

Cortisol and its derivatives for evaluation of stress in police dogs

Pyrczek T.¹, Stefaniak T.², Specialist Training Centre of the Border Guard in Luban¹, Department of Immunology, Pathophysiology and Veterinary Prevention, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences²

This article aims at the presentation of methods for stress evaluation in police dogs. Based on literature and self observations the consequences of long term stress that affects working dogs and dogs during long term training were presented. The methods of stress using behavioral examination and evaluation of selected hormonal, hematological and biochemical parameters were described. Measuring the level of cortisol, the principal glucocorticoid of anti-inflammatory actions, seems to be valuable for estimation of working dogs condition under the stress.

Keywords: cortisol, stress, police dogs.

Szacowanie stresu u zwierząt stanowi przedmiot badań, w których wykorzystywane są różne parametry (kliniczne, etologiczne, hormonalne, biochemiczne, immunologiczne; 1). Objawy kliniczne, wskazujące na możliwość pozostawania w długotrwałym stresie, są niekiedy obserwowane podczas szkolenia psów służbowych. Przypadki zachorowań psów wykazujących objawy długotrwałego stresu skłoniły nas do podjęcia badań nad oceną, jak poważnym zjawiskiem jest stres u psów podczas szkolenia.

W ostatnich latach duże zainteresowanie znajduje oznaczanie kortyzolu i jego pochodnych ze względu na wysoką zależność między stężeniem omawianych hormonów a poziomem stresu. Od szeregu lat poszukuje się nieinwazyjnych metod oznaczania tych hormonów w takich materiałach biologicznych, jak ślina, kał, mocz lub włosy (2, 3, 4). W wielu przypadkach, np. zwierząt stadnych utrzymywanych wolnostanowiskowo (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12),

Wykorzystanie oznaczania kortyzolu i jego pochodnych w ocenie stresu u psów służbowych

Tomaz Pyrczek¹, Tadeusz Stefaniak²

z Ośrodka Szkoleń Specjalistycznych Straży Granicznej w Lubaniu¹ oraz Katedry Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu²

a szczególnie w przypadku zwierząt dzikich, w ogrodach zoologicznych, materiały biologiczne niewymagające immobilizacji zwierzęcia (która jest konieczna przy pobieraniu krwi), stają się atrakcyjnym materiałem badawczym w ocenie stresu.

Mechanizm powstawania reakcji stresowej

W warunkach naturalnych stres u zwierząt zostaje zainicjowany potrzebą przetrwania, np. strach potencjalnych ofiar przed drapieżnikami. Aby organizm przeżył, musi szybko zareagować stosownie do sytuacji. Model stresu u zwierząt zaproponowany przez Moberg i Mench (13) wskazuje na trzy podstawowe elementy reakcji stresowej: rozpoznanie stresora przez organizm, obronę przed stresem i konsekwencje działania czynnika stresującego. Niezależnie od sposobu zakończenia reakcji organizmu na stres następuje: zmiana zachowania oraz aktywacja i odpowiedź ze strony układów nerwowego, endokrynnego i immunologicznego.

Zmiana zachowania pod wpływem stresu jest różna i nieadekwatna do „siły stresu”. Nie można postawić znaku równości pomiędzy różnymi objawami zachowania u zwierząt w sytuacji stresowej a rodzajem stresora (zachowania indukowane przez stres są różne).

W przypadku reakcji alarmowej, wywołanej działającym stresem, miejscem tworzenia odpowiedzi organizmu jest kora mózgowa, układ limbiczny oraz

podwzgórze. W wyniku pracy tych ośrodków zostają zaktywowane trzy osie hormonalne:

- 1) podwzgórzowo – przysadkowo – korononadnerczowa,
- 2) podwzgórzowo – przysadkowo – rdzeniowonadnerczowa,
- 3) podwzgórzowo – przysadkowo – tarczycowa.

Kortyzol, kortykosteron, somatotropina, prolaktyna, hormony tarczycy, adrenalina oraz noradrenalina są hormonami uczestniczącymi w regulacji reakcji organizmu na stres (tab. 1). W przebiegu reakcji stresowej następuje wyrzut katecholamin z rdzenia nadnerczy oraz glikokortykosteroidów z kory nadnerczy. Katecholaminy sprzyjają uwalnianiu tłuszczów i cukrów, poprzez aktywację lipo- oraz glikogenolizy, do mięśni dostarczana jest energia niezbędna do walki lub ucieczki. Glikokortykosteroidy mają zdolność do wydłużania czasu działania adrenaliny, co zapewnia utrzymanie wysokiego tempa metabolizmu. Ponadto ułatwiają one w sposób trwały przystosować organizm do nowych i/lub zmieniających się warunków. Hormony tarczycy zwiększają metabolizm energetyczny na poziomie mitochondriów, co pozwala na dostarczenie energii dla mięśni.

W reakcji stresowej rozróżnia się trzy fazy: stadium alarmowe – reakcja walki lub ucieczki, stadium adaptacji oraz stadium wyczerpania (załamania). Stadium wyczerpania pojawia się zwykle, gdy kończą się zasoby energetyczne, sam organizm

Tabela 1. Neuroendokrynną oś podwzgórzowo-przysadkowa i efekty jej pobudzenia (13)

Podwzgórze	CRH	GHRH	SS	TRH	PRH	GnRH
Przysadka	ACTH	GH	GH/TSH	TSH	PRL	LH/FSH
Narząd docelowy efekt końcowy	kora nadnerczy, glikokortykosteroidy, wydzielanie	wątroba, sekrecja, IGF-1	hamowanie metabolizmu	tarczyca, T3, T4	pobudzenie gruczołu sutkowego i laktogeneza	gonady, steroidy płciowe, komórki płciowe
Działanie	homeostaza, mobilizacja zapasów energetycznych	pobudzenie metabolizmu		pobudzenie metabolizmu, termogeneza	laktacja	rozdród

Objaśnienie skrótów: CRH – kortykotropina, GHRH – hormon uwalniający hormon wzrostu, SS – somatostatyna, TRH – hormon uwalniający hormon tyreotropowy, PRH – hormon uwalniający prolaktynę, GnRH – hormon gonadotropowy, ACTH – hormon adrenokortykotropowy, GH – somatotropina, TSH – hormon tyreotropowy, PRL – prolaktyna, LH – hormon luteotropowy, FSH – hormon folikulotropowy

jest wyniszczony, co dotyczy głównie stresu przewlekłego (distres).

