnica istotna statystycznie ($P \leq 0.05$) w porównaniu do kontroli

Fig. 2. The influence of cortisol in concentration 2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-4} M/l on oestrone secretion by porcine granulosa cells isolated from 6-7 mm of diameter ovarian follicles

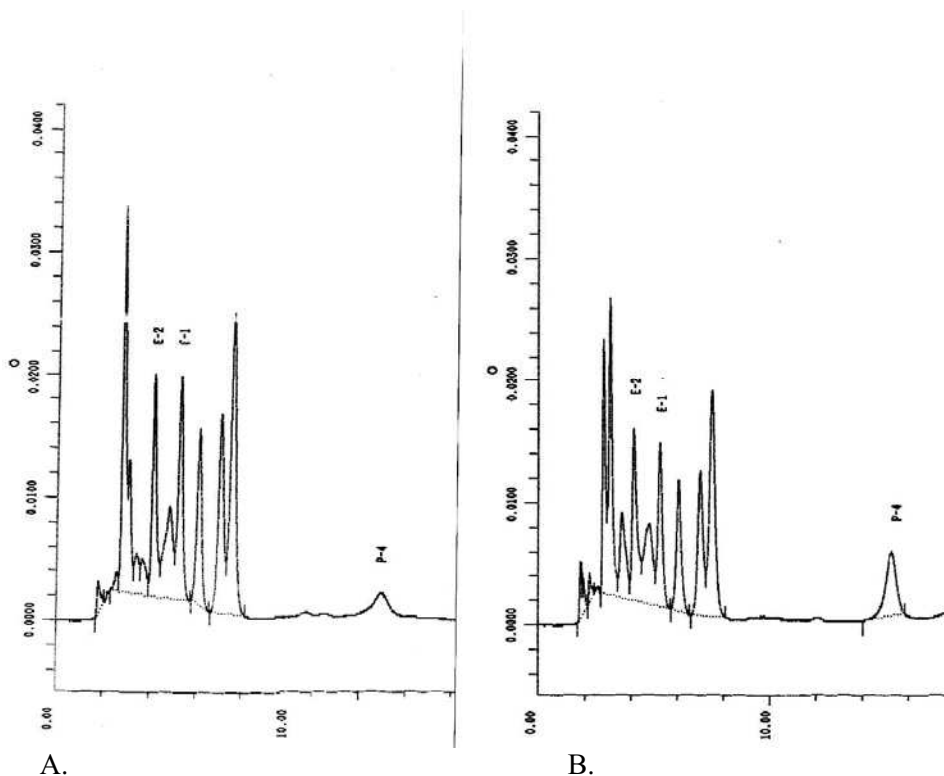
Ryc. 2. Wpływ kortyzolu w stężeniu 2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-4} M/l na wydzielanie estronu przez komórki zjamiste macior wyizolowane z pęcherzyków jajnikowych o średnicy 6-7 mm



* – significant difference ($P \leq 0.05$) in comparison to control

* – różnica istotna statystycznie ($P \leq 0.05$) w porównaniu do kontroli

Fig. 3. Secretion of progesterone by porcine granulosa cells under the influence of cortisol in concentration 2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-4} M/l
 Ryc. 3. Wydzielanie progesteronu przez komórki ziarniste macior wyizolowane z pęcherzyków jajnikowych o średnicy 6-7 mm pod wpływem kortyzolu w stężeniu 2.8×10^{-7} – 2.8×10^{-4} M/l



E-2 – 17 β -oestradiol E-2 – 17 β -estradiol
 E-1 – oestrone E-1 – estron
 P-4 – progesterone P-4 – progesteron

Fig. 4. Chromatographic separation of oestrogens and progesterone in culture medium by HPLC method. A. control granulosa cells culture (12 h); B. granulosa cells culture with 2.8×10^{-5} M/l of cortisol (12 h)

Ryc. 4. Chromatograficzny rozdział estrogenów i progesteronu w podłożu hodowlanym metodą HPLC. A. kontrolna hodowla komórek ziarnistych (12 godz.); B. hodowla komórek ziarnistych z kortyzolem w stężeniu 2.8×10^{-5} M/l

DISCUSSION

According to many authors [Turner et al. 2005, Turner et al. 2002, Varley and Stedman 1994] acute or repeated acute application of stressors connected with the increment in plasma cortisol concentrations does not impair reproduction in female pigs, even if it occurs during the critical endocrine events of the late follicular phase. There are also reports that influence of glucocorticoids on steroid production in granulosa cells is dependent on the stage of follicle maturation [Viveiros and Liptrap 1999]. Cortisol in the physiological range stimulates oestrogens production and release at the expense of progesterone synthesis due to increment in cytochrome P450 activity [Wood end Saund

1997] and lowering of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) level in the ovary [Chamberlain and Spicer 2001]. Indeed, some authors report that oestrogen production can be suppressed in porcine, bovine or rat granulosa cells under the influence of elevated level of cortisol or dexamethasone *in vitro*, but only when the exposition is longer than 48 h [Viveiros and Liptrap 1995]. The results obtained by us, point out that already the incubation of the cells for 6 and 12 h is sufficient to inhibit oestrogen secretion. Moreover, our data show that cortisol in high acute stress - like concentrations ($2.8 \times 10^{-7} - 2.8 \times 10^{-4}$ M/l) has an opposite effect on oestrogen and progesterone secretion from porcine pituitary cells *in vitro*. Cortisol causes the significant drop in 17β -oestradiol and oestrone secretion, whereas simultaneously exerts the dose - dependent influence on progesterone secretion. In concentration $2.8 \times 10^{-7} - 2.8 \times 10^{-5}$ M/l of cortisol causes the increment in P-4 secretion, whereas just in tenfold higher concentration produces the significant decrease in P-4 secretion. The possible reason of this occurrence may be the disruption in insulin-like growth factor (IGF-I) synthesis in granulosa cells by elevated level of cortisol. It is also possible that the high level of cortisol causes the increase in IGFBP level in granulosa cells. Because locally produced IGFBPs inhibit IGF actions at target cells [Giudice 2001], high concentration of cortisol can suppress in this way IGF-I - induced oestrogen production and secretion in granulosa cells. Additionally, it is known that glucocorticoids in high concentration may induce atresia-like characteristics in follicular cells, among other things by suppression of aromatase activity. Such action also can result in a significant drop in oestrogen synthesis [Viveiros and Liptrap 1995].

REFERENCES

- Chamberlain C.S., Spicer L.J., 2001. „Hormonal control of ovarian cell production of insulin-like growth factor binding proteins”, *Molecular and Cellular Endocrinology* 182, 69-81.
- Giudice L.C., 2001. „Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function”, *Journal of Society of Gynaecologic Investigation* 8 (1), 26-29.
- Khalid M., Haresign W., Luck M.R., 2000. “Secretion of IGF-I by ovine granulosa cells: effects of growth hormone and follicle stimulating hormone”, *Animal Reproduction Science* 58, 261-272.
- Kosior-Korzecka U., Bobowiec R., 2003. „Changes in the level of endogenous leptin, FSH, 17β -oestradiol and metabolites during lupin-induced increase in ovulation rate in ewes”, *Journal of Veterinary Medicine A* 50, 343-349.
- Sasson R., Winder N., Kees S., Amsterdam A., 2002. „Induction of apoptosis in granulosa cells by $TNF\alpha$ and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2”, *Biochemical Biophysical Research Communications* 294, 51-59.
- Turner A.I., Hemsworth P.H., Tilbrook A.J., 2005. „Susceptibility of reproduction in female pigs to impairment by stress or elevation of cortisol”, *Domestic Animal Endocrinology* 29, 398-410.
- Turner A.I., Hemsworth P.H., Tilbrook A.J., 2002. „Susceptibility of reproduction in female pigs to impairment by stress and the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis”, *Reproduction and Fertility Development* 14, 377-391.
- Varley M.A., Stedman R., 1994. „Stress and reproduction” [In:] Cole DJ, Wiseman J., Varley M.A., editors. *Principles in pig science*. Leicestershire: Loughborough, 277-296.

- Viveiros M.M., Liptrap R.M., 1995. „Altered ovarian follicle function in ACTH-treated gilts” *Animal Reproduction Science* 40; 107-119.
- Viveiros M.M., Liptrap R.M., 1999. „Glucocorticoid influence on porcine granulosa cell IGF-I and steroid hormone production *in vitro*”, *Theriogenology* 51 (6); 1027-1043.
- Wood C.E., Saoud C.J., 1997. „Influence of estradiol and androstenedione on ACTH and cortisol secretion in the ovine fetus”, *Journal of Society of Gynecologic Investigation* 4 (6); 279-283.

ZMIANY WYDZIELANIA ESTROGENÓW I PROGESTERONU PRZEZ KOMÓRKI ZIARNISTE DOJRZEWAJĄCYCH PĘCHERZYKÓW ŚWINI *IN VITRO* POD WPLYWEM KORTYZOLU W STĘŻENIACH TYPOWYCH DLA OSTREGO STRESU

Streszczenie. Powszechnie przyjmuje się, że jedynie przedłużona ekspozycja na stresor połączona ze znaczącym i długoterminowym wzrostem osoczowego stężenia kortyzolu może spowodować supresję reprodukcji u świń. Stąd, celem pracy było zbadanie, czy kortyzol w stężeniach typowych dla ostrego stresu powoduje zmiany wydzielania estrogenów (17 β -estradiolu – E-2 i estronu – E-1) oraz progesteronu (P-4) przez komórki ziarniste pęcherzyków izolowane od macior w późnej fazie pęcherzykowej cyklu rujowego. Jajniki pobierano od macior w wieku 5-6 lat. Komórki ziarniste izolowano z pęcherzyków jajnikowych o średnicy 6-7 mm i hodowano w podłożu DMEM/F 12 (1:1) z dodatkiem testosteronu (10^{-7} M/l) i gentamycyny (20 μ g/ml) bez kortyzolu lub, odpowiednio, z $2,8 \times 10^{-7}$, 10^{-6} , 10^{-5} i 10^{-4} mM/l kortyzolu. Po 6 i 12 godz. hodowli zbierano podłoże w celu określenia ilości wydzielonych estrogenów oraz progesteronu. Stężenia hormonów sterydowych analizowano metodą HPLC. Wydzielanie estrogenów i progesteronu zostało wyrażone jako stężenie hormonu wydzielonego do podłoża hodowlanego przez 5×10^5 komórek ziarnistych, odpowiednio w czasie 6 lub 12 godzin. Proliferację komórek określano za pomocą testu MTT. Uzyskane wyniki wskazują, że kortyzol niezależnie od zastosowanego stężenia ($2,8 \times 10^{-7}$ – $2,8 \times 10^{-4}$ M/l) powodował znaczącą ($P \leq 0,05$) supresję wydzielania E-2 i E-1 przez komórki ziarniste macior *in vitro* zarówno po 6, jak i 12 godz. hodowli. Natomiast wpływ kortyzolu na wydzielanie progesteronu przez komórki ziarniste był uzależniony od jego dawki. W przeciwieństwie do estrogenów, pod wpływem kortyzolu w stężeniach $2,8 \times 10^{-7}$ – $2,8 \times 10^{-5}$ M/l, obserwowano wzrost wydzielania P-4. Stwierdzono bardzo wysoką dodatnią korelację pomiędzy P-4 i dawką kortyzolu w tym zakresie stężeń ($r=0,81$ po 6 godz., $r=0,72$ po 12 godz.). Jednakże kortyzol w najwyższym z zastosowanych stężeń ($2,8 \times 10^{-4}$ M/l) powodował spadek wydzielania P-4 ($29,95 \pm 1,19$ pg/ml/ 5×10^5 komórek ziarnistych/ 6 godz. i $23,45 \pm 1,18$ pg/ml/ 5×10^5 komórek ziarnistych/ 12 godz.) w porównaniu do kontroli ($31,80 \pm 1,39$ pg/ml/ 5×10^5 komórek ziarnistych/ 6 godz. i $40,63 \pm 2,85$ pg/ml/ 5×10^5 komórek ziarnistych/ 12 godz.).

Słowa kluczowe: komórki ziarniste *in vitro*, kortyzol, 17 β -estradiol, estron, progesteron, maciora

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 18.06.2007

INFLUENCE OF PLANT EXTRACTS (*HERBIPLANT CS*) ON BIOCHEMICAL INDICES AND MINERAL ELEMENTS IN BLOOD SERUM OF FATTENERS

Daniel Korniewicz¹, Zbigniew Dobrzański², Adolf Korniewicz²,
Piotr Kaczmarek¹, Henryk Róžański¹, Krystyna Pogoda-Sewerniak²

¹LNB Poland Sp. z o.o. in Kiszkowo

²Wrocław University of Environmental and Life Sciences

Abstract. The mixture of plant extracts (*Herbiplant CS*) in amount of 125 and 500 mg/kg was added to feed mixtures of starter, grower and finisher type for fatteners from 20 to 100 kg of body weight. The research material were 27 fatteners divided into 3 groups, 9 individuals in each group. After 85 days of fattening, the blood from jugular vein was collected, and biochemical indices as well as macro and microelements concentration was determined. *Herbiplant CS* did not influence the crude protein, albumin and urea level in blood serum, while it significantly influenced the increase in glucose level that may profitably influence the energy balance. Applied phytopreparation did not influence the enzymatic (ATP, ALT and GGT), but had a beneficial effect on lipid balance, what was confirmed in lowered level of total cholesterol and its LDL fraction. The level of macroelements (Ca, P, Na, K, Cl) in blood serum was not dependent on used phytopreparation, however, the supplement significantly influence the increase in copper and zinc level in blood serum. No significant differences in the level of analysed parameters depending on used *Herbiplant CS* doses in mixtures for fatteners (125 and 500 mg/kg) were observed.

Key words: plant extracts, fatteners, blood serum, biochemical indices

INTRODUCTION

Biologically active substances that are present in herbs possess multidirection activity: antibacterial, antifungal, immunomodulating [Grela et al. 1998, Hart 2005, Ozcan and Boyraz 2000, Korniewicz and Róžański 2006], antioxidative and reducing oxidative stress in animals and humans [Pajk et al. 2006, Yingming et al. 2004]. They influence numerous metabolic processes [Bhattaram et al. 2002], point preventive and therapeutic

¹Corresponding autor – Adres do korespondencji: Zbigniew Dobrzański, Department of Animal Hygiene and Environmental, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. Chelmońskiego 38C, 51-630 Wrocław, e-mail khz@ozi.ar.wroc.pl

activity, are the potential substitute of feed antibiotics [Hanczakowska and Urbańczyk 2002, Lien et al. 2007].

These substances also inhibit especially big influence on the increase in enzymes activity [Platel and Srinivasan 1996 and 2000]. The enzymes, by free radicals removing, influence the protection of intestinal villuses causing the increase in their surface and the possibility of nutrients absorption. The result of such an influence may be the improvement of health status and production effects, what was showed for example in the research conducted by Grela et al. [1998, 2000] and Korniewicz [2004] and Kołacz et al. [1997].

In Research-Promoting Centre LNB Poland Ltd. in Kiszkowo, the preparation named *Herbiplant CS*, that is a mixture of plant extracts was made out.

In the previous study conducted by Korniewicz et al. [2007 b] it was showed that the preparation in a dose of 125 mg/kg of fed mixture for fatteners had a profitably influence on the increase in body weight gains, and lower feed intake for 1 kg of gain. Also the influence of the preparation on crude fibre digestibility, N-free extractives and the increase in nitrogen retention time was observed.

The aim of the research was an assessment of the influence of the two doses of *Herbiplant CS* phytopreparation (125 and 500 mg/kg) on chosen biochemical indices and mineral elements level in blood serum of fatteners that were given mixtures supplemented with the preparation during the whole fattening period.

MATERIAL AND METHODS

Herbiplant CS phytopreparation was made out in Research-Promoting Centre LNB Poland Ltd. It consists of micronised plant parts, volatile oils and plant extracts sedimented onto silica and stabilised with palm oil. The preparation is standardised regarding the content of following main plant-originating active substances: thymol – 38500, 1,8-cineol – 35000, carvacrol 10000, pinen- 4000, capsacine- 1700, cinnamon aldehyde- 975, eugenol- 450, flavonides- 6000, volatile oils- 97000 mg/kg.

Made out this way phytopreparation in a form of loose powder was used as premixes of starter, grower and finisher type component, administered in amount of 0.5% to feed mixtures. Wheat barn was used as the premixes carrier. Three kinds of feed mixtures from the same feed ingredients, differing only in *Herbiplant CS* supplement amount used in premixes, were produced.

Three nutrition groups were created:

- group I – control
- group II – *Herbiplant CS* – 125 mg/kg of feed mixture
- group III – *Herbilant CS* – 500 mg/kg of feed mixture

Three- stage experimental fattening was conducted from 20 up to 100 kg of body weight. Three kinds of feed mixtures adjusted to each fattening stage were composed:

- *starter* type mixture– 1st stage of fattening (24 days)
- *grower* type mixture– 2nd stage of fattening (26 days)
- *finisher* type mixture– 3rd stage of fattening (35 days)

Feed material used for feed mixtures production was subject to chemical analysis in the laboratory of Department of Animal Nutrition and Feed Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences using the analytical methods in force (AOAC,

1990). Energy value of feed mixtures was calculated basing on own components analysis and digestibility coefficients as well as formulas included in Pig Feeding Standards (1993) and CVB (2004). Percentage composition of *starter*, *grower* and *finisher* type mixtures and nutrients content are presented in Table 1.

Produced in a form of loose powder feed mixtures were subject to the biological assessment using fatteners in Animal Nutrition Experimental Plant in Gorzyń (Agricultural University in Poznań).

The research material consisted of 27 weaned piglets [sow (wbp x pbz) x boar (hamp x pietr)] of initial body weight of about 20 kg, that were classified to 3 feeding groups, 9 individuals in each one. All fatteners were kept individually in pens equipped with pigs feeders and nipple drinkers.

Table 1. Percentage composition and feeding value of mixtures for fatteners
Tabela 1. Skład procentowy i wartość pokarmowa mieszanek pełnoporcjowych dla tuczników

Ingredients Materiały paszowe	Units Jedn. miary	Type of mixture – Typ mieszanki		
		Starter	Grower	Finisz
Ground maize – Śruta kukurydziana	%	30,00	-	-
Ground wheat – Śruta pszenna	%	29,50	19,50	14,50
Ground barley – Śruta jęczmienna	%	15,00	42,00	25,50
Ground triticale – Śruta pszenżytnia	%	-	20,00	40,00
Wheat bran – Otręby pszenne	%	-	-	5,00
Soya bean oilmeal – Śruta p. sojowa	%	20,50	15,00	12,00
Acidifier – Lonacid Max (1017)	%	0,50	-	-
M.p.u. – Farmer premix:				
Starter Herba Global Forte	%	4,00	-	-
Grower/Finisz Herba Global Forte	%	-	3,00	2,50
Pre-mixture 1 or 2 or 3	%	0,50	0,50	0,50
Przedmieszka 1 lub 2 lub 3				
Total – Razem	%	100,00	100,00	100,00
In 1 kg of mixture: W 1 kg mieszanki:				
Metabolisable energy (netto) Energii metabolicznej (netto)	MJ	13,25	13,10	13,05
	kcal	2280	2260	2250
Crude protein – Białka ogólnego	%	17,70	16,40	15,60
Crude fiber – Włókna surowego	%	2,73	3,38	3,35
Crude fat – Tłuszczu surowego	%	2,42	2,03	2,04
Crude ash – Popiołu surowego	%	5,32	4,71	4,32
Łysinę – Lizyny	%	1,18	1,01	0,90
Methionine + Cystine – Metioniny z cystyną	%	0,69	0,60	0,57
Threonine – Treoniny	%	0,76	0,64	0,59
Tryptophan – Tryptofanu	%	0,21	0,20	0,19
Isoleucine – Izoleucyny	%	0,70	0,63	0,59
Ca total – Ca ogólny	%	0,78	0,69	0,59
P total – P ogólny	%	0,63	0,52	0,53
P digestible – P strawny	%	0,43	0,31	0,28
Na	%	0,19	0,17	0,15

After 24, 50 and 85 days of feeding with the mixtures, the individual control of body weight gains was performed, the feed intake and its utilization for 1 kg of body weight gain were calculated. Productive results of performed fattening were presented in a separate publication [Korniewicz et al. 2007c].

