

# Oznaczanie metabolitów kortyzolu w kale jako metoda oceny stresu u dzikich zwierząt

Katarzyna Kołodziejczyk, Anna Cywińska

z Zakładu Patofizjologii Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

**S**tres jest definiowany jako uogólniona reakcja adaptacyjna na różnorodne czynniki. Jest to sekwencja zdarzeń zapoczątkowana działaniem bodźca (stresora), który uruchamia reakcje w ośrodkowym układzie nerwowym i prowadzi do pobudzenia procesów fizjologicznych, których celem jest zapewnienie przetrwania w niesprzyjających warunkach oraz w sytuacjach zagrożenia życia. Pojęcie stresu i stresorów wprowadził Hans Selye (1), a jako ich przykład podał zmienne warunki środowiska czy przeżycia emocjonalne. Stworzył również pojęcie ogólnego zespołu przystosowawczego (general adaptation syndrome – GAS), który podzielił na trzy główne etapy: faza alarmowa, faza przystosowania oraz faza wyczerpania. GAS to mechanizm nerwo-hormonalny, w którym zaangażowane są: współczulny układ nerwowy, kora i rdzeń nadnerczy. Autor sugerował, że zdolność przystosowania się organizmów do stresującej sytuacji jest ograniczona i uwarunkowana genetycznie. Późniejsze badania wykazały, że ważną rolę w regulacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza odgrywa układ limbiczny, w szczególności hipokamp, kora przedczołowa oraz ciało migdałowe (2). Oznacza to, że stres powiązany jest z odczuwaniem emocji oraz tworzeniem wspomnień.

W wyniku działania stresora pobudzone są dwa typy odpowiedzi. Pierwszy z nich, pojawiający się w czasie krótszym niż minuta od ekspozycji na stresor, wynika z uwolnienia katecholamin. Powodują one między innymi przyspieszenie akcji serca i oddechów, wzrost ciśnienia krwi, spowolnienie motoryki przewodu pokarmowego oraz uwolnienie zapasów glukozy do krwi.

Glikokortykosteroidy odpowiedzialne są za reakcję długotrwałą, rozwijającą się w czasie około godziny od ekspozycji na stresor. Profil wydzielania glikokortykosteroidów jest swoisty gatunkowo. Ptaki, szczury, płazy i myszy wydzielają głównie kortykosteron, psy kortyzol i kortykosteron, natomiast koty, naczelnice i owce głównie kortyzol (3). Działanie glikokortykosteroidów prowadzi do wzrostu stężenia glukozy we krwi poprzez stymulację glukoneogenezy, ponadto pobudza wydzielanie erytropoetyny. Hormony odpowiadające za reakcje stresowe uwalniane są również w sytuacjach, które nie stanowią zagrożenia, a jedynie silne pobudzenie, np. podczas kopulacji czy porodu (4).

Moberg i Mensch (5) zaproponowali podział reakcji stresowej u zwierząt na trzy elementy: rozpoznanie stresora, obronę oraz konsekwencje wynikające z działania czynnika stresującego. Wyróżnili oni również dwa rodzaje stresu. Stres krótkotrwały (eustres), który postrzegany jest jako tzw. dobry stres, niemający negatywnych skutków dla organizmu. Wpływa on między innymi na poprawienie reakcji odpornościowych. Jeśli jednak stresor działa długo lub działanie

## Determination of cortisol metabolites in feces – a method for stress assessment in wild animals

Kołodziejczyk K., Cywińska A., Division of Pathophysiology, Department of Pathology and Veterinary Diagnostic, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Stress is the inseparable part of life of all animals. It is defined as the sum of the biological reactions to any adverse stimulus, physical, mental or emotional, external or internal that tend to disturb the homeostasis. If those reactions are inappropriate they may lead to the development of a disease. During stress reaction, there are numerous processes regulated by stress hormones (including cortisol), aimed to avoiding the damage. Chronic stress can lead to irreversible or severe changes, including decrease of immunity and reproductive disorders. Recently, the level of stress in animals and its consequences have been intensely investigated. In farm animals, reducing stress may lead to improve productivity and reproduction. The usefulness of determination of stress hormones levels in wild animals in the wild and in captivity was also noticed, especially in terms of protection of endangered species. There are various specimens for stress hormones testing, like blood, saliva and urine. One of the most widely used methods is to analyze stress hormones metabolites in feces. Taking the specimen is non-invasive and obtained results are highly reliable. The aim of this article was to present usefulness of this method for assessing the stress status in wild animals.