Stres ostry

Ostry stres (eustres) działa głównie pozytywnie na organizm (pobudza do działania, wywołuje skutki pozytywne). Istnieją jednak również dowody na charakter wyniszczający eustresu; działanie to biegnie dwutorowo:

- 1) zaburza ważne czynności biologiczne organizmu,
- 2) zmienia metabolizm na obronę organizmu przed stresem kosztem innych, mniej ważnych do przetrwania czynności organizmu.

Wykazano, że ostry stres może wywołać zaburzenia płodności u samic, a u młodych, rosnących myszy wywołuje zahamowanie wzrostu i wyczerpanie zapasów energetycznych (13). Pomimo takich dowodów na działanie ostrego stresu, Moberg i Mench (13) zwracają uwagę, że do momentu dopóki eustres nie przechodzi w distres, nie ma problemu klinicznego. Najgorszą sytuacją jest moment, gdy na ostry stres nałoży się dodatkowy czynnik stresowy (powstaje tzw. efekt sumowania stresu) lub gdy przejdzie on w stres przewlekły (distres).

Stres przewlekły

Stres przewlekły wynika z długiego działania czynnika stresowego. Nadal nie wyjaśniono do końca, jakim mechanizmem podlega długotrwała reakcja stresowa.

Stres przewlekły jest często trudny do zdiagnozowania metodami klinicznymi, niełatwo jest wskazać zwierzęta poddane przewlekłemu stresowi. Stosowanie oddzielnie testów behawioralnych, mierzenie poziomu kortyzolu czy adrenaliny w surowicy krwi nie udziela jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy u danego osobnika występuje przewlekły stres. Moberg i Mench (13) proponują, by do prawidłowej oceny stresu połączyć ocenę

behawioralną oraz ocenę układów immunologicznego, endokrynnego i nerwowego. Panuje zgoda co do faktu, że stres przewlekły musi długo trwać w czasie, muszą oddziaływać w regularnych odstępach czasu stresory, które wywołają tę postać stresu (13). Wiadomo, że długo trwający stres potrafi zmniejszać odpowiedź organizmu (zanikanie objawów behawioralnych, zwiększenie lub normalizacja poziomu kortyzolu we krwi). Jeśli zadziała nowy czynnik stresowy, poziom kortyzolu potrafi rosnąć, powodując wahania jego poziomu we krwi.

Należy także uznać, że każde zwierzę może odmiennie reagować na stres i wymaga indywidualnego podejścia w ocenie stresu. Moberg i Mench (13) proponują, aby nie używać terminu „stres przewlekły” tylko „przewlekły stres przerywany”. Wykazano, że w zależności od gatunku różne czynniki stresotwórcze wywołują różne reakcje stresowe, są one uzależnione od czasu ich trwania oraz nasilenia działania na organizm. U psów wykazano, że można mieszać ze sobą różne interakcje socjalne (strach, głód, chłód, frustracja), aby wywołać przewlekły stres przerywany (14,15, 16). Moberg i Mench (13) wskazują, że najważniejszym czynnikiem wywołania przewlekłego stresu przerywanego jest czas działania stresora, a niekoniecznie jego siła. Ponadto proponują oni zmniejszenie nacisku na tradycyjne podejście do stresu z uwzględnieniem osi podwzgórze – przysadka – kora nadnerczy i zwrócenie uwagi na układ immunologiczny, endogenne opiaty, neurotransmitery, serotoninę i dopaminę. Założenie jest takie, że jeden układ biologiczny może być pobudzany przez stresory, inny hamowany lub występuje wręcz modulacja interakcji pomiędzy różnymi układami (immunologicznym, nerwowym, endokrynnym).

Przewlekły stres przerywany wywołuje w pierwszej kolejności pobudzenie, a następnie uspokojenie zwierząt (oswojenie się ze stresem). Nie ma to jednak znaczenia, gdy chodzi o rodzaj stresora (reakcja

na stres zaczyna działać od początku). Odczulanie na stres ma znaczenie zarówno w terapii behawioralnej, jak i weterynaryjnej (pozwala przetrwać zagrożenia). Odczulanie może polegać na „zaturzeniu zwierzęcia w stresorze” (terapia gwałtowna) lub powolnym poddawaniu działania stresora, stopniowemu zwiększaniu jego natężenia i czasu trwania (7, 13, 17, 18). Mówiąc inaczej, stopniowe narażanie na stres wywołuje odczulanie zwierząt na jego skutki.

Objawy i skutki stresu u psów

Przewlekły stres przerywany może prowadzić do poważnych zaburzeń funkcji organizmu. Najczęstsze objawy towarzyszące długotrwałemu stresowi u psów przedstawiono w tabeli 2. Niektóre objawy z tego bogatego zestawu mogą występować także w pewnych interakcjach socjalnych, ponieważ należą one również do stresorów.