In the last day of the experiment (85th day of fattening – in the morning before feeding) blood from the jugular vein was collected, and after serum separation the following biochemical parameters were determined: crude protein, albumin, glucose, urea, hepatic enzymes (AST, ALT, GGT), total cholesterol and its HDL, LDL fractions and triglycerides. Also the content of macroelements: Ca, P, Mg, Na, K, Cl, and microelements: Fe, Cu, Zn was determined.

The analysis were conducted in the laboratory of Department of Animal Nutrition and Feed Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences using biochemical analyzer Pentra 400, Horiba ABX Company, with the suitable reagents of RANDOX Company.

The results were worked out statistically using one-factor analysis of variance, and differences of mean values between groups were assessed using Duncan's multiple range test (Statgraphics 5.0 software).

RESULTS AND DISCUSSION

Mixtures assessment

Feed mixtures of *starter* type administered to weaned piglets for the first 24 days of feeding contained 17.7% of crude protein, 1.18% of crude lysine, 0.69% of methionine with cystine, 0.76% of threonine and 0.21% of tryptophan. In the second stage of fattening lasting 26 days, *grower* type mixtures were used. They contained 16.4% of crude protein, 1.01% of crude lysine, 0.60% of methionine with cystine, 0.64% of threonine and 0.20% of tryptophan. In the third stage of fattening lasting 35 days fatteners were feeding with *finisher* type mixtures, that contained 15.6% of crude protein, 0.90% of crude lysine, 0.59% of methionine with cystine, 0.59% of threonine and 0.19% of tryptophan. The energy value of mixtures used in particular fattening stages was similar and amounted to 2280-2260-2250 kcal/kg, respectively (net energy).

Comparing to *starter* type mixtures, *grower* and *finisher* type ones had a lowered content of mineral components. The decrease in protein, amino acids and mineral components content in *grower* and *finisher* type mixtures in relation to *starter* type one is a result of physiological needs and is consistent with the recommendations included in Polish (1993) and Dutch (2004) pig feeding standards and with the pig feeding programme by LNB Poland Sp. Ltd. worked out by Korniewicz [2006].

Biochemical indices in blood serum

Obtained blood serum analysis results presented in Table 2, point some activity of assessed preparation given if feed mixture for fatteners in the whole fattening period. However, *Herbipiant CS* in a dose of 125 and 500 mg/kg did not influence such indices of protein transformation as: crude protein (68,8 – 72.0 g/l), albumin (55.9 – 56.6 g/l) and urea (6.42 – 6.35 mmol/l). In the previous research conducted by Korniewicz et al. [2007b], biochemical indices in blood serum of younger fatteners (45 kg) that were given feed mixture with an addition of *Herbipiant CS* in amount of 125 mg/kg, were

analysed. It was revealed that used preparation in that dose also did not affect the indices of protein transformation comparing to the control group. However, the indices were lower comparing to the older fatteners (100 kg) in the present study.

Table 2. Biochemical indices of fatteners blood serum
Tabela 2. Wskaźniki biochemiczne w surowicy krwi tuczników

Item Wyszczególnienie	Groups – Grupy		
	I Control Kontrolna	II Herbiplant CS 125 ppm	III Herbiplant CS 500 ppm
Total protein	68,8	72,0	71,1
Białko całkowite (g/l)	± 4,38	± 5,73	± 5,44
Albumins	55,9	56,6	56,2
Albuminy (g/l)	± 2,49	± 2,89	± 1,95
Urea	6,42	6,35	6,45
Mocznik (mmol/l)	± 0,30	± 0,27	± 0,51
Glucose	2,15 ^a	3,72 ^b	3,55 ^b
Glukoza (mmol/l)	± 0,39	± 0,37	± 0,33
AST (U/l)	53,7	55,1	53,8
	± 6,80	± 8,39	± 10,84
ALT (U/l)	41,2	41,4	42,5
	± 1,27	± 1,78	± 1,56
GGT (U/l)	38,7	40,1	41,0
	± 6,98	± 8,39	± 10,89
Cholesterol (mmol/l)	2,55 ^a	2,25 ^b	2,25 ^b
	± 0,20	± 0,26	± 0,22
HDL (mmol/l)	0,98	0,95	0,90
	± 0,10	± 0,13	± 0,11
LDL (mmol/l)	1,36 ^a	1,18 ^b	1,15 ^b
	± 0,14	± 0,12	± 0,11
Triglyceride	0,30	0,30	0,29
Trójglicerydy (mmol/l)	± 0,05	± 0,04	± 0,07

a, b – $P \leq 0,05$

Baranowski et al. [2004] assessed an influence of herbal mixture (35 g) and a herbal alcohol extract of *Rhodiola rosea radix* (*Rhodiolae roseae radix*) in a dose of 5 ml administered for 95 days, on the chosen biochemical features of boars' blood serum. The results obtained prove that used herbal mixture had a significant influence on the increase in crude protein content (75.44 g/l) comparing to boars that were given the extract of *Rhodiola rosea radix* (71.32 g/l). However, used herbs did not affect the urea level.

The results of own research prove, that *Herbiplant CS* in a dose of 125 as well as 500 mg/kg had a significant ($P \leq 0.05$) influence on the increase in glucose level (from 2.15 to 3.72 mmol/l). Hence, it can be concluded that the plant preparation profitably affects the energy balance of fatteners. Similar effect was obtained in the previous research [Korniewicz et al. 2007b] in the case of younger fatteners that were given the mixture with *Herbiplant CS* participation on the level of 125 mg. The increase in glucose level from 2.26 to 4.17 mmol/l was observed in the research.

Used for fatteners *Herbiplant CS* in a dose of 125 or 500 mg/kg did not influence the activity of enzymes like: AST (53.7 – 55.1 U/l), ALT (41.2 – 42.5 U/l) and GGT (38.7 – 41.0 U/l).

However, the results of analysis point the beneficial influence of assessed preparation on lipids management. This may be confirmed by a significant ($P \leq 0.05$) decrease in total cholesterol content (from 2.55 to 2.25 mmol/l) and its LDL fraction (from 1.36 to 1.15 mmol/l). Similar impact of *Herbiplant CS* in a dose of 125 mg/kg of feed mixture was observed in the case of younger fatteners [Korniewicz et al. 2007b]. Also Grela (2000) observed the profitable influence of herbs on fat transformations in fatteners. In another research, Korniewicz et al. [2007a] giving *Saccharomyces cerevisiae* yeast enriched in bioelements (Fe, Cu, Mn) to weaned piglets, also noted the influence of these elements (in an organic form) on the decrease in cholesterol level in blood serum.

Mineral elements in blood serum

Obtained results of blood serum analysis as regards mineral elements are presented in Table 3. They point that *Herbiplant CS* used in a feed mixture in a dose of 125 and 500 mg/kg did not affect Ca (3.12 – 3.13 mmol/l) and P level (3.46 – 3.38 mmol/l). However, a significant ($P \leq 0.05$) influence of *Herbiplant CS* in a dose of 500 mg/kg on the increase in Mg level from 0.99 to 1.10 mmol/l was noted.

The content of other controlled macroelements i.e. Na, Cl, K was not dependent on preparation used as a feed mixture addition. The level of these elements was close to reference values given by Winnicka [1997] and to those obtained in the previous study by Korniewicz et al. [2003] and Baranowski et al. [2004].

Table 3. Content of mineral elements in pigs blood serum

Tabela 3. Zawartość składników mineralnych w surowicy krwi

Item Wyszczególnienie	I	II	III
	Control Kontrolna	Herbiplant CS 125 ppm	Herbiplant CS 500 ppm
Ca mmol/l	3,12 ± 0,10	3,13 ± 0,14	3,12 ± 0,10
P mmol/l	3,46 ± 0,19	3,48 ± 0,19	3,38 ± 0,21
Mg mmol/l	0,99 ^a ± 0,14	1,06 ± 0,10	1,10 ^b ± 0,07
Na mmol/l	137,4 ± 1,28	138,0 ± 1,25	137,8 ± 1,60
K mmol/l	5,10 ± 0,34	5,12 ± 0,26	5,18 ± 0,30
Cl mmol/l	105,7 ± 1,45	105,8 ± 1,50	105,6 ± 1,18
Fe μmol/l	23,20 ± 3,27	25,08 ± 1,52	25,00 ± 3,20
Cu μmol/l	46,20 ^a ± 2,55	52,64 ^b ± 2,90	52,03 ^b ± 3,57
Zn μmol/l	18,90 ^a ± 1,82	23,00 ^b ± 2,26	25,42 ^b ± 2,65

a, b – $P \leq 0,05$

However, *Herbiplant CS* used in a feed mixture had a significant ($P \leq 0.05$) influence on the increase in Cu (from 46.2 to 52.03 $\mu\text{mol/l}$) and Zn level (from 19.9 to 25.4 $\mu\text{mol/l}$). Any significant differences between 125 and 500 mg/kg doses were observed. A profitable impact of the preparation on the increase in Fe level (from 23.2 to 25.0 $\mu\text{mol/l}$) was also noted, however, the difference was not confirmed statistically.

The level of mineral elements in blood serum of pigs is quite changeable and depends mainly on their content in a diet and on bioavailability. Novotný et al. [2005] administered Fe, Cu, Mn, Zn and Se in an organic or traditional form to feed mixture for weaned piglets. The content of these microelements in blood serum at the age of 65, 72, 80 and 93 days was controlled. Almost in all periods, the significant influence of organic form on the increase in the level of these microelements, i.e. Fe from 14.66 to 18.29, Cu from 17.8 to 22.71, Zn from 8.50 to 9.52, Mn from 0.43 to 0.57 $\mu\text{mol/l}$, was observed. Czech and Grela [2006] giving mineral chelates *Biomax* in a feed mixture for fatteners, noted a significant increase in Cu, Zn and Mn content in blood serum comparing to the control group.

Better utilization of mineral elements in feeding doses and their lower elimination in excreta is of a big physiological, health and ecological importance what is emphasized by some authors [Jongbloed et al. 2003, Kabata-Pendias and Pendias 1999].

CONCLUSIONS

1. *Herbiplant CS* phytopreparation added to the feed mixture in a dose of 125 and 500 mg/kg did not influence the level of crude protein, albumin and urea in blood serum of fatteners, however it significantly influence the increase in glucose level that may profitably affect the energy balance.

2. The used preparation did not influence the enzymatic activity (ATP, ALT and GGT), while it profitably influenced fat management, that was confirmed by decreased content of total cholesterol and its LDL fraction.

3. Macroelements content (Ca, P, Na, K, Cl) in blood serum was not dependent on used phytopreparation, however it significantly influenced the increase in copper and zinc level in blood serum, what suggests their better bioavailability.

4. Any significant differences in a level of analyzed indices in relation to used doses of *Herbiplant CS* in feed mixtures for fatteners (125 and 500 mg/kg) were observed.

REFERENCES

- AOAC., 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th Ed., Arlington, Virginia, USA.
- Baranowski M., Gajęcki M., Obramski K., 2004. The influence of herbal supplements given together with the feed mixture on chosen biochemical indices of boars' blood serum. Zesz. Nauk. AR Wrocław ser., Zoot. LII, 505, 42-46. (in Polish)
- Bhattaram V.A., Graefe U., Kohlert C., Veit M., Derendorf H., 2002. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomedicine* 9, 1-33.
- CVB, 2004. Veevoedertabel 2004. Centraal Veevoederbureau, Lelystad, Holandia.

- Czech A., Grela E.R., 2006. The influence of mineral chelates addition in mixtures for growing pigs on the growth and blood components. Ann. UMCS Lublin, sect. EE, 16, 111-117. (in Polish).
- Grela E.R., 2000. Influence of herbs mixture in pigs feeding on performance of some lipid parameters in blood and backfat. Ann. UMCS Lublin, sect. EE, 18, 245-250. (in Polish).
- Grela E.R., Sembratowicz L., Czech A., 1998. Immunostimulating herbs activity. Med. Wet., 54, 152-158. (in Polish).
- Hanczakowska E., Urbańczyk J., 2002. Efficiency of herb mixtures as antibiotic replacers for piglets according to their age. Ann. Anim. Sci., 2 (2), 131-138.
- Hart B.L., 2005. The evolution of herbal medicine: behavioural perspectives. Anim. Beh., 70, 975-989.
- Jongbloed A.W., Kemme P.A., De Groote G., Lippens M., Meschy F., 2002. Bioavailability of major and trace minerals. International Association of the European (EU) Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials, EMFEMA Brussels.
- Kabata-Pendias A., Pendias H., 1999. Biogeochemistry of trace elements. Wyd. Nauk. PWN Warszawa, (in Polish).
- Kołacz B., Bodak E., Światała M., Gajewczyk P., 1997. Herb as agents affecting the immunological status and growth of piglets weaned body weight deficiency. J. Anim. Feed Sci., 6, 269-279.
- Korniewicz A., Dobrzański Z., Kołacz R., Korniewicz D., 2003. Bioavailability of zinc, selenium and chromium from yeast *Saccharomyces cerevisiae* for swine. Chem. Agric. 4, 171-181.
- Korniewicz D. 2004. The possibilities of feed antibiotics substitution in feed mixtures for pigs. Zesz. Nauk. AR Wrocław, Nr 485, ser. Rozprawy CCXIV. (in Polish).
- Korniewicz D. 2006. Pigs – feeding programme. LNB Poland Sp. z o.o., Kiszkowo. (in Polish).
- Korniewicz D., Dobrzański Z., Korniewicz A., Pogoda-Sewerniak K., 2007a. The influence of iron, copper and manganese from organic forms (*Saccharomyces cerevisiae* yeast) on mineral elements and haematological and biochemical indices in blood serum of young pigs. Acta Scient. Pol. ser. Med. Veter., 6(1), 45-57. (in Polish).
- Korniewicz D., Róžański H., 2006. The efficiency of active substances of plant origin in pigs feeding. Konf. Nauk. „Nowe wyzwania w ochronie zdrowia świń”. Mag. Wet. Supl. – Świnie. Puławy 6-7.06.2006, s. 22-24. (in Polish).
- Korniewicz D., Róžański H., Dobrzański Z., Kaczmarek P., Korniewicz A., 2007b. The influence of plant extracts (*Herbiplant CS*) on the digestibility of main nutritional components, balance and absorption of mineral elements in fatteners. Ann. Anim. Sci. (in press).
- Korniewicz D., Róžański H., Usydus Z., Dobrzański Z., Korniewicz A., Kaczmarek P., Frankiewicz A., Szulc K., 2007c. The influence of plant extracts (*Herbiplant CS*) on production effects, slaughter value and fatty acids content of fatteners backfat. Folia Univ. Agric. Stetin. Ser. Agricultura., Alimentaria, Piscaria et Zootechnica (in press).
- Lien T.F., Horng Y.M., Wu C.P., 2007. Feasibility of replacing antibiotic feed promoters with the Chinese traditional herbal medicine *Bazhen* in weaned piglets. Livest. Prod. Sci. 107: 97-102.
- Normy Żywnienia Świń. Feed mixtures nutritional value. 1993. IFiZZ PAN Jabłonna. Wyd. Omnitel Press Warszawa. (in Polish).
- Novotný J., Seidel H., Kováč G., Babček R., 2005. Bioavailability of trace elements proteinates in pigs. Med. Wet., 61(1), 38-41.
- Özcan M., Boyraz N., 2000. Antifungal properties of some herb decoctions. Europ. Food. Res. Technol., 212, 86-88.
- Pajk T., Rezar V., Levart A., Salobir J., 2006. Efficiency of apples, strawberries, and tomatoes for reduction of oxidative stress in pigs as a model for humans. Nutrition, 22, 376-384.

- Platel K., Srinivasan K., 1996. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47, 55-59.
- Platel K., Srinivasan K., 2000. Influence of dietary spices or their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. *Nahrung* 44: 42-46.
- Winnicka A., 1997. Reference values for main laboratory analysis in veterinary. Wyd. SGGW Warszawa. (in Polish)
- Yingming P., Ying L., Hengshan W., Min L., 2004. Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. *Food Chem.*, 88: 347-350.

WPLYW EKSTRAKTÓW ROŚLINNYCH (*HERBIPLANT CS*) NA KSZTAŁTOWANIE SIĘ WSKAŹNIKÓW BIOCHEMICZNYCH I SKADNIKÓW MINERALNYCH W SUROWICY KRWI TUCZNIKÓW

Streszczenie. Mieszaninę ekstraktów roślinnych (*Herbiplant CS*) w ilościach 125 i 500 mg dodawano do mieszanek pełnoporcjowych typu starter, grower i finiszera dla tuczników od 20 do 100 kg masy ciała. Materiał badawczy stanowiło 27 tuczników przydzielonych do 3 grup po 9 osobników w grupie. Po 85 dniach tuczu pobrano krew z żyły jarzmowej i po oddzieleniu surowicy oznaczono w niej parametry biochemiczne oraz koncentracje makro- i mikroelementów. *Herbiplant CS* w dawce 125 i 500 mg/kg nie miał wpływu na poziom białka całkowitego albumin oraz mocznika w surowicy krwi., natomiast istotnie wpłynął na zwiększenie poziomu glukozy, co może mieć korzystny wpływ na gospodarkę energetyczną. Stosowany preparat nie miał wpływu na aktywność enzymatyczną (ATP, ALT i GGT), ale korzystnie wpłynął na gospodarkę tłuszczową, co znalazło potwierdzenie w zmniejszonym poziomie cholesterolu ogólnego i frakcji LDL. Poziom makroelementów (Ca, P, Na, K, Cl) w surowicy krwi nie był zależny od stosowanego fitopreparatu, natomiast wpłynął on istotnie na zwiększenie poziomu miedzi i cynku w surowicy krwi, co może świadczyć o lepszej ich bioprzyswajalności. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie badanych wskaźników zależnie od stosowanych dawek *Herbiplantu CS* w mieszankach dla tuczników (125 i 500 mg/kg).