**Keywords:** stress, cortisol, fecal cortisol metabolites, wild animals.

kilku stresorów kumuluje się, dochodzi do stresu przewlekłego (distres). Jego skutki są odwrotne niż w przypadku stresu trwającego krótko, ponieważ mamy do czynienia ze zjawiskiem immunosupresji. W początkowej fazie glikokortykosteroidy osiągają wysokie stężenia i hamują syntezę białek, a w efekcie substancji prozapalnych. Za to przy dłuższej ekspozycji na stresor ich stężenie utrzymuje się na niższym poziomie, ale przez dłuższy czas, wykazując działanie prozapalne i immunosupresyjne. W efekcie osobniki narażone na długotrwały stres są znacznie bardziej podatne na zakażenia, choroby autoimmunologiczne oraz problemy z rozrodem (4).

## Wskazania i możliwości badania stresu u zwierząt

W ostatnich latach zaczęto prowadzić coraz więcej badań na temat stresu i jego skutków u zwierząt. W przypadku zwierząt gospodarskich możliwość ograniczenia stresorów i w efekcie sytuacji stresowych może mieć bezpośrednie przełożenie na poprawienie ich rozrodczości i produktywności. Niedawno zainteresowano się metodami badania stresu u zwierząt dzikich, zwłaszcza pod kątem ochrony zagrożonych gatunków

oraz wynikającego z rozwoju cywilizacji konfliktu na linii człowiek-zwierzęta. Najczęściej do określania poziomu stresu u zwierząt wykorzystuje się pomiar stężenia kortyzolu. Jego stężenie można określać we krwi (w surowicy), moczu oraz ślinie, natomiast metabolity znaleźć można w mleku, włosach oraz kale. Określanie stężenia kortyzolu we krwi wykonywane jest dość powszechnie, np. u zwierząt domowych do oceny czynności kory nadnerczy. Należy jednak pamiętać, że hormon ten jest wydzielany w rytmie okołodobowym i charakteryzuje się pikami w różnych momentach dnia. Dlatego wnioski oparte na jednokrotnym pomiarze mogą być obarczone dużym błędem (6). Ponadto, w kontekście badania poziomu stresu, metoda ta nie daje miarodajnych wyników, ponieważ sama procedura pobierania krwi może być dla zwierzęcia stresująca i spowodować uruchomienie kaskady reakcji prowadzących do wzrostu poziomu kortyzolu w surowicy. We włosach metabolity kortyzolu pojawiają się dopiero po około miesiącu, a okres ten jest różny dla różnych gatunków (rodzaj włosów) oraz zależy od pory roku. Bardzo trudno jest zatem określić, kiedy dokładnie doszło do ekspozycji na stresor. Dlatego zaczęto poszukiwać innych możliwości i metod, które można z lepszym skutkiem zastosować do badania poziomu stresu u zwierząt, szczególnie żyjących na wolności. Badanie śliny i moczu również wiąże się z bezpośrednim kontaktem ze zwierzęciem. Próbowano pobierać mocz z gleby w jak najkrótszym czasie od mikcji, jednak pobrane próbki charakteryzowały się niedostateczną ilością materiału do badań oraz dużą ilością zanieczyszczeń, co znacznie utrudniało ich analizowanie. W przypadku mleka możliwe jest wyłącznie badanie samic i to tylko tych będących w okresie laktacji (3). Dlatego badanie metabolitów kortyzolu w kale (fecal cortisol metabolite – FCM) zaczęło być coraz szerzej stosowane w szczególności u zwierząt dzikich i zamieszkujących ogrody zoologiczne. Jest to metoda całkowicie nieinwazyjna i nie wymagająca bezpośredniego kontaktu z badanym osobnikiem.