Moberg i Mench (13) zwracają uwagę, że interpretacja zachowania zwierząt podczas sytuacji stresowej wymaga znacznej ostrożności, ponieważ:

- 1) odpowiedź behawioralna zwierząt na stres jest złożona, stąd nie powinno się jednoznacznie wykorzystywać zaburzeń zachowania jako wskaźnika poziomu stresu,
- 2) odpowiedź na stres (w szczególności na distres) ma swoje podłoże w lękach, unikaniu drapieżników,
- 3) odpowiedź na stres zależy od jego rodzaju; pomimo tego ogólna odpowiedź na sytuację stresującą zawsze jest podobna, oparta o ogólnie znane mechanizmy.

Podstawowe badanie hematologiczne wykazuje typowe zmiany w postaci leukogramu stresowego (neutrofilia, limfopenia, eozynopenia) oraz podwyższenia aktywności fosfatazy zasadowej (spotykana przy długotrwałym stresie np. z powodu bolesności towarzyszącej procesowi nowotworowemu).

Tabela 2. Typowe objawy stresu u psów (13, zmienione)

Rodzaj objawów	Przykłady
Zachowanie nieprawidłowe/stereotypie	zaburzenia snu, zaburzenie funkcji poznawczych, brak skupienia i uwagi, brak postępu w nauce, nadmierna aktywność motoryczna, nadwrażliwość na ból, stale rosnąca agresja, ssanie fałdów skóry, nadgarstków, sutków (głównie suki), lizanie boków ciała, zachowania obsesyjne – nadmierna pobudliwość, szczekanie, kopanie bez celu, niewłaściwe wykonywanie ćwiczeń – nadmierne wykonanie ćwiczenia w sposób sprzeczny z komendą (np. pies zamiast siadać, gwałtownie równa na nogi), dwuznaczne zachowania – pies jest niepewny, zachowania wskazują na znajdowanie się psa na granicy ucieczki lub ataku, gwałtowne oddawanie moczu „pod siebie” wskutek stresu lub zaraz po wystąpieniu czynnika stresowego, ostrzegawcze oszczekiwanie, kopofagia
Somatyczne	owrzodzenia błony śluzowej żołądka i jelit, spadek odporności, poliuria i polidypsja, zaniki mięśni oraz skóry, utrata włosów, brak apetytu, szybkie, płytkie zianie, napięcie mięśni – zeszywnienie ciała, wymioty i biegunka (u psów pracujących dominującym objawem jest biegunka), pocenie się na opuszkach, wzmożone ziewanie, ślinienie się, drżenie całego ciała, oblizywanie warg
Zmiany w zachowaniach socjalnych	depresje, unikanie kontaktu z innymi psami, postawa z obniżonym tułowiem (zgięte łokcie, nisko trzymany tułów, podwiniecie ogona, opuszczona głowa i małżowiny uszne)

Dlaczego oznacza się hormony steroidowe?

U psów hormony steroidowe oznaczane są głównie w celach diagnostycznych chorób endokrynologicznych, dermatologicznych, wyjaśniania tła zjawiska poliurii i/lub poli-dypsji. Rzadko można jednak spotkać badania poświęcone ocenie stresu u zwierząt na podstawie pomiarów stężenia kortyzolu w różnym materiale biologicznym. Wartości referencyjne kortyzolu we krwi wynoszą dla psów 10–60 ng/l (27–165 nmol/l; 19).

Część badaczy (2, 3, 4) postanowiła poszukać nieinwazyjnych sposobów badania poziomu stresu, oznaczając kortyzol lub jego metabolity w kale, ślinie i we włosach. Powodem tych badań było określanie doborstanu zwierząt, badanie reakcji behawioralnych w stadach, porównywanie wyników u psów narażonych na stres, głównie zwierząt pracujących, z psami domowymi (towarzyszącymi).

Liczne doświadczenia wykazały, że kortyzol jest dobrym miernikiem poziomu stresu u psów (14,15, 20, 21, 22, 23). U mięsożernych wykazano wpływ warunków utrzymania, zabiegów chirurgicznych, znieczuleń oraz ograniczenia swobody ruchu na stężenie kortyzolu we krwi (3, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

Zwrócono uwagę na fakt, że pobieranie krwi jest w pewnych warunkach mało praktyczne, a w przypadku zwierząt dzikich lub utrzymywanych w ogrodach zoologicznych wręcz niemożliwe. Łapanie zwierząt dzikich oraz usypianie ich samo w sobie wywoływało reakcję stresową, poza tym w grę wchodzi ryzyko zejścia śmiertelnego zwierzęcia przy usypianiu (niewłaściwe oszacowanie dawki leków usypiających, komplikacje związane z unieruchomieniem itp.).

Próbowano poszukać kompromisu w oznaczaniu kortyzolu i skoncentrowano się na badaniu zawartości pochodnych kortyzolu w moczu oraz kale. Uznano, że takie sposoby pozyskiwania materiału są najmniej inwazyjne dla zwierząt (15, 21, 24, 33, 34, 35). Okazało się jednak, że badanie

moczu może niekiedy być niemożliwe, ponieważ pozyskanie potrzebnej do standaryzacji próbki moczu oddanego w warunkach naturalnych lub w ogrodzie zoologicznym jest trudne. Innym materiałem biologicznym pozwalającym na oznaczenie kortyzolu jest ślina, chociaż jej pozyskanie także może sprawiać problemy (21).

Badania własne wskazują, że metoda oznaczania kortyzolu we krwi, w porównaniu do badania w ślinie, lub pochodnych kortyzolu w kale jest metodą obecnie najlepszą do oceny stresu u psów pracujących. Wadą metody są stresogenne okoliczności pozyskiwania krwi (wprowadzanie psów do gabinetu zabiegowego, wkłucie igły do żyły, obecność osób postronnych). Podczas pobierania krwi część psów wykazywała objawy ostrego stresu – obliźwanie warg, wzmożone przełykanie, drżenie ciała, ugięcie kończy, a w pojedynczych przypadkach nawet niepewność w zachowaniu się kończąca się paniką lub agresją.