Słowa kluczowe: ekstrakty roślinne, tuczniaki, surowica krwi, wskaźniki biochemiczne

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 18.06.2007

EFEKTYWNOŚĆ WZROSTU CIELĄT RASY CHAROLAISE Z UWZGLĘDNIENIEM GENETYCZNEGO POLIMORFIZMU MIOSTATYNY I SOMATOTROPINY

Roman Kwaśnicki¹, Roman Frankowski²

¹ Kolegium Karkonoskie w Jeleniej Górze

² Radan-1 sp. z o.o., Gospodarstwo Rolne

Streszczenie. U jałówek hodowlanych rasy charolaise, odchowanych przez krowy-matki w systemie wolnym utrzymania pastwiskowego, bezbudynekowego i dokarmianych paszami objętościowymi (kiszonki: z kukurydzy i mieszanek motylkowo-zbożowych oraz słoma), oznaczono genetyczny polimorfizm somatotropiny i miostatyny. Frekwencja genotypów: bGH-LL 0,417, bGH-LV 0,517 i bGH -VV 0,066 (alleli : bGH-L 0,765 i bGH-V 0,325) oraz MSTN-AA 0,817, MSTN-AB 0,183 i MSTN-BB 0,00 (alleli: MSTN-A 0,908 oraz MSTN-B 0,092). Najwyższą masę ciała przy urodzeniu i w wieku 7 mies. miały jałówki o bGH-VV (57,3 i 300,6 kg), statystycznie więcej aniżeli u pozostałych genotypów. Współzależności genotypów MSTN z cechami wzrostu nie stwierdzono. Wykazano statystycznie istotne różnice badanych mas ciała w grupach ojcowskich; najwyższe masy ciała miały córki buhaja *Dimas*, najniższe po ojcu *Calin* (odp. 51,3-39,6 kg i 295,5-275,2 kg, przy $P \leq 0,01$).

Słowa kluczowe: bydło, charolaise, genetyczny polimorfizm, bGH, MSTN

WSTĘP

Charolaise jest rasą późno dojrzewającą. Duża masa cieląt przy urodzeniu (buhajki ważą przeciętnie 48 kg, a cieliczki – 45 kg) prowadziła do trudnych porodów i znacznych upadków cieląt. Współcześnie hodowane krowy rasy charolaise, wskutek prowadzonej selekcji na eliminację tej cechy, znacznie lżej się cielą. Do krzyżowania z bydlęciem mięsno-mlecznym używa się obecnie buhajów dających lżejsze potomstwo przy urodzeniu [Dobicki i in. 2002]. Zwierzęta można opasać do wysokich mas ciała bez obniżenia jakości tuszy. Wydajność rzeźna buhajów opasanych do wieku 14-16 miesięcy wynosi od 60 do 65% [Reklewski 1995]. Bydło rasy charolaise dobrze wykorzystuje

pasze i łatwo przystosowuje się do różnych warunków klimatycznych, dlatego nadaje się do krzyżowania towarowego [Gregory i in. 1993, Grodzki 1977, Choroszy i in. 2000]. Potwierdzają to w swoich badaniach Petkov i in. [2000], w których wskazują na najlepsze wykorzystanie paszy przez mieszańce po buhajach charolaise (przy najkrótszym okresie opasu) w porównaniu do rówieśników rasy czarno-białej i mieszańców z rasą hereford.

Hormon wzrostu (growth hormone – GH, somatotropina) syntetyzowany jest przez przedni płąt przysadki. Ocenia się, że podanie egzogenego GH wzmacnia intensywność przemian metabolicznych (w tym syntezy białek), co sprawia, że w przypadku np. świń można oczekiwać zwiększenia przyrostu masy ciała o 10-20%, zwiększenia odkładania białka o 2-30%, zmniejszenia przyrostu tkanki tłuszczowej o 30-40% i wreszcie zwiększonej efektywności tuczu o 15-35% [Urbański 2003]. W doświadczeniu Grochowskiej [1994] porównano hormon wzrostu między bydłem użytkowanym mlecznie i mięśnie. Stwierdzono istotnie wyższy poziom bGH u jałówek i buhajów rasy c.b. nad mięsną rasą piemontese, co sugeruje, że bydlę mleczne charakteryzuje się wysokim poziomem somatotropiny we krwi, prawdopodobnie w wyniku wieloletniej selekcji w kierunku wzrostu produkcji mleka. Obserwacje wykazały przewagę homozygot Leu/Leu u bydła rasy c.b. nad pozostałymi genotypami GH w obrębie rasy. Z kolei najwyższą liczbę homozygot Val/Val stwierdzono u zwierząt rasy piemontese; jednak nie wykazano istotnych różnic w częstości genotypów i alleli genu somatotropiny między płciami w obrębie badanych ras.

Za geny, które potencjalnie wpływają na mięsność tuszy, uznano dotąd gen hormonu wzrostu (GH) oraz gen Pit1 – czynnika transkrypcyjnego regulującego ekspresję GH [Wyszyńska-Koko 2003]. Bydlęcy hormon wzrostu (bGH) jest głównym czynnikiem stymulującym wzrost i rozwój organizmu. Somatotropina działa anabolicznie – bezpośrednio na syntezę białek mięśni, a także bezpośrednio katabolicznie na tkankę tłuszczową [Evocek i in. 1988], wpływa na poprawę cech wzrostu i jakości tuszy. U bydła występuje mutacja punktowa polegająca na transwersji C → G w kesonie 5, która powoduje zamianę leucyny (Leu) na walinę (Val) w pozycji 127 sekwencji aminokwasów i występuje w trzech genotypach bGH: LL, LV, VV. Dymnicki i Oprządek [2000] wykazali wpływ polimorfizmu bGH na cechy użytkowości rzeźnej. Wykazano, że buhajki rasy simentalskiej o genotypie LV miały lepszą użytkowość mięsną niż buhajki o genotypach homozygotycznych (LL i VV). Badania Oprządek [1998] wykazały związek polimorfizmu genu GH z masą ciała oraz dobowymi przyrostami masy ciała buhajków.

U bydła znane jest zjawisko przerostu tkanki mięśniowej, zwane „podwójnym umięśnieniem”. Wynika ono z szeregu mutacji w genie miostatyny (MSTN, GDF8), które odpowiedzialne są za powstawanie nieaktywnego białka MSTN; miostatyna jest czynnikiem wzrostu, który działa jako negatywny regulator miogenezy (cyt. za Wyszyńską-Koko 2003). Biologiczną funkcję miostatyny (MSTN) jako regulatora wzrostu mięśni rozpoznano w roku 1997, uszkadzając mysz gen tego białka – GDF-8. U osobników z unieczynnionym genem GDF-8 zaobserwowano dwu-, a nawet trzykrotnie większą masę mięśni oraz hiperplazję i hipertrofię włókien w porównaniu do normalnych myszy [Mc Pherron i Lee 1997]. Znacznie powiększona muskulatura myszy, a także zbieżność umiejscowienia na mapie genetycznej mysiego genu GDF-8 i locus miostatyny bydła, dało powody do przypuszczania, że za hipertrofię mięśniową u bydła odpowiedzialny jest homolog mysiego genu miostatyny. Mc Pherron i Lee [1997] porównując ze sobą sekwencje genu MSTN z sekwencją aminokwasów w cząsteczce miostatyny innych

kręgowców wykazali, że istnieje duże podobieństwo tych sekwencji. W przypadku myszy, szczura, człowieka, świni, kury i indyka wykazano pełną homologię sekwencji aminokwasów, natomiast sekwencje miostatyny bydła i owcy różniły się od siebie 1-3 aminokwasami. Wskazuje to, iż miostatyna u różnych gatunków zwierząt pełni podobną funkcję biologiczną. Przyjmuje się, że bydlęcy gen MSTN składa się z trzech eksonów oraz dwóch intronów [Grobet i in. 1998].

Celem badań było określenie frekwencji polimorficznych genotypów bGH i MSTN u jałówek rasy charolaise, odchowanych przez krowy-matki oraz oszacowanie zależności z miernikami wzrostu: masą ciała po urodzeniu i w wieku 210 dni; dokonano także próby oszacowania ocenianych mierników wzrostu w obrębie pięciu grup ojcowskich.

MATERIAŁ I METODY

Materiał doświadczalny obejmował 60 czystorasowych jałówek hodowlanych w wieku 210 dni rasy charolaise urodzonych w latach 2002 -2004 i odchowanych przez krowy-matki w systemie wolnym, ekstensywnym i bezbudynkowym w gospodarstwie rolnym Dębinka (Radan-1, sp. z o.o.). Cielęta pochodziły po 5 buhajach: *Exlusif* (16 córek), *Epsom* (15), *Concile* (10), *Dimas* (6) i *Calin* (5); pozostałych 14 cieląt pochodziło po 7 innych buhajach (1-3 córek).

System utrzymania. Krowy z cielętami przebywały na pastwisku (około 0,8 ha na 1 krowę); bydło w sezonie pastwiskowym było dokarmiane słomą zbożową. W sezonie zimowym bydło gromadziło się na kwaterze centralnej, gdzie na okres od listopada do kwietnia zakładano legowiska (rozrzucona słoma zbożowa). Oslonę przed wiatrem stanowiła „ściana” lasu sosnowego (bydło do lasu nie miało dostępu). W okresie zimowym krowy żywiono *ad libitum* paszami objętościowymi: kiszonką z kukurydzy – 35-40% s.m. (preliminowane pobranie około 10 kg/szt.dz.), sianokiszonką z roślin strączkowych i zbożowych (GPS – 8 kg/szt.dz.) oraz słomą zbożową. Pasze zadawano na zadaszone stoły paszowe (6 krów/1m²). Pojenie (do woli) z beczkowitzu usytuowanego na kwaterze centralnej.

Sezon ocielen trwał od stycznia do czerwca; krowy unasienniano (własny inseminator) od kwietnia do września nasieniem francuskich buhajów katalogowych. Cielęta odsadzano od matek po 7-8 mies. życia (październik, listopad). Parametry wzrostu cieląt przyjęto z dokumentacji kontroli użytkowości, prowadzonej przez zootechnika oceny Polskiego Związku Hodowców i Producentów Bydła Mięsnego; masę ciała po urodzeniu ustalano w 2 dniu życia, masę ciała na wiek 210 dni interpolowano.

Metody oznaczenia polimorficznych genotypów bGH i MSTN; od cieląt, przed rannym odpasem, z żyły jarzmowej pobrane zostały do próbek K-EDTA próbki krwi. DNA izolowano z krwi metodą Kanai i in. [1994]. Polimorficzne formy bGH i miostatyny określono metodą PCR- RAFLP. Amplifikowane fragmenty DNA trawione były przy użyciu enzymów restrykcyjnych przez 3 godziny w temperaturze 37 °C. Fragmenty restrykcyjne (rozdzielane elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny) określono na drodze PCR (Polimerase Chain Reaction) w Laboratorium Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu.

Obliczenia statystyczne: wykorzystano model linearny z procedury GLM pakietu statystycznego SAS [SAS User's Guide. Version 8.0 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2000], niezależnie dla 3 cech oceny cieląt: masy ciała przy urodzeniu (Mc₁, kg), masy ciała przy odsadzeniu w wieku 210 dni (Mc₂₁₀, kg) i przyrostów dziennych w

okresie odchowu przy matkach (P_{1-210} , g); w obliczeniach wyeliminowano wpływ roku, grupy ojcowskiej i sezonu ocielenia:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + R_j + S_k + e_{ijkn}$$

gdzie:

- y_{ijk} – obserwacja n-tego osobnika w: i-tej grupie ojcowskiej (G), w j-tym roku urodzenia (R) oraz i k-tym sezonie ocielenia (S),
- G_i – efekt i-tej grupy ojcowskiej (6 grup: 5 grup po ojcach ($n \geq 5$ + grupa zbiorcza),
- R_j – efekt roku urodzenia (3 lata: 2002, 2003 i 2004),
- S_k – efekt k-tego sezonu ocielenia; 3 sezony: Z – zima (I, II), W – wiosna (III, IV), L – lato V, VI),
- e_{ijkn} – błąd przypadkowy.

WYNIKI I DYSKUSJA

Frekwencja polimorficznych genotypów somatotropiny (bGH, tab. 1), kształtowała się następująco: bGH-LL 0,417, bGH-LV 0,517 i bGH -VV 0,066, co warunkuje frekwencja alleli : bGH-L 0,765 i bGH-V 0,325. Wyniki własne są zbieżne z danymi uzyskanymi przez Nowopolską-Szczyglewską [2005] w tym samym stadzie, odp. bGH-LL 0,38, bGH-LV 0,54 oraz bGH-VV 0,09,

Frekwencja polimorficznych genotypów miostatyny (MSTN, tab. 1), kształtowała się następująco: MSTN-AA 0,817, MSTN-AB 0,183 i MSTN-BB 0,00, co warunkuje frekwencja alleli: MSTN-A 0,908 oraz MSTN-B 0,092. Zbieżne wyniki w tym samym stadzie uzyskała Nowopolska-Szczyglewska [2005], odpowiednio MSTN-AA – 0,84, MSTN-AB – 0,16, przy czym genotypu MSTN-BB także nie stwierdzono.

Wskaźniki wzrostu a polimorficzne genotypy bGH i MSTN. Na podstawie średnich wskaźników wzrostu w okresie odchowu jałówek hodowlanych do wieku 210 dni można wnioskować, że w gospodarstwie uzyskano optymalne warunki do ujawnienia wartości hodowlanej zwierząt; potwierdza to także, że ekstensywny, bezbudynkowy system utrzymania stada matek rasy CH jest zbieżny z dobrostanem utrzymania krów mięsnych warunkujących dobrą mleczność matek i wartościowe pastwisko dla cieląt.

Wpływ genotypów bGH. Średnie masy ciała po urodzeniu kształtowały się u jałówek analizowanej rasy w badanych latach na poziomie $46,1 \pm 4,72$ kg (tab. 2). Jałówki o polimorfizmie bGH-VV statystycznie wysoko istotnie miały wyższą masę ciała przy urodzeniu 57,3 kg, w porównaniu do rówieśnic o genotypie bGH-LL i bGH-LV (odp. 45,0 i 45,6 kg). Przy odsadzeniu cieląt od matek w wieku 7 mies. jałówki hodowlane miały wysoką masę ciała, średnio $284,5 \pm 13,32$ kg; Jałówki o genotypie bGH-VV były statystycznie wysoko istotnie cięższe (300,6 kg) aniżeli rówieśnice bGH-LL i bGH-LV (odp. 282,7 i 283,9 kg). Konsekwencją wysokich mas ciała odsadków były wysokie przyrosty dobowe w okresie odchowu, na poziomie $1.135,2 \pm 61,5$ g/dziennie, jednak różnic statystycznie nie potwierdzono (tab. 2).

Tabela 1. Frekwencja genotypów i alleli somatotropiny (bGH) i miostatyny (MSTN)
Table 1. Somatotropin and miostatin genotype and allele frequencies

Hormon Hormone	Polimorficzne genotypy Genotype			Allele Alleles	
	LL	LV	VV	L	V
bGH	0,417	0,517	0,066	0,765	0,325
MSTN	AA		AB	A	B
	0,817		0,183	0,908	0,092

Tabela 2. Wskaźniki wzrostu jałówek: masy ciała przy urodzeniu i w wieku 210 dni oraz przyrosty dzienne w okresie odchowu w zależności od polimorficznej formy bGH i MSTN
Table 2. Indices of heifers growth: body weight at birth and 210 days of age as well as daily gains during rearing due to bGH and MSTN polymorphism

Cechy Trait	Genotyp Genotype	bGH			MSTN		Razem Total
		LL	LV	VV	AA	AB	
	n	25	31	4	49	11	60
Mc ₁ , kg	x	45,0 A	45,6 A	57,3 B	46,1	46,31	46,1
BW at birth, kg	sd	4,67	5,71	4,11	6,22	5,97	4,72
Mc ₂₁₀ , kg	x	282,7 A	283,9 A	300,6 B	285,5	280,1	284,5
BW at 210 days, kg	sd	14,32	14,18	15,56	13,13	14,11	13,32
P ₁₋₂₁₀ , g	x	1132	1135	1159	1140	1113	1135
Daily gains 1 – 210 days	sd	65,6	55,1	51,8	60,7	61,8	61,5

A,B – średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się od siebie istotnie (P≤0,01)

A,B – Means denoted with different letters differ significantly at P≤0,01

Tabela 3. Oszacowanie wskaźników wzrostu jałówek w grupach ojcowskich: masy ciała przy urodzeniu i w wieku 210 dni oraz przyrostów dziennych
Table 3. Evaluation of growth indices of heifers due to sire group: body weight at birth and 210 days of age as well as daily gains

Cechy Trait	n	Mc ₁ , kg BW at birth, kg		Mc ₂₁₀ , kg BW at 210 days, kg		P ₁₋₂₁₀ , g Daily gains 1 – 210 days	
		x	sd	x	sd	x	sd
Ojciec, Sire							
Exlusif	15	48,3 d	5,31	282,3 d	14,36	1114	69,89
Epsom	13	46,6 d	6,38	284,8 d	16,08	1134	65,06
Concile	7	48,7 d	3,99	284,6 d	7,68	1123	42,27
Dimas	6	51,3 Ac	2,94	295,5 Ac	10,37	1163	46,50
Calin	5	39,6 Be	4,16	275,2 Be	6,14	1122	33,27
Pozostałe< 3* Others< 3*	14	43,1	4,50	278,1	12,82	1119	64,31
Średnio Average	60	46,13	4,72	284,52	13,32	1135,2	61,54

A, B – średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie wysoko istotnie (P≤0,01).

a, b – średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (P≤0,05).

A, B – means denoted with different letters differ significantly at P≤0,01.

a, b – means denoted with different letters differ significantly at P≤0,05.

* potomstwo po 7 buhajach (1-3 córki); pominięto w obliczeniach statystycznych.

* progeny from 7 bulls (1-3 daughters); exclude from statistical calculation.

PODSUMOWANIE

W badaniach własnych ustalono frekwencję genotypów: bGH-LL 0,417, bGH-LV 0,517 i bGH -VV 0,066 (alleli : bGH-L 0,765 i bGH-V 0,325) oraz MSTN-AA 0,817, MSTN-AB 0,183 i MSTN-BB 0,00 (alleli: MSTN-A 0,908 oraz MSTN-B 0,092). Najwyższą masę ciała przy urodzeniu i w wieku 7 mies. miały jałówki hodowlane o genotypie bGH-VV (57,3 i 300,6 kg), statystycznie wyższą aniżeli u pozostałych genotypów. Współzależności genotypów MSTN z cechami wzrostu nie stwierdzono. Wykazano statystycznie istotne różnice cech wzrostu jałówek w grupach ojcowskich; najwyższe masy ciała miały córki buhaja *Dimas*, najniższe po ojcu *Calin* (odp. 51,3-39,6 kg i 295,5-275,2 kg, przy $P \leq 0,01$).