### Metabolizm hormonów steroidowych

Kortyzol we krwi związany jest ze swoistą globuliną – transkortyną i tylko ok. 5-10% pozostaje w formie niezwiązanej, która jest aktywna metabolicznie (7). Krążąca w organizmie wolna postać hormonu metabolizowana jest w wątrobie, skąd jako związek sprzężony trafia przez nerki do moczu lub wraz z żółcią do jelit. W jelitach związki sprzężone są intensywnie metabolizowane przez bakterie, jednak nie dochodzi do rozłożenia ich szkieletu stearynowego, dzięki czemu można je wykrywać. W badaniu przeprowadzonym na zajęcach amerykańskich (*Lepus americanus*) potwierdzono, że stężenie wolnego kortyzolu we krwi odpowiada stężeniu metabolitów kortyzolu w kale (8). Czas pomiędzy momentem wyrzutu hormonów przez korę nadnerczy do krwi a ich pojawieniem się w kale jest różny dla odmiennych gatunków. Jest to związane przede wszystkim z niejednorodnym nasileniem metabolizmu oraz czasu pasażu jelitowego. Różne gatunki zwierząt charakteryzują się również odmiennym sposobem oraz częstotliwością oddawania kału.

Dla przykładu, najwyższe stężenie metabolitów kortyzolu w kale u owiec stwierdzono po 12 godzinach od podania dożylnie ACTH, natomiast u koni dopiero po 24 godzinach (3). Stężenie kortyzolu w surowicy jest zmienne w ciągu dnia, dlatego ważne jest badanie próbek pobranych o tej samej porze i najlepiej kilka razy w ciągu doby. Niezwykle istotna jest znajomość behawioru i trybu życia badanego gatunku. Pozwala to dobrze zaplanować proces badawczy i sprawić, aby był łatwiejszy, a wyniki bardziej wiarygodne. Istotny jest też wpływ płci. Różnice między samcami i samicami dotyczą przede wszystkim poziomu bazowego kortyzolu we krwi, reaktywności układu podwzgórze-przysadka – nadnercza, budowy chemicznej metabolitu oraz jego ilości wydzielanej do jelit. Badania wskazywały jednak na wyższe stężenie u samic (pies, kot, gepard, królik), u samców (szczur, lew morski, kura) albo brak różnic (wilk, nosorożec czarny, nosorożec biały, gołąb; 1). Zwykle u samic stwierdzano raczej wyższe stężenia kortyzolu we krwi, co związane jest prawdopodobnie z mniejszą zdolnością wiązania hormonów steroidowych z globulinami (transkortyna). U samic, w związku ze zmianami stężenia estrogenów i progesteronu, dochodzi również do zmienności poziomu kortyzolu w cyklu płciowym. W przypadku samców, podczas badań prowadzonych na słońiach afrykańskich (*Loxodonta africana*) będących w okresie godowym (must), czyli okresie zwiększonego wydzielania testosteronu, nie odnotowano żadnych zmian stężenia kortyzolu. Może jednak dochodzić do reakcji krzyżowych z hormonami androgenowymi podczas analizowania próbek w laboratorium (9).