Trudności może także sprawiać pobieranie śliny do badania. Psy badane źle tolerowały pobieranie śliny przez obcą osobę, co objawiało się niechęcią do żucia gąbki i cofaniem się. Odnotowano pojedyncze przypadki agresji. Pewnym problemem może być ograniczona dostępność profesjonalnych gąbek do pobierania śliny. Problem kolejny stanowi masa ciała psa – od psów małych (foksteriery) najczęściej nie udawało się uzyskać śliny za pomocą gąbki, od owczarków niemieckich uzyskanie śliny było możliwe, ale nie zawsze się psy śliniły. Większe objętości śliny uzyskiwano w godzinach porannych, przed karmieniem, niż po szkoleniu psów, co było wynikiem wzmożonego ziania podczas pracy psów. Następnym problemem była technika odzyskiwania śliny z gąbki. Zauważono, że samo wyciskanie gąbki nie dawało określonej objętości śliny, konieczne było połączenie wyciskania z wykręcaniem lub wirowaniem gąbki. Ze względów bezpieczeństwa pobierającego gąbki były umieszczane w jamie ustnej psów przy użyciu kleszczyków

hemostatycznych, co również wywoływało dyskomfort u badanych zwierząt. Ponadto budzi się podejrzenie, że aktualne stężenie kortyzolu w ślinie może w dużym stopniu zależeć od efektu jej rozcieńczenia przy zadziałaniu czynników stymulujących lub hamujących wydzielanie śliny. W celu zwiększenia prawdopodobieństwa pobrania odpowiedniej ilości śliny należałoby ją pobierać podczas karmienia zwierząt, co jednak mogłoby działać stresogennie ze względu na przerywanie pobrania karmy przez zwierzęta.

W badaniach własnych oznaczano także stężenie metabolitu kortyzolu – 11,17-dioaksoandrostanu (DOA) w kale. Zakładano, że pozyskiwany będzie tylko kał prawidłowo uformowany, w ilości 0,5 g. Praktyka pokazała, że psy pracujące dość często mają biegunkę, co ograniczyło możliwości pobierania kolejnych próbek do badań. W efekcie nie zawsze istniała możliwość uzyskania próbek kału do badań w zaplanowanym terminie. Poza tym, jeśli wydalanie rozrzedzonego kału (biegunka) było wypadkową stresu u psów pracujących, należałoby rozważyć możliwość pobierania kału biegunkowego do badań (jeśli poziom stresu rośnie, to z założenia poziom DOA również powinien wzrosnąć). Problemem może być jednak znacznie ograniczona szansa na pozyskanie próbki wodnistej kału.

Również pobieranie moczu jest kłopotliwym zabiegiem. Część zwierząt toleruje pobieranie moczu, inne nie. Pobieranie moczu od dzikich zwierząt jest praktycznie niemożliwe. W tabeli 3 przedstawiono zalety i wady różnych materiałów w ocenie stężenia kortyzolu i jego pochodnych.

Hennessy i wsp. (36) dokonali szeregu badań nad interakcjami człowiek–pies w warunkach schroniska. Stwierdzili oni, że w przebiegu stresu stężenie kortyzolu u psów rośnie około dwukrotnie. Na poziomie kortyzolu miał wpływ kontakt z człowiekiem. Przy wsparciu psów podczas szkolenia przez ludzi (przewodnik) nie notowano tak gwałtownych skoków poziomu

Tabela 3. Zalety i wady różnych materiałów biologicznych do oznaczania stężenia kortyzolu i jego metabolitów u psów służbowych

Materiał pobierany	Zalety	Wady
Krew	najczęściej zalecana metoda, można oznaczyć kortyzol w warunkach krajowych	wymaga wkłucia dożylnego i obecności osób postronnych, psy wykazują objawy stresu
Kał	brak wkłucia, nie ma osób postronnych, jest to metoda naturalnego pozyskania materiału do badania, nie wywołuje bólu	brak na rynku ogólnodostępnych testów komercyjnych do oznaczania DOA, trudno jest określić korelację wyniku kortyzolu do DOA
Ślina	brak wkłucia dożylnego	zwierzęta mogą wydzielać niewystarczającą objętość śliny, wykazywać objawy stresu w obecności osób trzecich, problem z pobraniem mają sami właściciele (kwestia instruktarzu), należy zachować zasady bezpieczeństwa (ryzyko pokąsania), ograniczona dostępność testów komercyjnych do oznaczania metabolitów kortyzolu w ślinie
Mocz	pobieranie podczas mikcji	nie wszystkie zwierzęta tolerują ten zabieg, problem z pobraniem mają sami właściciele (kwestia instruktarzu), nie do wykonania u dzikich zwierząt (problemy z pobieraniem próbek, ryzyko ataku)

kortyzolu, jak w sytuacji, gdy brakowało wsparcia ze strony człowieka.

Haverbeke i wsp. (23) do swoich badań wykorzystali psy szkolone dla jednostek wojskowych. Najwyższy wzrost kortyzolu w surowicy krwi odnotowano w środku doświadczenia, gdy psy były najmocniej obciążane i trwałe ćwiczenia. Średni poziom kortyzolu na początku eksperymentu wynosił 35 nmol/l (z odchyleniem standardowym 45 nmol/l). Po pierwszym zestawie ćwiczeń poziom kortyzolu wzrósł o 100% i wynosił 65 nmol/l (z odchyleniem standardowym 75 nmol/l). Przy powtórzeniu tych samych ćwiczeń po 3 tygodniach (drugi zestaw ćwiczeń) poziom kortyzolu był podwyższony w porównaniu do samego początku badania, ale był nieznacznie niższy od wyników oznaczania kortyzolu po pierwszym zestawie ćwiczeń – odpowiednio 55 nmol/l (z odchyleniem standardowym 65 nmol/l), co wskazuje na zjawisko habituacji przy powtarzającej się ekspozycji na stresory (17).