PIŚMIENNICTWO

- Choroszy Z., Trela J., Choroszy B., Czaja H., 2000. Wpływ wybranych genotypów oraz systemów opasania na zwiększenie produkcji żywca wołowego wysokiej jakości. Zesz. Nauk. PTZ, Przegl. Hod. 51, ss. 245-254.
- Dobicki A., Chladek G., Zachwieja A., 2002. Growth rate of calves and condition of their Red-and White, Charolaise F1 or R1 dams in relation to the genetic polymorphism of milk proteins. Animal Science Papers and Reports, 20 suppl. 1, 161-168.
- Dymnicki E., Oprządek J., 2000. Możliwości wcześniejszej selekcji bydła w kierunku cech użytkowości mięsnej. Anim.Sci.,35, (Supplement), 41-47.
- Evoek C.M., Etherton T.D., Chung C.S., Ivy R.E., 1988. Pituitary porcine growth hormone (pGH) analog stimulates pig growth performance in a similar manner. Journal of Animal Science66, ss. 1928-1941.
- Gregory K.E., Cundiff L.V., Koch R.M., Lunstra D.D., 1993. Differences among parental breeds in germplasm utilisation project. Beef Research, Progress Report No 4, 22-42.
- Grobet L., Poncelot D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michux Ch., Menissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M., 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double – muscling in cattle. Mammalian Genome 9, 210-213.
- Grochowska R., 1994. Analiza zależności pomiędzy żernością i wybranymi wskaźnikami biochemicznymi we krwi a niektórymi cechami produkcyjnymi bydła mlecznego. Praca doktorska. IGiHZ PAN, Jastrzębiec.
- Grodzki H., 1977. Badanie nad wykorzystaniem i przydatnością rasy charolaise do krzyżowania towarowego w wybranych rejonach kraju. Praca doktorska. SGGW-AR, Warszawa.
- Kanai N., Fujii T., Saito K., Yokoyama T., 1994. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily clotted blood. Journal of Clinical Pathology 47, 1043-1044.
- McPherron A., Lee S.J., 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 94, ss. 12457-12461.
- Nowopolska-Szczygłowska A., Dobicki A., Frankowski R., Bogdanowicz-Zazula M., 2004. Współzależność między wynikami odchowu a genetycznym polimorfizmem somatotropiny, leptyny i miostatyny u cieląt rasy Limousine i Charolaise. Zesz. Nauk. AR Wrocław, Zootechnika, LII, 505, 207-212.
- Nowopolska-Szczygłowska A., 2005. Efektywność odchowu cieląt ras mięsnych na podstawie oceny włókien m. longissimus dorsi, pobranych metodą oligobiopsji oraz polimorficznych form wybranych hormonów warunkujących umięśnienie. Rozprawa doktorska, AR Wrocław, ss. 92.

- Oldenbroek J.K., Garssen G.J., Verburg F., Verplanke J.C., 1993. Improvement of breeding value estimation for milk yield of juvenile cattle by physiological predictors. Proc. Internal Workshop; Physiological Predictors for Milk Production. Zeist.
- Oprządek J., 1998. Zależności pomiędzy apetytem i niektórymi cechami biochemicznymi a użytkowalnością rzeźną buhajków rasy czarnobiałej. Praca doktorska. IGiHZ PAN, Jastrzębiec.
- Petkov K., Kamieniecki H., Łukaszewski Z., 2000. Wpływ żywienia na efekty opasu mieszańców towarowych wybranych ras. Annals of Warsaw Agricultural University, Anim. Sci., 35 (Supplement), Warszawa, ss. 59-64.
- Reklewski Z., 1995. Możliwości pracy hodowlanej nad bydłem mięsnym w Polsce. Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego, 17, ss. 9-24.
- Schlee P., Graml R., Rottman O., Pirchner F., 1994. Influence of growth hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. Journal of Animal Breeding and Genetics 111, 253-256.
- Urbański P., 2003. Geny warunkujące tempo wzrostu i otluszczenia tuszy świń, Prace i Materiały Zootechniczne, Monografie i Rozprawy, z. 6, 49-65.
- Wyszyńska-Koko J., 2003. Geny warunkujące mięsność tuszy i jakość mięsa świń., Prace i Materiały Zootechniczne, Monografie i Rozprawy, Zeszyt 6, Jastrzębiec 2003, ss. 21-48.
- Zwierzychowski L., Łukaszewicz M., Dymnicki E., Oprządek J., 1998. Polymorphism of growth hormone κ -casein and β -lactoglobulin (β LG) genes in growing Friesian cattle. Animal Science Papers and Reports 16, 61-68.

GROWTH EFFICIENCY OF CHAROLAISE CALVES DUE TO MIOSTATIN AND SOMATOTROPIN GENETIC POLYMORPHISM

Abstract. In pedigree Charolaise heifers, reared in suckler herd on grasslands, without buildings, and supplemented with bulk feeds (maize silage and grain and papilionaceae mixture silage and straw) polymorphism of miostatin (MSTN) and somatotropin (bGH) was identified. Frequencies of genotypes were as follow: bGH-LL 0,417, bGH-LV 0,517, bGH -VV 0,066 and MSTN-AA 0,817, MSTN-AB 0,183, MSTN-BB 0,00, while frequencies of alleles were consequently: bGH-L 0,765 and bGH-V 0,325, MSTN-A 0,908 and MSTN-B 0,092. The highest body weight at birth and at age of 7 months characterized bGH-VV heifers (57,3 kg and 300,6 kg, respectively) – significant superiority in comparison to other genotypes. There were no relations found between MSTN genotypes and body growth traits. Statistically significant differences were stated in body weight due to sire group – the highest body weight of progeny was found for *Dimas* sire daughters while the lowest for *Calin* sire daughters (respectively: 51,3 vs 39,6 kg and 295,5 vs 275,2 kg; $P \leq 0,01$).

Key words: cattle, Charolaise, genetic polymorphism, bGH, MSTN

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.06.2007

POZYCJE ODPOCZYNKU BYDŁA UTRZYMYWANEGO NA SEMINATURALNYCH PASTWISKACH W PARKU NARODOWYM „UJŚCIE WARTY”*

Piotr Nowakowski, Aleksander Dobicki, Marta Ćwiertniewska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W badaniach własnych, wykonanych na terenie Parku Narodowego „Ujście Warty”, wykazano, że istnieją różnice w preferencji wyboru pozycji leżenia bydła w zależności od genotypu zwierzęcia. Genotyp Bydła warunkuje budowę anatomiczną (budowę kośćca, wielkość masy mięśniowej, wymienia itp.), która to z kolei jest przyczyną wyboru danej pozycji leżenia. Krowy o mięsnym typie budowy (genotypie) chętniej odstawiały tylne kończyny od ciała w przeciwieństwie do mieszańców z rasami mlecznymi, które raczej wybierały pozycję z podwiniętymi wszystkimi kończynami. Wśród krów mięsnych rasa hereford zdecydowanie preferowała pozycję z podwiniętymi kończynami tylnymi w stosunku do rasy limousine, która chętniej leżała przy odstawionych (wyprostowanych) tylnych kończynach. Wyniki te mogą być pomocne przy określeniu zróżnicowanych parametrów pomieszczeń do odpoczynku dla bydła o różnych typach budowy. Wpływ pogody na wybór pozycji leżenia bydła okazał się również istotny. Podczas chłodnej z opadami zwierzęta unikały nadmiernego ekspozowania ciała na warunki pogodowe i zbędnych strat ciepła z organizmu, podwijając wszystkie kończyny pod kłodę i ograniczając jej kontakt z podłożem. Natomiast przy słonecznej – upalnej pogodzie bydło chętnie prostowało kończyny, zwiększając tym samym powierzchnię i gwarantując lepszą wymianę ciepła z otoczeniem.

Słowa kluczowe: bydło, pozycje odpoczynku, genotyp, pogoda

WSTĘP

Park Narodowy (PN) „Ujście Warty” położony jest w obrębie pradoliny Toruńsko-Eberswaldzkiej, w pobliżu ujścia Warty do Odry; jest to najmłodszy, 23. PN w Polsce,

* Badania wykonano w ramach Projektu KBN: 2 PO6 Z 063 26.

który, oprócz dużego bogactwa przyrody, skupia liczne elementy antropogeniczne i synantropijne [Denisiuk, Denisiuk 2001]. Na krajobraz parku składają się głównie otwarte siedliska łąkowe, poprzecinane gęstą siecią kanałów i starorzeczy oraz zarośla wierzbowe. Przez środek parku przepływa rzeka Warta, dzieląc go na część północną – tzw. Polder Północny oraz południową – położoną w obrębie Kostrzyńskiego Zbiornika Retencyjnego (Obwód Ochronny Słońsk). PN „Ujście Warty” to jeden z najcenniejszych pod względem ornitologicznym obszarów w kraju. Unikalne tereny podmokłe, rozległe łąki i pastwiska są jedną z najważniejszych w Polsce ostoji ptaków wodnych i błotnych. W ekosystemie Parku stwierdzono ponad 250 gatunków ptaków, z czego legi u ponad 170 gatunków. Sześćdziesiąt cztery gatunki ptaków należą do kategorii „specjalnej troski” według Dyrektywy Ptasiej, a 31 z nich są tu gatunkami lęgowymi, np. derkacz, rybitwa białoczelna, wodniczka, żuraw, bąk i bielik. Corocznie gnieźdzą się na tym terenie 4 gatunki perkozów, 7–8 gatunków kaczek, 5 gatunków chruścieli, 7–8 gatunków mew i rybitw, 8–9 gatunków ptaków siewkowych. Dla wielu z nich jest to jedno z ważniejszych zimowisk, przykładowo dla łabędzi krzykliwych i niemych, kaczek, gęsi i bielików.

W latach 2004–2006 na terenie parku przeprowadzono badania dotyczące składu botanicznego i plonowania runi [Mikołajczak i in. 2007]; ściśle obserwacje przeprowadzono w trzech zbiorowiskach trawiastych: manny mielec (*Glyceria maxima*), mozgi trzcinowatej (*Phalaris arundinacea*) i mietlicy rozłogowej (*Agrostis stolonifera*). Wymienione zbiorowiska zajmują w parku łącznie około 70% powierzchni, a pozostałą powierzchnię pokrywa roślinność trawiasto-zielna, o bardzo urozmaiconym składzie botanicznym. Z obserwacji Mikołajczaka i in. [2007] wynika, że okres wykorzystywania użytków zielonych przez bydło zależy od uwilgotnienia terenu (długość zalewu wiosennego, a czasem i letniego) i ukończenia wylęgu ptaków gniazdujących. Plonowanie zbiorowisk: *Glyceria maxima* i *Phalaris arundinacea* jest podobne i waha się około 50 t/ha zielonej masy (9.3 t suchej masy). Zbiorowisko *Agrostis stolonifera* plonuje w granicach 40 t zielonej masy (ok. 7 t suchej masy). Badania Dobieckiego i in. [2007] nad efektywnością produkcji stada bydła mięsnego wypasanego w systemie wolnym na terenach trawiastych PN „Ujście Warty”, przeprowadzone na 1617 krowach–matkach różnych ras (2004–2006), wykazały m.in., że odchowane cielęta w wieku 7 mies. uzyskały wysokie masy ciała: jałówki 215,9±22,27 i buhajki 292,6±28,3 kg., co świadczy o dużej wartości diety pokarmowej wypasnanych zbiorowisk roślinnych, warunkujących optymalną mleczność matek i wysokie przyrosty masy ciała ich potomstwa. Dokładne zrozumienie potrzeb tego gatunku wymaga poznania poszczególnych aspektów jego zachowania w środowisku zbliżonym do naturalnego. Wyniki takich obserwacji mogą stanowić cenne źródło informacji wykorzystywanych do oceny dobrostanu zwierząt w różnych systemach chowu. Jednym z wymogów, jakie muszą być spełnione w celu zapewnienia zwierzętom gospodarskim odpowiedniego poziomu dobrostanu, jest umożliwienie im wygodnego odpoczynku. Prawidłowe legowisko ma szczególne znaczenie dla dużych przeżuwaczy, takich jak bydło i powinno charakteryzować się zapewniającym komfort metrażem i podłożem [Wróblewska 2005].

W badaniach Nowakowskiego i in. [2005] określono mobilność, rozproszenie i aktywność w obrębie stada bydła mięsnego w warunkach wypasu wolnego. Średnie tempo przemieszczania się bydła w okresie obserwacji porannych i wieczornych wyniosło około 226–250 m/godz. Nie zaobserwowano wyraźnych więzi przestrzennych pomiędzy krową i jej cielęciem, z wyjątkiem aktu ssania. Cielęta przebywały z reguły w oddaleniu

od swoich matek, w odległości 200-300 m. Nie stwierdzono wyraźnych różnic w grupowaniu się zwierząt w okresie obserwacji rano i wieczorem. Stwierdzono, że 15,8 do 19,3% zwierząt ma tendencję do rozpraszania się, natomiast większość osobników (80,7 do 84,2%) tworzyło grupy. Najczęściej spotykanymi agregacjami były grupy złożone z więcej niż 2 kategorii zwierząt (np. krowy + cielęta + jałówki + buhaje). Grupy, o takim mieszanym składzie, stanowiły odpowiednio 50% grup w godzinach porannych i 40% grup w godzinach wieczornych, następnie grupy krów z cielętami, które stanowiły odp. 26,6 i 36,1%. W warunkach wolnego wypasu stada bydła stwierdzono, że w większości przypadków (83,8%) odległości pomiędzy zwierzętami w wydzielonej autonomicznie grupie nie przekraczały 50 m.

Bydło poświęca na leżenie w ciągu doby od 7 do 13 godzin (wliczając w to sen, odpoczynek i przeżuwanie) zależnie od wieku, rasy oraz sposobu utrzymania. Możliwość wygodnego i spokojnego leżenia jest podstawową potrzebą bydła. Wpływa na zdrowie, a także wydajność krów, gdyż około 70% czasu przeżuwania odbywa się w pozycji leżącej. Przy czym, jak podaje Albright i in. [1975], 56% czasu krowy leżą na lewym boku. Ograniczenie czasu tej formy odpoczynku jest dla zwierząt źródłem stresu i ma negatywne skutki dla ich organizmu [CIGR 2004, Jezierski i Daniewski 2000, Nishida i in. 2004]. Zwierzęta w oborach z uwięzią leżą dłużej niż w pomieszczeniach wolnostanowiskowych, ale rzadziej podnoszą się i kładą. Są mniej niepokojone przez inne zwierzęta, ale mają mniejszą swobodę ruchów. Spędzony przez krowy czas na legowisku w oborach uwięziowych zależy od długości stanowiska lub w oborach wolnostanowiskowych – od zagęszczenia zwierząt oraz od rodzaju podłoża, które powinno być suche i nieśliskie [Blackshaw 2003, Jezierski 1987, RSCPA 2000]. Dechamps i in. [1989] zaobserwowali, że bydło w oborze stanowiskowej zmienia pozycję podczas leżenia średnio 13-16 razy. Nieodpowiednie podłoże jest przyczyną niechęci zwierząt do wstawania i kładzenia się, a przez to powoduje skracanie czasu leżenia na korzyść wydłużania czasu stania bez jedzenia i przeżuwania [Haley i in. 2001]. Budowa stanowisk warunkuje też pozycje kończyn oraz tułowia podczas leżenia i ma wpływ na powstawanie technopatii, zwłaszcza kończyn i racic [Jezierski 1987].

Celem przeprowadzonych obserwacji było ustalenie najczęściej wybieranych pozycji odpoczynku przez bydło w seminaturalnych warunkach terenów trawiastych oraz analiza przyjmowanych pozycji leżenia przez krowy oraz cielęta, w zależności od genotypu zwierząt i panujących warunków pogodowych.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było stado bydła mięsnego utrzymywane w warunkach wypasu wolnego na terenie Parku Narodowego Ujście Warty, przy minimalnej ingerencji ze strony człowieka. Stado bydła mięsnego w PN „Ujście Warty” wypasane jest na trzech głównych zbiorowiskach roślinnych: mozgi trzcinowatej (*Phalaris arundinacea*), manny mielec (*Glyceria maxima*) oraz mietlicy rozłogowej (*Agrostis stolonifera*); bydło chętnie zjadało także młode rośliny wierzby, samorzutnie wysiewające się w runi pastwiska, a przemienne wykaszanie runi ogranicza także sukcesję rzeżenia włoskiego i samosiejek wierzby [Dobicki i in, 2006]. Stado to charakteryzowało się prawie kompletnym składem społecznym, który stanowiły: krowy mamki, cielęta, jałówki oraz buhaje. Reprezentowały zwierzęta czystorasowe: hereford, limousine, simentaler w typie mięsnym, czarno-białe oraz mieszańce – z krzyżowania krów w typie ogólnie-

użytkowym i mlecznym z buhajami ras mięsnych. Sezon wycieleń w tym stadzie przypadał na miesiące luty – kwiecień. Obserwacje prowadzono na otwartej przestrzeni seminaturalnych użytków zielonych, z udziałem drzew i krzewów wierzbowych oraz z naturalnymi nierównościami terenu i wzniesieniami poprzecinanych naturalnymi ciekami wodnymi (grądy i łągi).

Obserwacje przeprowadzono we wrześniu 2005 roku w dwóch wybranych grupach bydła: (1) liczącej 340 SF i pasącej się na powierzchni ok. 300 ha oraz (2) liczącej 800 SF i pasącej się na powierzchni ok. 350 ha. Udokumentowano 558 obserwacji leżenia krów matek oraz 197 pozycji cieląt (tab. 1).

Tabela 1. Liczba obserwacji dotycząca poszczególnych genotypów krów i cieląt
Table 1. Number of observations of suckler-cows and calves due to genotype

Rasa Genotype	Krowy matki Suckler-cows [n]	Cielęta Calves [n]
Czarno-biała i mieszańce Black-white and dairy x beef hybrids	273	99
Hereford Hereford	145	29
Limousin Limousin	74	55
Simentaler Simmentaler	68	14
Ogółem Total	560	197

W ciągu jednego dnia obserwacji opisywano pozycje leżenia kolejnych 36 krów oraz 15 cieląt odpoczywających na pastwisku. Wyróżniono 29 pozycji leżenia bydła według metodyki własnej (tab. 2), w oparciu o klucz pozycji według Jezierskiego [1987]. Przy opisie pozycji leżenia notowano: kategorię zwierzęcia (krowa, cielę), genotyp, nr pozycji według przyjętego klucza (tab. 2) oraz warunki pogodowe obserwacji (1 – słonecznie i zachmurzenie do 50% powierzchni nieba, temp. powietrza 25-30 °C; 2 – zachmurzenie 50% i więcej powierzchni nieba, bez opadów, temp. powietrza 20-25 °C; 3 – zachmurzenie całkowite z opadami, temp. powietrza 15-20 °C).

Do weryfikacji statystycznej wpływu genotypu i warunków pogodowych na przyjmowane pozycje leżenia zastosowano test mediany χ^2 (pakiet Statistica 6.0 pl). Analizie statystycznej poddano najczęściej występujące pozycje leżenia krów (pozycje 1-6 – tab. 2) pogrupowano bez rozróżniania leżenia na lewym lub prawym boku ciała, ale uwzględniając położenie tylnych kończyn, w zależności od genotypu (krowy ras mięsnych, mieszańce). Porównano częstotliwość występowania trzech pozycji (obie przednie kończyny podwinięte, natomiast tylne: – obie podwinięte, P1 + P2; – obie wyprostowane, P3 + P4; – jedna podwinięta, a druga wyprostowana, P5 + P6) u dwóch grup genotypów: (1) krów ras mięsnych oraz (2) krów mieszańców ras mlecznych i mięsnych. Porównano również częstotliwości występowania tych samych pozycji w obrębie krów ras mięsnych: hereford, limousine i simentaler. W analizie wpływu warunków atmosferycznych na przyjmowane postawy uwzględniono trzy wyżej wymienione grupy pozycji przy 3 poziomach pogody (1 – słonecznej; 2 – pochmurnej; 3 – deszczowej).