### Badanie metabolitów kortyzolu w kale

Podczas pobierania próbek kału ważna jest identyfikacja zwierzęcia i znajomość jak największej ilości szczegółów na jego temat (płci i wieku). W przypadku zwierząt żyjących w ogrodach zoologicznych obserwowanie ich podczas pobytu na wybiegu oraz rozdzielanie poszczególnych osobników w zagrodach czy boksach znacznie ułatwia przypisanie próbki do konkretnego zwierzęcia. Ponadto znana jest płeć, wiek i inne dane, jak np. przebyte choroby, ciąża, laktacja. W przypadku zwierząt dzikich identyfikacja jest znacznie trudniejsza, choć stosuje się różne rozwiązania tego problem. Podczas badania nasilenia stresu u dzikich słońi afrykańskich z parku Serengeti w Tanzanii (10) naukowcy, obserwując zwierzęta z odpowiedniej odległości, fotografowali je i dokładnie opisywali każde zwierzę (wielkość, płeć, rozstaw ciosów, znaczenia na małżowinach usznych). Dzięki temu, gdy któryś z osobników oddał kał, można go było dokładnie zidentyfikować. Za każdym razem odnotowywano godzinę defekacji. Gdy stado odchodziło na bezpieczną odległość, pobierano próbki i nadawano im numer odpowiadający numerowi zwierzęcia w stworzonej wcześniej bazie danych (ryc. 1, 2, 3). Dzięki znajomości poszczególnych zwierząt oraz składu grup udało się odnotować zależność między poziomem stresu a liczbą osobników w stadzie oraz rozmiarem zwierząt. Zależności te zostały potwierdzone w badaniu

prowadzonym przez inną grupę, na słońcach niemających kontaktu z badanymi w pierwszym doświadczeniu (11). Inny przykład badań na afrykańskim gatunku to określenie wpływu obecności ludzi na dziko żyjące lwy (*Panthera leo*) w Kenii (12). Obserwowano cztery stada oraz cztery koalicje samców. Co najmniej jednemu osobnikowi z każdej grupy założono w znieczuleniu obrozę telemetryczną, co pozwoliło na śledzenie zwierząt. Drapieżniki te wykazują największą aktywność po zmroku, między godziną 18.00 a 8.00 rano i bez możliwości określenia ich położenia przy użyciu telemetrii przeprowadzenie takiego badania nie byłoby możliwe. Jeszcze inną metodę musiały zastosować grupa naukowców badająca wpływ zagęszczenia turystów na kozice (*Rupicapra rupicapra tatraica*) w Tatrzańskim Parku Narodowym (13). Ich zadanie było znacznie bardziej skomplikowane niż w przypadku identyfikowania słoń, ponieważ poszczególne kozice nieznacznie się między sobą różnią. Dlatego skupiono się wyłącznie na określeniu płci i przybliżonego wieku podczas obserwacji zwierząt przez lornetkę. Gdy zauważono, że któreś ze zwierząt oddaje kał, nanoszono jego lokalizację na przygotowaną wcześniej mapę, co ułatwiało później odnalezienie kału i pobranie próbek.

Przy pobieraniu i przechowywaniu próbek wymagana jest szczególna staranność. Wykazano, że metabolity kortyzolu nie są równomiernie rozmieszczone w kale, dlatego zaleca się pobranie kilku jego fragmentów (co najmniej 0,5 g). Ważne jest, aby kał był dobrze uformowany, dlatego w przypadku zwierząt z biegunką, np. psów pracujących w policji, u których często występuje biegunka, nie udało się pobrać odpowiedniej ilości materiału i metoda ta okazała się mało przydatna do określenia stresu u tych zwierząt (14). W związku z tym, że czynniki środowiskowe, takie jak temperatura, wilgotność, promieniowanie słoneczne oraz enzymy bakteryjne, mogą wpływać na kał, materiał najlepiej jest pobrać możliwie jak najszybciej po defekacji i przechowywać schłodzony, a następnie zamrozić w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . W badaniu wpływu ww. czynników na zmiany stężenia metabolitów kortyzolu w kale tygrysów (*Panthera tigris*) odnotowano, że FCM zaczyna ulegać rozkładowi po ok. 48 h od defekacji (15). Dlatego w opublikowanych badaniach, próbki starano się pobierać maksymalnie 2 godziny po defekacji, jednak było to zależne od panujących danego dnia warunków atmosferycznych, w tym między innymi temperatury powietrza. W przypadku zbierania próbek w Tatrach w zimie, czas między oddaniem kału a zebraniem próbki mógł być wydłużony ze względu na niską temperaturę otoczenia i pokrywą śnieżną. Niezależnie jednak od warunków, pojemniki z kałem przechowywano schłodzone, np. w lodówce turystycznej z wkładem chłodzącym) do czasu zamrożenia ich w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . W tej temperaturze zebrany materiał może być przechowywany nawet do 6 miesięcy.