W badaniach Haverbeke i wsp. (23) psy podlegały stymulacji za pomocą bodźców wizualnych (zdalnie sterowane autko-zabawka), jak i dźwiękowych (wystrzały). Autko było kierowane przez ukrytego operatora. Psu prezentowano autko przez 30 sekund; zabawka kręciła się w kółko przed wejściem do wybiegu. Wystrzały trwały 3 sekundy, oddawano je w odległości 1 metra od psa. Natężenie huku wystrzału podczas badania wynosiło 110–120 dB. Psy podczas badania przebywały w kojcach. Psy wykazywały wzmożoną aktywność ruchową na początku i końcu doświadczenia, a w środkowej fazie szkolenia było ono najniższe. Psy były bardziej aktywne podczas symulacji słuchowej i wzrokowej niż podczas zwykłego stanu kontrolnego (brak stymulacji wzrokowej i akustycznej).

Wykorzystanie autka-zabawki jako bodźca wzrokowego było stosowane jeszcze wcześniej przez innych badaczy (37). Podobne doświadczenia, ale na modelu tworzenia niekorzystnych i korzystnych warunków środowiskowych dla badanych psów przeprowadzili Beerda i wsp. (14, 15).

Psy młode były bardziej aktywne i zdyszane niż psy stare. Psyzymane w domach były mniej aktywne oraz o połowę rzadziej przyjmowały niską postawę ciała. Psy młode pracujące były bardziej aktywne, ziały i przemieszczały się częściej niż psy stare. Nie znaleziono istotnych różnic pomiędzy psami utrzymywanymi w domu i w jednostce. Psy utrzymywane w domach radziły sobie nieco gorzej z ćwiczeniami niż psy przebywające w kojcach. Prawdopodobnie psy mieszkające na miejscu jednostki szkoleniowej były bardziej zapoznane z terenem ćwiczeń niż psy domowe (23). Według tych autorów niski poziom kortyzolu na początku i końcu szkolenia

świadczą o szybkiej i dobrej adaptacji psów do środowiska ćwiczeń. W badaniu tej samej grupy wystrzały okazały się najsilniejszymi stresorami, wywoływały niskie ugięcie kończyn i drżenie ciała. Zauważono jednak, że powtarzanie tych samych czynności szkoleniowych z psami przestawało indukować wzrost stężenia kortyzolu (ulegał on stabilizacji).

Inni autorzy (16) wskazali na fakt, że silny stres wywołują również inne metody stresowania psa (np. trzaskanie drzwiami), co nasilało kręcenie się psów w koło. Lefebvre i wsp. (38) zwrócili uwagę, że przyczyną występowania stresu u psów pracujących jest przebywanie w ubogim otoczeniu, z czym nie zgadzają się inni badacze. Uznano, że ziewanie jest wynikiem średniego stresu oraz konfliktu w grupie psów. Panuje zgoda co do faktu, że pojawienie się stereotypii jest objawem cierpienia psa i powinno być silnym ostrzeżeniem dla właścicieli, że dzieje się źle.

Według Haverbeke i wsp. (23) stereotypie są wynikiem ubożego otoczenia psa i trwają tak długo, aż otoczenie stanie się interesujące dla psa lub psu zmienia się całkowicie środowisko, w którym przebywa (przeniesienie psa w inne miejsce). Stereotypie mogą ujawniać się także wskutek przewlekłego stresu związanego z przeszłością psa (39). U psów pracujących nie wykazano wzrostu wokalizacji, zadyszki, lizania lub ssania łap, drżenia (wykazano, że lizanie warg lub bezcelowe lizanie, jest przejawem stresu, trwogi u psów). Psy służbowe również nie ziały po szkoleniu.

U psów na poziom glikokortykosteroidów wpływ ma płęć. Wykazano, że wyższy poziom kortyzolu w surowicy u suk ma związek z poziomem estrogenów i estradiolu w surowicy krwi (40). U samców poziom kortyzolu jest stabilny. Do wzrostu stężenia kortyzolu zwykle dochodzi, gdy młody pies staje się dominantem (u osobników alfa poziom tego hormonu jest zwykle podwyższony). Podobnie wzrasta stężenie kortyzolu u psów zdominowanych, zajmujących najniższą pozycję w hierarchii. Psy dorosłe lub stare, niezależnie od płci, które utraciły pozycję osobnika alfa nie wykazują wysokiego poziomu kortyzolu. Co więcej, psy dorosłe i stare scalają całą grupę, pozwalają na przenikanie innych osobników z innych grup do swojego stada. Nie dopuszczają do tego młode, dorosłe samce i samice, które uzyskały status osobników alfa. W badaniach de Villiers i wsp. (22) na likaonach, nowo wybrane osobniki alfa nie pozwalały na mieszanie grup, izolowały wręcz własne stada.

Niższy poziom kortyzolu u osobników dojrziałych w stadach małych niektórych badaczy wiązało z wiekiem, który gwarantuje większe doświadczenie niż u osobników młodych (41, 42).