Tabela 2. Opis pozycji i liczba obserwacji [n] poszczególnych pozycji odpoczynku krów i cieląt, według Jezierskiego [1987]

Table 2. Description of positions and number of observations [n] due to laying position of cows' and calves', according to Jezierski [1987]

Pozycja Position	Opis pozycji leżenia – Description of laying position					Obserwacje – Observations			
	Bok Side	Głowa Head	Kłoda Trunk	Kończyny przednie Front legs	Kończyny tylne Hind legs	n	%	n	%
1	1	1	1	1	1	76	13,6	21	10,7
2	2	1	1	1	1	101	18,1	29	14,7
3	1	1	1	1	2	30	5,4	15	7,6
4	2	1	1	1	2	51	9,1	12	6,1
5	1	1	1	1	3	91	16,3	28	14,2
6	2	1	1	1	3	94	16,8	36	18,3
7	1	1	1	3	1	4	0,7	1	0,5
8	2	1	1	3	1	4	0,7	0	0,0
9	1	1	1	3	2	10	1,8	6	3,0
10	2	1	1	3	2	16	2,9	1	0,5
11	1	1	1	3	3	13	2,3	2	1,0
12	2	1	1	3	3	10	1,8	5	2,5
13	1	2	2	2	2	4	0,7	4	2,0
14	2	2	2	2	2	3	0,5	5	2,5
15	1	3	1	1	1	7	1,3	3	1,5
16	2	3	1	1	1	13	2,3	5	2,5
17	1	3	1	1	3	7	1,3	5	2,5
18	2	3	1	1	3	9	1,6	1	0,5
19	1	3	1	1	2	3	0,5	1	0,5
20	2	3	1	1	2	3	0,5	2	1,0
21	1	2	1	1	1	4	0,7	4	2,0
22	2	2	1	1	1	3	0,5	4	2,0
23	1	3	1	3	2	0	0,0	1	0,5
24	2	3	1	3	2	0	0,0	3	1,5
25	1	1	1	2	2	1	0,18	1	0,5
26	2	1	1	2	2	1	0,18	1	0,5
27	2	1	1	2	3	1	0,18	0	0,0
28	2	2	2	3	3	1	0,18	0	0,0
29	1	3	1	3	1	0	0,0	1	0,5
Ogółem liczba obserwacji – Total number of observations:						560	100,0	197	100,0

Opis pozycji leżenia: **bok**, na którym zwierzę leżało (prawy – 1, lewy – 2); **głowa** (w górze prosto – 1, na ziemi prosto – 2, na ziemi w pozycji „zwiniony pies” – 3); **kłoda** (ułożenie mostkowe – 1, na boku – 2); **kończyny przednie** (obie podwinięte – 1, obie wyprostowane – 2, jedna podwinięta i jedna wyprostowana – 3); **kończyny tylne** (obie podwinięte – 1, obie wyprostowane – 2, jedna podwinięta i jedna wyprostowana – 3).

Description of laying position: **side**, on which animal was laying (right – 1, left – 2); **head** position (in the air – 1, on the ground – 2, on the ground „bent dog” – 3); **trunk** position (straight on sternum – 1, on a side – 2); **front legs** (both bent – 1, both straight – 2, one leg bent and one straight – 3); **hind legs** (both bent – 1, both straight – 2, one leg bent and one straight – 3).

WYNIKI I DISKUSJA

Z obserwacji własnych wynika, że istnieje statystycznie istotna różnica w wyborze pozycji między krowami, które najczęściej odpoczywały w pozycji leżącej z podwiniętymi wszystkimi kończynami, w ułożeniu mostkowym na lewym boku, a cielętami, które również preferowały ułożenie mostkowe na lewym boku, jednak ich kończyny przednie były podwinięte, natomiast tylne wyprostowane w stawach skokowych (tab. 2). Ponadto porównując sześć najczęściej spotykanych u krów pozycji, stanowiących 79,1% ogółu obserwacji (P1 – P6, tab. 2), widoczna jest tendencja w preferowaniu leżenia na lewym boku, co jest typowe dla bydła podczas przeżuwania [Jeziński 1987].

Genotyp krowy miał istotny wpływ na najczęściej przyjmowane pozycje leżenia krów (P1– P6), bez rozróżniania boku ciała, na którym zwierzę leżało, ale uwzględniając położenie tylnych kończyn, Wykonany test mediany χ^2 porównujący częstotliwość występowania trzech wariantów pozycji (P1 + P2; P3 + P4; P5 + P6) u dwóch genotypów (krów ras mięsnych, krów mieszańców ras mlecznych i mięsnych) wykazał, że krowy o genotypie mięsnym preferowały pozycje P5 + P6, natomiast mieszańce częściej przyjmowały pozycje P1 + P2 – tab. 3.

Krowy o typowo mięsnym genotypie (rasy mięsne) częściej przyjmowały pozycje z kończynami tylnymi (jedną lub dwoma) wyprostowanymi w stawie skokowym, w stosunku do krów mieszańców (rasa mleczna x rasa mięsna) leżących najczęściej w pozycji ze wszystkimi kończynami podwiniętymi. Obserwowane różnice mogły mieć przyczynę w typie budowy – krowy ras mięsnych z uwagi na obfitą tkankę mięśniową i tłuszczową mają tendencje do trzymania kończyn tylnych w stanie wyprostowanym w przeciwieństwie do krów mlecznych, o uboższym umięśnieniu; wyjątek stanowią krowy o bardzo dużym wymieniu, które też mają kończyny wyprostowane.

Porównano testem medianym χ^2 częstotliwość występowania tych samych pozycji u krów ras mięsnych: hereford, limousine i simentalerer; pozycje P1 + P2 były preferowane głównie przez krowy rasy hereford. Krowy tej rasy najczęściej leżały w pozycji z podwiniętymi wszystkimi kończynami, na co pozwalała ich stosunkowo najmniej masywna budowa ciała i małe wymię. Pozycje P3 + P4 częściej wybierane były przez krowy rasy limousine, które chętnie leżały z obiema tylnymi kończynami wyprostowanymi w stawach skokowych, co mogło być wynikiem ich budowy anatomicznej – bardziej masywne w porównaniu do krów hereford i simentaler. Natomiast pozycje P5 + P6 najczęściej występowały u krów rasy simentaler (tab. 3), które preferowały leżenie z jedną nogą wyprostowaną – mniejszy kaliber ciała nie wymagał większego ociążania tylnych kończyn, jednak stosunkowo wśród krów porównywanych ras najwydatniej zbudowane wymię mogło sprawiać, że chętniej odstawiały i prostowały jedną z kończyn.

Podobnie jak u krów cielęta najczęściej przyjmowały 6 pozycji (P1 – P6, tab. 2); stanowią one 71,6% wszystkich obserwacji. Obliczenia statystyczne nie potwierdziły istotnej zależności pomiędzy genotypem cieląt a pozycją leżenia. Przyczyną tego mogła być zbyt mała liczebność obserwacji lub inne niż u dorosłych osobników proporcje w budowie ciała – bardziej zbliżona budowa anatomiczna cieląt badanych ras. Nie spotkano się z opisem tego typu obserwacji w literaturze światowej. Jeziński [1987] zajmował się jedynie badaniem ogólnej preferencji bydła w wyborze pozycji leżenia oraz zależności czasowej leżenia; bydło podczas leżenia preferowało pozycje, w których zwierzę leżało na mostku, z podwiniętymi przednimi kończynami, a tylnymi przy tułowiu lub

odsuniętymi o 45°, zwinęciem w kłębek występowało tylko podczas snu, a większe zróżnicowanie pozycji zwierzęta wykazują podczas leżenia bez przeżuwania niż z przeżuwaniem [Jeziński 1987]. Uogólniając, było częściej na pastwisku aniżeli w oborze przyjmowało pozycje z wyprostowanymi kończynami – do 20% czasu leżenia. Z obserwacji Jezińskiego [1987] wynikało również, że podczas leżenia bez przeżuwania zwierzęta preferują bok prawy (z wyjątkiem rasy charolaise), a przeżuwając – częściej leżały na lewym boku. Ten sam autor wykazał również różnice w sumarycznym czasie leżenia udowadniając, że zwierzęta z dolewem krwi rasy jersey w porównaniu z innymi grupami mieszańców bydła mlecznego charakteryzowała większa pobudliwość – w związku z czym spędzały one o 1-2% mniej czasu leżąc (przy utrzymaniu w oborze wolnostanowiskowej).

Tabela 3. Analiza wpływu typu użytkowego i rasy oraz pogody na przyjmowane pozycje leżenia krów-matek w 4-6 miesiącu laktacji

Table 3. Analysis of the effect of animal type, breed and weather type on suckler cows laying positions in 4- 6 month of lactation

Czynnik Factor „P” *)	Pozycja – Position *)			N total (%)	Test mediany χ^2 Median test χ^2
	P1 + P2	P5 + P6	P3 + P4		
Wpływ typu zwierzęcia – Effect of animal type					
1 Typ mięsny Beef types	83 (34%)	102 (42%)	59 (24%)	244 (100%)	
2 Typ mleczno- mięsny Dairy – beef hybrids	94 (47,5%)	83 (41,5%)	22 (11%)	199 (100%)	χ^2 =13,67 (df=2) P = 0,0011
N total	177 (40%)	185 (41,5%)	81 (18,5%)	443 (100%)	
Wpływ rasy w obrębie typu mięsnego; Effect of breed within beef type					
1 hereford Hereford	40 (59%)	20 (29%)	8 (12%)	68 (100%)	
2 simentaler Simmental	17 (41%)	20 (49%)	4 (10%)	41 (100%)	$\chi^2 = 7,43$ (df=2)
3 limousin Limousine	20 (54%)	7 (19%)	10 (27%)	37 (100%)	P = 0,0243
N total	77 (53%)	47 (32%)	22 (15%)	146 (100%)	
Wpływ pogody – Effect of weather type					
1 Słoneczna Sunny	87 (31%)	129 (18,5%)	57 (43%)	273 (100%)	
2 Pochmurna Cloudy	51 (40%)	43 (13%)	20 (33%)	114 (100%)	$\chi^2=19,40$ (df= 2)
3 Deszczowa Rainy	39 (70%)	13 (9%)	4 (16,5%)	56 (100%)	P = 0,0001
N total	177 (38%)	185 (16%)	81 (37%)	443 (100%)	

*) P: bok, na którym zwierzę leżało (prawy – P1, lewy – P2);

P: side, on which animal was laying (right – P1, left – P2)

Opisane w literaturze badania [Albright i in. 1975, Dechamps i in. 1989, Haley i in. 2001, Jezierski 1987] skupiają się głównie na pomiarze czasu tej formy odpoczynku. Dowiedziono, że bydło potrafi, w odpowiedzi na zmiany środowiska, redukować potrzeby metaboliczne organizmu oraz wielkość efektu ekspozycji na chłód poprzez odpowiednią orientację sylwetki w stosunku do słońca i wiatru [Keren i Olson 2006], natomiast nie spotkano się z badaniami zależności pomiędzy pogodą a pozycją leżenia.

W badaniach własnych zaobserwowano wpływ pogody na przyjmowane przez bydło pozycje leżenia: chłodniejsza, z opadami skłaniała zwierzęta do ograniczenia powierzchni styku ciała z podłożem (kończyny raczej podwinęte pod ciało) i powierzchni ekspozowanej na opady, natomiast gorąca i słoneczna sprawiała, że zwierzęta chętniej prostowały kończyny zwiększając ekspozowaną na warunki środowiskowe powierzchnię ciała (tab. 3). Podczas prowadzenia obserwacji dominowała pogoda słoneczna (1), przy której leżące zwierzęta najchętniej przyjmowały pozycję P3 + P4, z wyprostowanymi w stawach skokowych kończynami tylnymi, ekspozując tym samym większą powierzchnię ciała. Pogoda chłodna z opadami (3) powodowała ograniczanie przez zwierzęta powierzchni styku ciała z podłożem i przyjmowanie głównie pozycji P1 + P2, z podwinętymi wszystkimi kończynami.

PODSUMOWANIE

W badaniach własnych wykazano, że istnieją różnice w preferencji wyboru pozycji leżenia bydła w zależności od genotypu zwierzęcia. Genotyp bydła warunkuje budowę anatomiczną (budowę kośćca, wielkość masy mięśniowej, wymienia itp.), która to z kolei jest przyczyną wyboru danej pozycji leżenia. Krowy o mięsnym typie budowy (genotypie) chętniej prostowały tylne kończyny (42% – jedna noga i 24% dwie nogi), w przeciwieństwie do mieszańców z rasami mlecznymi, które raczej wybierały pozycję z podwinętymi wszystkimi kończynami (47,5%). Wśród krów mięsnych rasa hereford zdecydowanie preferowała pozycję z podwinętymi kończynami tylnymi (59%), w stosunku do rasy limousine, która chętniej leżała przy odstawionych (wyprostowanych) tylnych kończynach (46%). Wyniki te mogą być pomocne przy określeniu zróżnicowanych parametrów pomieszczeń do odpoczynku dla bydła o różnych typach budowy.

Wpływ pogody na wybór pozycji leżenia bydła okazał się również istotny. Podczas chłodnej z opadami zwierzęta unikały nadmiernego ekspozowania ciała na warunki pogodowe i zbędnych strat ciepła z organizmu, podwijając wszystkie kończyny pod kłodę i ograniczając jej kontakt z podłożem (70%). Natomiast przy słonecznej – upalnej pogodzie bydło chętnie prostowało kończyny, zwiększając tym samym powierzchnię i gwarantując lepszą wymianę ciepła z otoczeniem (61,5%).

PIŚMIENNICTWO

- Albright J.L., Youngblut D.H., Arave C.W., Wilson J.C., 1975. Bovine laterality, resting behavior. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*, 85: 407.
- Blackshaw J.K., 2003. Notes on some topics in applied animal behaviour. School of Veterinary Science, University of Queensland, 3rd edition, Queensland, Australia.
- CIGR, 2004. Design recommendations of beef cattle housing. 2nd edition, East Lansing, Michigan, USA.
- Dechamps P., Nicks B., Canart B., Gielen M., Istasse L., 1989. A note on resting behavior of cows before and after calving in two different housing systems. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 23: 99-105.
- Denisiuk M., Denisiuk Z., 2001. Park Narodowy Ujście Warty w systemie parków narodowych w Polsce. *Chrońmy Przyrodę Ojczystą*, 5: 18- 32.
- Dobicki A., Nowakowski P., Kwaśnicki R., Głowacki J., Wypychowski K., 2007. Efektywność produkcji stada bydła mięsnego wypasanego w systemie wolnym na terenach trawiastych Parku Narodowego „Ujście Warty”, *Roczniki Naukowe PTZ*, (w druku).
- Dobicki A., Nowakowski P., Mikołajczak Z., Wypychowski K., 2006. Miejsce bydła mięsnego i koni w ekosystemie Parku Narodowego „Ujście Warty”. *Seminaria Naukowe Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego*, 5 (56), 97-111.
- Haley D.B., de Passille A.M., Rushen J., 2001. Assessing cow comfort: effects of two floor types and two tie stall designs on the behaviour of lactating dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 71(2):105-117.
- Jeziński T., 1987. Zachowanie się bydła o różnej użytkowości zależnie od genotypu i sposobu utrzymania. *Rozprawa habilitacyjna IGHZ PAN Jastrzębiec, Ossolineum*.
- Jeziński T., Daniewski W., 2000. Genetyczne uwarunkowanie cech behawioralnych związanych z dobrostanem zwierząt. *Przegląd Hodowlany*, 8:29-33.
- Keren E.N., Olson B.E., 2006., Thermal balance of cattle grazing winter range: model application. *J. Anim. Sci.*, 84(5):1238-1247.
- Mikołajczak Z., Dobicki A., Nowakowski P., Wojciechowska M., Głowacki J., 2007. Skład florystyczny oraz potencjał produkcji biomasy dla bydła wybranych zbiorowisk trawiastych Parku Narodowego „Ujście Warty”, *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, (wysłano do druku).
- Nishida T., Hosoda K., Matsuyama H., Ishida M., 2004. Effect of lying behavior on uterine blood flow in cows during the third trimester of gestation. *J. Dairy Sci.*, 87:2388-2392.
- Nowakowski P., Dobicki A., de Rancourt L., Wypychowski K., 2005. Mobilność, rozproszenie i aktywność w obrębie stada bydła mięsnego w warunkach wypasu wolnego. *Roczniki Naukowe PTZ*, t. 1, 2005, supl. 1 53-62.
- RSPCA, 2000. Welfare standards for beef cattle.
- Wróblewska L., 2005. Dobrostan w chowie bydła mięsnego. *Przegląd Hodowlany*, 4, 3-5.

RESTING POSITIONS OF CATTLE KEPT IN FREE RANGE CONDITIONS ON SEMI-NATURAL GRASSLANDS OF „WARTA MOUTH” NATIONAL PARK

Abstract: Preferences of cattle in resting position were studied. Twenty nine laying positions were distinguished. Observations of laying – resting positions of suckler-cows and calves were performed in large herd of cattle free range grazing natural grasslands of National Park „Warta Mouth” during summer time in temperate climate. The most common positions observed were analyzed statistically due to cattle genotype and weather condi-

tions (sunny, moderate and rainy). More beef type cows preferred to have hind legs straight why hybrids (dairy x beef genotypes) used to have all 4 legs bent while resting. Within pure beef genotypes analyzed (Hereford, Limousine, Simmental) Hereford cows preferred to have 4 legs bent while Limousine ones preferred hind legs to be straighten. There was no genotype effect observed on resting positions of calves. Type of weather affected significantly laying positions of cattle. Animals used to have all 4 legs bent next to trunk during rainy weather while legs were kept straight to maximize body surface exposure during sunny weather in temperate climate. Results may be used as reference when welfare issues or designing space area for resting cattle are discussed.

Key words: cattle, resting positions, genotype, weather

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.06.2007

THE MUCOUS MEMBRANE IN AREAS DEVOID OF PAPILLAE OF THE APEX AND BODY OF THE TONGUE IN THE SILVER FOX (*VULPES VULPES FULVA*)

Mirosława Kulawik¹, Maria Sozańska²

¹ Agricultural University in Poznań

² Silesian University of Technology in Katowice

Abstract. A total of 10 tongues of the silver fox (*Vulpes vulpes fulva*) were used in this study. Material came from animals of both sexes and was collected after they were slaughtered.

Tissues collected from the ventral surface of the apex and the lateral surfaces of the body of the tongue were examined under a light microscope. Additionally morphometric analysis of the thickness of the epithelium was performed.

As a result of the performed observations it was found that the surface of the mucous membrane on the apex of the tongue is plicated, while on the body of the tongue it is smooth. The epithelium covering the ventral surface of the apex and the lateral surfaces of the body of the tongue in the silver fox is nonkeratinized stratified squamous epithelium. The epithelium formed numerous streaks of various length, which grew into the connective tissue.

The epithelium covering the ventral surface of the apex of the tongue was thicker than on the lateral surfaces of the body of the tongue. No statistical differences were found for the analyzed traits.

Lamina propria of the mucosa formed numerous connective tissue papillae, which were distributed among the epithelial streaks. The elastic fibers were arranged primarily transversely to the long axis of the tongue.

Key words: silver fox, tongue, tunica mucosa

INTRODUCTION

Studies on the tongue and its structures conducted so far on species from order *Carnivora* concern first of all domestic animals, such as the dog [Singh et al. 1980, Iwasaki and Sakata 1985, Iwasaki and Miyata 1989] and the cat [Boshell et al. 1982, Robinson and Winkles 1990, Iwasaki 1993, Ojima 1998]. Researchers focus mainly on the description of

the distribution of papillae on the tongue in individual species as well as on the investigations of their structure [Iwasaki and Sakata 1985]. Some studies were conducted on the keratinization processes of the epithelium on filiform papillae [Boshel et al. 1982, Iwasaki and Miyata 1989]. The aim of the investigations was also to determine quantitative changes in papillae and taste buds on the tongue [Robinson and Winkles 1990, Ojima 1998].

However, there are no results in available literature concerning studies describing the tongue in the silver fox, belonging to order *Carnivora*, which is a popular breeding fur animal.

The aim of the study was to investigate the mucosa on the ventral surface of the apex and lateral surfaces of the body of the tongue in the silver fox and to analyze morphometrically the thickness of the epithelium on examined areas.

MATERIAL AND METHODS

The analyses were conducted on 10 tongues of silver fox (*Vulpes vulpes fulva*). Material came from animals of both sexes and was collected after they were slaughtered at a fur farm.

Tongues for examinations under a light microscope (LM) immediately after being removed were fixed in 10% neutralized formalin or Bouin's solution. Next smaller tissue samples were collected from the ventral surface of the apex and lateral surfaces of the body of the tongue, which were dehydrated in a series of alcohols with increasing concentrations (from 50% to 96%), embedded in paraplast and sliced using a Leica RM 2055 microtome into sections of 3 to 5 μm . Tissue samples were sliced in three planes, i.e. sagittal, transverse and horizontal. In the study the applied method included Masson-Goldner, H+E, resorcin-fuchsin or orcein staining.

Morphometric analyses were conducted on histological slides, which were observed using a light microscope coupled with a camera with a computer image analysis program MultiScan V. 6.08. The thickness of the epithelium covering the ventral surface of the apex and lateral surfaces of the body of the tongue was analyzed. Based on the obtained measurements the mean value (X), the minimum value (Min), the maximum value (Max) and standard deviation (SD) were calculated. Statistical differences of means for the measured trait were determined using the t-Student's test.

RESULTS AND DISCUSSION

Lingual papillae in different animal species and in the human are distributed on the dorsum of the tongue and on its margins, while the ventral surface and the lateral surfaces of the body of the tongue are devoid of papillae. Occasionally lingual papillae were observed in that area in ruminants, e.g. in the goat and sheep, as it was reported by Kumar et al. [1998] and Krysiak and Świeżyński [2001]. In the coypu at the end of the ventral surface of the apex of the tongue there are filiform papillae and scarce fungiform papillae [Kulawik-unpublished data]. In the silver fox on the ventral surface of the apex and on the lateral surfaces of the body of the tongue no papillae were observed.

In the silver fox the transition from areas devoid of papillae to areas on which papillae are found is sudden, similar as it is the case in the raccoon dog [Kulawik and Niegartowicz-Zdrojewska 2006]. The mucosa on the ventral surface of the apex is strongly plicated (Fig. 1), while on the lateral surface of the body of the tongue it is smooth (Fig. 2).

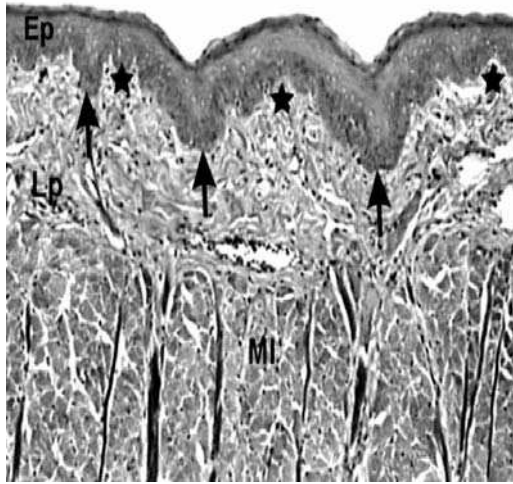


Fig. 1. Transverse cross-section of the ventral surface of the apex of the tongue in the silver fox: **Ep** – epithelium, **arrows** – epithelial streaks, **Lp** – lamina propria of the mucosa, **asterisks** – connective tissue papillae, **MI** – muscles of the tongue. LM, x 6.3

Ryc. 1. Przekrój poprzeczny powierzchni dolnej wierzchołka języka u lisa srebrzystego: **Ep** – nabłonek, **strzałki** – pasma nabłonkowe, **Lp** – blaszka właściwa błony śluzowej, **gwiazdki** – brodawki łącznotkankowe, **MI** – mięśnie języka. LM, x 6.3

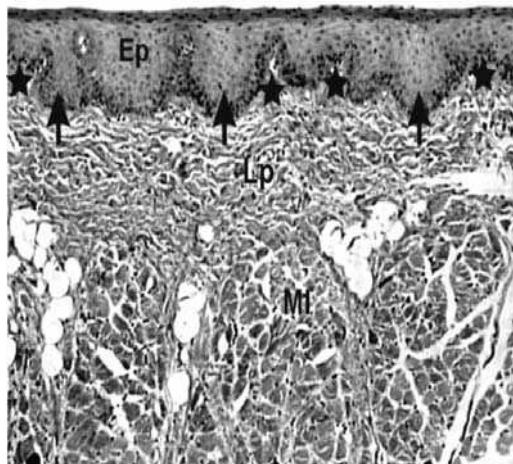


Fig. 2. Transverse cross-section of the lateral surface of the body of the tongue in the silver fox: **Ep** – epithelium, **arrows** – epithelial streaks, **Lp** – lamina propria of the mucosa, **asterisks** – connective tissue papillae, **MI** – muscles of the tongue. LM, x 6.3

Ryc. 2. Przekrój poprzeczny powierzchni bocznej języka u lisa srebrzystego: **Ep** – nabłonek, **strzałki** – pasma nabłonkowe, **Lp** – blaszka właściwa błony śluzowej, **gwiazdki** – brodawki łącznotkankowe, **MI** – mięśnie języka. LM, x 6.3

The mucous membrane of the tongue is a continuation of the mucosa of the oral cavity and for this reason it is lined with the stratified squamous epithelium. The epithelium on the analyzed areas of the tongue in the silver fox is nonkeratinized and produces numerous epithelial streaks, growing into the area of the lamina propria of the tongue (Figs. 1 and 2). Epithelial streaks are of different length and for this reason the epithelium thickness varies.

The lamina propria of the mucosa in the analyzed areas devoid of papillae in the tongue of the silver fox forms numerous connective tissue papillae of different height and arranged between epithelial streaks (Figs. 1 and 2). In the area of the lamina propria of the mucosa numerous blood vessels and elastic fibers were observed. Elastic fibers are arranged mainly transverse to the long axis of the tongue (Fig. 3). A similar arrangement of these fibers was shown in the rabbit [Kulawik 2006] and the raccoon dog [Kulawik and Nienartowicz-Zdrojewska 2006].

Morphometric studies showed that the mean thickness of the epithelium on the ventral surface of the apex is bigger than the mean thickness of the epithelium on the lateral surfaces of the tongue (Tab. 1). The analysis did not show statistical differences in the analyzed trait in areas devoid of papillae of the apex and the body of the tongue.

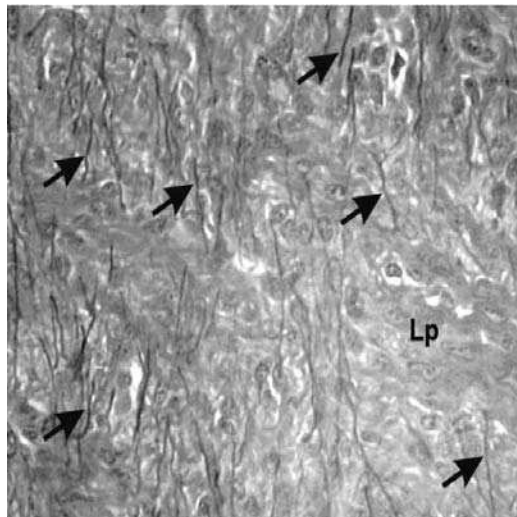


Fig. 3. A horizontal cross-section of the area devoid of papillae on the tongue in the silver fox: **Lp** – lamina propria of the mucosa, **arrows** indicate elastic fibers. LM, x 12.5

Ryc. 3. Przekrój grzbietowy obszaru bezbrodawkowego języka u lisa srebrzystego: **Lp** – blaszka właściwa błony śluzowej, **strzałki** wskazują włókna sprężyste, LM, x 12.5

Table 1. The thickness of the epithelium on the ventral surface of the apex and on lateral surfaces of the body of the tongue in the silver fox

Tabela 1. Grubość nabłonka na powierzchni dolnej wierzchołka i na powierzchniach bocznych trzonu języka u lisa srebrzystego

Thickness of epithelium Grubość nabłonka	Number of measurements Liczba pomiarów	X (µm)	Min (µm)	Max (µm)	SD
Apex of the tongue Wierzchołek języka	100	148.66	57.94	247.26	53.30
Body of the tongue Trzon języka	100	139.99	49.77	239.99	55.79

No statistical differences ($P > 0.05$)
Brak różnic statystycznych ($P > 0.05$)

CONCLUSIONS

1. The surface of the mucosa in the area devoid of papillae of the apex of the tongue is plicated, while on the body of the tongue it is smooth.

2. The mean thickness of the epithelium covering the ventral surface of the apex of the tongue is bigger than the mean thickness of the epithelium on the lateral surfaces of the body of the tongue.

3. The elastic fibers on areas devoid of papillae of the tongue are arranged primarily transversely to the long axis of the tongue.

REFERENCES

- Boshel J.L., Wilborn W.H., Singh B.B., 1982. Filiform papillae of cat tongue. *Acta Anat.* 114, 97-105.
- Iwasaki S., 1993. A study of the filiform papillae of the newborn domestic kitten *Felis catus* by scanning electron microscopy. *J. Mamm. Soc. Jpn.* 18 (1), 33-38.
- Iwasaki S., Miyata K., 1989. Fine structure of the filiform papilla of beagle dogs. *J. Morphol.* 201, 235-242.
- Iwasaki S., Sakata K., 1985. Scanning electron microscopy of the lingual dorsal surface of the beagle dog. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 62 (1), 1-14.
- Krysiak K., Świeżyński K., 2001. *Anatomia zwierząt*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kulawik M., 2006. Development of the mucosa on lateral surfaces of the lingual body in the period from day 15 of prenatal life to 6th month of postnatal life in the rabbit. *EJPAU* 9, 2.
- Kulawik M., Nienartowicz-Zdrojewska A., 2006. The mucous membrane on the ventral surface of the apex and on the lateral surfaces of the body of the tongue in the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 2006 (praca w druku).
- Kumar P., Kumar S., Singh Y., 1998. Tongue papillae in goat: a scanning electron – microscopic study. *Anat. Histol. Embryol.* 27, 355-357.

- Ojima K., 1998. Quantitative and distributive study of the fungiform papillae in the cat tongue in microvascular cast specimens. *Ann. Anat.* 180, 409-414.
- Robinson P.P., Winkles P.A., 1990. Quantitative study of fungiform papillae and taste buds on the cat's tongue. *Anat. Rec.* 225, 108-111.
- Singh B.B., Boshell J.L., Steflik D.E., McKinney R.V., Jr., 1980. A correlative light microscopic, scanning and transmission electron microscopic study of the dog tongue filiform papillae. *Scan Electron Microsc.* III, 511-516.

BLONA ŚLIZOWA NA OBSZARACH BEZBRODAWKOWYCH WIERZCHOŁKA I TRZONU JĘZYKA U LISA SREBRZYSTEGO (*VULPES VULPES FULVA*)

Streszczenie. Do badań użyto 10 języków lisa srebrzystego (*Vulpes vulpes fulva*). Materiał pochodził od zwierząt obu płci i został pobrany po ich uboju. Tkanki pobrane z powierzchni dolnej wierzchołka i powierzchni bocznych trzonu języka badano za pomocą mikroskopu świetlnego. Poza tym dokonano analizy morfometrycznej grubości nabłonka.

W wyniku przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że powierzchnia błony śluzowej na wierzchołku języka jest pofałdowana, natomiast na trzonie jest gładka. Nabłonek pokrywający powierzchnię dolną wierzchołka i powierzchnie boczne trzonu języka u lisa srebrzystego jest wielowarstwowy płaski nierogowaciejący. Nabłonek tworzy liczne i różnej długości pasma, które wrastają do tkanki łącznej.

Nabłonek pokrywający powierzchnię dolną wierzchołka języka jest grubszy niż na powierzchniach bocznych trzonu języka. Badane cechy nie wykazują różnic statystycznych.

Błaszka właściwa błony śluzowej języka tworzy liczne brodawki łącznotkankowe, które znajdują się pomiędzy pasmami nabłonkowymi. Włókna sprężyste rozmieszczone są głównie poprzecznie do osi długiej języka.

Słowa kluczowe: lis srebrzysty, język, błona śluzowa

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 18.06.2007

REMARKS ON THE HISTORY OF BREEDING HUCUL HORSES

Halina Purzyc

Warsaw University of Life Sciences

Abstract. The first pieces of information on the breeding of Hucul horses date back to the times of the Austrian monarchy in the mid-1800. Hucul horses are at present bred in Poland, Romania, Slovakia, Hungary, the Czech Republic, Austria, Germany and Ukraine. The biggest amount of breeding material has been collected in Poland, mainly in state farms. These horses, according to the FAO recommendations on the Preservation of Genetic Resources of Farm Animals, were classified as a vanishing breed and they were included in the conservative breeding program.

Key words: Hucul horse, breeding, history

The first pieces of information on the breeding of Hucul horses date back to the times of the Austrian rule [Starzewski 1927]. In mid-1800 the commanding officer of the Austrian State Stud Farm in Radowce (Radautz) in the Bukovina region, col. Martin von Herrmann (1788-1857) created a herd of Hucul horses, kept next to a herd of thoroughbred and half-blood Arab stallions [Pruski 1960, Starzewski 1927]. Horses for the Radowce herd were purchased in the area of Żabie (present-day Werchowyna), Kosowo (Kosów Lacki) and Vorochta, while provinces of the Austro-Hungarian kingdom were supplied many mountain stallions [Starzewski 1927]. Herrmann applied for authorization to establish a branch breeding Hucul horses [Brzeski et al. 1988, Kario 1991, Pruski 1960, Pruski 1975]. On his initiative a division of the Radowce herd was founded in Lucina in 1856 in order to preserve the mountain character of Hucul horses [Holländer 1962, Hroboni 1968, Jackowski 2005, Jackowski 2005]. It was a manor farm belonging to Radowce located at the altitude of 981 m [Kario 1991, Pruski 1960, Pruski 1975, Starzewski 1927]. In order to improve the population 2 stallions and 10 mares of primitive horses were purchased from the Transylvania region, the so-called szekely horses, and they were supplemented with local breeding material [Brzeski et al. 1988,

Jackowski 2005, Pruski 1960]. The Hucul herd in Lucina was closed down in 1870 [Cywiński 1958, Holländer 1962, Osowicki 1904, Starzewski 1927], although some authors give the date of 1872 [Brzeski et al. 1988, Jackowski 2005, Kario 1991, Pruski 1960, Pruski 1975, Pruski 1975]. Mares from this herd were sold to local inhabitants, while stallions were transferred to the State Stallion Stud Farm in Ober Wikow, near Radowce [Kario 1991, Pruski 1960, Pruski 1975]. Four years later (1876) it again opened and started breeding work [Osowicki 1904, Starzewski 1927]. Other researchers reported that the Lucina Stud Farm started to operate again in 1877 [Brzeski et al. 1988, Cywiński 1958, Holländer 1962, Jackowski 2005, Kario 1991, Pruski 1960, Pruski 1975, Pruski 1975]. Horses for the stud, 1 stallion and 10 Hucul mares, were purchased from the inhabitants of Lucina. This material was the foundation of the new stud farm, still in existence today. Since that moment the Lucina breeding centre remained until 1914 the main centre for the production of pedigree material for the breeding of Hucul horses throughout the country [Brzeski 1988, Pruski 1960, Pruski 1975]. At that time the leading stallions were Stirbul, Miszka, Taras and Czeremosz, and later Hroby and Goral. Stallion Hroby, of unknown pedigree, had an admixture of Arab blood and left the biggest male line, later found in Romania, the Czech Republic, Hungary, Poland and the former Soviet Union [Brzeski et al. 1988]. All the authors agreed that the successive closure of the oldest Hucul horse stud farm occurred in 1914.

The first Hucul stallion station was created in Kossowo in 1891, while another one was opened in 1895 in Żabie. In these stations Hucul stallions were kept together with Arab stallions from the Ober Wikow herd, while starting from 1899 only Hucul stallions were kept there. Both stallion stations operated until 1914 (Fig. 1).



Ryc. 1. Wałachy rasy huculskiej na pastwisku
Fig. 1. Hucul geldings on a pasture

An important event in the breeding of Hucul horses was the first show of this breed organized in Żabie on 9 September 1899 under the patronage of the Agricultural Society in Lvov and Cracow [Bojanowski 1899, Brzeski et al. 1988, Pruski 1960, Pruski 1975]. Since that day until the outbreak of World War I similar shows were organized every several years. In that period, apart from the state breeding of Hucul horses, there was another private herd belonging to Stanisław Przybyłowski in Krzyworównia near Żabie [Holländer 1924, Starzewski 1927]. For the time of WWI the Lucina herd was transferred to Waldhof in western Austria, where it was kept until 1918 [Holländer 1962]. This was done in 1914 [Holländer 1962, Jackowski 2005, Pruski 1960, Pruski 1975] or a year later [Kario 1991]. According to another source the Hucul herd was stationed in Waldhof in the years 1918-1922 [Jackowski 2004]. The Lucina stud was re-established in 1919 [Pruski 1960, Pruski 1975]. In Poland, in the period between WWI and WWII there was a private stud of the Mencil brothers in Pawełcze in the Stanisławów district and in Niskołyze in the Buczacz district [Holländer 1926, Holländer 1962]. After the fall of the Austro-Hungarian monarchy in 1918 3 main separate breeding centres were founded for Hucul horses: in Romania, in Poland and in the Czech Republic [Brzeski et al. 1988, Kario 1991, Pruski 1960].

After Poland regained independence in 1918 the Galician part of the Hucul region was found in this country. Since then the interest in breeding Hucul horses in our country increased. In 1924 thanks to the efforts of M. Hollaender, a vice-director of the State Stallion Stud Farm in Sądowa Wisznia, systematic registers of brood mares were initiated in Poland [Holländer 1926]. A year later obligatory licensing of stallions was introduced. On the initiative of M. Hollaender the Association of Hucul Horse Breeders based in Kossowo was founded in 1925 [Brzeski et al. 1988, Holländer 1937, Kario 1991, Tomczyk-Wrona 2005]. It was subordinate to the Lvov Chamber of Agriculture [Holländer 1937, Holländer 1962]. A breeder from the Małopolska region, E. Bohosiewicz, became its chairman [Pruski 1960]. This association received considerable support from the Ministry of Agriculture. In 1925 shows of Hucul horses were re-established in Żabie, where the best pedigree material was collected. Shows were also held in Kossowo and Uścieryki. In 1928 the Ministry of Agriculture started paying bonuses for proper rearing of male foals for future stallions, while in 1937 it bought from the State Stallion Stud Farm in Sądowa Wisznia an original Hucul horse, stallion 551 Polan, which for its conformation was a typical representative of this breed [Purzyc 2006].

In spite of the considerable interest in the breeding of Hucul horses in Poland and an increase in the population of this breed, no state stud farm was founded before WWII. There were only the private stud farms of the Mencil brothers in Pawełcze and in Niskołyze. In the years 1939-1944 stallions from the State Stallion Stud Farm in Sądowa Wisznia were transferred to Klikowa near Tarnów. The herd was next moved to Drogomyśl, Dębica and again to Sądowa Wisznia [Purzyc 2006].

The period of WWII caused considerable ravages also in the breeding of Hucul horses. After the war the number of stallions of this breed at the State Stallion Studs dropped to several head. At the same time the Stud Farm in Racot, headed by Stefan Alexandrowicz, purchased 6 Hucul mares to work in the garden [Brzeski et al. 1988, Hroboni 1968]. Moreover, in Poland there were Hucul horses of Hungarian origin, which were initially placed in Kwilcz, and next at the Stud Farm in Janów Podlaski (Fig. 2).



Ryc. 2. Maść myszato-srokata u konia huculskiego
Fig. 2. Mouse-piebald colour In Hucul horses

A breakthrough in the breeding of Hucul horses was the establishment in 1950 of the first state Hucul stud farm in Jodłownik, in the Limanowa district, the Kraków province [Hrobóni 1968, Kario 1991, Kario 2005]. Hucul horses from the stud farms in Racot and Janów Podlaski were placed there. Additionally, mares for the herd were purchased from private owners. Mr. Pisulewski, Eng., was appointed the director of the stud farm and under his supervision the stud became known for their breeding successes. In Jodłownik several valuable herd dams were reared, which blood still flows in Polish Hucul horses [Hrobóni 1968]. The stud farm was located there for a few years only. In 1953 it was transferred to Tylicz near Krynica [Brzeski et al. 1988, Cywiński 1958, Holländer

1962, Kario 1991]. According to other sources it was in 1954 [Kario 2005] or in 1955 [Hrobni 1968]. In spite of the good, mountain conditions, favourable for the development of Hucul horses, in 1958 it was again moved to Siary near Gorlice [Brzeski et al. 1988, Hrobni 1968, Jackowski 2005, Kario 1991]. Other sources report it was in 1959 [Holländer 1962, Kario 2005]. At that time Hucul horses started to be adapted to utilization as pack horses. Through appropriate selective breeding and selection, without losing the proper Hucul type of conformation, the height and body weight were increased [Głębocki 1962, Hrobni 1968]. That was not easy to attain, since apart from the appropriate type, the Hucul horse could not lose such merits as resilience, perfect feed conversion rate, stamina and willingness to pull [Hrobni 1968]. The appropriate selective breeding and selection resulted in very good breeding results. Pedigree breeding in Siary was the foundation for the entire present-day breeding of Hucul horses in Poland. Within this breeding project male lines were established from the lines of Goral, Hroby, Polan and Gurgul [Hrobni 1968]. The Hucul stud farm in Siary, thanks to breeding work extending over the course of many years, achieved increased height and body weight of Hucul horses, while still preserving its type of conformation. Up to 1985, when another Hucul stud farm was established at the Experimental Station of the Institute of Animal Science in Odrzechowa near Rymanów, the Siary stud farm was the only state stud of this horse breed [Barzyk et al. 1991]. In November 1993 the Hucul Stud Farm in Gładyszów was founded as a unit responsible for the breeding of this breed in the area and facilities allocated from the former Siary Stud Farm (Fig. 3). In 1999 the stud bought the land and housing facilities of the former Agricultural Cooperative in Regetów, which were adapted for its needs. In 1993 in the Bieszczady National Park the Conservative Hucul Horse Breeding Unit was founded [Komornicki 2005, Krawczyk 1994, Pasternak 1995, Wojciechowski 2004]. Horses for the Wołosate stud were purchased from a private stud farm in Rabe near Ustrzyki Górne, followed by the purchase of several dams from state and private stud farms [Wojciechowski 2004].

In the 1990's private stud farms of Hucul horses started to be founded in Poland, initially in south-eastern Poland and later throughout the country. In 1998 the Association of Hucul Horse Breeders was founded and registered [Jackowski 1998]. At present most pedigree material of this breed in Poland is found at the Hucul Stud Farm in Gładyszów. It is followed in terms of the quantity of collected material by the Conservative Hucul Horse Breeding Unit in the Bieszczady National Park in Wołosate and the Experimental Station of the Institute of Animal Science in Odrzechowa near Rymanów.

Representatives of male lines, having an effect on the Polish breeding of Hucul horses include Polan, Gurgul, Goral, Ousor, Hroby, Pietrosu and Prislop, while representatives of female lines have been Agatka, Bajkałka, Czeremcha, Wrona, 169 Ousor (by Gurgul-Gurgul V-23), Góralka Nowosądecka (Jagoda), Laliszka, Nakoneczna, Wołga, Polanka, Srocza, Sekunda (Żyrka), Wydra (Wyderka) and Reda (Fig. 4).

All stallions and mares of the Hucul breed starting from 1962 have been recorded in Herd Books. Hucul horses, following FAO recommendations for the Preservation of Genetic Resources of Farm Animals, are classified as a vanishing breed and included in the conservative breeding program.

At present, apart from the Polish breeding program, Hucul horses are also bred in Romania, Slovakia, Hungary, the Czech Republic, Austria, Germany and Ukraine [Jackowski 2005].



Ryc. 3. Żrebię huculskie z klaczą
Fig. 3. A Hucul foal with a mare



Ryc. 4. Konie huculskie na łące
Fig. 4. Hucul horses on a meadow

REFERENCES

- Barzyk J., Brzeski E., Jackowski M., Jazowska J., Kario W., 1991. Konie huculskie. cz. III. Zesz. Nauk. AR Krak. Sesja Nauk., 29, 23-28.
- Bojanowski S., 1899. Premiowanie koni huculskich w Żabiem. Tyg. Rol. Kraków., 38, 309-312.
- Brzeski E., Górská K., Rudowski M., 1988. Konie huculskie. PWN, Warszawa.
- Cywiński L., 1958. Hodowla konia huculskiego. Przegl. Hod., 1, 23-26.
- Głębocki M., 1962. Hodowla koni w krakowskim rejonie hodowli zwierząt zarodowych. Przegl. Hod., 1, 22-24.
- Holländer M., 1924. Z wycieczki po Huculszczyźnie. Jeź. i Hod., 37/38, 290-291.
- Holländer M., 1926. Premjowanie ogierów i klaczy typu konika i hucała., 3/4, 20-21.
- Holländer M., 1937. W sprawie huculów. Jeź. i Hod., 5, 92-93.
- Holländer M., [w:] Księgi stadne koni fiordzkich, koni huculskich i koników. Tom I. PWRiL, Warszawa 1962, 5-9.
- Hrobni Z., 1968. Konie huculskie w Polsce. Koń Pol., 2, 2-6.
- Jackowski M., 1998. Powrót Związku Hodowców Konia Huculskiego. Koń Pol., 4, 35.
- Jackowski M., 2004. Stadnina na końcu świata. Koń Pol., 1, 42-45.
- Jackowski M., 2005. Konie stadniny w Łuczynie. Przegl. Hod., 7, 24-25.
- Jackowski M., 2005. Polska hodowla koni huculskich. Hodowca i Jeździec., 7, 22-25.
- Jackowski M., 2005. Stadnina prezydentów. Koń Pol., 1, 22-26.
- Jackowski M., 2005. Stadnina przez pół Bukowiny. Koń Pol., 2, 28-32.
- Kario W.: [w:] Krzemień M. Hucuły – konie połonin. Wyd. Parol Company, Kraków 1991, 32-60.
- Kario W.: [w:] Budzyński T. Hucuły konie z gór. Wyd. LIBRA, Rzeszów 2005, 12-14, 16-18.
- Komornicki J.: [w:] Budzyński T. Hucuły konie z gór. Wyd. LIBRA, Rzeszów 2005, 20-21.
- Krawczyk P., 1994. Koń huculski w Bieszczadach. Chroń. Przyr. Ojcz., 5, 88-90.
- Osowicki A., 1904. Das Huzulenpferd. Stuttgart.
- Pasternak B., 1995. Zachowawcza hodowla konia huculskiego w Bieszczadzkiem Parku Narodowym. Parki Narod., 2, 19.
- Pruski W., 1960. Hodowla koni. T. I. PWRiL. Warszawa, s. 203-112, 776-781, 783- 786, 788.
- Pruski W., 1975. Hodowla zwierząt gospodarskich w Galicji w latach 1772- 1918. T. I. Okres 1772-1881. Zakład Narodowy im. Ossolińskich. Wrocław, 445-447.
- Pruski W., 1975. Hodowla zwierząt gospodarskich w Galicji w latach 1772- 1918. T. I. Okres 1882-1918. Zakład Narodowy im. Ossolińskich. Wrocław, 268-270.
- Purzyc H., 2006. Cechy konia huculskiego w świetle badań morfometrycznych. Praca doktorska. SGGW. Warszawa.
- Starzewski T., 1927. O koniu huculskim w Polsce. Roczn. Nauk Roln. i Leśn., Poznań.
- Tomczyk-Wrona I., 2005. Konie huculskie. Początki rodzin żeńskich. Koński Targ., 1, 28-29.
- Wojciechowski W., 2004. Wołosate. Zachowawcza Hodowla Konia Huculskiego. Koński Targ., 12, 30-31.

Z HISTORII HODOWLI KONIA RASY HUCULSKIEJ

Streszczenie. Pierwsze informacje dotyczące hodowli konia huculskiego sięgają czasów związanych z rządami austriackimi z połowy XIX wieku. Konie huculskie hodowane są w Polsce, Rumunii, na Słowacji, Węgrzech, w Czechach, Austrii, Niemczech i na Ukrainie. Największy materiał zarodowy zgromadzony jest w Polsce, głównie w stadninach państwowych. Konie te, zgodnie z kwalifikacjami FAO, dla Zachowania Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich, zaliczone zostały do ras ginących i objęto je programem hodowli zachowawczej.

Słowa kluczowe: koń huculski, hodowla, historia

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 18.06.2007

HISTORY OF RESPIRATORY TRACT ENDOSCOPY¹

Grzegorz Sapikowski, Józef Nicpoń, Jarosław Popiel,
Agnieszka Kurosad, Paweł Czerw

Wrocław University of Environmental and Life Sciences

Abstract. Article describes in details the history of respiratory tract bronchoscopy from the beginning (Aristotle's time) up to now. The authors' intention was to present readers the first steps in exploration of respiratory tract in human and animals and evolution of tools used in that examination.

Key words: history, respiratory tract, bronchoscopy

The knowledge of anatomy and physiology of the respiratory tract organs has been gained over many centuries. The ban on postmortem examination that was binding for a long time limited cognitive opportunities of scientists, who were forced to determine the function of individual organs basing on their own speculations. This often led to the formation and strengthening of false opinions concerning the function of respiratory organs, e.g. larynx was regarded as an organ responsible for blood transport [Zaleska-Kręcicka et al. 1995].

Aristotle described in detail, around 350 B.C., the correct location, anatomical structure and function of larynx. The issue of permit for postmortem examination (about 300 B.C.) significantly accelerated progress in cognitive research of respiratory tract organs, and for this reason many of their descriptions survived. In the middle of the second century A.D., a Greek doctor Galen working in Rome, in his study: „*De Usu Partium Corporis Humani*”, presented a theory on the anatomical structure of cartilages and functions of larynx. Anatomical studies conducted by Leonardo da Vinci during autopsies were a valuable source of information about the respiratory tract at the end of XV century. The study published in 1555 by Vesalius: „*De Humani Corporis Fabrica*” included illustrations of correctly built larynx as well as accurate description of its function. Additionally, by means of sketches, it presented the procedure of tracheotomy

Corresponding autor – Adres do korespondencji: Grzegorz Sapikowski, Departament of Internal and Parasitic Diseases with Clinic for Horses, Dogs and Cats, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław

conducted on an animal. The first monograph concerning larynx, whose author was Fabricius of Padua, was published in 1600 – „*De Visione Voce Auditu*”. Other scientists: Giovanni Morgagni, Ferreini and Bertini, supplemented current knowledge on the respiratory organ, describing the existence of laryngeal pouches and introducing new anatomical terms: glottis and vocal chords. A new period in the examinations started from 1800, when interest in the diagnosis and description of pathological conditions increased. Experimental studies were conducted at that time, and the protective function of larynx with regard to the lower respiratory tract was noticed [Zalesska-Kręcicka et al. 1995].

The year of 1854 is regarded as the beginning of the formation of new field of medicine – laryngology, which was related to the discovery of a Spanish singing teacher Patricio Rodriguez Manuel Garcia who, using a system built of dental mirrors and a mirror, reflected sun rays and saw his own vocal chords. This event constituted an impulse for an eminent doctor and neurologist Ludwig Türck of Vienna as well as a contemporary professor of physiology at Jagiellonian University, Johan Czermak, to commence studies on laryngeal mirror prototypes, and promotion of laryngological examination [Borkowski et al. 1982, Zalesska-Kręcicka et al. 1995]. Further experiments, aimed at obtaining detailed knowledge on the respiratory organ structure, were limited by the anatomical conditions within the throat, which became a basis for the development of new tools and instruments allowing for intravital penetration of its interior and conducting of medical procedures. The invention of rhinoscope by Antoni Jurasz and promotion of its use for diagnostic purposes [Borkowski et al. 1982] is an example.

In 1833, Willis diagnosed laryngoplegia for the first time, as a consequence of recurrent vagus nerve branch. Twenty five (25) years later, a French neurophysiologist Claude Bernard caused aphonia experimentally in the dog, damaging vagus nerve. An English doctor Morell McKenzie is regarded as a creator of modern laryngology. He introduced a round laryngological mirror, wrote the first manual concerning larynx diseases, and in 1887 twice collected intravitaly a specimen from pathological lesions in the larynx of a Prussian king Frederic Wilhelm. In this way, first descriptions of intravital biopsies of the respiratory organ were formed. The presence of cancerous cells was found as late as during the second microscopic examination of laryngeal specimens of king Frederic Wilhelm, and the diagnosed larynx tumour became the cause of the king's death [Zalesska-Kręcicka et al. 1995].

The determination of the doctors and scientists to conduct the visual examination of the organism interior contributed to the construction of instruments, constituting prototypes of modern endoscopes. Their pioneering devices and primitive examination technique evolved over many decades. Initially, endoscopes were used for the examinations of the alimentary tract and urinary system. The first successful attempt of endoscopy described was the endoscopy of the urinary tract conducted by Filip Bozzini in 1806. He used a specially formed zinc pipe, including a mirror and a wax candle, constituting the source of light. In 1868 a German internist, professor Adolf Kussmaul, for the first time inserted a simple endoscope into the stomach of a professional "knife-swallower". A professor Jan Mikulicz, from Krakow, who specialized in alimentary tract studies, constructed an endoscope with a slightly bent distal part, which made its inserting difficult but significantly enlarged the field of vision. Elsner followed the same direction of studies, and in 1910 used a mobile prism in his device, which allowed enlarging the field of vision to over 90°. Alfred Kirstein was the first scientist to introduce light into

the examined organ, using mirrors fixed inside the endoscope. He was also the originator of using a working canal in endoscopes [Kraft 1993, Kubiak 1998, Nicpoń and Kubiak 2000, Sapikowski 1996].

At the beginning of the 30s Schindler developed the first semi-flexible endoscope of 11 mm diameter. The proximal part of the endoscope was stiff, while the distal part enabled its tilting by 34° and had an angle of sight up to 60°. The structure was improved by Henning in 1934. His endoscope had a smaller diameter (8.5 mm) and 90° angle of sight, and a rubber balloon in its distal part, which protected the organ examined. This apparatus guaranteed the best quality of image available in those times and was used in gastroscopic examinations [Kubiak 1998].

The first physician who proved the possibility of respiratory tract endoscopy was an American, Horace Green, who in 1847 inserted an endoscope in the trachea. The procedure, however, was regarded as too risky and further attempts were abandoned. Until today, the first experimental rinsing of the respiratory tract with physiological saline solution, conducted by Green, is considered as the beginning of broncho-alveolar lavage (BAL). Nonetheless, his research papers published in 1847 and including his observations made during the respiratory tract rinsing procedures, led to his being eliminated from New York Medical Society group (Rowińska-Zakrzewska and Kusia 1997, Sapikowski 2000). BAL as a therapeutic procedure was popularized in the 20s of XX century, and as late as in the 70s its usefulness in the diagnosis of respiratory organ diseases was proved. The experimental studies on BAL application in the diagnostics of the respiratory tract diseases in dogs were conducted in the years 2000-2004 in the clinical endoscopy laboratory of the Agricultural University in Wrocław [Pirożyński 1999, Rowińska-Zakrzewska and Kusia 1997, Spużak 2004].

A professor of the Jagiellonian University, Przemysław Pieniążek, an outstanding surgeon, a creator of "Polish laryngology" and the first laryngological clinic, contributed significantly to the development of studies over the respiratory tract. In 1884 he inserted a metal funnel of his own invention through the tracheotomy opening, and - using a headlight - viewed trachea and the main bronchi as the first man in the world. Thus, he became a father of lower tracheobronchoscopy. Laryngology owes him numerous studies as well as the first Polish laryngology manual, which was published in 1897 [Brzeziński 1995, Rowińska-Zakrzewska and Kusia 1997]. In 1895 Alfred Kirstein viewed directly the interior of larynx, using only a spatula. In the same year, Gustav Killian of Freiburg inserted an endoscope of his own design into the respiratory tract, designed of a stiff, metal pipe with an external source of light, and viewed the interior of the examined organs. These events initiated quick development of laryngoscopy and bronchoscopy. In 1897 Kirstein used a laryngoscope with electric lighting in the examination of the larynx, while Killian first used and described the application of endoscope aiming at removing a foreign body (a pork bone) from the right bronchi of a man. Over the subsequent years, Killian developed many improvements and modifications of his own method of endoscopic examinations, and is commonly recognized as a creator of upper - classical bronchoscopy [Brzeziński 1995, Sapikowski 2000, Zalesska-Kręcicka et al. 1995].

Pioneering studies of Green, Bruns, Dessault and other surgeons, who operatively restored the patency of the respiratory tract removing polyps, foreign bodies and tumours, were of considerable cognitive value for the development of diagnostics of respiratory organ diseases. In 1904, an American Chevalier Jackson used an innovative

solution in the form of distal lighting and a suction canal in the endoscope of his own design. This scientist formed foundations of modern bronchology and contributed to the establishment of Philadelphia School of Bronchoesophagology. Together with his son he published a manual entitled „*Bronchoesophagology*”, which is regarded as „bronchological Bible” until today [Brzeziński 1995, Rowińska-Zakrzewska and Kusia 1997, Zalesska-Kręcicka et al. 1995].

The event that negatively influenced the development of endoscopy was the discovery, on 8 November 1895, of x rays made by Wilhelm Roentgen. The first X-ray image of Roentgen wife's hand – Berta, was made on 22 December 1895. Roentgen's discovery was of crucial importance for clinical diagnostics, since it enabled to make the internal structures of organism visible without disturbing its integrity. In 1897 Rosenfeld as the first scientist used radiological examination for the chest organ imaging. The above mentioned examinations were initiated in Poland by professor Jaworski from Krakow. The fascination with the image recorded on an X-ray plate, the simplicity of conducting the examination and patient's comfort during the examination, led to the spreading and quick development of radiology [Empel 1995, Koper 1994, Zgliczyński 1989]. Its dominance over other imaging methods was supported by the introduction of contrasting agents, which made it possible to see the organs that were so far invisible on review X-ray pictures. In 1921 the contrast examinations were also used in diagnostics of the respiratory tract, and Siccard and Forrestier were regarded as creators of bronchoscopy. X-ray machines constructed after World War II, using voltage over 100 kV, enabled to make pictures with "hard radiation", reduce the exposure time and obtain very good quality images of the structures photographed, which strengthened the position of X-ray examination in imaging diagnostics. In 1951, Morgan and Osterkamp developed an electronic x-ray image amplifier, which constituted the beginning of x-ray television [Empel 1995, Koper 1994, Zgliczyński 1989]. This diagnostic technique broadened the possibilities of roentgenodiagnostics with internal organ visualization in a functional aspect. Despite the fact that Roentgen's discovery became within a few months a "common good of all mankind", this imaging method of endogenous structures of the organism was not without certain limitations and negative effects. For this reason, pneumologists became again interested in the bronchoscopic technique in the 30s of the previous century, which was mainly related to the diagnostics and therapy of tuberculosis, and this new domain of endoscopic examinations of the respiratory tract was called phthysiological bronchology. The position of bronchoscopy in the diagnostics of the respiratory organ was definitely strengthened in the 50s. Its development was related to increased incidence of lung cancer in humans [Rowińska-Zakrzewska and Kusia 1997].

The year 1957 brought a breakthrough in the development of endoscopy as a result of the invention of a fiber-optic endoscope with a flexible and movable working part, called a fiberoscope, invented by Basil Hirshovitz (American doctor) and Curtis and Peters (physicists). The technique of bronchoscopic examination with the use of stiff endoscopes was described as classical bronchoscopy, while from the moment of introducing flexible endoscopes we started to call it bronchofiberoscopy [Kraft 1993, Sapikowski 2000].

In 1964, a Japanese Shigeto Ikeda, educated both in technology and in medicine, developed a design of a flexible apparatus designated for endoscopy of the respiratory tract. On the basis of the above design, the companies of Machida Endoscope Co. Ltd

and Olympus Optical Co. Ltd. constructed the first bronchofiberscope, which was presented at the 9th international congress of chest diseases in Copenhagen in 1966. The improved version of this bronchoscope was launched in the American market in 1969. The technical parameters of this endoscope allowed reaching sub-segment bronchi [Rowińska-Zakrzewska and Kusia 1997, Sapikowski 2000]. Since that time, despite the development of newer imaging techniques (computer tomography, ultrasonography), bronchoscopy has occupied a key position in diagnostics of the respiratory organ diseases. An increase of opportunistic infection in the subsequent years forced the increased application of bronchoscopic diagnostics [Rowińska-Zakrzewska and Kusia 1997].

The development and introduction in 1984 of a new generation of flexible endoscopes, called videobronchoscopes, by doctor Ryosuke Ono, constituted a new step in the development of endoscopic examinations. Their modern structure enabled to reduce considerably the working part diameter, which in turn allowed their applying in pediatrics and veterinary medicine of small animals [Kraft 1993, Kubiak 1998, Sapikowski 2000, Skrzypczak 1996].

In recent years, due to very rapid development of electronics and the need of medical device miniaturization, new generations of endoscopes have been introduced, whose explorative, diagnostic and therapeutic capabilities are significantly higher than in the past. Endoscopy has become a platform of intra-organ ultrasonography (echoendoscopy) and Doppler's examination, and it also enabled to use laser techniques in the diagnostics of tumours (fluorescence endoscopy) and surgery [Kubiak 1998, Pirożyński 1999, Zalesska-Kręcicka et al. 1995]. Quick progress concerned also endoscopic manipulators. Innovative technical solutions of modern fiberscopes increase the possibilities of their therapeutic application when removing foreign bodies and neoplastic lesions as well as when rinsing and substituting parts of respiratory tract with prostheses [Rowińska-Zakrzewska and Kusia 1997, Skrzypczak 1996].

The evolution of endoscopic technique gradually reduced the nuisance and increased safety of this method. Pioneering studies were burdened with numerous cases of serious damage, burns and even perforation of the organs explored. Complications occurred relatively frequently even after successful endoscopy. Each new type of endoscope, apart from significant improvement of explorative capabilities and the quality of the obtained image, also increased safety of the conducted procedure. The introduction of semi-flexible endoscopes and the application of a "cold source of light" also contributed greatly to the increase of safety. The invention of fiberscope, however, constituted a breakthrough moment for the development of endoscopy [Kubiak 1998, Nicpoń and Kubiak 2000, Sapikowski 2000].

The endoscopic technique was applied for the first time in veterinary medicine in 1888. Polański and Schindelka, using an endoscope of 55 cm length and 55 mm diameter with a lamp source of light and a cooling system, conducted the first nose and air pouches endoscopy in a horse. Similar examinations were conducted by Marek and Wirth in 1912. In 1913 Frese used an endoscope developed by the companies of Wolf and Knittlingen of 50 cm length and 8 mm diameter in order to conduct rhinolaryngoscopy in horses. This endoscope was characterized by an innovative structure: it had mobile optics the control of the angle of sight within the range of 45-90°, and was battery or transformer powered. Wirths, who used a medical cytoscope in his studies, was a pioneer of creating photographic documentation of endoscopic images in animals. Ini-

tially, for practical reasons, only endoscopy in horses was conducted in veterinary medicine. The first endoscopic examination described in a dog was esophagoscopy, conducted by Horning and Mackee in the USA in 1924. The above mentioned scientists conducted the first bronchoscopic examination in a dog in the same year [Kraft 1993, Sapikowski 2000, Tams 1990].

However, the developed structures of endoscopes were of limited practical use due to great differences of species, concerning mainly the size of animals. The introduction of fiberoscopes of considerable length allowed conducting alimentary tract endoscopy in large animals and increased safety of the examination. Endoscopy shortly became a basic procedure in the diagnosis of laryngoplegia in horses.

The intensive development of veterinary medicine of small animals resulted in the fact that – during the 60s and 70s – significant development of endoscopy technique took place, and numerous scientific publications appeared. At present, endoscopy in veterinary medicine is used not only in diagnostics and therapy of internal diseases, but also in surgery and obstetrics, and examinations include new species, e.g. birds, monkeys [Borkowski et al. 1982, Harcourt-Brown 1997, Nicpoń and Kubiak 2000, Ödkvist and Schauman 1980, Tams 1990]. In 1982, a review article of doctor Tomasz Borkowski (1982) was published in *Veterinary Medicine*, entitled „*Ocena endoskopii w praktyce weterynaryjnej*” [*Assessment of endoscopy in veterinary practice*], in which its author made an attempt at the evaluation of this examination method, on the basis of experience obtained during his stay in the clinics of New York State College of Veterinary Medicine.

The cooperation of the Institute and Clinic of Internal Diseases of the Faculty of Veterinary Medicine in Wrocław with professor Wilfried Kraft from Munich and Eckehard Deegen from Hanover resulted in the opening of the first veterinary endoscopy diagnostics laboratory in Poland in 1987. The conducted studies included endoscopic diagnostics of the alimentary tract, respiratory organ and urinary tract in dogs, horses and cats (Fig. 1, 2, 3). Experimental examinations of other species - small ruminants and pigs - were also conducted (Fig. 4). The conducted research resulted in many conference reports, scientific publications and a manual of endoscopic examinations in dogs and cats published in 2000 [Nicpoń and Kubiak 2000, 1998]. The results of the conducted scientific studies also served for the preparation of three doctoral dissertations concerning the alimentary tract and respiratory organ diseases [Kubiak 1998, Sapikowski 2000, Spuzak 2004].

Despite the fact that endoscopic examinations are in many cases the only method allowing determining the causes of the respiratory tract diseases (non-contrasting foreign bodies inside the bronchial tree, various inflammatory states and neoplasms), they are not frequently conducted in everyday veterinary practice among field veterinarians, mainly because of high endoscopes purchase costs.

By means of this publication we wish to encourage colleagues from veterinary surgeries to take interest in this diagnostic and therapeutic method.



Fig. 1 . Prof. Józef Nicpoń, DVM, Ph.D, Wojciech Hildebrand, DVM, Ph.D – dog's endoscopic examination 1993.

Rys. 1. Prof. dr Józef Nicpoń, dr Wojciech Hildebrand – badanie endoskopowe psa

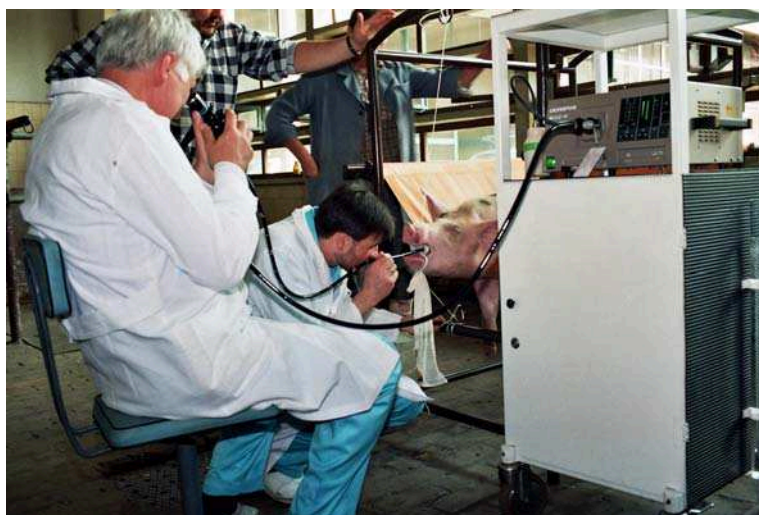


Fig. 2. Prof. Józef Nicpoń DVM, Ph.D Krzysztof Janeczko DVM, Ph.D - swine's endoscopic examination 1995.

Rys. 2. Prof. dr Józef Nicpoń, dr Krzysztof Janeczko – badanie endoskopowe świni



Fig. 3 . Grzegorz Sapikowski, DVM, Ph.D dr Krzysztof Kubiak DVM, Ph.D – bronchoscopy of dogs 2000 .

Rys. 3. Dr Grzegorz Sapikowski, dr Krzysztof Kubiak – bronchoskopia psa

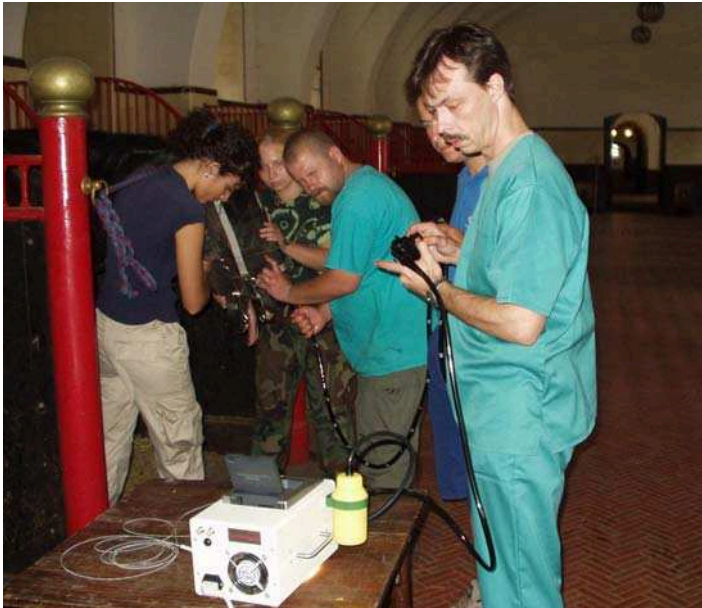


Fig. 4 . Paweł Czerw, DVM, Ph.D, Przemysław Różycki, DVM – endoscopic examination of horse 2003.

Rys. 4. Paweł Czerw, DVM, Ph.D, dr Przemysław Różycki, DVM – badanie endoskopowe konia

REFERENCES

- Borkowski T., Hackett R., Zimmer J., 1982. Estimation of endoscopy in veterinary practice. *Vet. Med.* 38: 659-662.
- Brzeziński T., 1995. History of medicine. PZWL Publishers, Warsaw.
- Empel W., 1995. History of clinical rentgenodiagnostics. *Vet. Med.* 5: 374-377.
- Harcourt-Brown N., 1997. Endoscopy in parrots. *In Practice* 19: 2-13.
- Koper S., 1994. Veterinary radiology – the historical feature and the contemporary imaging methods. *Vet. Med.* 50: 432-436.
- Kraft W., 1993. Tierärztliche endoskopie. Schattaur. Stuttgart.
- Kubiak K., 1998. Estimation of fiberoscope usefulness in the diagnostics of digestive tract diseases in dogs. *Vet. Med.* 55:471-475.
- Nicpoń J., Kubiak K., 2000. Endoscopic examination in dogs and cats. Agricultural Academy Publishers, Wrocław.
- Nicpoń J., Kubiak K., 1998. Usefulness of bronchoscopy in diagnostics of respiratory tract diseases in dogs. *Vet. Med.* 54:43-45.
- Ödkvist L. M., Schauman P., 1980. A bronchial foreign body in a chimpanzee. *Small Anim. Pract.* 21:347-352.
- Pirożyński M., 1999. Bronchofibroskopy. α -medica press, Bielsko-Biała.
- Rowińska-Zakrzewska E., Kusia J., 1997. Respiratory tract diseases. PZWL Publishers, Warsaw.
- Sapikowski G., 2000. Endoscopy in diagnosis of respiratory system diseases in dogs. Dissertation. Wrocław
- Skrzypczak P., 1996. Use of the endoscopy technique in diagnostics of dogs diseases. Material of Scientific Symposium – Actual problems in dogs pathology. Wrocław.
- Spuzak J., 2004. Examination of bronchio - alveolar lavage in diagnostics of low respiratory tract diseases in dogs. *Vet. Med.* 62: 678-682.
- Tams TR., 1990. Small Animal Endoscopy. The C.V. Mosby Company, St. Louis, Missouri.
- Zalesska-Kręcicka M., Kręcicki T., Jeleń M., 1995. Atlas of larynx diseases. Ed. Vol., Wrocław.
- Zgliczyński S L., 1989. Radiology. PZWL Publishers, Warsaw.

HISTORIA ENDOSKOPII UKŁADU ODDECHOWEGO

Streszczenie. Autorzy opisują szczegółowo historię bronchoskopii układu oddechowego od czasów Arystotelesa do chwili obecnej. Intencją autorów było przedstawienie pierwszego kroku tych badań u ludzi i zwierząt oraz omówienie ewolucji narządów służących temu celowi

Słowa kluczowe: historia, układ oddechowy, bronchoskopia

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 18.06.2007

SPIS TREŚCI CONTENTS

Barbara Badzian

- Poziom aminokwasów egzogennych w ścianie jelita cienkiego,
wątrobie i osoczu krwi kurcząt po zastosowaniu witamin
rozpuszczalnych w wodzie 3
- The level of exogenous amino acids in intestine wall,
liver and blood serum after application
of water soluble vitamins in chickens

Witold Kędzierski, Sylwester Kowalik, Iwona Janczarek

- Wybrane wskaźniki biochemiczne i hematologiczne
oraz częstotliwość skurczów serca u koni rasy kłusak francuski
w kolejnych etapach treningu 15
- Chosen biochemical and hematological blood parameters
and heart rates of young trotters in consecutive phases of training

Urszula Kosior-Korzecka, Marcin Kalinowski, Ryszard Bobowiec

- Changes in oestrogens and progesterone secretion under
the influence of acute stress - like concentrations
of cortisol by porcine granulosa cells *in vitro* 25
- Zmiany wydzielania estrogenów i progesteronu
przez komórki ziarniste dojrzewających pęcherzyków świnii *in vitro*
pod wpływem kortyzolu w stężeniach typowych dla ostrego stresu

Daniel Korniewicz, Zbigniew Dobrzański, Adolf Korniewicz, Piotr Kaczmarek, Henryk Różański, Krystyna Pogoda-Sewerniak

- Influence of plant extracts (*Herbiplant CS*) on biochemical indices
and mineral elements in blood serum of fatteners 35
- Wpływ ekstraktów roślinnych (*Herbiplant CS*) na kształtowanie się
wskaźników biochemicznych i składników mineralnych
w surowicy krwi tuczników

Roman Kwaśnicki, Roman Frankowski

- Efektywność wzrostu cieląt rasy charolaise
z uwzględnieniem genetycznego polimorfizmu
miostatyny i somatotropiny 45
- Growth efficiency of Charolaise calves due to miostatin
and somatotropin genetic polymorphism

Piotr Nowakowski, Aleksander Dobicki, Marta Ćwiertniewska

- Pozycje odpoczynku bydła utrzymywanego na semi-naturalnych
pastwiskach w Parku Narodowym „Ujście Warty” 53
- Resting positions of cattle kept in free range conditions
on semi-natural grasslands of “Warta Mouth” National Park

Mirosława Kulawik, Maria Sozańska

- The mucous membrane in areas devoid of papillae
of the apex and body of the tongue in the silver fox (*Vulpes vulpes fulva*) 63
Błona śluzowa na obszarach bezbrodawkowych wierzchołka
i trzonu języka u lisa srebrzystego (*Vulpes vulpes fulva*)

Halina Purzyc

- Remarks on the history of breeding Hucul horses 69
Z historii hodowli konia rasy huculskiej

Grzegorz Sapikowski, Józef Nicpoń, Jarosław Popiel, Agnieszka Kurosad,**Paweł Czerw**

- History of respiratory tract endoscopy 77
Historia endoskopii układu oddechowego