Opracowano dwie metody przygotowania zebranych próbek do dalszych analiz. Pierwsza z nich polega na pobraniu próbki świeżego rozmrożonego kału o masie 0,5 g i homogenizację jej w 80% metanolu przez 30 min. Po odwirowaniu supernatant należy odwirować z buforem w stosunku 1:10 (3)



Ryc. 1. Obserwacja stada słońi afrykańskich (*Loxodonta africana*) przy wodopoju. Obserwujący znajdują się w odległości, która nie wpływa na zachowanie się zwierząt



Ryc. 2. Dokładna obserwacja i znajomość danego gatunku pozwala na określenie ich płci i przybliżonego wieku. Na zdjęciu widoczne dwie dorosłe samice, starsza (po lewej) i młodsza (po prawej) oraz młode (w środku), którego płeć była trudna do określenia



Ryc. 3. Dorosły samiec w momencie oddawania kału oraz moczu. Miejsce defekacji zostaje opisane, a po odejściu stada pobierana jest próbka do badań

**Tabela 1.** Przykłady gatunków zwierząt, u których określano stężenie metabolitów kortyzolu w kale

Zwierzęta towarzyszące	pies domowy ( <i>Canis familiaris</i> ), kot domowy ( <i>Felis catus</i> )
Zwierzęta hodowlane	bydło domowe ( <i>Bos taurus</i> ), owca domowa ( <i>Ovis aries</i> ), koń domowy ( <i>Equus caballus</i> ), świnia domowa ( <i>Sus domestica</i> )
Gryzonie i zajęczaki	myszy i szczury laboratoryjne, koszatniczka pospolita ( <i>Octodon degus</i> ), wiewiórka szara ( <i>Sciurus carolinensis</i> ), zając amerykański ( <i>Lepus americanus</i> ), pęgowiec amerykański ( <i>Tamias striatus</i> )
Jeleniowate i wołowate	jeleń szlachetny ( <i>Cervus elaphus</i> ), jeleń kanadyjski ( <i>Cervus elaphus canadensis</i> ), sarna europejska ( <i>Capreolus capreolus</i> ), kozica tatrzańska ( <i>Rupicapra rupicapra tatraica</i> )
Naczelne	kapucynka białoczelna ( <i>Cebus albifrons</i> ), szympanś zwyczajny ( <i>Pan troglodytes</i> ), pawian niedźwiedzi ( <i>Papio ursinus</i> ), makak królewski ( <i>Macaca mulatta</i> )
Dzikie kotowate	gepard grzywiasty ( <i>Acinonyx jubatus</i> ), jaguar amerykański ( <i>Panthera onca</i> ), lew afrykański ( <i>Panthera leo</i> ), pantera mglista ( <i>Neofelis nebulosa</i> ), tygrys azjatycki ( <i>Panthera tigris</i> )
Dzikie psowate	likaon pstry ( <i>Lycaon pictus</i> ), krokuta cętkowana ( <i>Crocuta crocuta</i> )
Słoniowate	słoń afrykański ( <i>Locodonta africana</i> ), słoń indyjski ( <i>Elephas maximus</i> )
Nosorożcowate	nosorożec biały ( <i>Ceratotherium simum</i> ), nosorożec czarny ( <i>Diceros bicornis</i> )

Druga metoda opisuje ekstrakcję 0,2 g suszonego sproszkowanego kału gotowanego w 90 lub 100% etanolu. Z przeprowadzonych do tej pory badań można wywnioskować, że dla obu metod wyniki są porównywalne (16)