De Villiers i wsp. (22) uważają, że w przypadku likaonów młody wiek oraz brak doświadczenia życiowego, w tym etap uczenia się pożądanych umiejętności przez młode osobniki, mają wpływ na poziom kortyzolu i zachowywaną pozycję w stadzie. Nie stwierdzili jednoznacznie powiązań pomiędzy pozycją w stadzie, stężeniem kortyzolu a poziomem stresu. Wyniki tej grupy badawczej wskazują, że istniały wyraźne różnice w poziomie kortyzolu pomiędzy osobnikami dorosłymi a dorastającymi, w sytuacji gdy te ostatnie stały się dominantami. Wykazali oni odwrotną korelację wieku do poziomu kortyzolu – młode osobniki dominujące miały wyższy poziom kortyzolu niż dorosłe zdominowane. W porównaniu do badań wcześniejszych (43) stwierdzono u likaonów niższy poziom kortyzolu, pomimo zachowania takiego samego protokołu badania. Autorzy ci zwrócili również uwagę, że na poziom kortyzolu może mieć wpływ walka o jedzenie i ciągłe ryzyko pokąsania przez innych członków stada.

Glikokortykoterapia lub stres ma wpływ na poziom DOA w kale. Skoki poziomu DOA w kale wykazano po podaniu deksametazonu. Schatz i Palme (44) zauważyli również dodatkowe krótkie skoki poziomu DOA. Podobne zjawisko zauważyli u psów inni uczeni (28, 29). Zwrócili uwagę na fakt, że sytuacja ta mogła być wywołana okolicznościami stresującymi (piki kortyzolu pojawiły się na drugi dzień po podaniu deksametazonu i były wywołane iniekcją).

Podsumowując, na pulę kortyzolu oraz jego pochodnych mają wpływ: wiek, płęć, pozycja w stadzie, konflikty w grupie psów, podawanie leków steroidowych. Do czynników stresogennych u psów należą: walka o dominację w stadzie, walka o pokarm, wprowadzenie obcego psa na terytorium innego psa, silne urazy fizyczne (ból), ból nowotworowy, poddawanie psów silnym bodźcom dźwiękowym (głównie strzały z broni), brak socjalizacji zarówno z ludźmi, jak i psami, szkolenie zbyt intensywne, szkolenie psów w kierunku obronnym (obserwacje własne niepublikowane), konfrontacja pomiędzy sukami – samice utrzymywane w grupach szkoleniowych wykazują znaczną agresję wobec innych suk, czego nie obserwowano w grupach samców (obserwacje własne niepublikowane). Samice mają większą skłonność do zmian nastrojów, częściej atakują bez ostrzeżenia swoje konkurentki.

Schatz i Palme (44) stwierdzili, że stosunek wartości kortyzol/kortykosteron do 20 α -dihydroprogesteronu był zdecydowanie niższy u psów niż u kotów. W tym badaniu porównywano ponadto związane frakcje DOA, kortyzolu i kortykosteronu do frakcji wolnych. Frakcje steroidów związane z kwasem glukuronowym

lub siarkowym nie mogły być hydrolizowane przez enzymy, co miało wpływ na uzyskane wyniki.

Psy wykazywały umiarkowany wzrost koncentracji kortyzolu oraz DOA zarówno po podaniu ACTH, jak i deksametazonu. U psów – samców stężenie DOA w kale wzrastało z 10–15 nmol/kg przed podaniem ACTH do ok. 25 nmol/kg po podaniu. DOA u suk rosło z ok. 100 nmol/kg przed podaniem ACTH do ok. 400 nmol/kg po podaniu. Co ciekawe, akurat odwrotne tendencje co do płci występują u kotów (20, 44, 45).

Beerda i wsp. (21) oraz Carlstead i wsp. (24, 33) zwrócili uwagę, że pobieranie krwi w celu oznaczenia kortyzolu jest badaniem inwazyjnym i stresującym. W ślad za tym Cook i wsp. (2), Koren i wsp. (3), Davenport i wsp. (4) zaproponowali oznaczanie poziomu kortyzolu w ślinie i we włosach. Koren i wsp. (3) oznaczali poziom kortyzolu we włosach góralków przylądkowych, a Davenport i wsp. (4) u rezusów. Obydwa badania wskazały, że oznaczanie poziomu kortyzolu w włosach najlepiej wykazuje przewlekły stres i może służyć do oceny funkcjonowania nadnerczy.

Koren i wsp. (3), a także Yang i wsp. (47) wskazywali, że włosy mogą posłużyć ponadto do oceny zanieczyszczenia środowiska, wyszukiwania narkotyków, steroidów anabolicznych, określania stężenia hormonów płciowych oraz glikokortykosteroidów. Pozyskiwanie włosów jest proste do wykonania, można je łatwo przechowywać, nie ma wpływu na ocenę ich składu obecność wody lub innych zanieczyszczeń. Do oznaczania hormonów przydatne są włosy stare, zrzucone, które umożliwiają indywidualną ocenę hormonalną danego osobnika. Młode włosy zbyt krótko żyją, aby mogły odzwierciedlić faktyczny poziom hormonów (3).

Accorsi i wsp. (20) udowodnili pozytywną korelację poziomu kortyzolu mierzonego w kale i włosach, do funkcji osi podwzgórze – przysadka – nadnercza u psów i kotów. Podobne wnioski wysnuli Davenport i wsp. (4), którzy badali poziom stresu u rezusów i również znaleźli oni pozytywną korelację poziomu kortyzolu oznaczanego we włosach do kortyzolu obecnego w ślinie. Dotychczas nie wiadomo, w jakim stopniu oś podwzgórze – przysadka – nadnercza wpływa na metabolizm włosów. Stenn i Paus (48) udowodnili, że glikokortykosteroidy i androgeny wpływają na funkcje poszczególnych struktur skóry (brodawek, gruczołów łojowych, naskórka). Nie jest jednak znany wpływ lokalizacji włosów, zanieczyszczeń okrywy włosowej, pochodzenia i funkcji włosów na poziom hormonów steroidowych we włosach. Słominski i wsp. (49) udowodnili, że istnieje wyraźna zależność układu nerwowego

od funkcjonowania skóry i jej wytworów. Co więcej, frakcja natłuszczająca włosy jest źródłem hormonów (z wyjątkiem ACTH i kortyzolu). Botchkarev (50) oraz Słominski i wsp. (49) nazywają wręcz skórę lokalnym ekwiwalentem osi podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowej. U niemowląt Yamada i wsp. (51) wykazali, że dzieci hospitalizowane wykazują wyższy poziom kortyzolu we włosach, niż zdrowe.

Podsumowanie

Oznaczanie steroidów jest pomocne w diagnostyce klinicznej i behawioralnej. Psy zestresowane gorzej się uodporniają, częściej chorują, dłużej muszą być leczone. W przypadku psów służbowych długotrwały stres może powodować czasową lub całkowitą niezdolność zwierzęcia do służby. Ta sytuacja ma znaczenie głównie ze względu na straty finansowe ponoszone przez właściciela.

Wysoki poziom kortyzolu będzie świadczył o stresie w grupie, niewystarczającej adaptacji do otoczenia, może ułatwić wyjaśnienie objawów strachu u psów. Analiza stresu w grupie może być pomocna przy wytlumaczeniu upadków psów w danej grupie jako efekt np. niewystarczającej odporności poszczepiennej.

Piśmiennictwo

- Davenport G.M., Hicks T.A., McGlone J.J., Whisnant C.S., Kattesh H.G., Norman R.L.: Behavioral, endocrine, immune and performance measures for pigs exposed to acute stress. *J. Anim. Sci.* 1998, **76**, 474-483.
- Cook C.J., Mellor D.J., Harris P.J., Ingram J.R., Matthews L.R.: Hands-on and Hands-off measurements of stress. W: Moberg G.P., Mench J.A. (edit.), *The Biology of Animal Stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CAB International, 2000, s. 126-146.
- Koren L., Mokady O., Karasov T., Klein J., Koren G., Gefen E.: A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Anim. Behav.*, 2002, **63**, 403-406.
- Davenport M.D., Tiefbacher S., Lutz C.K., Novak M.A., Meyer J.S.: Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2006, **147**, 255-261.
- Ladewig J., Smidt D.: Behaviour, episodic secretion of cortisol, and adrenocortical reactivity in bulls subjected to tethering. *Hormones and Behavior* 1989, **23**, 344-360.
- De Boer S.F., Slangen J.L., van der Guten J.: Adaptation of catecholamine and corticosterone responses to short-term repeated noise stress in rats. *Physiol. Behav.* 1988, **44**, 273-280.
- De Boer S.F., Slangen J.L., van der Guten J.: Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiol. Behav.* 1989, **45**, 789-795.
- Blecha F., Baker P.E.: Effect of cortisol in vitro and in vivo on production of bovine interleukin-2. *Am. J. Vet. Res.* 1986, **47**, 841-845.
- Blecha F., Boyles S.L., Riley J.G.: Shipping suppresses lymphocyte blastogenic responses in Angus and Brahman X Angus feeder calves. *J. Anim. Sci.* 1984, **59**, 576-583.
- Jensen K.H., Pedersen L.J., Nielsen E.K., Heller K.E., Ladewig J., Jørgensen E.: Intermittent stress in pigs: effects on behavior, pituitary-adrenocortical axis, growth and gastric ulceration. *Physiol. Behav.* 1996, **59**, 741-748.
- McGlone J.J., Salak J.L., Lumplin E.A., Nicholson R.L., Gibson M., Norman R.L.: Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. *J. Anim. Sci.* 1993, **71**, 888-896.
- Minton J.E., Apple J.K., Parsons K.M., Blecha F.: Stressor-associated concentrations of plasma cortisol cannot account for reduced lymphocyte function and changes in

serum enzymes in lambs exposed to restraint and isolation stress. *J. Anim. Sci.* 1995, **73**, 812-817.