Otrzymane próbki poddaje się następnie badaniu metodą radioimmunologiczną (RIA) lub immunoenzymatyczną (ELISA). Badania porównawcze komercyjnych testów z użyciem kału od różnych gatunków dzikich zwierząt wykazały, że najlepsze efekty daje użycie przeciwciał wykrywających kortykosteron (16). Mogą one być używane nie tylko w badaniu metodą radioimmunologiczną, ale również w metodzie ELISA. Okazało się jednak, że wiele uzyskanych rezultatów to wyniki fałszywie dodatnie w związku z reakcjami krzyżowymi zachodzącymi pomiędzy podobnymi strukturalnie związkami znajdującymi się w kale. Druga możliwość analityczna to użycie testu ELISA ze specjalnie przygotowanym przeciwciałem dla metabolitów glikokortykosteroidów. Palme i Möstl (3) opisali grupę specyficznych testów dla metabolitów kortyzolu z użyciem 11-oksoetiocholanolonu jako immunogenu. Wyniki badań z użyciem tego przeciwciała były zadowalające w przypadku krów i koni oraz zwierząt dzikich, takich jak jelenie, zające czy słonie. Późniejsze publikacje potwierdziły trafność tej metody w wielu innych gatunków.

Istotna jest również metoda weryfikacji otrzymanych wyników (6). Jako najważniejszą uznaje się weryfikację fizjologiczną, która polega na farmakologicznej indukcji fizjologicznych zmian w stężeniu glikokortykosteroidów, w celu potwierdzenia ich wpływu na zmiany stężenia metabolitów w kale. Najczęściej wykorzystywaną metodą weryfikacji jest test stymulacji ACTH lub test hamowania niskimi dawkami deksametazonu. W idealnych warunkach próbki kału są

pobierane na krótko przed i w konkretnym czasie po podaniu ACTH lub deksametazonu, co powinno skutkować znacznym wzrostem stężenia kortyzolu w surowicy w teście stymulacji bądź spadkiem stężenia w teście hamowania. Opublikowano wiele badań na temat metabolitów kortyzolu w kale, ale tylko w około połowie przeprowadzono weryfikację wyników. W przypadku zwierząt dzikich nie ma możliwości przeprowadzenia takiej weryfikacji, dlatego zaleca się, by każde zwierzę (grupa zwierząt) było swoją własną próbą kontrolną.

Badanie wielu próbek przed i po stresującym wydarzeniu, takim jak immobilizacja, poskrabanie czy transport, może być przydatne do ustalenia związku wydarzenia ze wzrostem poziomu kortyzolu. Tego typu eksperymenty przeprowadzone dla wielu gatunków z różnych grup taksonomicznych wykazały, że zabiegi, takie jak znieczulenie, okiełznanie, ingerencja ludzi w środowisko naturalne, wyzwania socjalne, różne warunki utrzymania, wpływają na zmianę stężenia metabolitów w kale.

### Zmiany stężenia metabolitów kortyzolu u różnych gatunków zwierząt

Do tej pory przeprowadzono badania stężenia metabolitu kortyzolu u wielu gatunków zwierząt (tab. 1). U jaguarów (*Panthera onca*) w niewoli badano wpływ zabiegu elektroejakulacji na poziom stresu (17). Zanim przystąpiono do zabiegu, pobierano próbki kału przez 5 dni przed nim, tak, by ustalić bazowy poziom metabolitów w kale dla danego zwierzęcia. Przez kolejne 5 dni po zabiegu pobierano próbki i porównywano z otrzymanymi wcześniej wynikami. Okazało się, że w 80% przypadków stężenie FCM znacznie wzrosło w 1–2 dniu po znieczuleniu i elektroejakulacji. W innym eksperymencie (18) kilkanaście zebra (*Equus grevyi*) zostało przetransportowanych do innej części parku Narodowego Meru w Kenii. Stężenia FCM w kale było mierzone w czasie immobilizacji, podczas pobytu w zagrodzie (kwarantanna) oraz po wypuszczeniu na wolność. Jako próby kontrolnej użyto stężenia FCM u zebra, które nie zostały odłowione i przetransportowane. Podczas kwarantanny w zagrodzie w 3–4 oraz 5–6 tygodniu od złapania, stężenie FCM było wyższe niż w momencie translokacji czy u zwierząt z grupy kontrolnej. Sugeruje to, że przebywanie w zamknięciu jest bardzo stresujące dla tych zwierząt. Poziom FCM wrócił do normy dopiero po około 11–18 tygodniach od momentu wypuszczenia na wolność. Wskazuje to na sukces i przystosowanie się zwierząt do nowego środowiska. Podobne badania przeprowadzono na nosorożcach (19). Badano nosorożce czarne (*Ceratotherium simum*) i białe (*Diceros bicornis*), poddane stresowi, jakim był transport do nowych ogrodów zoologicznych. Próbki były pobierane w czasie immobilizacji przed transportem oraz przez 6 kolejnych tygodni od przyjazdu do nowego miejsca pobytu. W sumie pobrano 200 g kału od każdego zwierzęcia. Potwierdzono, że stężenie kortyzolu i jego metabolitów stopniowo spadało, jednak rozkład tego spadku w czasie był różny dla różnych osobników. Kolejny przykład to porównanie poziomu stresu u gepardów (*Acinonyx jubatus*) żyjących na wolności i przebywających w ogrodach

zoologicznych (20, 21). Wykazano, że zwierzęta w niewoli miały znacznie wyższy bazowy poziom FCM niż dzikie. Ponadto, poziom estradiolu i testosteronu był znacznie niższy. Wskazuje to na przewlekły stres u zwierząt w niewoli, który przekłada się na ich problemy z rozmnażaniem i większą podatność na choroby.

## Podsumowanie

Monitorowanie aktywności kory nadnerczy poprzez badanie metabolitów uwalnianych hormonów jest przydatne do określania poziomu stresu u zwierząt. Stosuje się wiele metod, jednak badanie stężenia metabolitów kortyzolu w kale wydaje się najlepsze i najbardziej wiarygodne, zwłaszcza w przypadku zwierząt dzikich. W związku z tym, że próbki pobierane są w sposób całkowicie nieinwazyjny, nie dochodzi do dodatkowego stresu. Ponadto, można otrzymać wiele próbek od jednego osobnika, a wyniki pozwalają ocenić poziom stresu u badanych zwierząt. W przypadku zwierząt żyjących w ogrodach zoologicznych daje to możliwość oceny i poprawy warunków ich życia w niewoli. U zwierząt żyjących na wolności możliwe jest badanie wpływu działalności ludzi i warunków środowiska oraz monitorowanie zdolności przystosowawczych zwierząt, zwłaszcza gatunków zagrożonych wyginięciem. Jak zauważa w swoim artykule T. Kaleta (22): „Różnorodne zmiany w środowisku naturalnym następują dziś bardzo szybko i zdolność do skutecznej adaptacji będzie z pewnością wyznacznikiem składu gatunkowego fauny świata już w bliskiej przyszłości”. Ważne jest zatem dokładne zaplanowanie badań, które umożliwią monitorowanie adaptacji zwierząt i pomocą zapobiec niszczeniu środowiska naturalnego przez człowieka.

## Piśmiennictwo

1. Selye H.: Stress and the General Adaptation Syndrome. *Br. Med. J.* 1950, **1** (4667), 1383–1391.
2. Herman J.P., Ostrander M.M., Mueller N.K., Figueiredo H.: Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2005, **29**, 1201–1213.
3. Möstl E., Palme R.: Hormones as indicators of stress, *Domest. Anim. Endocrinol.*, **23**, 2002, 67–74.
4. White B.A., Porterfield S.P.: *Endocrine and Reproductive Physiology*. Mosby, 2012.
5. Moberg G., Mensch J.: *The Biology of Animal Stress. Basic Principles and Implications to Animal Welfare*. CAB International, Wallingford 2000.
6. Touma C., Palme R.: Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2005, **1046**, 57–74.
7. Rosner W.: The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances, *Endocr. Rev.*, 1990, **11**, 80–91.
8. Sheriff M. J., Krebs C.J., Boonstra R.: Assessing stress in animal populations: Do fecal and plasma glucocorticoids tell the same story?, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2010, **166**, 614–619.
9. Ganswindt A., Palme R., Heistermann M., Borrigan S., Hodges J.K.: Non-invasive assessment of adrenocortical function in the male African elephant (*Loxodonta africana*) and its relation to musth, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2003, **134**, 156–166.
10. Tingvold H.G., Fyumagwa R., Bech C., Baardsen L.F., Rosenlund H., Roskaft E.: Determining adrenocortical activity as a measure of stress in African elephants (*Loxodonta africana*) in relation to human activities in Serengeti ecosystem. *Afr. J. Ecol.*, 2013, **51**, 1–10.
11. Foley C.A.H., Papageorge S., Wasser S.K.: Noninvasive Stress and Reproductive Measures of Social and Ecological Pressures in Free-Ranging African Elephants, *Conserv. Biol.*, 2001, **15**, 1134–1142.

12. Creel S., Christianson D., Schuette P.: Glucocorticoid stress responses of lions in relationship to group composition, human land use and proximity to people, *Conserv. Physiol.*, 2013, **1**, doi:10.1093/conphys/cot021.
13. Zawijacz-Kozica T., Selva N., Barja I., Jodłowski M.: Concentration of fecal cortisol metabolites in chamois in relation to tourist pressure in Tatra National Park (South Poland), *Acta Theriologica*, 2013, **58**, 227–235.
14. Pyrczek T., Stefaniak T.: Wykorzystanie oznaczania kortyzolu i jego pochodnych w ocenie stresu u psów służbowych, *Życie Wet.*, 2013, **88**, 136–142.
15. Parnell T., Narayan E.J., Nicolson V., Martin-Vegue P., Mucci A., Hero J.-M.: Maximizing the reliability of non-invasive endocrine sampling in tiger (*Panthera tigris*): environmental decay and intra-sample variation in fecal glucocorticoid metabolites, *Conserv. Physiol.*, 2015, **3**, doi:10.1093/conphys/cov053.
16. S.K., Hunt K.E., Brown J.L., Cooper K., Crockett C.M., Bechert U., Millspaugh J.J., Larson S., Monfort S.L.: A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2000, **120**, 260–275.
17. Morato R.G., Bueno M.G., Malmheister P., Verreschi I.T.N., Barnabe R.C.: Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2004, **37**, 1903–1907.
18. Franceschini M.D., Rubenstein D.I., Low B., Romero L.M.: Fecal glucocorticoid metabolite analysis as an indicator of stress during translocation and acclimatization in an endangered large mammal, the Grevy's zebra, *Anim. Conserv.*, **11**(4), doi: dx.doi.org/10.1111/j.1469-1795.2008.00175.x.
19. Turner J.W., Tolson P., Hamad N.: Remote assessment of stress in white rhinoceros (*ceratotherium simum*) and black rhinoceros (*diceror bicornis*) by measurement of adrenal steroids in feces, *J. Zoo Wildl Med.*, 2002, **33**, 214–221.
20. Terio K.A., Citinio S.B., Brown J.I.: Fecal cortisol metabolite analysis for non invasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*), *J. Zoo Wildl Med.*, 1999, **30**, 434–491.
21. Terio K.A., Marker L., Munson L.: Evidence for chronic stress in captive but not free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on adrenal morphology and function, *J. Wildl Dis.*, 2004, **40**, 259–266.
22. Kaleta T.: Stres i zachowanie się zwierząt dzikich – badania i interpretacje, *Życie Wet.*, 2009, **84**, 21–26.

Lek. wet. Katarzyna Kołodziejczyk,  
e-mail: kasiakolo.vet@gmail.com