- Moberg G.P., Mench J.A.: *The Biology of Animal Stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CAB International, 2000.
- Beerda B., Schilder M.B., van Hooff J.A., de Vries H.W., Mol J.A.: Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiol. Behav.* 1999, **66**, 233-42.
- Beerda B., Schilder M.B., Bernadina W., van Hooff J.A., de Vries H.W., Mol J.A.: Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. *Physiol. Behav.* 1999, **66**, 243-254.
- Beerda B., Schilder M.B., van Hooff J.A., de Vries H.W., Mol J.A.: Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Anim. Welfare* 2000, **9**, 49-62.
- Kant G.J., Eggleston T., Landman-Roberts L., Kenion C.C., Driver G.C., Meyerhoff J.L.: Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1985, **22**, 631-634.
- Hart B.L., Hart L.A.: *Canine and Feline Behavioral Therapy*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1985.
- Muller G. H., Kirk R. W., Scott D. W.: *Small Animal Dermatology*. 4th ed., W. B. Saunders, Philadelphia, 1989.
- Accorsi Pier A., Carloni E., Velsecchi P., Viggiani R., Gamberoni M., Tamanini C., Seren E.: Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008, **155**, 398-402.
- Beerda B., Schilder M.B., M.B.H. Janssen, N.S.C.R.M., Mol J.A.: The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Horm. Behav.* 1996, **30**, 272-279.
- De Villiers M.S., van Jaarsveld A.S., Meltzer D.G.A., Richardson P.R.K.: Social dynamics and the cortisol response to immobilization stress of the African Wild Dogs (*Lycan pictus*). *Horm. Behav.* 1997, **31**, 3-14.
- Haverbeke A., Diederich C., Depiereux E., Giffroy J.M.: Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiol. Behav.* 2008, **98**, 59-67.
- Carlstead K., Janine L. Brown, and John Seldensticker: Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). *National Zoological Park, Smithsonian Institution*, Washington, DC, 1993, **12**, 321-331.
- Church D.B., Nicholson A.I., Ilkiw J.E., Emslie D.R.: Effect of non-adrenal illness, anaesthesia and surgery on plasma cortisol concentrations in dogs. *Res. Vet. Sci.* 1994, **56**, 129-131.
- Clark J.D., Rager D.R., Crowell-Davis S., Evans D.L.: Housing and exercise of dogs: effects on behavior, immune function, and cortisol concentration. *Anim. Lab. Sci.*, 1997, **47**, 564-570.
- Fox S.M., Mellor D.J., Firth E.C., Hodge H., Lawoko C.R.O.: Changes in plasma cortisol concentration before, during and after analgesia, anaesthesia plus ovariohysterectomy in bitches. *Res. Vet. Sci.* 1994, **57**, 110-118.
- Hennesy M.B., Davis H.N., Williams M.T., Mellott C., Douglas C.E.: Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Physiol. Behav.* 1997, **62**, 485-490.
- Hennesy M.B., Williams M.T., Miller D.M., Douglas C.W., Voith V.L.: Influence of male and female patterns on plasma cortisol and behaviour: can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1998, **61**, 63-77.
- Moe R.O., Bakken M.: Effects of handling and physical restraint on rectal temperature, cortisol, glucose and leukocyte counts in the silver fox (*Vulpes vulpes*). *Acta Vet. Scand.* 1997, **38**, 29-39.
- Ogburn P., Crouse S., Martin F., Houpt K.: Comparison of behavioral and physiology responses of dogs wearing two different types of collars. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1998, **61**, 133-142.
- Smith J.D., Allen S.W., Quandt J.E.: Changes in cortisol concentration in response to stress and postoperative pain in client-owned cat and correlation with objective clinical variables. *Am. J. Vet. Res.* 1999, **60**, 432-436.
- Carlstead K., Brown J.L., Monfort S.L., Killens R., Wildt D.E.: Urinary monitoring of adrenal responses to psychological stressors in domestic and nondomestic felids. *Zoo Biol.* 1992, **11**, 165-176.
- Kaplan A.J., Peterson M.E., Kempainen R.J.: Effects of disease on the result of diagnostic tests for use in detecting hyperadrenocorticism in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995, **207**, 445-451.
- Rijnberk A. and Mol J.A.: Adrenocortical function. W: J.J. Kaneko (edit.): *Clinical Biochemistry of Domestic Animal*, 4th ed., 1989, s. 610-629.
- Hennesy M.B., Voith V.L., Hawke J.L., Young T.L., Centrene J., McDowell A.L., Linden E.: Effects of a program of human

- interaction and alterations in diet composition on activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in dogs housed in a public animal shelter. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002, **221**, 65-71.
37. Goddard M.E., Beilharz R.G.: A multivariate analysis of the genetics of fearfulness in potential guide dogs. *Behav. Genet.*, 1985, **15**, 69-89.
38. Lefebvre D., Diederich C., Delcourt M., Giffroy J.: The quality of the relation between handler and military dogs influences efficiency and welfare of dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2007, **104**, 49-60.
39. Manson G., Rushen J.: *Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare*. 2nd ed., Cromwell Press, Trowbridge, UK, 2006.
40. Saltzman W., Schultz-Darken N. J., Scheffler G., Wegner F. H., Abbott D. G.: Social and reproductive influences on plasma cortisol in female marmoset monkeys. *Physiol. Behav.* 1994, **56**, 801-810.
41. McGuire, M. T., Brammer, G. L., Raleigh, M. J.: Resting cortisol levels and the emergence of dominant status among male vervet monkeys. *Horm. Behav.* 1986, **20**, 106-117.
42. Yodyingyuad, U., Eberhart, J. A., Keverne, E. B.: Effects of rank and novel females on behaviour and hormones in male talapoin monkeys. *Physiol. Behav.* 1982, **28**, 995-1005.
43. de Villiers M.S., Meltzer D.G.A., van Heerden J., Mills M.G.L., Richardson P.R.K., van Jaarsveld A.S.: Handling-induced stress and mortality in African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Proc. R. Soc. B.* 1995, **262**, 215-220.
44. Schatz S., Palme R.: Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Vet. Res. Commun.* 2001, **25**, 271-287.
45. De Palma C., Viggiano E., Barillari E., Plame R., Dufour A.B., Fantini C., Natoli E. Evaluating the temperament in shelter dogs. *Behaviour* 2005, **142**, 1307-1328.
46. Cook C.J., Mellor D.J., Harris P.J., Ingram J.R., Matthews L.R.: Hands-on and Hands-off measurements of stress. W: Moberg G.P., Mench J.A. (edit.): *The Biology of Animal Stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CAB International, 2000, s. 126-146.
47. Yang H.Z., Lan J., Meng Y.J., Wan X.J., Han D.W.: A preliminary study of steroid reproductive hormones in human hair. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1998, **67**, 447-450.
48. Stenn K.S., Paus R.: Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* 2001, **81**, 449-494.
49. Slominski A., Worstman J., Tuckey R.C., Paus R.: Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007, **265-266**, 143-149.
50. Botchkarev V.A.: Stress and the hair follicle: exploring the connections. *Am. J. Pathol.* 2003, **162**, 709-712.
51. Yamada I., Stevens B., de Silva N., Gibbins S., Beyene J., Taddio A., Newman C., Koren G.: Hair cortisol as a potential biologic marker of chronic stress in hospitalized neonates. *Neonatology* 2007, **92**, 42-49.

Prof. dr hab. Tadeusz Stefaniak, Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław