



WYDZIAŁ  
NAUK O ZWIERZĘTACH  
I BIOGOSPODARKI

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE

WYDZIAŁ NAUK O ZWIERZĘTACH I BIOGOSPODARKI

Dyscyplina Zootechnika i Rybactwo

mgr inż. Anna Skowerska-Wiśniewska

**Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach  
zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji**

Image of Behavioral and Physiological Reactions of Horses in Herd Life  
Disturbed by Separation and Social Support Introduced

*Rozprawa doktorska*  
*Doctoral thesis*

**Promotor:**

Prof. dr hab. Iwona Janczarek

Katedra Hodowli i Użytkowania Koni

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2023

### Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

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

Data 17.05.2023

Podpis promotora 

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 17.05.2023r.

Podpis autora A. Skowronko - W. Kwiecień

**Wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej (oznaczenia od P1 do P4:  
chronologiczna kolejność publikowania; oznaczenia od A1 do A4: merytoryczna  
kolejność prac)**

Cykl publikacji składa się z czterech oryginalnych prac dotyczących zagadnień związanych z prawidłowym i zaburzonym życiem stadnym koni oraz izolacją socjalną i metodom jej zapobiegania poprzez wsparcie ze strony innych gatunków zwierząt gospodarskich.

Sumaryczna liczba punktów MEiN: 370 pkt, sumaryczny Impact Factor = 10,091.

1. **[P1, A1]** Stachurska, A., **Wiśniewska, A.** (autor korespondujący), Kędziński, W., Różańska-Boczula, M., Janczarek, I. (2021). Behavioural and Physiological Changes in a Herd of Arabian Mares after the Separation of Individuals Differently Ranked within the Dominance Hierarchy. *Animals*, 11(9), 2694. <https://doi.org/10.3390/ani11092694>.

*Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN =100, IF=3,231***

*Indywidualny wkład w w/w publikacji: współudział w stworzeniu koncepcji i zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu doświadczenia, analizie statystycznej, gromadzeniu źródeł, zbieranie danych do bazy, współudział w redakcji i korekcie pracy*

2. **[P2, A4]** **Wiśniewska, A.**, Janczarek, I., Wilk, I., Tkaczyk, E., Mierzicka, M., Stanley, C. R., Górecka-Bruzda, A. (2021). Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals*, 11(11), 3081. <https://doi.org/10.3390/ani11113081>.

*Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN =100, IF=3,231***

*Indywidualny wkład w w/w publikacji: współudział w stworzeniu koncepcji, współudział w opracowaniu metodologii i zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu doświadczenia, gromadzeniu źródeł, przygotowaniu zarysu tekstu pracy i korekcie pracy*

3. [P3, A3] **Wiśniewska, A.**, Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek, B., Pokora, E., Łuszczynski, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271. <https://doi.org/10.3390/ani12172271>.

*Liczba punktów w roku publikacji: MEiN =100, IF=3,231*

*Indywidualny wkład w w/w publikacji: wiodący udział w stworzeniu koncepcji badawczej, opracowaniu metodologii, przeprowadzeniu doświadczenia oraz przygotowaniu zarysu tekstu pracy*

4. [P4, A2] Jastrzębska, E. **Wiśniewska, A.** (autor korespondujący), Wilk, I., Próchniak, T., Janczarek, I. (2023) – Effect of Selected Factors on Features of Short-Term Social Isolation of Horses: A Pilot Study, *Med. Weter.* 79 (3), 134-141. <http://dx.doi.org/10.21521/mw.674>

*Liczba punktów w roku publikacji: MEiN =70, IF=0,398*

*Indywidualny wkład w w/w publikacji: wiodący udział w stworzeniu koncepcji badawczej, opracowaniu metodologii oraz redakcji i korekcie pracy*

***Łączna liczba punktów MEiN = 370***

***IF (Impact Factor) – 10,091***

*Oświadczenia współautorów wyżej wymienionych prac wraz z określeniem ich indywidualnego wkładu zamieszczono w załączniku nr 1.*

*Wydruki publikacji wchodzących w cykl publikacji przedstawiono w załączniku nr 2.*

## Spis treści

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Streszczenie</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>Summary</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>Wstęp</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>Hipotezy badawcze i cel pracy</b> .....                                  | <b>14</b> |
| <b>Material i metody</b> .....  | <b>16</b> |
| Konie.....  | 16        |
| Przeprowadzone testy i procedury doświadczalne .....                        | 16        |
| <i>Test zaburzenia hierarchii dominacji [P1A1]</i> .....                    | 16        |
| <i>Test nowego obiektu: żywy/nieżywy ruchomy obiekt [P2A4]</i> .....        | 17        |
| <i>Test podejścia do obiektu (żywy/nieżywy ruchomy obiekt) [P2A4]</i> ..... | 18        |
| <i>Test współtowarzyszenia gatunków [P3A3]</i> .....                        | 18        |
| <i>Test konia izolowanego [P4A2]</i> .....                                  | 19        |
| Metody badawcze .....   | 20        |
| Parametry częstości i zmienności rytmu serca.....                           | 20        |
| Cechy behawioralne i lokomotoryczne.....                                    | 21        |
| Metody statystyczne.....  | 23        |
| <b>Wyniki</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>Dyskusja</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>Podsumowanie i wnioski</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>Piśmiennictwo</b> .....  | <b>43</b> |
| Oświadczenia współautorów (załącznik nr 1)                                  |           |
| Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej (załącznik nr 2)          |           |

## STRESZCZENIE

Głównym celem badawczym cyklu publikacji była ocena behawioru, aktywności lokomotorycznej i parametrów fizjologicznych koni podczas zaburzania hierarchii stadnej, wymuszonej izolacji socjalnej lub interakcji z przedstawicielami innych gatunków zwierząt roślinożernych rozpatrywanej jako ewentualne wsparcie socjalne podczas odosobnienia. Materiał badawczy do wszystkich prac stanowiło 79 klinicznie zdrowych, dorosłych koni gorącokrwistych, użytych w zależności od badania w liczbie 12-27 sztuk. Przeprowadzono pięć głównych testów behawioralnych (test zaburzenia hierarchii dominacji, test nowego obiektu: żywy/nieżywy ruchomy obiekt, test podejścia do obiektu: żywy/nieżywy ruchomy obiekt, test współtowarzyszenia gatunków, test konia izolowanego) oraz dodatkowo test do określenia pozycji hierarchii koni w stadzie. Testy składały się najczęściej z kilku etapów i faz badawczych, z wykorzystaniem powtórzenia schematu różnej kombinacji tego samego testu. W teście nowego obiektu i podejścia do obiektu wykorzystano bydło domowe, a w teście współtowarzyszenia gatunków mini-stado bezrogich kóz. Wśród wiodących metod badawczych znalazły się pomiary cech fizjologicznych, a także pomiary cech behawioralnych i lokomotorycznych. Pomiary parametrów częstości/zmienności rytmu serca (HR/HRV) wykonano z użyciem mierników Polar ELECTRO OY, typ RS800CX z nadajnikiem H2 lub stetoskopem, a następnie użyto oprogramowanie Kubios HRV i/lub oprogramowanie PolarProTrainer 5. W poszczególnych pracach analizie poddano odpowiednio od jednego do sześciu parametrów rytmu serca. Behawior (od pięciu do trzynastu cech) i lokomotoryczność (od trzech do pięciu cech) określono za pomocą obserwacji bezpośredniej lub z wykorzystaniem zapisu kamerami cyfrowymi Sanyo Xacti VPC-WH1. Ponadto, jednorazowo zastosowano wizualną skalę analogową (VASf) i obserwacyjne pomiary częstości oddechów. W zależności od uzyskanej struktury danych, wybrane wyniki przedstawiono w formie algorytmów. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania STATISTICA 13.3, R 4.0.3 i SAS 9.4. Stwierdzono, że czasowe izolowanie oraz zaburzanie życia stadnego koni zawsze wywołuje u tych zwierząt negatywne emocje i reakcje behawioralne wskazujące na stres. Przywrócenie odizolowanych koni do grupy nie przynosi szybkiego wyciszenia niepożądanych nastrojów w stadzie. Właściciele koni powinni zatem brać pod uwagę ten fakt podczas separacji niektórych jego członków, stwarzając odpowiednie warunki w trakcie takiego postępowania. Warto też podkreślić, że zapewnienie zastępczego wsparcia socjalnego może co najwyżej częściowo łagodzić skutki izolacji socjalnej koni, gdyż

towarzystwo kozłów nieznacznie zapobiega ich samotności, a obecność krowy wywołuje wręcz negatywne reakcje. Można natomiast dodać, że kozły mogą stanowić pozytywny element urozmaicenia środowiska życia stada koni. Niestety, trudno jest przewidzieć nasilenie objawów stresu izolacyjnego koni na podstawie np. fizjologicznych pomiarów spoczynkowych. Należy więc kontynuować badania nad stosowaniem procedur niwelujących wspomniane zjawisko u tych zwierząt. Powinno się jednak liczyć z faktem, że być może nigdy nie uda się osiągnąć pełnej relaksacji u koni odseparowanych od stada.

**Słowa kluczowe:** konie, stado, izolacja, wsparcie socjalne, behawior, fizjologia

## SUMMARY

The main research objective of the series of publications was to evaluate the behavior, locomotor activity and physiological parameters in horses during disturbance of the herd hierarchy, forced social separation and interaction with representatives of other species of herbivorous animals considered as possible social support during confinement. The material for all studies consisted of 79 clinically sound adult warmblood horses: 12-27 individuals depending on the study. Five main behavioral tests were performed (dominance hierarchy disorder test, new object test: living/inanimate moving object, approach to an object test: living/inanimate moving object, species association test, separated horse test) and, additionally, a test to determine the position of the horse in the herd hierarchy. The tests usually consisted of several stages and research phases, with the use of repeating the scheme of various combination of the same test. Domestic cattle were used in the test of the new object and approach to the object, and a mini-herd of polled goats in the species association test. The main methods included the measurements of physiological characteristics as well as the measurements of behavioral and locomotor characteristics. Measurements of heart rate/heart rate variability (HR/HRV) parameters were performed using Polar ELECTRO OY, type RS800CX with H2 transmitter or stethoscope, and then Kubios HRV software and/or PolarProTrainer 5 software. One to six heart rhythm parameters were analyzed in a study. Behavior (five to thirteen traits) and locomotor activity (three to five traits) were determined by direct observation or recording with Sanyo Xacti VPC-WH1 digital cameras. In addition, a visual analog scale (VASf) and observational respiratory rate measurements were used in one study. Selected results were presented in the form of algorithms depending on the obtained data structure. The statistical analyses were performed using STATISTICA 13.3, R 4.0.3 and SAS 9.4 softwares. It was found that temporary separation and disturbance of the herd life of horses always evokes negative emotions and behavioral reactions indicating stress. Return of the separated horses to the herd does not result in a quick calming of undesirable emotions in the herd. Hence, horse owners should take into account the this fact when separating some of its members, and provide appropriate conditions for such an action. It is also worth emphasizing that providing substitute social support can only partially mitigate the effects of horses' social separation. The company of goats only partly prevents solitude whereas the presence of a cow causes quite negative reactions in horses. However, it can be added that the goats can be a desirable element of diversifying the living environment of the horse herd. Unfortunately, it is difficult to predict the severity of



separation stress symptoms in horses based on e.g. physiological measurements conducted at rest. Therefore, it is necessary to continue research on procedures used to mitigate this phenomenon in horses. However, it should be taken into account that probably it will never be possible to achieve a complete relaxation in horses separated from the herd.

**Keywords:** horses, herd, separation, social support, behavior, physiology

## WSTĘP

Zwierzęta stadne odczuwają silną potrzebę przebywania w grupie znanych sobie osobników, z którymi łączą je więzi społeczne [Lang i Farine, 2017]. Współpraca między osobnikami przebywającymi w stadzie warunkach naturalnych umożliwia przetrwanie zarówno zwierząt roślinożernych, jak i niektórych gatunków drapieżników [Shimada i Suzuki, 2020; Cameron i in., 2009]. W przypadku tych pierwszych zwiększa ona możliwość przeżycia w trakcie zagrożenia atakiem, a w przypadku drugich wspomaga osiągnięcie sukcesu podczas polowania [Lang i Farine, 2017; Olson i in., 2015]. Stada o ściśle określonych zależnościach socjalnych tworzą m.in. konie [Hartmann i in., 2012; Henderson, 2007]. Codzienne podtrzymywanie więzi społecznych zapewnia harmonię i dobrostan w grupie [Krueger i in., 2021]. Te same wzorce behawioru stadnego obserwuje się u koni dziko żyjących i udomowionych [Giles i in., 2015]. Przykładem może być tworzenie długotrwałych więzi w stadach składających się standardowo z ogiera, kilku dorosłych klaczy i ich źrebiąt [Linklater i Cameron, 2000]. Klacze rozwijają afiliacyjną i równocześnie bardzo korzystną dla nich integrację społeczną, która ułatwia codzienne funkcjonowanie, zmniejsza nękanie przez samce, ale też zwiększa wskaźnik urodzeń źrebiąt [Shimada i Suzuki, 2020; Cameron i in., 2009]. Z drugiej strony, utrzymywana jest hierarchia stadna wyrażana za pomocą dominacji lub podległości [Pierard i in., 2019]. Dominacyjna hierarchia stadna, która jest stosunkowo stabilną strukturą, zależy m.in. od cech psychicznych koni, ich wieku i płci, statusu reprodukcyjnego, kondycji fizycznej, a także czasu przebywania w stadzie [Giles i in., 2015; Hartmann i in., 2009; Ransom i Cade, 2009; Heitor i in., 2006; Weeks i in., 2000]. Podległość jest natomiast jej naturalnym dopełnieniem.

Warto też podkreślić, że system społeczny koniowatych jest nietypowy dla kopytnych, ale za to podobny do niektórych gatunków naczelnych, takich jak np. goryl [Cameron i in., 2009]. Świadczy o tym m.in. dobra zdolność rozpoznawania innych osobników. Ponadto, konie (*E. przewalskii*, *E. caballus*) i niektóre populacje zebr (*E. zebra*, *E. burchelli*) są ustrukturyzowane przez długotrwałe relacje społeczne i rozrodcze w grupach poligynicznych [Linklater i in., 2000]. Związki są długowieczne w stosunku do życia reprodukcyjnego, a członkostwo w grupie jest stabilne w porównaniu z innymi poligynicznymi kopytnymi.

Inaczej wyglądają stworzone przez człowieka tzw. sztuczne stada koni, które są zwykle utrzymywane bez ogiera, co ma na celu ułatwienie regulacji rozrodu

i ograniczenie kontuzji [Jørgensen i in., 2009]. To niestabilne grupowanie koni jest przede wszystkim powszechne w dużych skupiskach koni użytkowych, utrzymywanych na małych arealach, w miejskich lub podmiejskich ośrodkach konnych [Sigurjónsdóttir i Haraldsson, 2019; van Dierendonck, 2004]. Jednakże warto pamiętać, że stałość składu grupy koni jest podstawą ustalenia hierarchii stadnej, zmniejsza poziom agresji międzyosobniczej, zwiększając automatycznie dobrostan jego członków. Niektóre badania opisują konsekwencje wprowadzenia nieznanego osobnika do społecznej grupy koni lub reakcję jednostki oddzielonej od takiej grupy [Stachurska i in., 2021a; Hartmann i in., 2011; Jørgensen i in., 2011; Lansade i in., 2008]. Jednak nie są dostępne żadne informacje na temat reakcji stada na usunięcie jej członka. Hartmann i in. [2012] sugerowali, że uzasadnione są badania nad konsekwencjami usunięcia z grupy osobnika określonej hierarchii w kontekście behawioru pozostałych członków. Ten problem badawczy nie został jednak rozwiązany, mimo iż w obiektach jeździeckich i stadninach jest wiele sytuacji, w których konie muszą być wydzielone z grupy, np. gdy są używane do rekreacji, sportu lub leczenia weterynaryjnego. Interesujące jest zatem zbadanie, jak zareaguje wówczas reszta stada, czy w ogóle zauważy brak swoich członków, czy też doświadczy wówczas stresu.

Warto podkreślić, że efekt izolacji socjalnej koni, mimo iż jest generalnie dobrze omówiony, podlega nieustającym badaniom [Lundblad i in., 2021; Reid i in., 2017; Yarnell i in., 2015]. Dzieje się tak, gdyż zwierzęta stadne z natury ciężko znoszą samotność, która może wywoływać u nich negatywne reakcje behawioralne i fizjologiczne [Lansade i in., 2008]. Dla przykładu, wśród zmian fizjologicznych wyróżnia się m.in. wzrost tętna i częstości oddechów oraz stężenia kortyzolu we krwi [Krueger i in., 2021; Lansade i in., 2008]. W zakresie lokomotoryczności zdania są natomiast częściowo podzielone [Stachurska i in., 2021a; Lansade i in., 2008]. Pewne jest jednak, że koń podczas izolacji na wybiegu zaczyna niespokojnie biegać wzdłuż ogrodzenia przywołując nerwowo pozostałe osobniki [Yarnell i in., 2015]. Wzmógłony ruch pobudza wówczas perystaltykę jelit, co skutkuje defekacją. Podniesiona temperatura ciała powoduje natomiast pocenie się, czego efektem może być nawet odwodnienie organizmu. W skrajnych przypadkach, stres izolacyjny może też powodować samookaleczenie i przejawy innych zachowań patologicznych [Fureix i in., 2012]. W konsekwencji osłabia się zestresowany organizm, by ostatecznie ulec wyniszczeniu [Roberts i in., 2017; Henderson, 2007].

Izolacja socjalna jest zatem nadal jednym z większych problemów dotyczących współcześnie użytkowanych koni [Bourjade i in., 2008], mimo iż ich cechy osobnicze powodują różny poziom uzależnienia od stada. Konsekwencją jest odmienna odpowiedź

na omawiane zjawisko. U źrebiąt po odsadzeniu, skutki tęsknoty za matką niweluje się poprzez dopuszczanie do nich dorosłych, zrównoważonych koni. Zmniejsza się wówczas częstość występowania negatywnych interakcji społecznych, a rozwijają się zachowania afiliacyjne. Najprawdopodobniej, młody niestabilny socjalnie osobnik otrzymuje w ten sposób wsparcie w formie przewodnika stada. Powszechnie też wiadomo, że w kolejnych stadiach rozwoju koni, często dochodzi do ich izolacji lub łączenia w małe grupy tej samej płci, rasy i wieku. Ma to ograniczyć pojawienie się ewentualnych konfliktów mogących skutkować obrażeniami. Ponadto, według Stanley i in. [2018], obecny sposób utrzymania koni w stadach osobników niespokrewnionych może przynieść wystarczające korzyści w zakresie wsparcia socjalnego. Może być to zatem porównywalne do relacji w naturalnym stadzie koni.

Współczesne użytkowanie koni nie pozwala na unikanie izolacji [Jørgensen i in., 2011; Bourjade i in., 2008]. Jednakże, odpowiednie zarządzanie tymi zwierzętami może przyczynić się do stosunkowo bezpiecznego i bezproblemowego przeżycia tego przykrego dla konia zdarzenia. Nie tylko odpowiednie zarządzanie, ale też np. wieszanie zabawek, fotografii innych koni lub lusterek w boksach polecane jest jako metoda niwelowania stresu izolacyjnego [Kay i Hall, 2009; Cooper i McGreevy, 2007; McAfee i in., 2002]. Poszukiwanie nowych metod zapobiegania skutkom izolacji jest konieczne, gdyż te obecnie oferowane nie są do końca skuteczne [Bulens i in., 2013; Cooper i McGreevy, 2007]. Izolacja socjalna koni jest zatem nieustająco otwartym obszarem badawczym. Wskazując na ten fakt warto pamiętać, że jedną z zasadniczych wartości, jakie przynosi życie stadne jest wsparcie socjalne od grupy [Krueger, 2008; Stanley i in., 2018]. Wsparcie to definiowane jest głównie w przypadku ludzi [Cobb, 1976]. Chroni przed zdrowotnymi konsekwencjami stresu życiowego, pozwala przetrwać kryzys, jak również przyspiesza powrót do zdrowia. Zespół tworzący stabilną, społeczną jednostkę obserwowany jest również często w świecie zwierząt [Fischer i in., 2017; Gero i in., 2015; Wittemyer i in., 2005]. Dlatego też zastępcze wsparcie społeczne dla osobników pozbawionych własnego stada może być kluczowym podejściem do promowania dobrostanu fizycznego i psychicznego zwierząt gospodarskich [Rault, 2012].

W przeszłości koniowate były często trzymane i wypasane razem z innymi gatunkami zwierząt gospodarskich, co oznaczało, że zwierzęta były przyzwyczajone do siebie nawzajem. Przywracanie koni i bydła lub owiec do współlistnienia we wspólnym środowisku przyniosło pozytywne rezultaty [Cromsigt i in., 2018]. Warto zatem zatrzymać się nad często obserwowanymi relacjami między różnymi gatunkami zwierząt [Kiffner i in.,

2014; Schmitt i in., 2014]. Zwierzęta towarzyszące mogą utrzymywać wspólne relacje, czego przykładem są psy i koty [Feuerstein i Terkel, 2008]. Relacje takie występują również w grupie zwierząt gospodarskich, o czym świadczy możliwość wspólnego wypasu młodych jagniąt i jałówek [Anderson i in., 1987] lub też koni z owcami [Pluta i in., 2013]. Kozy domowe zostały natomiast zasugerowane przez fora jeździeckie i strony branżowe jako gatunek, który może udzielić wsparcia socjalnego koniom podczas izolacji [Diedericks, 2020; FEI, 2018]. Aspekty te nie zostały natomiast potwierdzone naukowo.

Jednakże, współczesny system utrzymania koni zmienił się do tego stopnia, że często przez całe życie nie mają one nawet minimalnego kontaktu z przedstawicielami innego gatunku zwierząt gospodarskich [McGreevy i in., 2018]. Stąd też dawne współlistnienie, czy nawet wsparcie socjalne trudno jest uznać za aksjomat. Wprost przeciwnie, nie wiadomo, czy zwierzęta te zamiast łagodzenia sfery emocjonalnej, nie wywołują u koni strachu przed nieznanym [Boissy, 1995]. Zwłaszcza, że często nie nowość bodźca, ale gwałtowność jego wprowadzenia jest postrzegana przez konie jako bardziej wzbudzająca strach [Corgan i in., 2021; Boissy, 1995]. Reakcja na nieznaną zwierzę, a zwłaszcza stosunkowo duże, jakim jest krowa, nie była wcześniej testowana na koniach w standardowych warunkach. Wydaje się jednak, że ewolucyjne mieszanie się gatunków nie powinno wywoływać u koni strachu przed innymi zwierzętami lub strach ten powinien występować w stopniu ograniczonym. Idąc dalej tym tokiem myślowym, można się spodziewać wystąpienia interakcji o charakterze afiliacyjnym, które mogłyby niwelować skutki izolacji socjalnej [Menard i in., 2002].

# HIPOTEZY BADAWCZE I CEL PRACY

## Hipotezy badawcze

1. Odseparowanie wybranych osobników od stada wywołuje zmiany behawioralne i fizjologiczne u pozostałych jego członków. Zmiany te różnią się w zależności od hierarchii izolowanych osobników [P1A1].
2. Podstawowe czynniki, czyli płeć, sposób utrzymania i rodzaj użytkowania wpływają na obraz krótkotrwałej izolacji socjalnej koni. Typowe cechy behawioru izolacyjnego koni mają wpływ na występującą wówczas częstość rytmu serca i częstość oddechów. Ponadto, spoczynkowa wartość tych parametrów może być diagnostykiem w przewidywaniu odpowiedzi koni na krótkotrwałą izolację [P4A2].
3. Małe przeżuwacze mogą wspierać socjalnie konie poprzez zmniejszenie ich pobudliwości emocjonalnej podczas izolacji. Wsparcie ze strony obcego gatunku zwierząt nie jest jednak potrzebne koniom przebywającym w stadzie [P3A3].
4. Konie izolowane od innych gatunków dużych zwierząt gospodarskich (przykład bydła domowego) mogą traktować je jako nieznane obiekty wywołujące strach lub unikanie [P2A4]. Jednakże, strach przed bydlęm powinien być mniejszy niż przed nieożywionymi obiektami ruchomymi o podobnej wielkości.

## Cel pracy

Głównym celem badawczym była ocena zmian fizjologicznych, behawioralnych i lokomotorycznych koni podczas zaburzenia hierarchii stadnej, wymuszonej izolacji socjalnej lub interakcji z przedstawicielami innych gatunków zwierząt roślinożernych, rozpatrywanej jako ewentualne wsparcie socjalne. Określono też następujące cele szczegółowe:

- [P1, A1] ocena wybranych cech behawioru, poziomu aktywności lokomotorycznej oraz parametrów częstości i zmienności rytmu serca koni w stadzie podczas krótkiej separacji socjalnej osobników o różnej hierarchii;

- [P4, A2] analiza wpływu płci, sposobu utrzymania w ośrodku i rodzaju użytkowania koni na behawioralno-fizjologiczny wyraz ich krótkotrwałej izolacji socjalnej, a następnie poszukiwanie możliwości oceny obrazu tej izolacji za pomocą podstawowych parametrów fizjologicznych, czyli częstości rytmu serca i częstości oddechów;

- [P3, A3] ocena porównawcza parametrów częstości i zmienności rytmu serca oraz aktywności lokomotorycznej koni podczas przebywania w stadzie/izolacji w towarzystwie/bez towarzystwa kozłów;

- [P2, A4] ocena reakcji behawioralnej i parametrów częstości i zmienności rytmu serca koni w odpowiedzi na obecność krowy w najbliższym otoczeniu lub - dla porównania - na obecność nieożywionego obiektu ruchomego o zbliżonych rozmiarach.

# MATERIAŁ I METODY

## Konie

Materiał badawczy do wszystkich prac stanowiło 79 klinicznie zdrowych koni gorącokrwistych (klacze i wałachy), z czego stawka zakwalifikowana do konkretnego układu badawczego/doświadczenia zamykała się w przedziale od 12 [P1A1] do 27 osobników [P4A2]. Konie utrzymywane były w stajniach z systemami boksowymi umożliwiającymi kontakt wzrokowy z innymi końmi, karmione trzy razy dziennie sianem łąkowym i paszą treściwą, ze stałym dostępem do wody i lizawki solnej. Były wypuszczane na padoki/pastwiska z innymi końmi, gdzie przebywały 2 - 12h. Przedział wiekowy koni wyniósł odpowiednio: 5 – 10 lat [P1A1], 4 – 27 lat [P4A2], 4 – 19 lat [P3A3] i 6 – 20 lat [P2A4]. Sposób utrzymania koni był ujednolicony, oprócz występującego w pracy P4A2, gdzie odnotowane różnice potraktowano jako czynniki badawcze.

Liczebność koni użytych do każdego z układów badawczych/doświadczeń była wystarczająca do przeprowadzania analiz statystycznych pozwalających na uzyskanie wystarczająco wiarygodnych wyników (uzyskano prawidłową moc testu statystycznego).

Ponadto, w przeprowadzonych badaniach uczestniczyły też przeżuwacze (bydło domowe, kozy domowe). W jednej z prac wykorzystano dwie krowy – rasy białogrzbietej [P2A4], a w kolejnej z prac trzy wykastrowane kozy bez rogów - rasy polskiej białej uszlachetnionej [P3A3].

## Przeprowadzone testy i procedury doświadczalne

### *Test zaburzenia hierarchii dominacji [P1A1]*

Przed rozpoczęciem testu zaburzenia hierarchii dominacji przeprowadzono wstępny test behawioralny służący określeniu pozycji hierarchii klaczy w stadzie. Polegał on na wypuszczeniu koni na wybieg, gdzie znajdował się żłób z paszą. Pozycję w hierarchii ustalono według kolejności podchodzenia klaczy do żłobu z paszą. Klaczom, które ukończyły próbę (pobrały paszę) uniemożliwiano ponowne podejście do żłobu. Test zaburzenia hierarchii dominacji składał się natomiast z powtarzanych trzykrotnie trzech 15-minutowych faz, podczas których prowadzono pomiary parametrów fizjologicznych i behawioralnych u koni pozostających na wybiegu. Faza pierwsza polegała na wypuszczeniu całego stada klaczy na wybieg. Podczas drugiej fazy, klacze o określonej pozycji w hierarchii były oddzielane od stada. Zastosowano trzy kombinacje tego testu: 1)

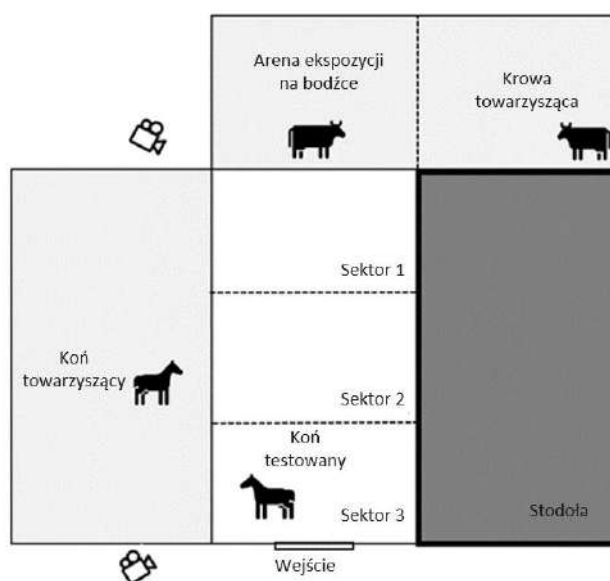


odseparowanie trzech klaczy o najwyższej pozycji hierarchicznej; 2) oddzielenie klaczy o różnej pozycji hierarchicznej; 3) separacja klaczy o najniższej pozycji hierarchicznej. W trzeciej fazie analizowano reakcję koni w stadzie po ponownym dołączeniu separowanych klaczy.

#### *Test nowego obiektu: żywy/nieżywiony ruchomy obiekt [P2A4]*

Pierwszy z dwóch etapów testu nowego obiektu (żywy ruchomy obiekt) polegał na wypuszczeniu konia na znany mu ziemny padok testowy, na którym znajdował się nieznanymi obiekt – krowa. Padok ten podzielono wcześniej równoległe do krótkiej ściany na trzy równe sektory, gdzie pierwszy sektor znajdował się najbliżej bodźca (nowy obiekt), a trzeci sektor najdalej tego bodźca. Na drugim padoku, który przylegał do długiej ściany padoku testowego, znajdował się wówczas koń towarzyszący badanemu koniowi, który początkowo (próba kontrolna) przebywał na wybiegu bez bodźca (nowego obiektu) przez okres 30 min.

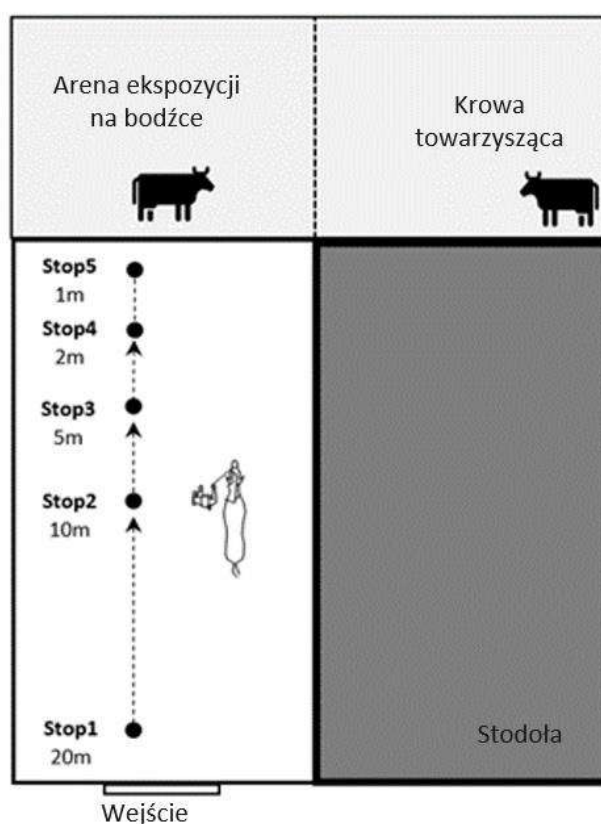
Jako żywy ruchomy obiekt zastosowano jedną z dwóch krow eksponowanych na małym padoku przylegającym do krótkiej ściany padoku testowego. Krowy różniły się wielkością i barwą sierści (duża krowa i mała krowa). Bodziec (jedna z dwóch krow) był eksponowany przez kolejne 30 min. Druga krowa, która była niewidoczna dla koni, przebywała wówczas w oddzielnym ogrodzeniu (ryc. 1). Po upływie ustalonego czasu, czyli 30 min., krowa została zamieniona na drugą na kolejne 30 min. Kolejność eksponowania krow była przydzielana do koni losowo. Po miesiącu przerwy przeprowadzono analogiczne badanie (drugi etap testu), jednak tym razem bodźcem było ruchome pudło wielkości porównywalnej do wielkości krow (nieżywiony ruchomy obiekt).



Rycina 1. Schemat przebiegu *Testu nowego obiektu: żywy/nieżywiony ruchomy obiekt [P2A4]*

### *Test podejścia do obiektu (żywy/nieżywiony ruchomy obiekt) [P2A4]*

Kolejny test wykonano po upływie 30 dni licząc od zakończenia drugiego etapu testu nowego obiektu (nieżywiony ruchomy obiekt). W próbie kontrolnej konie były prowadzone w rękę przez znanego im opiekuna w kierunku miejsca planowanej ekspozycji bodźca i zatrzymywane w pięciu wyznaczonych wcześniej punktach: punkt pierwszy 20 m od bodźca, punkt drugi 10 m od bodźca, punkt trzeci 5 m od bodźca, punkt czwarty 2 m od bodźca, punkt piąty 1 m od bodźca (ryc. 2). Po tygodniu konie były prowadzone analogicznie, jak w próbie kontrolnej, jednakże tym razem w miejscu planowanej ekspozycji obiektu znajdował się żywy ruchomy obiekt, a następnie nieżywiony ruchomy obiekt.

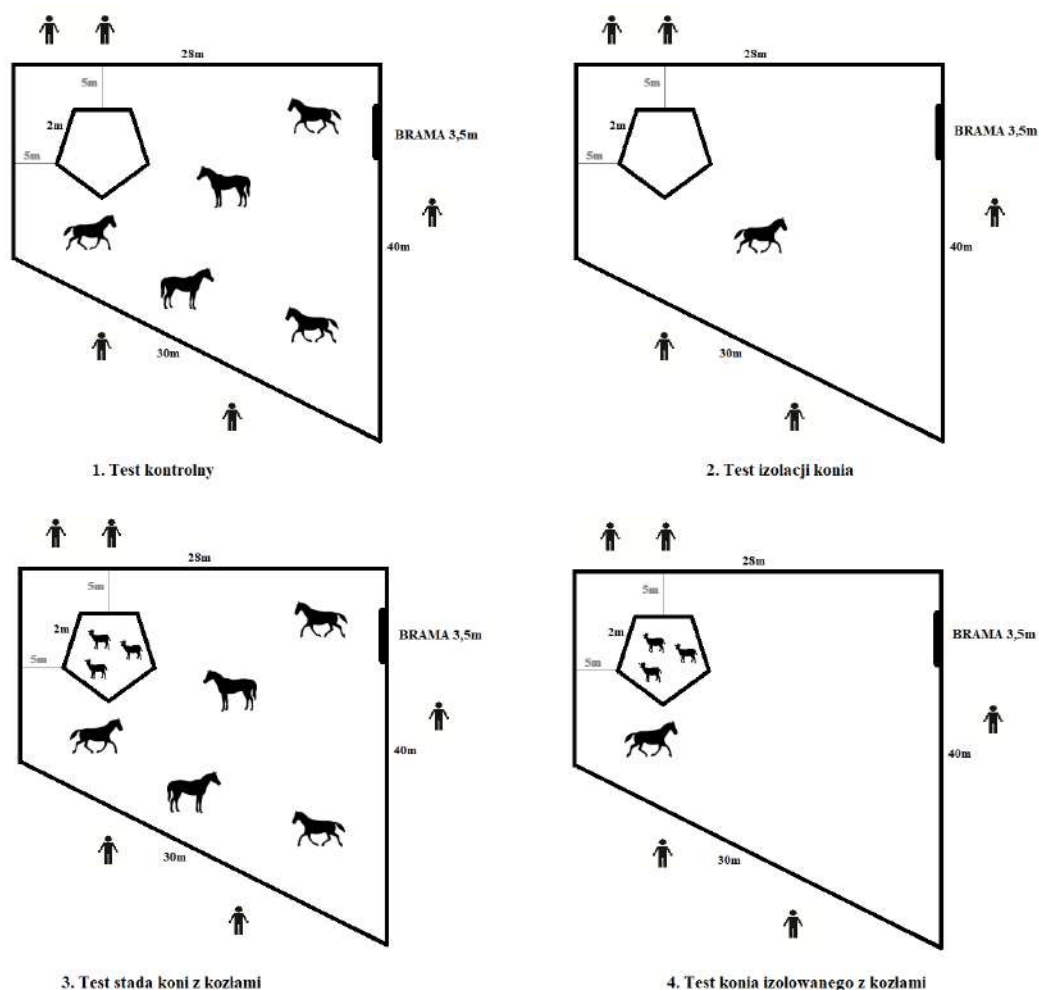


Rycina 2. Schemat przebiegu *Testu podejścia do obiektu (żywy/nieżywiony ruchomy obiekt) [P2A4]*

### *Test współtowarzyszenia gatunków [P3A3]*

Doświadczenie przeprowadzono w pięciu etapach trwających po 15 min. każdy. W pierwszym etapie stado koni zostało wypuszczone na znany im wybieg, gdzie na środku znajdowała się zagroda z przeznaczeniem dla kozłów (ryc. 3). W drugim etapie konie wyprowadzano pojedynczo na ten sam wybieg z zagrodą. W trzecim etapie trzy kozły były przeprowadzane przez opiekuna po korytarzu stajni, co miało na celu przyzwyczajenie koni do ich obecności. W czwartym etapie stado koni wyprowadzano na wybieg, na którym

w zagrodzie przebywały kozły. W piątym etapie konie wyprowadzano pojedynczo na ten sam wybieg, a w umieszczonej na środku zagrodzie przebywały ponownie kozły.



Rycina 3. Schemat przebiegu *Testu współtowarzyszenia gatunków* [P3A3]

#### *Test konia izolowanego* [P4A2]

Test konia izolowanego rozpoczął się wypuszczeniem stada koni na okres 60 min. na znany im padok. W kolejnym kroku przeprowadzono test izolacji, który polegał na pojedynczym odprowadzeniu przez opiekuna każdego konia z wybiegu do własnego boksu w stajni na okres 5 min. W tym czasie w stajni przebywał tylko eksperymentator. Następnie koń był wyprowadzany na korytarz stajni, a dalej wyprowadzany ze stajni i puszczany luzem na drogę prowadzącą do wybiegu, tak by mógł powrócić do stada. Na konia przy wybiegu oczekiwał drugi opiekun, który w odpowiednim momencie otwierał bramę, co pozwalało koniowi na dołączenie do stada. Po 20 minutach, kolejny koń był poddawany analogicznemu testowi izolacji.

## Metody badawcze

Do wiodących metod badawczych zaliczono pomiar i analizę parametrów częstości rytmu serca [P1-P4] i zmienności rytmu serca [P1-P3], częstości oddechów [P4] oraz ocenę i pomiary cech behawioralnych oraz cech lokomotorycznych [P1-P4].

### Parametry częstości i zmienności rytmu serca

W pracach P1-P3 przeprowadzono analizę częstości (HR) i zmienności rytmu serca (HRV) koni, która posłużyła do oceny poziomu ich pobudzenia emocjonalnego. We wszystkich badaniach pomiary wykonano za pomocą Polar ELECTRO OY, Kempele, Finlandia, typ RS800CX z nadajnikiem H2. Konie były przyzwyczajone do tych urządzeń. Elektrody mocowano paskiem w miejscu poprzęgu po lewej stronie klatki piersiowej, na wysokości serca. Dla zoptymalizowania przewodzenia i zminimalizowania oporu elektrycznego, gumowy element paska w miejscu osadzenia elektrod pokrywano dużą ilością żelu do EKG [Kovács i in., 2015]. Następnie na wysokości mostka konia do elastycznych pasków mocowano zsynchronizowane z konkretnym nadajnikiem monitory HR/HRV. Dane z monitorów HR transmitowano do komputera za pomocą urządzenia peryferyjnego IrDA USB 2.0. Adapter Zmienne analizowano według wytycznych podanych przez Tarvainen i in. [2014], wykorzystując oprogramowanie Kubios HRV (wersja 2.1., Kuopio, Finlandia) [P2A4] i/lub oprogramowanie PolarProTrainer 5 (v41.2, Kempele, Finlandia) [P2A4, P3A3]. Korekcję artefaktów w analizie RR (odstęp między kolejnymi uderzeniami serca) wykonano w sposób manualny [P1A1], z wykorzystaniem filtrów o dużej mocy [P2A4] lub o małej mocy [P3A3]. W zależności od założeń metodycznych pracy, analizowano wybrane wcześniej fragmenty zapisu danych, tj. spoczynkowe, w trakcie testu i po jego zakończeniu. Fragmenty te były tożsame z etapami/ fazami/kombinacjami poszczególnych testów.

W grupie parametrów wskazujących na podwyższoną aktywność części współczulnej autonomicznego układu nerwowego (AUN) znalazły się:

- 1) HR mierzona liczbą uderzeń serca/min. [P1A1, P2A4, P3A3],
- 2) RR interwał [ms] – interwały pomiędzy kolejnymi załamkami R zespołu QRS [P3A3],
- 3) LF [ $\text{ms}^2$ ] – składowa mocy widma niskich częstotliwości (0.04 – 0.15 Hz) [P3A3].

Analizie poddano również parametry HR/HRV wskazujące na podwyższoną aktywność części przywspółczulnej autonomicznego układu nerwowego:

- 1) RMSSD [ms] - pierwiastek kwadratowy kolejnych różnic w odstępach między uderzeniami serca mierzony w ms [P1A1, P2A4, P3A3],
- 2) HF [ms<sup>2</sup>] – składowa mocy widma wysokiej częstotliwości (0.15 – 0.4 Hz) [P3A3].

Określono również parametr LF/HF [%] – stosunek mocy widma niskich częstotliwości do mocy widma wysokich częstotliwości, wskazujący na równowagę współczulno – przywspółczulną AUN [von Borell i in., 2007] [P3A3].

Ponadto, w pracy oznaczonej symbolem P4A2 zmierzono spoczynkową i poizolacyjną częstość rytmu serca i częstość oddechów. Zastosowano najprostsze metody pomiarowe, czyli częstość oddechów na minutę określono na podstawie obserwacji ruchów wznoszących łuk żebrowy, natomiast częstość rytmu serca mierzono przez jedną minutę stetoskopem, przyłożonym za łokciem konia z lewej strony ciała. Wybór wskazanych metod pomiarowych miał na celu przełożenie na aplikacyjny charakter pracy. Na podstawie uzyskanych wartości obliczono następnie wskaźniki o nazwie: różnica w częstości rytmu serca, czyli różnica pomiędzy izolacyjną częstością rytmu serca a spoczynkową częstością rytmu serca oraz różnica w częstości oddechów, czyli różnica pomiędzy izolacyjną częstością oddechów a spoczynkową częstością oddechów. Wyliczenie tych wskaźników pozwoliło na uwzględnienie fizjologicznych różnic osobniczych w spoczynkowym poziomie badanych parametrów [Janczarek i in., 2016].

### **Cechy behawioralne i lokomotoryczne**

W pracy oznaczonej symbolem P4A2 behawiorysta przeprowadził przed rozpoczęciem badań standardowy test człowieka biernego [Fureix i in., 2009]. Ponadto, w przypadku każdego z układów badawczych/doświadczenia, zastosowano metodę obserwacji bezpośredniej przeprowadzonej przez wykwalifikowanych behawiorystów, którzy w żadnym stopniu nie wpływali na występujące wówczas zachowanie się koni. Dodatkowo, w celu ewentualnej konieczności weryfikowania lub uszczegółowienia obserwacji bezpośredniej stosowano zapis kamerami cyfrowymi Sanyo Xacti VPC-WH1, Moriguchi, Japonia [P2A4]. Podobnie, jak w przypadku analizy parametrów HR/HRV, obserwacje przeprowadzano z uwzględnieniem etapów i faz badawczych.

W przypadku pracy P1A1 (*test zaburzenia hierarchii dominacji*) w grupie cech wskazujących na zaniepokojenie koni analizie poddano częstość wokalizacji, defekacji/oddawania moczu, wysokiej pozycji głowy i ogona, tendencji do przebywania

blisko innych koni, przylegania bokiem do boku drugiego konia (tzw. klejenia się), stulonych lub skierowanych do przodu uszu. W celu określenia oznak spokoju analizowano czas odpoczynku, senności, zabawy, częstość wzajemnych interakcji pielęgnacyjnych i częstość rozkładania uszu na boki. Poza tym, aktywność lokomotoryczną uwzględniono w odniesieniu do czasu stępa, kłusa, galopu, podskoków i pojedynczych kroków (czyli nie więcej niż trzech) [P1A1]. Zwiększoną aktywność lokomotoryczną uznano za oznakę pobudzenia.

Behawior koni w pracy P2A4 podczas *testu nowego obiektu: żywy/nieżywy ruchomy obiekt* analizowano natomiast pod względem długości pobytu w wybranym sektorze wybiegu oraz częstości i całkowitego czasu trwania wybranych zachowań „alarmowych”. Do analizowanych zachowań „alarmowych” zaliczono liczbę wokalizacji, parskania (silne, głośne wydmuchanie powietrza przez nozdrza), defekacji oraz całkowity czas trwania (s) zachowań ostrzegawczych, takich jak trzymanie ogona wysoko (powyżej linii poziomej w stosunku do jego podstawy) oraz wysoko utrzymywanej głowy i szyi (powyżej linii poziomej w stosunku do kłębu). Ponadto, podczas *testu podejścia do obiektu: żywy/nieżywy ruchomy obiekt*, eksperymentator oceniał intensywność odczuwanego strachu przez konia podczas badania, zaznaczając punkt na wizualnej skali analogowej (VASf). Ocena VASf była dotychczas stosowana w badaniach do oceny subiektywnych odczuć u ludzi, np. [van Duinen i in., 2008; Hornblow i Kidson, 1976] oraz w weterynarii do pomiaru nasilenia bólu u konia [De Grauw i Van Loon, 2016; Sutton i in., 2013].

W pracy P3A3 podczas *testu współtowarzyszenia gatunków* określono też łączny czas (s) trwania stępa, kłusa i galopu oraz czas stania.

Podczas *testu konia izolowanego* w pracy o symbolu P4A2 określono liczbę defekacji, częstość wokalizacji, częstość grzebania przednią kończyną konia oraz chodzenie po boksie z uwzględnieniem krótkotrwałego i ciągłego wystąpienia tej cechy (krótkotrwała i ciągła aktywność). Określono również przeważający rodzaj chodu podczas powrotu koni luzem ze stajni do bramy wybiegu, co nazwano sposobem powrotu do stada: stęp, kłus, galop (ponad 50% dystansu) lub ewentualny brak dołączenia do stada z wyboru konia. Ponadto, w tejże pracy przeprowadzono pomiar czasu od momentu wejścia opiekuna przez bramę na teren wybiegu w celu złapania konia i przejścia z koniem do bramy do momentu wyjścia z wybiegu. Oceniane było też zachowanie się koni w tym czasie. W celu ujednoczenia uzyskanych wyników cechy czasowe i liczbowe pogrupowano w przedziały wartości, przydzielając następnie punkty od 0 do 5 każdej z nich. Cechę stanowiącą końcowy wynik sumaryczny określono jako ‘efekt izolacji’.

## Metody statystyczne

Wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania STATISTICA 13.3 i R 4.0.3 (StatSoft, Kraków, Polska) [P1A1], SAS 9.4 (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA) [P2A4, P3A3, P4A2]. W każdym przypadku przeprowadzono analizę rozkładu danych: w pracy P1A1 testem Shapiro–Wilka, w pracy P2A4, P3A3, P4A2 testem Kołmogorowa–Smirnowa, a ponadto w pracy P3A3 testem Cramera-von Mises’a i Andersona-Darlinga.

W dalszym kroku w pracy oznaczonej symbolem P1A1 zastosowano test Friedmana (nieparametryczny odpowiednik jednoczynnikowej analizy wariancji), ponieważ rozkład analizowanych w tym przypadku danych behawioralnych i lokomotorycznych nie był zgodny z rozkładem normalnym ( $p < 0.05$ ). Analizę porównań wielokrotnych median „post-hoc” przeprowadzono przy użyciu testu Wilcoxon dla zmiennych zależnych, stosując korektę Bonferroniego. W przypadku HR/HRV stwierdzono zgodność rozkładu danych z rozkładem normalnym ( $p > 0.05$ ), dlatego zastosowano wielowymiarową analizę wariancji (MANOVA) dla powtarzanych pomiarów. Istotność różnic między średnimi określono w tym przypadku testem Tukey’a przy  $\alpha = 0.05$ .

W przypadku pracy o symbolu P2A4 częstość występowania zachowań alarmowych i czas ich trwania były wartościami niezwykle niskimi, więc zmienne te nie były dalej analizowane. Czas spędzony w sektorach, efekt sektora, bodźca (nowy obiekt), jak również interakcję bodźca z sektorem oceniono za pomocą uogólnionych modeli mieszanych (GLIMMIX). Parametr HR nie był zgodny z rozkładem normalnym ( $p < 0.05$ ), więc został znormalizowany przy użyciu funkcji logarytmicznej. Wpływ płci i wieku na HR, RMSSD i VASf, bodziec, interakcję bodźca z VASf analizowano za pomocą GLIMMIX, zakładając rozkład Gaussa dla HR i RMSSD oraz rozkład Poissona dla VASf. Wszystkie modele zawierały losowy czynnik zwierzęcia i korektę Tukey’a uwzględniającą powtarzane pomiary na tych samych zwierzętach. Do obliczenia statystyk i błędów standardowych na oryginalnej skali zmiennych wykorzystano procedurę ILINK dla wartości po normalizacji, przedziały ufności przedstawiono jako miarę wariancji. W celu zbadania zgodności oceny strachu (VASf) z parametrami HR i RMSSD obliczono korelacje rangowe Spearmana.

W pracy o symbolu P3A3 istotność wpływu czynników stałych (kolejne badanie, płeć i wiek konia) na badane cechy weryfikowano przy użyciu wieloczynnikowej analizy wariancji (procedura GLM). Istotności różnic między średnimi określono za pomocą porównań wielokrotnych Tukey’a ( $\alpha = 0.05$ ). W etapach doświadczenia uwzględniono wyniki z pierwszych pięciu minut testowania i z całego okresu testowania, czyli 15 minut.

W pracy o symbolu P4A2 zdefiniowano czynniki stałe, takie jak płeć, ośrodek utrzymujący koni i rodzaj użytkowania oraz dodatkowo (dla wybranych modeli): sposób powrotu do stada, wystąpienie defekacji, krótkotrwała i ciągła aktywność w boksie oraz częstość grzebania przednią kończyną konia. Analizowana była zmienność następujących cech: spoczynkowa częstość rytmu serca, izolacyjna częstość rytmu serca, różnica w częstości rytmu serca, spoczynkowa częstość oddechów, izolacyjna częstość oddechów, różnica w częstości oddechów, punkty za tzw. efekt izolacji oraz liczba wokalizacji, z tym, że dwie ostatnie cechy, ze względu na strukturę danych, nie zostały wykorzystane we wszystkich obliczeniach. Analizę wpływu zastosowania izolacji na zmianę częstości rytmu serca i częstości oddechów przeprowadzono w oparciu o test t-Studenta dla zmiennych zależnych. Następnie obliczono współczynniki korelacji rangowych Spearmana wraz z istotnościami ( $\alpha=0,05$ ), pomiędzy cechami takimi jak: spoczynkowa częstość rytmu serca, izolacyjna częstość rytmu serca, różnica w częstości rytmu serca, spoczynkowa częstość oddechów, izolacyjna częstość oddechów, różnica w częstości oddechów, punkty za tzw. efekt izolacji, liczba wokalizacji. Następnie badano wpływ czynników takich jak: płeć, ośrodek, rodzaj użytkowania, sposób powrotu do stada, wystąpienie defekacji, krótkotrwała aktywność, ciągła aktywność i częstość grzebania przednią kończyną konia na wartość takich cech, jak spoczynkowa częstość rytmu serca, izolacyjna częstość rytmu serca, różnica w częstości rytmu serca, spoczynkowa częstość oddechów, izolacyjna częstość oddechów, różnica w częstości oddechów. W analizie wykorzystano test Wilcozona oraz test  $\text{Chi}^2$  Kruskala-Wallisa. Dla efektów stałych o istotnym wpływie na poziom analizowanych cech (punkty za tzw. efekt izolacji, defekacja, krótkotrwała aktywność, ciągła aktywność, częstość grzebania przednią kończyną konia) zastosowano parzystą analizę dwustronnych porównań wielokrotnych, wykorzystując metodę Dwassa, Steela i Critchlowa-Flignera.



## WYNIKI

W wyniku przeprowadzenia *testu zaburzenia hierarchii dominacji* [P1A1] odnotowano istotny wpływ kolejnej fazy testu i kombinacji testu, czyli izolacji kolejnych grup koni na większość cech behawioralnych, lokomotorycznych i parametrów HR/HRV pozostałych członków stada (tab. 1). Wyjątek stanowił jedynie czas odpoczynku, senności i stępa.

Tabela 1. Wpływ warunków eksperymentalnych na analizowane cechy

| Cechy behawioralne            | p-value | Cechy lokomotoryczne  | p-value |
|-------------------------------|---------|-----------------------|---------|
| Wokalizacja                   | 0.0020  | Stęp                  | 0.0716  |
| Defekacja/oddawanie moczu     | 0.0344  | Kłus                  | 0.0029  |
| Wysoka pozycja głowy          | 0.0001  | Galop                 | 0.0022  |
| Wysoka pozycja ogona          | 0.0002  | Podskoki              | 0.0210  |
| „Klejenie się” do innych koni | 0.0068  | Pojedyncze kroki      | 0.0274  |
| Postawa agresywna             | 0.0114  | Czynności rytmu serca | p-value |
| Odpoczynek                    | 0.3801  | HR                    | 0.0002  |
| Senność                       | 0.1740  | RMSSD                 | 0.0002  |
| Zabawa                        | 0.0002  |                       |         |
| Wzajemna pielęgnacja          | 0.0011  |                       |         |
| Uszy skierowane do przodu     | 0.0205  |                       |         |
| Uszy skierowane na boki       | 0.0003  |                       |         |
| Uszy stulone                  | 0.0015  |                       |         |

W zakresie odpowiedzi na pierwszą część hipotezy, tj. czy wystąpiły istotne różnice w cechach behawioralnych, lokomotorycznych i parametrach rytmu serca w pozostałym stadzie (z wyłączeniem klaczy oddzielonych) pomiędzy kolejnymi fazami eksperymentu, niezależnie od kombinacji testu, stwierdzono, że zmienne wzrosły w 78,6% tych cech (w tym HR) w fazie zaburzenia hierarchii dominacji (Mdn. faza II: 104.00) w porównaniu z fazą poprzedzającą zaburzenie (Mdn. faza I: 80.67). Wyniki były natomiast podobne w zakresie cechy o nazwie „klejenie się” do innych koni (Mdn. faza I: 8.00 vs faza II: 8.33). Obniżyła się natomiast istotnie częstość pojawiania się wzajemnego pielęgnowania (Mdn. faza I: 7.00 vs faza II: 5.00) i uszu skierowanych na boki (Mdn. faza I: 10.00 vs faza II: 5.33). Porównując fazę po zaburzeniu hierarchii (faza III) z fazą zaburzenia hierarchii (faza II) nie zaobserwowano wzrostu wartości analizowanych cech, przy czym połowa z tych cech (w tym HR) utrzymywała się na podobnym poziomie (Mdn. faza III: 104.67 vs faza II: 104.00), zaś druga obniżyła się (tj. np. wokalizacja (Mdn. faza II: 2.33 vs faza III: 0.67), wysoka pozycja głowy (Mdn. faza II: 8.00 vs faza III: 2.33), wysoka pozycja ogona (Mdn. faza II: 6.33 vs faza III: 2.67), ‘klejenie się’ do innych koni (Mdn. faza II: 8.33 vs faza III: 5.67), uszy skierowane do przodu (Mdn. faza II: 11.00 vs faza III: 6.67), uszy

stulone (Mdn. faza II: 16.00 vs faza III: 8.00) i czas klusa (Mdn. faza II: 125.67 vs faza III: 67.00)).

W zakresie odpowiedzi na drugą część hipotezy, tj. czy reakcja koni wchodzących w skład stada różniła się w kolejnych kombinacjach testu, czyli gdy zostały oddzielone klacze o różnej pozycji hierarchicznej, nie stwierdzono jednoznacznych wyników. W analizie uwzględniono tylko te cechy, które wykazały statystycznie istotne różnice ( $p < 0,05$ ) między medianami w fazie zaburzenia hierarchii dominacji. Analogiczne różnice w pozostałych dwóch fazach (defekacja/oddawanie moczu, wysoka pozycja głowy, uszy skierowane do przodu, klus, pojedyncze kroki, HR i RMSSD) nie były natomiast brane pod uwagę. Cechy o nazwie zabawa (Mdn. test 2: 2.00 vs test 1: 7.00), uszy stulone (Mdn. test 2: 6.00 vs test 1: 22.00), wysoka pozycja ogona (Mdn. test 2: 3.00 vs test 1: 9.00), 'klejenia się' do innych koni (Mdn. test 2: 8.00 vs test 1: 13.00) oraz wzajemna pielęgnacja (Mdn. test 2: 1.00 vs test 1: 4.00) były niższe podczas oddzielenia od stada klaczy o różnej pozycji hierarchicznej w porównaniu do pierwszej kombinacji testu, kiedy oddzielono klacze o najwyższej pozycji hierarchicznej. Cechy w trzeciej kombinacji testu, czyli kiedy oddzielono klacze o najniższej pozycji hierarchicznej w porównaniu do drugiej kombinacji testu były podobne w 70,0% przypadków. Istotnie niższe wartości dotyczyły jedynie wokalizacji (Mdn. test 3: 0.00 vs test 2: 3.00), a wyższe w przypadku wzajemnej pielęgnacji (Mdn. test 3: 11.00 vs test 2: 1.00) i podskoku (Mdn. test 3: 72.00 vs test 2: 34.00). Ponadto, cechy o nazwie zabawa, uszy stulone i galop nie różniły się w pierwszej i trzeciej kombinacji testu. Wokalizacja (Mdn. test 1: 3.00 vs test 3: 0.00), wysoka pozycja ogona (Mdn. test 1: 9.00 vs test 3: 1.00) i 'klejenie się' do innych koni (Mdn. test 1: 13.00 vs test 3: 5.00) były niższe w trzeciej kombinacji testu w porównaniu do pierwszej kombinacji testu. Wyższe wartości charakteryzowały natomiast w tym przypadku agresywną postawę (Mdn. test 1: 0.00 vs test 3: 4.00), wzajemna pielęgnacja (Mdn. test 1: 4.00 vs test 3: 11.00), uszy skierowane na boki (Mdn. test 1: 2.00 vs test 3: 8.00) i podskoki (Mdn. test 1: 34.00 vs test 3: 72.00).

W pracy o symbolu P4A2 nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu efektów stałych, takich jak płeć, ośrodek i rodzaj użytkowania na wartość analizowanych cech. Równocześnie potwierdzono wpływ izolacji na częstość rytmu serca i częstość oddechów (tab. 2), a następnie istotne różnice pomiędzy częstością rytmu serca i częstością oddechów mierzonych w spoczynku i po izolacji. Częstość rytmu serca wyniosła odpowiednio  $27.3 \pm 2.2$  vs  $30.6 \pm 7.8$ , a częstość oddechów  $8.9 \pm 1.3$  vs  $9.9 \pm 2.7$ .

Tabela 2. Wpływ izolacji na częstość rytmu serca i częstość oddechów

| Różnice wartości parametru po izolacji i w spoczynku | $\mu$ | SE   | t value | Pr. >  t |
|--|-------|------|---------|----------|
| Częstość rytmu serca                                 | -4.38 | 0.79 | -5.57   | <0.01    |
| Częstość oddechów                                    | -1.42 | 0.23 | -6.19   | <0.01    |

Odnotowano ponadto, że współczynniki korelacji między analizowanymi w tej pracy cechami okazały się w niespełna 68% istotne statystycznie. W grupie korelacji istotnych, 26% stanowiło korelacje ujemne. Spoczynkowa częstość oddechów i spoczynkowa częstość rytmu serca była w najmniejszej liczbie przypadków skorelowana z pozostałymi cechami. Izolacyjna częstość oddechów była natomiast istotnie skorelowana ze wszystkimi cechami. Punkty za tzw. efekt izolacji jako jedyna cecha ujemnie korelowała z innymi cechami.

W przypadku koni, które wracały galopem do stada wystąpiła istotnie wyższa spoczynkowa częstość oddechów, izolacyjna częstość oddechów i różnica w częstości oddechów (odpowiednio: 9.70; 11.90; 2.20 oddechy/min.) w porównaniu do koni, które wracały do stada stępem (odpowiednio: 7.50; 8.50; 1.00 oddechy/min.) i kłusem (odpowiednio: 8.62; 9.62; 1.00 oddechy/min.). Izolacyjna częstość rytmu serca różniła się natomiast jedynie między końmi wracającymi do stada stępem (29.00 ud./min.) w porównaniu do koni wracających galopem (35.00 ud./min.).

U koni z odnotowaną defekacją podczas izolacji odnotowano istotnie wyższą izolacyjną częstość rytmu serca, różnicę w częstości rytmu serca i różnicę w częstości oddechów (odpowiednio: 34.44 ud./min.; 6.44 ud./min.; 2.11 oddechów/min.) w porównaniu do koni, które nie defekowały (odpowiednio: 30.35 ud./min.; 3.29 ud./min.; 1.06 oddechów/min.). W pozostałych przypadkach istotnych różnic nie odnotowano.

Spoczynkowa częstość rytmu serca i izolacyjna częstość rytmu serca była istotnie niższa u koni z odnotowaną „krótkotrwałą aktywnością” (odpowiednio: 26.73 ud./min.; 30.24 ud./min.) w porównaniu do koni, u których nie było efektu tego czynnika (odpowiednio: 27.93 ud./min.; 31.87 ud./min.).

W grupie koni z odnotowaną „ciągłą aktywnością” wartość izolacyjnej częstości rytmu serca, różnicy w częstości rytmu serca, spoczynkowej częstości oddechów, izolacyjnej częstości oddechów i różnicy w częstości oddechów (odpowiednio: 35.22 ud./min.; 7.11 ud./min.; 9.56 oddechów/min.; 11.67 oddechów/min.; 2.11 oddechów/min.) była istotnie wyższa od wartości odnotowanych, gdy „ciągła

aktywność” nie występowała (odpowiednio: 29.94 ud./min.; 2.94 ud./min.; 8.53 oddechów/min.; 9.59 oddechów/min.; 1.06 oddechów/min.).

Konie, u których wystąpiła cecha ‘grzebanie kończyną’ po izolacji, charakteryzowały się wyższą wartością izolacyjnej częstości rytmu serca, różnicy w częstości rytmu serca, izolacyjnej częstości oddechów i różnicy w częstości oddechów (odpowiednio: 35.40 ud./min.; 6.90 ud./min.; 11.90 oddechów/min.; 2.40 oddechów/min.), w porównaniu do koni, u których ‘grzebanie kończyną’ nie wystąpiło (odpowiednio: 29.50 ud./min.; 2.81 ud./min.; 9.31 oddechów/min.; 0.81 oddechów/min.).

W pracy oznaczonej symbolem P3A3 odnotowano wpływ czynnika kolejnego testu na 30% analizowanych cech (tab. 3). W grupie tych cech znalazły się wszystkie trzy cechy lokomotoryczne, trzy parametry z okresu testowania (HR, RMSSD, LF/HF), trzy z okresu po testowaniu (HR, RMSSD, LF) i jeden parametr z okresu spoczynku (LF/HF).

Tabela 3. Cechy, w przypadku których odnotowano istotny wpływ czynnika kolejnego testu ( $P \leq 0.05$ )

| Cecha                            | DF | Suma kwadratów typu Typ III | Średni kwadrat | Wartość F | Pr. > F |
|----------------------------------|----|-----------------------------|----------------|-----------|---------|
| Stanie                           | 3  | 328262.2375                 | 109420.7458    | 7.69      | 0.0002  |
| Step                             | 3  | 139415.7375                 | 46471.9125     | 4.56      | 0.0055  |
| Kłus/galop                       | 3  | 571903.3000                 | 190634.4333    | 51.74     | <.0001  |
| HR15<br>podczas<br>testowania    | 3  | 9007.261111                 | 3002.420370    | 9.69      | <.0001  |
| HR po<br>testowaniu              | 3  | 4784.437500                 | 1594.812500    | 6.12      | 0.0009  |
| RMSSD15<br>podczas<br>testowania | 3  | 14621.69028                 | 4873.89676     | 3.22      | 0.0276  |
| rMSSD po<br>testowaniu           | 3  | 27211.62250                 | 9070.54083     | 5.66      | 0.0015  |
| LF po<br>testowaniu              | 3  | 87147953.37                 | 29049317.79    | 3.33      | 0.0241  |
| LF/HF w<br>spoczynku             | 3  | 41438.38037                 | 13812.79346    | 4.65      | 0.0050  |
| LF/HF15<br>podczas<br>testowania | 3  | 633809.6458                 | 211269.8819    | 4.21      | 0.0083  |

Czas stania (s) na wybiegu przyjmował istotnie najwyższą wartość podczas testu stada koni z kozłami (test III:  $533.25 \pm 149.12$ ) i testu konia izolowanego z kozłami (test IV:  $539.15 \pm 91.59$ ). Cecha ta osiągnęła najniższą wartość podczas testu izolacji konia (test II:  $381.90 \pm 144.63$ ). W trakcie testu kontrolnego stada czas stania przyjął natomiast wartość pośrednią (test I:  $458.35 \pm 82.04$ ). Czas stępa (s) był istotnie dłuższy od pozostałych podczas

testu kontrolnego stada koni (test I:  $419.15 \pm 81.21$ ), a najkrótszy w trakcie testu izolacji konia (test II:  $303.20 \pm 108.79$ ). W przypadku dwóch pozostałych testów wartości były pośrednie (test III:  $346.70 \pm 127.20$  i test IV:  $344.30 \pm 85.92$ ). Kłus/galop (s) charakteryzował się wartością istotnie wyższą od pozostałych podczas testu izolacji konia (test II:  $214.90 \pm 111.62$ ). Pozostałe wartości nie różniły się natomiast istotnie (test I:  $22.50 \pm 20.22$ ; test III:  $20.05 \pm 35.13$ ; test IV:  $16.55 \pm 29.06$ ).

Spoczynkowe HR, które zamykało się w przedziale od test I:  $36.00 \pm 2.05$  do test IV:  $38.15 \pm 4.11$ , nie różniło się istotnie między sobą. Parametr HR mierzony w trakcie pierwszych 5 min. testowania był istotnie wyższy od pozostałych w teście izolacji konia (test II:  $72.50 \pm 25.95$ ) i w teście konia izolowanego z kozłami (test IV:  $49.65 \pm 4.61$ ). Parametr HR w trakcie 15 min. testowania był najwyższy podczas testu konia izolowanego z kozłami (test IV:  $75.27 \pm 25.02$ ). Wartość ta była równocześnie zbliżona do odnotowanej w teście izolacji konia (test II:  $69.83 \pm 22.84$ ). Najniższe HR<sub>15</sub> podczas testowania wystąpiło podczas testu stada koni z kozłami (test II:  $48.67 \pm 4.96$ ). Wartość ta była zbliżona do uzyskanej w czasie testu kontrolnego stada koni (test I:  $56.00 \pm 9.82$ ). Wartości z testu I i II były również do siebie zbliżone. Parametr HR po teście przyjmował najwyższą wartość podczas testu konia izolowanego z kozłami (test IV:  $66.00 \pm 23.91$ ) i testu izolacji konia (test II:  $58.80 \pm 19.82$ ). Druga z tych wartości była równocześnie zbliżona do odnotowanej w teście kontrolnym stada koni (test I:  $49.85 \pm 9.04$ ) i teście stada koni z kozłami (test III:  $46.20 \pm 6.35$ ).

Istotne różnice między RR w spoczynku w kolejnych testach nie wystąpiły (w przedziale od  $1589.90 \pm 169.14$  do  $1670.40 \pm 101.20$ ). RR<sub>5</sub> podczas testowania był istotnie wyższy od pozostałych w teście kontrolnym stada koni (test I:  $1142.30 \pm 277.12$ ) i teście stada koni z kozłami (test III:  $1215.15 \pm 132.99$ ). RR<sub>15</sub> podczas testowania był istotnie wyższy od pozostałych w teście stada koni z kozłami (test III:  $1251.50 \pm 144.96$ ) i teście kontrolnym stada koni (test I:  $1121.87 \pm 194.20$ ). Druga z tych wartości była równocześnie zbliżona do uzyskanej podczas testu konia izolowanego (test II:  $959.80 \pm 312.87$ ). Dalej, wartość ta była zbliżona do odnotowanej w teście konia izolowanego z kozłami (test IV:  $898.20 \pm 306.90$ ).

Spoczynkowe RMSSD (w przedziale od  $97.74 \pm 23.71$  do  $114.92 \pm 38.09$ ) i rMSSD<sub>5</sub> podczas testowania (w przedziale od  $65.66 \pm 51.04$  do  $92.51 \pm 37.71$ ) nie różniły się istotnie podczas kolejnych testów. W przypadku RMSSD<sub>15</sub> podczas testowania i RMSSD po testowaniu, wartości wyższe od pozostałych wystąpiły w teście stada koni z kozłami (odpowiednio: test III:  $96.33 \pm 34.76$ ;  $103.75 \pm 42.46$ ) i teście kontrolnym stada koni (odpowiednio: test I:  $73.14 \pm 29.74$ ;  $77.43 \pm 35.01$ ), z tym że druga z tych wartości była równocześnie zbliżona do uzyskanych w teście konia izolowanego (odpowiednio: test II:

62.89±42.14; 63.78±42.10) i teście konia izolowanego z kozłami (odpowiednio: test IV: 63.61±47.55; 54.94±42.71).

Spoczynkowe wartości LF (w przedziale od 3142.55±1919.71 do 4721.39±2313.17), LF5 podczas testowania (w przedziale od 3675.25±4056.18 do 4746.33±3727.34) i LF15 podczas testowania (w przedziale od 3219.63±2948.68 do 4769.70±2791.97) nie różniły się istotnie w kolejnych testach. Istotne różnice wystąpiły natomiast w przypadku LF po testowaniu. Najwyższą wartość odnotowano w teście stada koni z kozłami (test III: 4890.61±2445.00), a najniższą w teście konia izolowanego z kozłami (test IV: 2023.21±2082.74). Parametr ten w pozostałych dwóch testach przyjmował wartości zbliżone do wartości najwyższej i najniższej (test I: 3494.14±3453.20; test II: 4041.42±3644.05).

W przypadku spoczynkowego LF/HF wartość najwyższą odnotowano w teście stada koni z kozłami (test III: 185.91±62.51) i teście konia izolowanego z kozłami (test IV: 144.73±60.96). W przypadku drugiego z tych testów parametr ten był równocześnie zbliżony do uzyskanego w teście kontrolnym stada koni (test I: 125.74±51.96) i teście konia izolowanego (test II: 136.66±43.01).

W tabeli 4 przedstawiono cechy, w przypadku których odnotowano istotny wpływ czynnika płci. Do tych cech zaliczono czas stania, czas stępa oraz HR i RR po teście.

Tabela 4. Cechy, w przypadku których odnotowano istotny wpływ czynnika płci ( $P \leq 0.1$ )

|                  | DF | Suma kwadratów typu Typ III | Średni kwadrat | Wartość F | Pr. > F |
|------------------|----|-----------------------------|----------------|-----------|---------|
| Stanie           | 1  | 54123.50                    | 54123.50       | 3.80      | 0.0550  |
| Stęp             | 1  | 34804.05                    | 34804.05       | 3.42      | 0.0686  |
| HR po testowaniu | 1  | 743.77                      | 743.77         | 2.85      | 0.0955  |
| RR po testowaniu | 1  | 319594.41                   | 319594.41      | 3.74      | 0.0570  |

Czas stania klaczy podczas testów był istotnie krótszy od czasu stania wałachów (449.45±124.17 vs 506.88±140.34). Czas trwania stępa okazał się natomiast istotnie dłuższy u klaczy w porównaniu z wałachami (377.83±95.54 vs 328.85±116.94). Parametr HR po teście klaczy podczas testów był istotnie wyższy niż u wałachów (59.28±19.69 vs 51.15±15.19). W przypadku RR po teście sytuacja była natomiast odwrotna, gdzie uzyskano następujące wartości: 1108.28±313.22 (klacze) i 1257.13±303.63 (wałachy).

W pracy oznaczonej symbolem P2A4 określono natomiast wpływ analizowanych czynników na czas spędzony w każdym sektorze padoku badawczego podczas testu nowego obiektu (tab. 5).

Tabela 5. Wpływ badanych czynników na wyrażony w procentach całkowity czas spędzony przez konie w każdym sektorze padoku eksperymentalnego

| Zmienna                      | Sektor          | Bodziec      | Sektor*Bodziec | Płeć       | Wiek       |
|------------------------------|-----------------|--------------|----------------|------------|------------|
| <i>F; p</i>                  |                 |              |                |            |            |
| Czas spędzony w sektorze (%) | 16714.1; < 0.01 | 5.18; < 0.01 | 504.73; < 0.01 | 0.18; 0.67 | 0.38; 0.53 |

W kolejnym etapie analizy wyników stwierdzono, że konie spędzały istotnie różny czas w każdym sektorze, co miało miejsce bez uwzględnienia eksponowanego bodźca. We wszystkich warunkach konie istotnie unikały sektora w pobliżu eksponowania bodźca w porównaniu z sektorem środkowym ( $t = 23,5$ ,  $p < 0,01$ ) i sektorem najdalej od bodźca ( $t = 142,4$ ,  $p < 0,01$ ) Sektor najbardziej oddalony od bodźca był ponadto najbardziej preferowanym obszarem do przebywania (sektor środkowy vs. sektor najbardziej oddalony od bodźca,  $t = 163$ ,  $p < 0,01$ ).

Porównując natomiast czas spędzony w obecności różnych bodźców (żywy/nieożywiony nowy obiekt), najbardziej unikany bodźcem był pierwszy żywy ruchomy obiekt (duża krowa), a następnie nieożywiony ruchomy obiekt (pudło), dalej drugi żywy ruchomy obiekt (mała krowa) i na końcu badanie kontrolne. Najbardziej awersyjny bodziec, czyli duża krowa, powodował, że konie spędzały najmniej czasu w sektorze najbliższym bodźca w porównaniu z pobytem kontrolnym, kiedy bodźca nie eksponowano ( $t = 39,2$ ,  $p < 0,01$ ), kiedy eksponowano małą krowę ( $t = 39,7$ ,  $p < 0,01$ ) lub kiedy eksponowane było pudło ( $t = 24,2$ ,  $p < 0,01$ ). Pudło było mniej awersyjne niż duża krowa, ale przyczyniało się do spędzenia mniej czasu w sektorze najbliższej bodźca, niż podczas eksponowania małej krowy ( $t = 16,0$ ,  $p < 0,01$ ) i podczas nie eksponowania bodźca ( $t = 15,5$ ,  $p < 0,01$ ). Ponadto, nie było różnic w czasie przebywania w sektorze najbliższej bodźca, gdy eksponowano małą krowę oraz gdy bodziec w ogóle nie był eksponowany ( $t = 0,46$ ,  $p = 1,00$ ).

W środkowym sektorze, czas przebywania był istotnie wyższy, gdy koniom była eksponowana duża krowa, niż gdy było eksponowane pudło ( $t = 5,91$ ,  $p < 0,01$ ), mała krowa ( $t = 15,2$ ,  $p < 0,01$ ) i gdy nie eksponowano bodźca ( $t = 12,4$ ,  $p < 0,01$ ). Obecność pudła

przyczyniła się do dłuższego czasu spędzanego w sektorze najbliższym bodźca, niż gdy była tam eksponowana mała krowa ( $t = 9,43$ ,  $p < 0,01$ ) lub gdy bodźca w ogóle nie było ( $t = 6,32$ ,  $p < 0,01$ ).

Analogicznie, konie przebywały najdłużej w sektorze najbardziej oddalonym od bodźca podczas ekspozycji dużej krowy w porównaniu do ekspozycji pudła ( $t = 8,73$ ,  $p < 0,01$ ), małej krowy ( $t = 23,0$ ,  $p < 0,01$ ) oraz do badania kontrolnego ( $t = 25,1$ ,  $p < 0,01$ ). Widok pudła przyczynił się natomiast do spędzenia dłuższego czasu w sektorze najbardziej oddalonym od bodźca niż kiedy eksponowano małą krowę ( $t = 16,4$ ,  $p < 0,01$ ) i kiedy nie eksponowano żadnego bodźca ( $t = 8,73$ ,  $p < 0,01$ ).

W kolejnym kroku analizie poddano wyniki koni uzyskane po przeprowadzeniu testu podejścia do obiektu. Wpływ kolejnego zatrzymania, bodźca, płci i wieku koni na parametry ich rytmu serca (HR, RMSSD) i skalę oceny VASf zaprezentowano w tabeli 6.

Tabela 6. Wpływ zatrzymania, bodźca, interakcji zatrzymania i bodźca oraz płci i wieku dla HR, RMSSD i VASf.

| Analizowane cechy | Zatrzymanie | Bodziec       | Zatrzymanie *Bodziec | Płeć       | Wiek       |
|-------------------|-------------|---------------|----------------------|------------|------------|
| <b>F; p</b>       |             |               |                      |            |            |
| HR (ud./min)      | 0.29; 0.89  | 133.0; < 0.01 | 0.61; 0.77           | 5.27; 0.02 | 2.42; 0.12 |
| RMSSD (ms)        | 1.44; 0.22  | 25.24; < 0.01 | 0.90; 0.52           | 6.48; 0.01 | 0.52; 0.47 |
| VASf (mm)         | 4.13; 0.01  | 7.78; < 0.01  | 1.47; 0.17           | 0.07; 0.78 | 1.34; 0.25 |

Generalnie, HR osiągnął najwyższy poziom (64,7 ud./min.) podczas wspomnianego testu, gdy eksponowano krowę. Sytuacja ta skutkowała istotnie wyższym poziomem tego parametru niż podczas testu kontrolnego (o 13,9 ud./min.,  $t = 13,6$ ;  $p < 0,01$ ) i ekspozycji pudła (o 14,9 ud./min.,  $t = 11,5$ ;  $p < 0,01$ ). Ponadto, klacze charakteryzowały się wyższym HR niż wałachy (o 6,7 ud./min.,  $F = 5,27$ ;  $p = 0,02$ ). Podobnie, ekspozycja krowy wywołała niższy poziom RMSSD (43,3 ms) niż test kontrolny (o 28,4 ms,  $F = 12,0$ ;  $p < 0,01$ ) i ekspozycja pudła (39,7 ms,  $F = 14,0$ ;  $p < 0,01$ ). Klacze generalnie charakteryzowały się niższym RMSSD niż wałachy (o 28,7 ms,  $F = 6,48$ ;  $p < 0,01$ ).

HR (od  $48.35 \pm 4.87$  do  $70.3 \pm 24.14$ ) i RMSSD (od  $46.52 \pm 27.16$  do  $85.90 \pm 38.45$ ) nie różniły się między zatrzymaniami. Różnice wystąpiły wówczas w wynikach ze skali VASf (od  $3.95 \pm 6.64$  do  $25.00 \pm 37.00$ ). Wyniki te różniły się też w zależności od



eksponowanego bodźca. Według skali oceny człowieka, ekspozycja krowy i pudła wywoływała więcej strachu z każdym zatrzymaniem (z wyjątkiem pierwszego zatrzymania) niż podczas testu kontrolnego.

Wykazano też dodatnie korelacje wyników skali VASf z HR ( $r_s (n = 20) = 0,22, p < 0,01$ ) i ujemne korelacje z RMSSD ( $r_s (n = 20) = - 0,24, p < 0,01$ ) podczas kolejnych zatrzymań. Subiektywna ocena (VASf) i miary obiektywne (HR i RMSSD) były najczęściej skorelowane ze sobą podczas zatrzymania na przystanku najbardziej oddalonym od eksponowanej krowy i pudła. Podczas ostatniego zatrzymania tylko RMSSD korelowało ujemnie z VASf ( $p = 0,05$ ) w wariancie testu polegającego na eksponowaniu pudła.

## DYSKUSJA

Wpływ odseparowania od stada był często badany w odniesieniu do izolowanego osobnika [Yarnell i in., 2015]. Reakcje behawioralno-fizjologiczne koni pozostających w stadzie po separacji niektórych jego członków są natomiast poznane w stopniu niewystarczającym, co stało się inspiracją do rozpoczęcia badań z tego zakresu [P1A1]. Uzyskane wyniki wskazały, że współczesny sposób utrzymania koni może powodować zaburzenia życia stadnego. Zaobserwowane zmiany behawioralne, lokomotoryczne i czynności układu nerwowego wskazują na fakt, iż stado koni nie jest obojętne na separację jego członków. Dzieje się tak bez względu na pozycję hierarchiczną izolowanych osobników, co w badaniach własnych obrazowało się zwiększeniem częstości występowania m.in. wokalizacji, wysokiego ustawienia głowy i ogona, agresywnej postawy, a także czasu trwania kłusa, galopu, podskoków. Warto podkreślić, że podwyższeniu ulegała także częstość rytmu serca. Duża część zaobserwowanych form zachowania się jest typowa dla zwiększonej czujności i pobudzenia emocjonalnego [Christensen i in., 2005; Janczarek i in., 2020]. Dobrym przykładem jest w tym miejscu odnotowana u badanych klaczy pozycja uszu, które częściej niż przed separacją wybranych członków stada były trzymane do przodu lub były stulone. Według Halla i in. [2013], uszy skierowane do przodu są oznaką zainteresowania, czujności i uwagi, natomiast uszy stulone odzwierciedlają negatywny stan afektywny. Podobnie, zauważony spadek czasu wzajemnego pielęgnowania koresponduje również z wyższym pobudzeniem emocjonalnym [Shimada i Suzuki, 2020; van Dierendonck i in., 2004]. Hartmann i in. [2012] wskazują na wokalizację, czyli między m.in. rżenie, parskanie, na defekację, wzmożoną lokomotoryczność, grzebanie kończynami i przyjmowanie postawy charakterystycznej dla czujności jako behawior typowy dla separacji jednostki. Autorzy nie opisują jednak zachowania się pozostałej grupy, podkreślając równocześnie, że reakcje izolowanych osobników były bardzo zróżnicowane.

Ponadto, na negatywny wpływ separacji wybranych członków na pozostałą część stada wskazuje przewaga aktywności części współczulnej AUN nad antagonistyczną częścią przywspółczulną, co wskazuje na sytuację stresową. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem pierwszą część postawionej hipotezy.

W kolejnym kroku przeprowadzonego testu zbadano, czy powrót osobników po separacji zmienił reakcję w stadzie. Wyniki nie były jednak w tym przypadku już tak spektakularne, gdyż czas trwania i częstość wyrażania zarówno behawioru odzwierciedlającego pobudzenie emocjonalne zmniejszył się, a behawioru wskazującego na

uspokojenie pozostał na podobnym poziomie w porównaniu z separacją. Wydaje się, że powrót oddzielonych klaczy zaczął uspokajać stado, które odczuło ten stan jako przywracanie normalności.

Wyniki uwzględniające czynnik różnej kombinacji testu wskazały natomiast, że oddzielenie klaczy o różnym składzie hierarchicznym powodowało niejednoznaczne reakcje ze strony pozostałych członków stada. Dla przykładu, porównując wpływ odseparowania grupy o mieszanej pozycji hierarchicznej (druga kombinacja testu) od grupy o dominującej pozycji hierarchicznej (pierwsza kombinacja testu) na behavior, stwierdzono dłuższy czas galopu u tych pierwszych wskazując tym samym na wzrost ich pobudzenia emocjonalnego. Oddzielenie klaczy o uległej pozycji (trzecia kombinacja testu) i klaczy o pozycji mieszanej nie wykazało natomiast konsekwentnych tendencji do pobudzenia lub uspokojenia reszty stada. Odseparowanie grupy o uległej pozycji wydłużało czas podskoków wskazujący na pobudzenie, ale równocześnie wzmagało wzajemną pielęgnacją wykazującą uspokojenie. Z kolei, oddzielenie grupy uległej w porównaniu z grupą dominującą wywołało wzrost częstości pojawiania się postawy agresywnej i czasu podskoków, co świadczy o wyższym pobudzeniu emocjonalnym. Jednocześnie zwiększała się częstość występowania wzajemnej pielęgnacji i uszu skierowanych na boki, a zmniejszała częstość wokalizacji, wysokiej pozycji ogona i 'klejenia się' do koni, co wskazywało na tendencję do uspokojenia.

Reasumując warto podkreślić, że w przeciwieństwie do ewidentnych zmian w kierunku pobudzenia emocjonalnego wywołanych samym faktem separacji, reakcja na oddzielenie osobników o różnej pozycji hierarchicznej nie była już tak wyraźna. Tym samym wyniki badań nie dostarczają dowodów na poparcie drugiej części hipotezy. Można zatem sugerować, że członkom stada było obojętne, jakie klacze zostały oddzielone. Najprawdopodobniej wydarzyło się tak, gdyż relacje dominacji nie mogły ulec zmianie w stadzie, ponieważ okres zaburzenia hierarchii był za krótki. Być może dominująca klacz lub klacze są potrzebne innym członkom w stadzie dopiero w przypadku np. przerażenia lub ochrony przed realnym zagrożeniem. Przypuszczalnie separacja przeprowadzona na potrzeby omawianego badania nie dostarczyła aż tak silnych wrażeń, by pozostałe klacze szukały wsparcia lidera. Według Hartmanna i in. [2012], główną wartością koni i innych gatunków żyjących w grupach jest możliwość wzajemnej czujności i co za tym idzie ochrony przed drapieżnikami. Funkcja ta jest przypisana każdemu osobnikowi bez względu na rangę społeczną, stąd też konsekwencje usunięcia z grupy koni o wyższej lub niższej randze mogą być przeceniane przez właścicieli tych zwierząt. Na tym etapie badań sugeruje się zatem, że pozycja hierarchiczna klaczy izolowanych od stada nie jest czynnikiem decydującym

o odpowiedzi pokazywanej przez pozostałych jego członków. W kontekście reasumpcji diskutowanych wyników ważne jest, że opierając się na stwierdzeniach opublikowanych przez Hartmanna i in. [2012], liczebność stada klaczy i liczebność separowanych osobników była wystarczająca do ekstrapolacji tego zjawiska na naturalnie żyjące stada koni. W sztucznych stadach może być natomiast przydatna do oceny reakcji na separację razem utrzymywanych klaczy i wałachów, co podkreśla Jørgensen i in. [2009]. Separacja części członków stada okazała się zatem stresująca dla jego pozostałej części, mimo że konie mogły być przyzwyczajone do takiego postępowania w ramach codziennej rutyny. Jak wspomniano na wstępie, separowanie poszczególnych koni jest systematycznie stosowane, stąd wyraźny wzrost pobudzenia emocjonalnego pokazuje, jak działalność człowieka w tym zakresie może być ważna dla dobrostanu koni. Wyniki własne wskazują zatem, że właściciele koni powinni brać pod uwagę pobudzenie w stadzie koni podczas separacji niektórych jego członków i stwarzać odpowiednie warunki dla takiego postępowania. Stado, nawet stworzone przez ludzi, zachowuje wrażliwość na chwilową utratę swoich członków. Pomimo tego, że takie sytuacje powtarzają się w praktyce, są one dla koni stresujące. Reakcja na wyodrębnienie ze stada członków o różnej pozycji hierarchicznej może oznaczać, że zarówno dominujący, jak i podporządkowani członkowie stada pełnią swoje role w jego konsolidacji, gdyż ich brak zaburza skład grupy.

Członkowie stada nie reagują zatem pozytywnie na utratę swoich członków, ale i koń odizolowany od swoich współtowarzyszy doznaje w mniejszym lub większym stopniu negatywnych emocji [Mendonça i in., 2019]. Niestety, współczesne użytkowanie koni wiąże się z koniecznością izolacji tych zwierząt [Henderson, 2007]. Wydaje się jednak, że przynajmniej niektóre konie mogą przyzwyczać się do nawet szeroko prowadzonej izolacji socjalnej [Henderson, 2007]. Przykładem są konie sportowe. Warto zatem odpowiedzieć na pytanie, co decyduje o tolerancji lub jej braku na omawiane zjawisko? Czy jest to tylko odpowiedni sposób zarządzania końmi podczas przyzwyczajania do izolacji, czy też o efekcie finalnym decydują względy osobnicze? Czy można zatem przewidzieć, które konie lepiej zniosą izolację, a które gorzej? Wyniki badań własnych częściowo odpowiadają na te pytania [P4A2]. Niektóre parametry testowane w tym badaniu (tj. izolacyjna częstość rytmu serca i oddechów, różnica w częstości rytmu serca i oddechów, punkty za tzw. efekt izolacji i częstość wokalizacji), były najczęściej ze sobą skorelowane. Niestety, liczba istotnych korelacji między spoczynkową częstością rytmu serca i spoczynkową częstością oddechów, które są najłatwiejsze do zbadania w warunkach polowych, okazały się w stosunkowo niewielkim stopniu powiązane z parametrami poizolacyjnymi. Można zatem zasugerować,

że wyniki dotyczące parametrów spoczynkowych nakazują poszukiwania innych rozwiązań badawczych, które pozwolą na wczesną ocenę zdolności przystosowawczych konkretnych koni do odosobnienia. W omawianej pracy podjęto też próbę zastosowania różnicy w wartości izolacyjnej i spoczynkowej tych parametrów. Wydaje się, że wartości te, co prawda nie mogą być prognostykiem skutków izolacji, ale za to powinny skutecznie oceniać omawiane zjawisko. Będą bowiem wskazywały na faktyczny stan zwierzęcia po izolacji, ale z uwzględnieniem parametrów spoczynkowych, które wyznaczają bazową pobudliwość emocjonalną, co nie pozwala ich zupełnie pomijać [Janczarek i in., 2018].

Ciekawe wyniki w zakresie oceny zjawiska izolacji socjalnej wystąpiły też podczas korelacji tzw. efektu izolacji z pozostałymi cechami fizjologicznymi i behawioralnymi. Paradoksalnie, konie, z którymi opiekun miał problem podczas schwytania na wybiegu lepiej znosiły izolację. Być może były po prostu bardziej samodzielne od innych, co obrazowały niechęcią do podporządkowania się człowiekowi i brakiem potrzeby wsparcia ze strony pozostałych członków stada. Podobnego zdania jest Stachurska i in. [2021b] wskazując, że konie o dominujących cechach charakteru są bardziej samodzielne od tych podległych.

Omawiając behavior koni izolowanych, warto zatrzymać się też przy jednym przypadku. A mianowicie, spoczynkowa częstość oddechów była istotnie wyższa u koni wracających do stada galopem w stosunku do koni wracających stępem lub kłusem oraz u koni niespokojnych w boksie izolacyjnym. Można zatem na tej podstawie pokusić się o sugestię, że konie z podwyższoną częstością oddechów w spoczynku mogą gorzej znosić izolację socjalną. Podobnego zdania jest Freeman [2008]. Autor ten stwierdził, że wspomniana sytuacja może mieć związek z większym zapotrzebowaniem na tlen i wzmoczoną wymianą gazową.

Wydaje się zatem, że chęć do socjalności w życiu obecnie utrzymywanych koni może być w znacznym stopniu zaburzona i nie można jej porównywać do relacji społecznych w stadzie koni żyjących na wolności. Nienaturalne warunki utrzymania i specyfika użytkowania zmienia behavior koni w sposób nieodwracalny. Podobnego zdania jest Silk [2007], który twierdzi, że socjalność ewoluuje, gdy bezpośrednie korzyści z bliskiego związku z innymi osobnikami przewyższają koszty, jakie ponosi organizm. Człowiek coraz częściej nie uwzględnia socjalnej natury koni, co może powodować, że zwierzęta te będą musiały nauczyć się „normalnego” funkcjonowania bez stada.

Droga koni do nauczenia się życia w izolacji wydaje się nadal daleka, co powoduje, że ciągle poszukuje się metod niwelowania skutków tego zjawiska [Cooper i McGreevy,

2007; Kay i Hall, 2009; Kędziński i in, 2017]. Dotychczas nie dowiedziono jednak wpływu towarzystwa innych gatunków zwierząt na niwelowanie skutków samotności koni. Powszechnie wiadomo, że takim gatunkiem jest koza domowa, której obecność, zwłaszcza przy koniach chorych, niestabilnych emocjonalnie lub po prostu odosobnionych, poleca chociażby Międzynarodowa Federacja Jeździecka [www.fei.org, 2022]. W pracy o symbolu P3A3 zbadano wpływ obecności kozłów na wybiegu na częstość i zmienność rytmu serca oraz lokomotoryczność koni w stadzie i koni izolowanych. Dla porównania, badania powtórzono bez obecności kozłów. Zaczynając od lokomotoryczności, okazuje się, że różnicował ją zastosowany w pracy układ eksperymentalny. Obecność kozłów w każdym przypadku zwiększała czas stania koni izolowanych w stosunku do standardowej izolacji. Zasugerowano zatem, że towarzystwo kozłów jest w stanie znacznie ograniczyć lokomotoryczność koni izolowanych, co według Kruegera i in. [2021], można uznać za wynik w pełni zadawalający w niwelowaniu skutków badanego zjawiska.

Izolacja socjalna nie tylko wzmaga lokomotoryczność, ale też wywołuje negatywne emocje [Malik, 1998]. Wyniki z zakresu pobudliwości emocjonalnej okazały się jednak różne od uzyskanych w przypadku cech lokomotorycznych. Izolacja socjalna spowodowała niepożądane zmiany parametrów HR i RR bez względu na towarzystwo kozłów lub też brak tego towarzystwa, co było zwłaszcza widoczne na początku (pierwsze pięć min.) izolacji. Można na tej podstawie sugerować, że początkowe chwile izolacji są silnym przeżyciem emocjonalnym, co potwierdzają wyniki badań Moons i in. [2005] oraz Mal i in. [1991]. Kolejne minuty stabilizują nieznacznie emocje koni, aczkolwiek stabilizacja ta nie jest na tyle znacząca, żeby przez 15 minut po izolacji doprowadzić organizm do stanu spoczynkowego. Można zatem stwierdzić, że towarzystwo kozłów nie blokuje wzrostu pobudzenia emocjonalnego koni izolowanych. Być może sytuacja ta zmieniłaby się podczas długotrwałego izolowania koni. Co ciekawe, towarzystwo kozłów uspokaja konie, ale przede wszystkim w stadzie. Konie prawdopodobnie postrzegają te zwierzęta jako rodzaj urozmaicenia środowiska pastwiskowego. Podobnego zdania jest Patkowski i in. [2019].

Wyniki z zakresu omawianej pracy co najwyżej częściowo potwierdziły postawioną w niej hipotezę, gdyż towarzystwo kozłów ogranicza aktywność lokomotoryczną izolowanych koni, ale niestety nie obniża pobudzenia emocjonalnego towarzyszącego temu zjawisku. Wyniki te są zgodne z opublikowanymi przez innych autorów, którzy wskazują na rozbieżność między sytuacyjnym behawiorem demonstrowanym przez konie a występującymi wówczas emocjami [Janczarek i in., 2019; Wilk i Janczarek, 2015].

Parametry aktywności AUN, czyli RMSSD charakteryzujący aktywność części przywspółczulnej, a dalej LF wskazujący na aktywność części współczulnej oraz LF/HF jako informacja o zrównoważeniu AUN [Janczarek i in., 2017; Malik, 1998] również nie pozwoliły określić jednoznacznego wpływu lub braku wpływu towarzystwa kozłów na niwelowanie skutków izolacji socjalnej koni. Warty podkreślenia jest natomiast zauważalny pozytywny wpływ towarzystwa kozłów na emocje koni w stadzie, na co wskazuje głównie parametr RMSSD. Co prawda, wyniki te nie potwierdzają zakładanej w pracy hipotezy, ale w zamian za to rzucają nowe światło na pozytywny wpływ użytych w doświadczeniu zwierząt na emocje koni w stadzie. Można zatem przypuszczać, że wprowadzenie nowych gatunków zwierząt do stada koni powinno niwelować złe emocje, napięcia i zaburzenia hierarchiczne. Socjalne wsparcie ze strony kozłów dla członków stada stworzonego przez człowieka, celem łatwiejszego zarządzania końmi, jest zatem możliwe. Problemy związane z izolacją koni nie zostają natomiast rozwiązane w obszarze emocjonalnym, mimo iż z punktu widzenia behawioralnego pozytywny efekt jest zauważalny.

Kolejnym gatunkiem zwierząt gospodarskich, które poddano ocenie pod kątem ewentualnego wykorzystania jako zwierzęta towarzyszące koniom, było bydło domowe [P2A4]. Jednakże wcześniejsze obserwacje własne i innych użytkowników koni wskazywały na występowanie reakcji lękowych u koni w bezpośredniej bliskości krów. Ponieważ współczesne konie rzeczywiście nie mają kontaktu z bydłem, można rozpatrywać reakcję konia na ekspozycję na przedstawicieli tego gatunku jako reakcję na nowy obiekt. Dlatego badanie rozszerzono dla porównania o wystawienie konia na obecność nieznanego, nieożywionego, ruchomego obiektu zbliżonego wielkością do wymiarów krowy. Wyniki badań potwierdziły wcześniejsze obserwacje – konie reagują na ekspozycję na kontakt z krową w stopniu zbliżonym do reakcji na test nowości [Wiśniewska i in. 2021]. Generalnie, konie nie zbliżały się do krowy z własnej woli. Obawa i strach przed nieznanym są cechami przetrwałymi u koni pomimo udomowienia [Górecka-Bruzda i in., 2017]. Nasilenie reakcji strachu u koni w teście podprowadzania konia w rękę do obiektu było stosunkowo niskie, co mogło być po części spowodowane obecnością człowieka, do którego konie mają zaufanie i postrzegają jego obecność jako wsparcie w trudnych sytuacjach [Górecka i in., 2007]. Ponadto, konie użytkowane przez człowieka łatwo akceptują kontakt z obiektami, które początkowo wywoływały strach [Christensen, 2013]. Wyniki przeprowadzonych badań wyraźnie wskazują również na silniej wyrażoną, negatywną reakcję na jedną z dwóch krów użytych jako nieznanymi obiektami. Taka reakcja potwierdza wcześniejsze doniesienia świadczące o tym, że konie posiadają zdolność do rozpoznawania indywidualnych cech

innych obiektów ożywionych [Proops i in., 2009]. Być może dochodziło także do specyficznej, międzygatunkowej komunikacji, np. z wykorzystaniem bodźców zapachowych, charakterystycznych dla zwierząt [Witzany, 2014]. Ponadto, pomiary parametrów rytmu serca w teście podprowadzania w rękę wykazały większą reaktywność klaczy, niż wałachów [Wiśniewska i in., 2021]. Zależność nasilenia poszczególnych reakcji koni i cech ich temperamentu w zależności od płci budzi duże zainteresowanie [Aune i in., 2020], zatem wyniki uzyskane w omawianym doświadczeniu mogą stanowić wkład do toczącej się na ten temat dyskusji w świecie nauki.



## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Generalnie, czasowe zaburzenie życia stadnego koni zawsze wywołuje u tych zwierząt negatywne emocje i reakcje behawioralne wskazujące na stres. W zakresie izolacji socjalnej warto natomiast podkreślić, że zapewnienie zastępczego wsparcia socjalnego może jedynie częściowo łagodzić skutki tego zjawiska. Należy więc kontynuować badania nad zastosowaniem procedur niwelujących stres izolacyjny u koni. Być może jednak nigdy nie uda się osiągnąć pełnej relaksacji u konia odseparowanego od stada.

Uzyskane wyniki pozwoliły też na opracowanie szczegółowych stwierdzeń i wniosków:

1) [P1A1] Krótkotrwała separacja niektórych członków stada koni powoduje wzrost aktywności lokomotorycznej, zmiany behawioralne oraz zmiany parametrów częstości i zmienności rytmu serca pozostałych członków stada wskazujące na zwiększone pobudzenie emocjonalne i niepokój. Reakcja ze strony pozostałych członków stada nie zależy od pozycji hierarchicznej odseparowanych osobników. Stado, nawet stworzone przez ludzi, zachowuje zatem wrażliwość na chwilową utratę swoich członków, co oznacza że zarówno dominujący, jak i podporządkowani jego członkowie pełnią swoje role w konsolidacji grupy, gdyż ich brak zaburza jej harmonię. Właściciele koni powinni brać pod uwagę pobudzenie emocjonalne w stadzie koni podczas separacji niektórych jego członków i stwarzać odpowiednie warunki dla takiego postępowania.

2) [P4A2] Płeć koni, procedury stosowane w ośrodku utrzymania koni - związane z różnym czasem trwania codziennych kontaktów społecznych (konie mniej lub bardziej przyzwyczajone do przebywania w samotności) oraz regularność i rodzaj użytkowania można zaliczyć do czynników, które nie mają wpływu na obraz krótkotrwałej izolacji socjalnej tych zwierząt. Ocena zdolności adaptacyjnych koni do izolacji wydaje się trudna do przeprowadzenia. Na tym etapie badań można zasugerować, że spoczynkową częstość oddechów oraz efekt izolacji (tj. czas potrzebny na odizolowanie konia od stada wraz z występującym w tym czasie behawiorem) najprawdopodobniej można zaliczyć do cech potencjalnie przydatnych w ocenie tego typu zdolności.

3) [P3A3] Towarzystwo kozłów na padoku może być uznane za co najwyżej częściowo niwelujące skutki izolacji socjalnej koni, gdyż nie ogranicza emocjonalnych skutków tego zjawiska. Zmniejsza się jednak wówczas lokomotoryczność koni, co może przyczynić się do planowanego ograniczania ruchu tych zwierząt podczas konieczności indywidualnego utrzymywania ich na padokach. Kozły w zagrodzie na padoku mogą natomiast stanowić pozytywny element urozmaicenia środowiska dla koni w stadzie.

Występujące w takim układzie obniżenie pobudliwości emocjonalnej koni można traktować jako relaksujący akcent ze strony innego gatunku zwierząt.

4) [P4A3] Konie nieprzyzwyczajone wcześniej do krów traktują je jak obiekty, których warto unikać, na co wskazuje behavior charakterystyczny dla zaniepokojenia, a także zmiany parametrów częstości i zmienności rytmu serca obrazujące wzrost pobudzenia emocjonalnego. Mimo, iż badane gatunki mogą być z powodzeniem wypasane razem, to jednak wydaje się, że bliska obecność krów nie wpływa dobrze na samopoczucie koni. Ponadto, krowy jako obiekty ożywione, a zatem nieprzewidywalne, mogą wywoływać większe unikanie niż obiekt ruchomy, ale nieożywiony. Interakcje i komunikacja między przedstawicielami tych dwóch gatunków wymaga opisanie i wyjaśnienia w dalszych badaniach.

## PIŚMIENNICTWO

1. Anderson, D. M., Hulet, C. V., Smith, J. N., Shupe, W. L., Murray, L. W. (1987). Bonding of young sheep to heifers. *Applied Animal Behaviour Science*, 19(1-2), 31-40. DOI: 10.1016/0168-1591(87)90200-0.
2. Aune, A., Fenner, K., Wilson, B., Cameron, E., McLean, A., McGreevy, P. (2020). Reported behavioural differences between geldings and mares challenge sex-driven stereotypes in ridden equine behaviour. *Animals*, 10(3), 414. DOI: 10.3390/ani10030414.
3. Boissy, A. (1995). Fear and fearfulness in animals. *The quarterly review of biology*, 70(2), 165-191.
4. Bourjade, M., Moulinot, M., Henry, S., Richard-Yris, M. A., Hausberger, M. (2008). Could adults be used to improve social skills of young horses, *Equus caballus*?. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 50(4), 408-417. DOI: 10.1002/dev.20301.
5. Bulens, A., Van Beirendonck, S., Van Thielen, J., Driessen, B. (2013). The enriching effect of non-commercial items in stabled horses. *Applied Animal Behaviour Science*, 143(1), 46-51. DOI: 10.1016/j.applanim.2012.11.012.
6. Cameron, E. Z., Setsaas, T. H., Linklater, W. L. (2009). Social bonds between unrelated females increase reproductive success in feral horses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13850-13853. DOI: 10.1073/pnas.0900639106.
7. Christensen, J. W. (2013). Object habituation in horses: The effect of voluntary versus negatively reinforced approach to frightening stimuli. *Equine Veterinary Journal*, 45(3), 298-301. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00629.x.
8. Christensen, J. W., Keeling, L. J., Nielsen, B. L. (2005). Responses of horses to novel visual, olfactory and auditory stimuli. *Applied Animal Behaviour Science*, 93(1-2), 53-65. DOI: 10.1016/j.applanim.2005.06.017.
9. Cobb, S. (1976). Social support as a moderator of life stress. *Psychosomatic medicine*, 38(5), 300-314.
10. Cooper, J., McGreevy, P. (2007). Stereotypic behaviour in the stabled horse: causes, effects and prevention without compromising horse welfare. In *The welfare of horses* (pp. 99-124). Springer, Dordrecht.
11. Corgan, M. E., Grandin, T., Matlock, S. (2021). Evaluating the Reaction to a Complex Rotated Object in the American Quarter Horse (*Equus caballus*). *Animals*, 11(5), 1383. DOI: 10.3390/ani11051383.
12. Cromsigt, J. P., Kemp, Y. J., Rodriguez, E., Kivitt, H. (2018). Rewilding Europe's large grazer community: how functionally diverse are the diets of European bison, cattle, and horses?. *Restoration Ecology*, 26(5), 891-899. DOI: 10.1111/rec.12661.

13. De Grauw, J. C., Van Loon, J. P. A. M. (2016). Systematic pain assessment in horses. *The veterinary journal*, 209, 14-22. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.07.030.
14. Diedericks, A.; Are Goats Good Companions for Horses. *Equestrian Space*. 2020. Available online: <https://equestrianspace.com/are-goats-good-companions-for-horses/> (dostęp 28.05.2022).
15. FEI. A Horse's Best Friend. 2018. Available online: <https://www.fei.org/stories/lifestyle/my-equestrian-life/horses-animal-companions> (dostęp 30.05.2022).
16. Feuerstein, N. L., Terkel, J. (2008). Interrelationships of dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus* L.) living under the same roof. *Applied Animal Behaviour Science*, 113(1-3), 150-165. DOI: 10.1016/j.applanim.2007.10.010.
17. Fischer, J., Kopp, G. H., Dal Pesco, F., Goffe, A., Hammerschmidt, K., Kalbitzer, U., ... Zinner, D. (2017). Charting the neglected West: The social system of Guinea baboons. *American Journal of Physical Anthropology*, 162, 15-31. DOI: 10.1002/ajpa.23144.
18. Freeman, D. W. (2008). Physical conditioning of horses. Oklahoma Cooperative Extension Service.
19. Fureix, C., Bourjade, M., Henry, S., Sankey, C., Hausberger, M. (2012). Exploring aggression regulation in managed groups of horses *Equus caballus*. *Applied Animal Behaviour Science*, 138(3-4), 216-228. DOI: 10.1016/j.applanim.2012.02.009.
20. Fureix, C., Jegou, P., Sankey, C., Hausberger, M. (2009). How horses (*Equus caballus*) see the world: humans as significant "objects". *Animal Cognition*, 12(4), 643-654. DOI: 10.1007/s10071-009-0223-2.
21. Gero, S., Gordon, J., Whitehead, H. (2015). Individualized social preferences and long-term social fidelity between social units of sperm whales. *Animal Behaviour*, 102, 15-23. DOI: 10.1016/j.anbehav.2015.01.008.
22. Giles, S. L., Nicol, C. J., Harris, P. A., Rands, S. A. (2015). Dominance rank is associated with body condition in outdoor-living domestic horses (*Equus caballus*). *Applied animal behaviour science*, 166, 71-79. DOI: 10.1016/j.applanim.2015.02.019.
23. Górecka-Bruzda, A., Jaworski, Z., Suwała, M., Boroń, M., Ogłuszka, M., Earley, B., Sobczyńska, M. (2017). Longitudinal study on human-related behaviour in horses—Can horses (*Equus caballus*) be de-domesticated?. *Applied Animal Behaviour Science*, 195, 50-59. DOI: 10.1016/j.applanim.2017.05.020.
24. Górecka, A., Bakuniak, M., Chruszczewski, M. H., Jezierski, T. A. (2007). A note on the habituation to novelty in horses: handler effect. *Animal Science Papers and Reports*, 25(3), 143-152.

25. Hall, C., Huws, N., White, C., Taylor, E., Owen, H., McGreevy, P. (2013). Assessment of ridden horse behavior. *Journal of Veterinary Behavior*, 8(2), 62-73. DOI: 10.1016/j.jveb.2012.05.005.
26. Hartmann, E., Christensen, J. W., Keeling, L. J. (2009). Social interactions of unfamiliar horses during paired encounters: Effect of pre-exposure on aggression level and so risk of injury. *Applied Animal Behaviour Science*, 121(3-4), 214-221. DOI: 10.1016/j.applanim.2009.10.004.
27. Hartmann, E., Keeling, L. J., Rundgren, M. (2011). Comparison of 3 methods for mixing unfamiliar horses (*Equus caballus*). *Journal of veterinary behavior*, 6(1), 39-49. DOI: 10.1016/j.jveb.2010.09.023.
28. Hartmann, E., Søndergaard, E., Keeling, L. J. (2012). Keeping horses in groups: A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 136(2-4), 77-87. DOI: 10.1016/j.applanim.2011.10.004.
29. Heitor, F., do Mar Oom, M., Vicente, L. (2006). Social relationships in a herd of Sorraia horses: Part I. Correlates of social dominance and contexts of aggression. *Behavioural Processes*, 73(2), 170-177. DOI: 10.1016/j.beproc.2006.05.004.
30. Henderson, A. J. (2007). Don't fence me in: managing psychological well being for elite performance horses. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 10(4), 309-329. DOI: 10.1080/10888700701555576.
31. Hornblow, A. R., Kidson, M. A. (1976). The visual analogue scale for anxiety: a validation study. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 10(4), 339-341.
32. Janczarek, I., Kędzierski, W., Stachurska, A., Wilk, I. (2016). Can releasing racehorses to paddocks be beneficial? Heart rate analysis—preliminary study. *Annals of Animal Science*, 16(1), 87-97. DOI: 10.1515/aoas-2015-0049.
33. Janczarek, I., Kędzierski, W., Stachurska, A., Wilk, I., Kolstrung, R., Strzelec, K. (2017). Autonomic nervous system activity in purebred Arabian horses evaluated according to the low frequency and high frequency spectrum versus racing performance. *Acta Veterinaria Brno*, 85(4), 355-362. DOI:10.2754/avb201685040355.
34. Janczarek, I., Stachurska, A., Wilk, I., Krakowski, L., Przetacznik, M., Zastrzeżyńska, M., Kuna-Broniowska, I. (2018). Emotional excitability and behaviour of horses in response to stroking various regions of the body. *Animal Science Journal*, 89(11), 1599-1608. DOI: 10.1111/asj.13104.
35. Janczarek, I., Wilk, I., Stachurska, A., Krakowski, L., Liss, M. (2019). Cardiac activity and salivary cortisol concentration of leisure horses in response to the presence of an audience in the arena. *Journal of Veterinary Behavior*, 29, 31-39. DOI: 10.1016/j.jveb.2018.07.007.

36. Janczarek, I., Stachurska, A., Kędzierski, W., Wiśniewska, A., Ryzak, M., Koziół, A. (2020). The intensity of physiological and behavioral responses of horses to predator vocalizations. *BMC veterinary research*, 16(1), 1-12. DOI: 10.1186/s12917-020-02643-6.
37. Jørgensen, G. H. M., Borsheim, L., Mejdell, C. M., Søndergaard, E., Bøe, K. E. (2009). Grouping horses according to gender—effects on aggression, spacing and injuries. *Applied Animal Behaviour Science*, 120(1-2), 94-99. DOI: 10.1016/j.applanim.2009.05.005.
38. Jørgensen, G. M., Fremstad, K. E., Mejdell, C. M., Bøe, K. E. (2011). Separating a horse from the social group for riding or training purposes: a descriptive study of human-horse interactions. *Animal Welfare*, 20(2), 271-279. DOI: 10.1017/S096272860000275X.
39. Kay, R., Hall, C. (2009). The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer. *Applied Animal Behaviour Science*, 116(2-4), 237-243. DOI: 10.1016/j.applanim.2008.08.013.
40. Kędzierski, W., Janczarek, I., Stachurska, A., Wilk, I. (2017). Comparison of effects of different relaxing massage frequencies and different music hours on reducing stress level in race horses. *Journal of equine veterinary science*, 53, 100-107. DOI: 10.1016/j.jevs.2017.02.004.
41. Kiffner, C., Kioko, J., Leweri, C., Krause, S. (2014). Seasonal patterns of mixed species groups in large East African mammals. *PLoS One*, 9(12), e113446. DOI: 10.1371/journal.pone.0113446.
42. Kovács, L., Tózsér, J., Kézér, F. L., Ruff, F., Aubin-Wodala, M., Albert, E., ... Szenci, O. (2015). Heart rate and heart rate variability in multiparous dairy cows with unassisted calvings in the periparturient period. *Physiology & Behavior*, 139, 281-289. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.11.039.
43. Krueger, K. (2008). Social ecology of horses. In *Ecology of social evolution* (pp. 195-206). Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-540-75957-7\_9.
44. Krueger, K., Esch, L., Farmer, K., Marr, I. (2021). Basic Needs in Horses?—A Literature Review. *Animals*, 11(6), 1798. DOI: 10.3390/ani11061798.
45. Lang, S. D., Farine, D. R. (2017). A multidimensional framework for studying social predation strategies. *Nature ecology & evolution*, 1(9), 1230-1239. DOI: 10.1038/s41559-017-0245-0.
46. Lansade, L., Bouissou, M. F., Erhard, H. W. (2008). Reactivity to isolation and association with conspecifics: A temperament trait stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science*, 109(2-4), 355-373. DOI: 10.1016/j.applanim.2007.03.003.
47. Linklater, W. L., Cameron, E. Z. (2000). Tests for cooperative behaviour between stallions. *Animal Behaviour*, 60(6), 731-743. DOI: 10.1006/anbe.2000.1525.

48. Linklater, W. L., Cameron, E. Z., Stafford, K. J., Veltman, C. J. (2000). Social and spatial structure and range use by Kaimanawa wild horses (*Equus caballus*: Equidae). *New Zealand Journal of Ecology*, 139-152.
49. Lundblad, J., Rashid, M., Rhodin, M., Haubro Andersen, P. (2021). Effect of transportation and social isolation on facial expressions of healthy horses. *PLoS One*, 16(6), e0241532. DOI: 10.1371/journal.pone.0241532.
50. Mal, M. E., Friend, T. H., Lay, D. C., Vogelsang, S. G., Jenkins, O. C. (1991). Physiological responses of mares to short term confinement and social isolation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 11(2), 96-102. DOI: 10.1016/S0737-0806(07)80138-9.
51. Malik, M. (1998). Heart rate variability. *Current opinion in cardiology*, 13(1), 36-44. DOI:10.1097/00001573-199801000-00006.
52. McAfee, L. M., Mills, D. S., Cooper, J. J. (2002). The use of mirrors for the control of stereotypic weaving behaviour in the stabled horse. *Applied Animal Behaviour Science*, 78(2-4), 159-173. DOI: 10.1016/S0168-1591(02)00086-2.
53. McGreevy, P., Christensen, J. W., Von Borstel, U. K., McLean, A. (2018). *Equitation science*, 2nd ed.; Wiley-Blackwell: West Sussex, UK, 2018; pp. 1–393.
54. Menard, C., Duncan, P., Fleurance, G., Georges, J. Y., Lila, M. (2002). Comparative foraging and nutrition of horses and cattle in European wetlands. *Journal of applied ecology*, 39(1), 120-133. DOI: 10.1046/j.1365-2664.2002.00693.x.
55. Mendonça, T., Bienboire-Frosini, C., Kowalczyk, I., Leclercq, J., Arroub, S., Pageat, P. (2019). Equine activities influence horses' responses to different stimuli: Could this have an impact on equine welfare?. *Animals*, 9(6), 290. DOI: 10.3390/ani9060290.
56. Moons, C. P. H., Laughlin, K., Zanella, A. J. (2005). Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. *Applied Animal Behaviour Science*, 91(3-4), 321-335. DOI: 10.1016/j.applanim.2004.10.007.
57. Olson, R. S., Haley, P. B., Dyer, F. C., Adami, C. (2015). Exploring the evolution of a trade-off between vigilance and foraging in group-living organisms. *Royal Society open science*, 2(9), 150135. DOI: 10.1098/rsos.150135.
58. Patkowski, K., Pluta, M., Lipiec, A., Greguła-Kania, M., Gruszecki, T. M. (2019). Foraging behavior patterns of sheep and horses under a mixed species grazing system. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 22(4), 357-363. DOI: 10.1080/10888705.2018.1522505.
59. Pierard, M., McGreevy, P., Geers, R. (2019). Effect of density and relative aggressiveness on agonistic and affiliative interactions in a newly formed group of horses. *Journal of Veterinary Behavior*, 29, 61-69. DOI: 10.1016/j.jveb.2018.03.008.
60. Pluta, M., Patkowski, K., Gasińska, B., Bryczek, E. (2013). Behavior and interactions in and between herds of Polish Konik horse and Uhruska sheep during mixed-species grazing

- practice. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio EE Zootechnica*, 31(1), 49-58.
61. Proops, L., McComb, K., Reby, D. (2009). Cross-modal individual recognition in domestic horses (*Equus caballus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 947-951. DOI: 10.1073/pnas.0809127105.
  62. Ransom, J. I., Cade, B. S. (2009). Quantifying equid behavior—a research ethogram for free-roaming feral horses. DOI: 10.3133/tm2A9.
  63. Rault, J. L. (2012). Friends with benefits: social support and its relevance for farm animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 136(1), 1-14. DOI: 10.1016/j.applanim.2011.10.002.
  64. Reid, K., Rogers, C. W., Gronqvist, G., Gee, E. K., Bolwell, C. F. (2017). Anxiety and pain in horses measured by heart rate variability and behavior. *Journal of Veterinary Behavior*, 22, 1-6. DOI: 10.1016/j.jveb.2017.09.002.
  65. Roberts, K., Hemmings, A. J., McBride, S. D., Parker, M. O. (2017). Causal factors of oral versus locomotor stereotypy in the horse. *Journal of Veterinary Behavior*, 20, 37-43. DOI: 10.1016/j.jveb.2017.05.003.
  66. Schmitt, M. H., Stears, K., Wilmers, C. C., Shrader, A. M. (2014). Determining the relative importance of dilution and detection for zebra foraging in mixed-species herds. *Animal Behaviour*, 96, 151-158. DOI: 10.1016/j.anbehav.2014.08.012.
  67. Shimada, M., Suzuki, N. (2020). The contribution of mutual grooming to affiliative relationships in a feral Misaki horse herd. *Animals*, 10(9), 1564. DOI: 10.3390/ani10091564
  68. Sigurjónsdóttir, H., Haraldsson, H. (2019). Significance of group composition for the welfare of pastured horses. *Animals*, 9(1), 14. DOI: 10.3390/ani9010014.
  69. Silk, J. B. (2007). The adaptive value of sociality in mammalian groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1480), 539-559. DOI: 10.1098/rstb.2006.1994.
  70. Stachurska, A., Różańska-Boczula, M., Wnuk-Pawlak, E. (2021a). The difference in the locomotor activity of horses during solitary and paired release. *Pferdeheilkunde Equine Med*, 37, 50-54. DOI: 10.21836/PEM20210107.
  71. Stachurska, A., Wiśniewska, A., Kędzierski, W., Różańska-Boczula, M., Janczarek, I. (2021b). Behavioural and Physiological Changes in a Herd of Arabian Mares after the Separation of Individuals Differently Ranked within the Dominance Hierarchy. *Animals*, 11(9), 2694.
  72. Stanley, C. R., Mettke-Hofmann, C., Hager, R., Shultz, S. (2018). Social stability in semiferal ponies: networks show interannual stability alongside seasonal flexibility. *Animal Behaviour*, 136, 175-184. DOI: 10.1016/j.anbehav.2017.04.013.



73. Sutton, G. A., Dahan, R., Turner, D., Paltiel, O. (2013). A behaviour-based pain scale for horses with acute colic: scale construction. *The Veterinary Journal*, 196(3), 394-401. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.008.
74. Tarvainen, M. P., Niskanen, J. P., Lipponen, J. A., Ranta-Aho, P. O., Karjalainen, P. A. (2014). Kubios HRV—heart rate variability analysis software. *Computer methods and programs in biomedicine*, 113(1), 210-220. DOI: 10.1016/j.cmpb.2013.07.024.
75. von Borell, E., Langbein, J., Després, G., Hansen, S., Lettieri, C., Marchant-Forde, J., ... Veissier, I. (2007). Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals—A review. *Physiology & behavior*, 92(3), 293-316. DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.01.007.
76. van Dierendonck, M. C., Sigurjónsdóttir, H., Colenbrander, B., Thorhallsdóttir, A. G. (2004). Differences in social behaviour between late pregnant, post-partum and barren mares in a herd of Icelandic horses. *Applied Animal Behaviour Science*, 89(3-4), 283-297. DOI: 10.1016/j.applanim.2004.06.010.
77. van Duinen, M., Rickelt, J., Griez, E. (2008). Validation of the electronic visual analogue scale of anxiety. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 32(4), 1045-1047. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2008.02.002.
78. Weeks, J. W., Crowell-Davis, S. L., Caudle, A. B., Heusner, G. L. (2000). Aggression and social spacing in light horse (*Equus caballus*) mares and foals. *Applied Animal Behaviour Science*, 68(4), 319-337. DOI: 10.1016/S0168-1591(99)00126-4.
79. Wilk, I., Janczarek, I. (2015). Relationship between behavior and cardiac response to round pen training. *Journal of Veterinary Behavior*, 10(3), 231-236. DOI: 10.1016/j.jveb.2015.01.001.
80. Wiśniewska, A., Janczarek, I., Wilk, I., Tkaczyk, E., Mierzicka, M., Stanley, C. R., Górecka-Bruzda, A. (2021). Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals*, 11(11), 3081. DOI: 10.3390/ani11113081.
81. Wittemyer, G., Douglas-Hamilton, I., Getz, W. M. (2005). The socioecology of elephants: analysis of the processes creating multitiered social structures. *Animal behaviour*, 69(6), 1357-1371. DOI: 10.1016/j.anbehav.2004.08.018.
82. Witzany, G. (2014). Why Biocommunication of Animals? In *Biocommunication of Animals*; Witzany, G., Ed.; Springer Science + Business Media: Dordrecht, The Netherlands, 2014; pp. 1–6.
83. Yarnell, K., Hall, C., Royle, C., Walker, S. L. (2015). Domesticated horses differ in their behavioural and physiological responses to isolated and group housing. *Physiology & behavior*, 143, 51-57. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.02.040.
84. www.fei.org, 2022.

**Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia  
współautorów**

## Article

# Behavioural and Physiological Changes in a Herd of Arabian Mares after the Separation of Individuals Differently Ranked within the Dominance Hierarchy

Anna Stachurska <sup>1</sup>, Anna Wiśniewska <sup>1,\*</sup>, Witold Kędzierski <sup>2</sup>, Monika Różańska-Boczula <sup>3</sup>  
and Iwona Janczarek <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Horse Breeding and Use, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; anna.stachurska@up.lublin.pl (A.S.); iwona.janczarek@up.lublin.pl (I.J.)
- <sup>2</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; witold.kedzierski@up.lublin.pl
- <sup>3</sup> Department of Applied Mathematics and Computer Science, Faculty of Production Engineering, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; monika.boczula@up.lublin.pl
- \* Correspondence: anna.wisniewska@up.lublin.pl

**Simple Summary:** There are many situations in riding facilities and studs in which horses have to be separated out of a group, for example, when they are needed for a riding lesson, training purposes or veterinary treatments. Such a group may form a social herd in which a dominance hierarchy with dominant and submissive members is established. In the study, we investigated how mares respond to a short separation of some of the herd members and whether the response differs according to the rank order of the mares separated. The response was determined with rates of different behaviours showing agitation or calmness, times of locomotion and physiological parameters. The results of the experiment show that the separation of some mares increases the agitation in the remaining herd. In spite of the fact that such situations are constantly repeated in practice, they are stressful for the horses. The reaction of the remaining herd does not depend strictly on the composition of the mares separated regarding their rank in the dominance hierarchy, i.e., it does not differ consistently when a dominant, mixed or submissive group of mares is separated.

**Abstract:** Horses in a herd develop and maintain a dominance hierarchy between all individuals. There are many situations in riding facilities and studs in which horses have to be separated out of a group. The aim of the study was to determine the rate of behaviours, level of locomotor activity and cardiac activity variables in a herd of horses during a short social separation of individuals differently ranked in the dominance hierarchy. Twelve adult Arabian mares were involved. A behavioural test had been performed before the main experiment to determine the rank order of the mares in this social herd. Three tests were performed when a dominant, mixed and submissive three-member group of mares was separated for 10 min. The response of the remaining herd was determined by a rate of behaviours, time of locomotor activity and cardiac parameters. The results of the experiment reveal evident changes towards emotional arousal in the social herd elicited by a short separation of some conspecifics. The herd created by humans preserves the sensitivity to a temporary loss of its members. The response of the remaining herd does not depend strictly on the composition of the separated mares regarding their rank in the dominance hierarchy.

**Keywords:** horse; social herd; hierarchy; separation; behaviour; agitation



**Citation:** Stachurska, A.; Wiśniewska, A.; Kędzierski, W.; Różańska-Boczula, M.; Janczarek, I. Behavioural and Physiological Changes in a Herd of Arabian Mares after the Separation of Individuals Differently Ranked within the Dominance Hierarchy. *Animals* **2021**, *11*, 2694. <https://doi.org/10.3390/ani11092694>

Academic Editor: Simon Bailey

Received: 24 August 2021

Accepted: 10 September 2021

Published: 14 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Social bonds are observed in many studies performed on feral and free-ranging horses slightly impeded by human interference e.g., [1–4]. The same social behaviour patterns are

observed in outdoor-living or pastured horses under extensive human management when given the opportunity [5]. These observations show the natural propensity of horses to evolve long-term bonds within herds. Under natural conditions, a herd usually consists of a stallion, one or more, often a few, adult, usually unrelated mares and their foals [6]. The mares evolve affiliative social integration, which has strong benefits for them, for example, it enables allogrooming, reduces harassment by males and increases foal birth rates [1,4]. Both mares and foals prefer to bond with peers within their sex [7].

On the other hand, the horses in a herd develop and maintain the dominance hierarchy between each individual mainly through agonistic interactions. Most studies indicate that agonism is strongly correlated with the dominance rank among females [2,3,8]. The hierarchy is relatively stable and ranks positively with horses' age, total aggressiveness, body size and condition, as well as the duration of residency in the herd, although those correlations are not found universally [5,8–11]. The horse's sex is of great importance for the hierarchy. The stallion is not the highest-ranked horse, but a mare is the leader of a herd [2,3,12]. The reproductive status of females also influences their social dominance in a band [13]. The more dominant horses manifest aggression more often than individuals ranked lower in the hierarchy [8].

Groups of pastured horses under human management are usually maintained without a stallion. Horse owners tend to keep horses in homogenous groups to facilitate management and avoid injuries [14]. However, broodmares with their foals are sometimes maintained with barren mares and geldings [7]. Keeping breeding mares together with barren mares and adult geldings in a herd does not interfere with the normal species-specific behaviour [13,14]. The stability of group composition in pastured horses facilitates establishing the dominance hierarchy. In turn, the established hierarchy reduces aggression levels in a herd, which correlates with the welfare of horses. Unstable social grouping increases aggression and may lead to injury [12,13].

Social ties within a horse herd arise thanks to gregariousness, i.e., dependence on conspecifics in a herd, especially manifested by the reactivity to social isolation. Horses are gregarious animals, hence social isolation can elicit different responses in them, for example, vocalisation [15]. The dependence is opposite to independence and correlates with gregariousness and sociability. Independence means an individual's ability to function without the social support of conspecifics [16]. The horses vary regarding the levels of these traits. Lower sociability indicates that some horses may be more self-reliant, relaxed and better able to cope with social isolation than their conspecifics. Independence and boldness are separate traits in horses, but only boldness increases with age [15,16]. The sociability depends on the breed, for example, Irish Draught and American Quarter horses rank lower for this trait than Arabians and Thoroughbreds [17]. Horses that do not cope well when separated from conspecifics, for example, Thoroughbreds, are at a high risk of stereotypic behaviours [18].

Some studies report the consequences of introducing unfamiliar newcomers into a social group of horses or the reaction of an individual being separated from such a group [15,19–21]. However, no information is available on the response of the herd to taking out a member. Hartmann et al. [22] suggested that investigations were warranted on the consequences of removing either higher or lower ranked horses from their group on collective movements. There are many situations in riding facilities and studs in which horses have to be separated out of a group, for example, when they are needed for a riding lesson, training purposes or veterinary treatments. It is interesting to investigate how the remaining group reacts, whether it notices the lack of some conspecifics at all or experiences a stress. We hypothesized that a short separation of some individuals from a herd elicits behavioural, locomotor and physiological changes in the remaining herd and those changes differ depending on the hierarchy rank of the conspecifics separated. The aim of the study was to determine the rate of behaviours, level of locomotor activity and cardiac activity variables in a herd of horses during a short social separation of individuals differently ranked in the dominance hierarchy.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Horses

In the study, 12 purebred Arabian mares aged five to ten years were involved. The mares had been kept in the breeding facility for at least one year. They were maintained in single box stalls. The construction of the stall's side walls allowed eye contact between the horses, whereas the frontal walls made it possible for horses to touch other horses from neighbouring stalls. The mares were fed three times daily with a concentrate and meadow hay. The morning feeding was carried out at 6 a.m. The mares had stayed together in a paddock or pasture with access to water from 8 a.m. to 5 p.m. each day for at least the last six months. The pasture-beds for the whole group of mares were 3000–3500 m<sup>2</sup> each. The foals of the mares were already weaned at the time of the experiment. Nine mares were in the second trimester of pregnancy and three mares were barren.

### 2.2. Procedure of Testing Dominance Hierarchy

A behavioural test had been performed to determine the rank order of mares in this social herd before the experiment began. Accordingly, at 8 a.m. on three consecutive days, all the mares were turned out freely into a small paddock. A crib 100 cm long, 30 cm deep and 20 cm wide holding the concentrate was located there. The mares were familiarised with this crib. The rank in the hierarchy was determined according to the order of approaching the crib and beginning to consume the concentrate. Mares that began to eat simultaneously were considered to be of the same rank. Successive mares that completed the test (after eating a few bites of the concentrate) were taken away from the crib and tied to the fence of the paddock. The concentrate was added successively until the test was completed. The results of the test were similar on consecutive days. They allowed us to distinguish the following hierarchy:

- The leader of the herd always approached the crib and began to consume the concentrate first and alone;
- Two subdominant mares simultaneously began to consume the concentrate in second place;
- A group of seven mares ranked third;
- A subservient mare ranked fourth;
- A solitary mare, which usually kept away from the herd, then approached the crib a few minutes later and was ranked fifth.

### 2.3. Procedure of Main Tests

The experiment was carried out at 8:00 a.m., i.e., two hours after the morning feeding, on three days. Another test was performed on each experimental day. The experimental days were split up by three-day intervals to prevent the habituation of the mares to the experimental procedure. The mares were turned out into a paddock of 50 × 70 m size. Water and food were not available in the paddock and no green growth around the paddock was present. On each experimental day, a sport-tester (Polar ELECTRO OY-RS800CX sport140, Polar Electro Oy, Kempele, Finland) was attached to a belt placed around the chest of each horse and activated to measure the cardiac variables. The horse was then left in its box for 5 min to become accustomed to the device. The mares had already been familiarised with the device a week before the beginning of the experiment.

Each test consisted of the following three 15 min phases:

- Phase 1 after releasing the mares into the paddock;
- Phase 2 when selected mares were separated from the herd;
- Phase 3 after bringing the separated mares back to the herd.

The separated mares were led by familiarised grooms to their own boxes in the stable. The cribs in the boxes contained some concentrate to calm the horses and occupy them with eating. After the second phase, the mares were led back to the herd. The tests differed with the composition of the groups of three mares separated:

- The first test carried out on the first experimental day—the group dominant over the rest of the herd including the leader and two subdominant mares;
- The second test carried out on the second experimental day—the mixed group including the leader, subservient and solitary mares;
- The third test carried out on the third experimental day—the submissive group including two subdominant mares simultaneously submissive to the leader and the solitary mare submissive to the whole herd. The measurements conducted in each phase concerned the herd without the mares separated in phase 2.

#### 2.4. Measurements within Main Tests

The rate of behaviours, time of locomotor activity and cardiac parameters were recorded separately for each phase of the experiment. The following behaviours observed were assumed to display agitation: Vocalisation, defecation/urination, high head and tail positions, clinging to conspecifics, aggressive posture and ears pressed caudally or held forward (Table 1). Rest standing, drowsiness, play, mutual grooming and ears held laterally were considered to be signs of calmness [23–27]. The prevalence of the behaviours was recorded regardless of how long they lasted. The locomotor activity was considered regarding the time of a walk, trot, canter, jumps and single steps [28]. More than three steps were assumed to be a gait and fewer than three steps were classified into single steps. Increased locomotion activity was considered as a sign of agitation. The time of each gait repeated within a phase was totalled.

**Table 1.** Description of the behaviours recorded in the study.

| Behaviour                | Description   |
|--------------------------|---|
| Vocalisation             | Signals produced by the nostrils during expiration (snorts, snores and blows).  |
| Defecation/Urination     | Elimination of faeces or urine.   |
| High head position       | Neck raised over 45 degrees to the horizontal level.  |
| High tail position       | Fleshy part of tail outstretched horizontally or elevated above horizontal.   |
| Clinging to conspecifics | Body contact not reciprocated by the receiver. The horse is difficult to split up, inseparable from conspecifics.   |
| Aggressive posture       | Ears pressed caudally against the head and neck; head or kick threat.   |
| Rest standing            | Standing inactive in a relaxed posture, usually with head slightly lowered. The horse is standing on three or four limbs and can reposition them slightly remaining close to the original position. The head and neck can move without movement of the limbs. |
| Drowsiness               | The horse is standing on three or four limbs without moving in any direction. Ears rotate laterally.  |
| Play                     | Behavioural elements and sequences similar to serious adult fighting behaviour but of a play character performed while in motion at any gait. Play is directed at another individual, which may or may not reciprocate.                                       |
| Mutual grooming          | Grooming by gentle nipping, nuzzling or rubbing involving the muzzle and teeth while standing beside one another, usually head to shoulder or head to tail.   |
| Position of ears         | Ears held forward: Curiosity, alert<br>Ears held laterally: Relaxation, drowsiness, boredom<br>Ears pressed caudally: Aggression, frustration   |

The heart rate (HR; beats per min) and the root mean square of the successive differences in beat-to-beat intervals (RMSSD; ms) were also analysed. The HR increases as a result of elevated sympathetic nervous system activity, whereas augmented RMSSD shows the predomination of parasympathetic nervous system activity. Hence, an increased HR was considered as a sign of agitation, whereas increased RMSSD was a sign of calmness.

### 2.5. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed utilising STATISTICA 13.3 and R software (R version 4.0.3). The normality of the data distribution was assessed with the Shapiro–Wilk test. The non-parametric analysis of variance for repeated measures (Friedman’s test) was used since the distribution of the behavioural and locomotor data was not normal ( $p < 0.05$ ). Post-hoc analysis of multiple pairwise comparisons was conducted using the paired Wilcoxon signed-rank test.  $p$ -values were adjusted using the Bonferroni multiple testing correction method. In the case of the cardiac variables, the normality of the data distribution was not rejected ( $p > 0.05$ ), hence multivariate analysis of variance (MANOVA) for repeated measures was used. The significance of differences between means was determined with Tukey’s test. A minimum level of significance was accepted at  $\alpha = 0.05$ .

### 3. Results

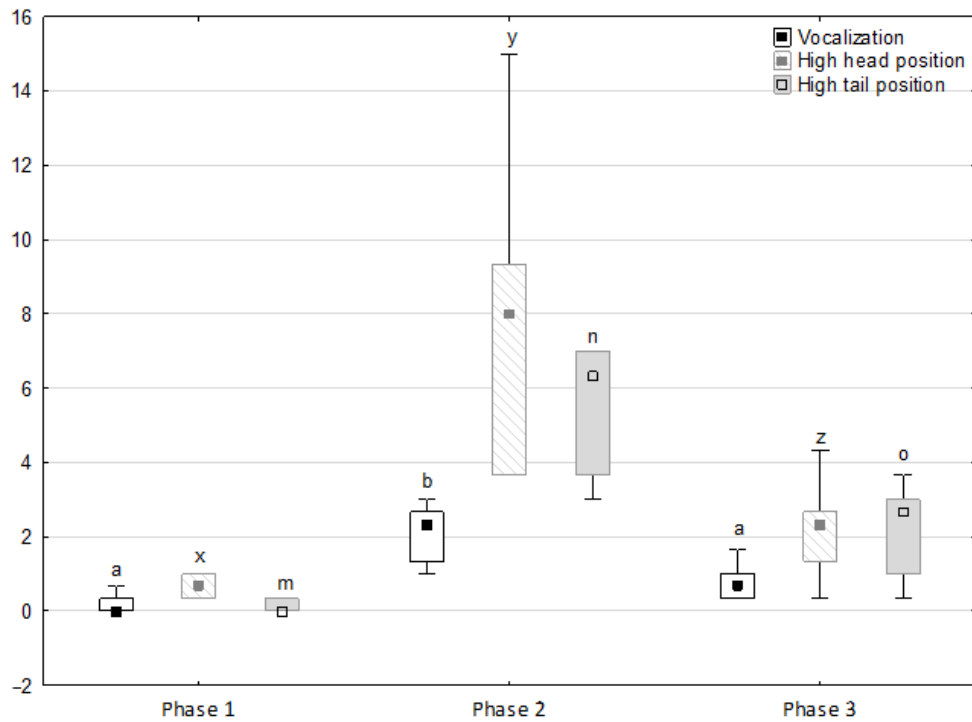
As presented in Table 2, the effect of experimental conditions (experimental phase and test) was statistically significant ( $p < 0.05$ ) for the traits studied in addition to rest standing, drowsiness and walk.

**Table 2.** The effect of experimental conditions (experimental phase and test) on behavioural (Friedman test probability value) and cardiac activity traits (MANOVA test probability value).

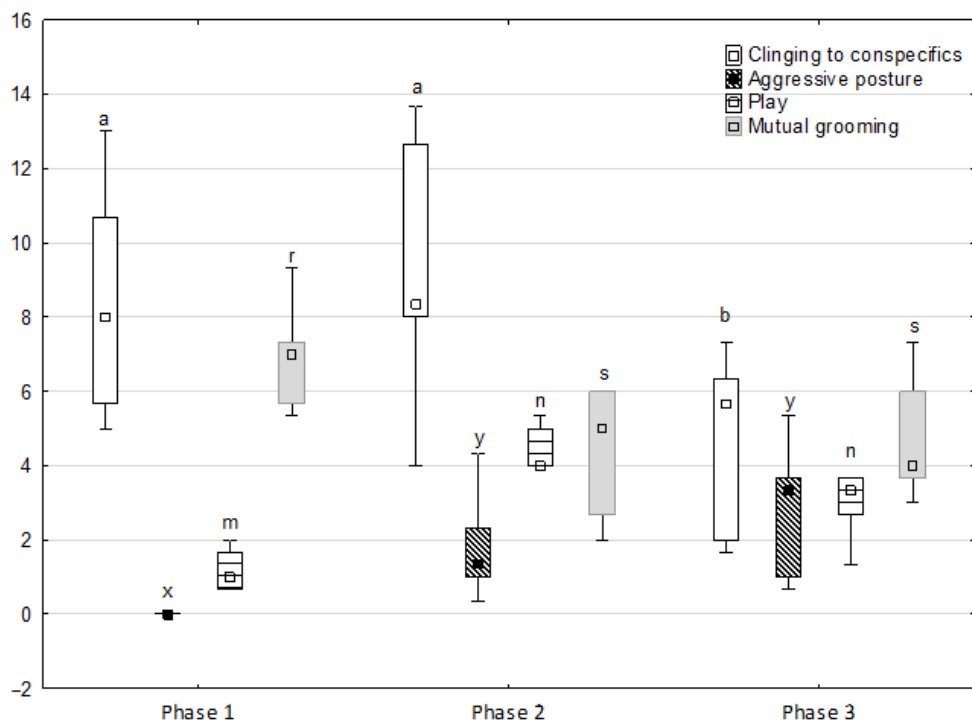
| Behavioural Traits       | $p$ -Value | Locomotor Traits        | $p$ -Value |
|--------------------------|------------|-------------------------|------------|
| Vocalisation             | 0.0020 *   | Walk                    | 0.0716     |
| Defecation/Urination     | 0.0344 *   | Trot                    | 0.0029 *   |
| High head position       | 0.0001 *   | Canter                  | 0.0022 *   |
| High tail position       | 0.0002 *   | Jumps                   | 0.0210 *   |
| Clinging to conspecifics | 0.0068 *   | Single steps            | 0.0274 *   |
| Aggressive posture       | 0.0114 *   | Cardiac Activity Traits | $p$ -Value |
| Rest standing            | 0.3801     | HR                      | 0.0002 *   |
| Drowsiness               | 0.1740     | RMSSD                   | 0.0002 *   |
| Play                     | 0.0002 *   |                         |            |
| Mutual grooming          | 0.0011 *   |                         |            |
| Ears held forward        | 0.0205 *   |                         |            |
| Ears held laterally      | 0.0003 *   |                         |            |
| Ears pressed caudally    | 0.0015 *   |                         |            |

\*  $p < 0.05$ .

Figures 1–5 illustrate the answer to the first part of the hypothesis, i.e., whether there were significant differences in the behavioural, locomotor and cardiac traits in the remaining herd (excluding the separated mares) between successive phases of the experiment, regardless of the kind of test. Only those traits that showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians in the non-parametric test or means in the parametric test were considered. The variables increased in 78.6% of these traits (HR in those) in phase 2 compared to phase 1. They were similar considering clinging to conspecifics and lowered in the case of mutual grooming and ears held laterally. When comparing phase 3 to phase 2, an increase in variables was not observed, whereby the variables remained at a similar level in half of the traits (HR in those) and lowered in another half (vocalisation, high head position, high tail position, clinging to conspecifics, ears held forward, ears pressed caudally and trot).

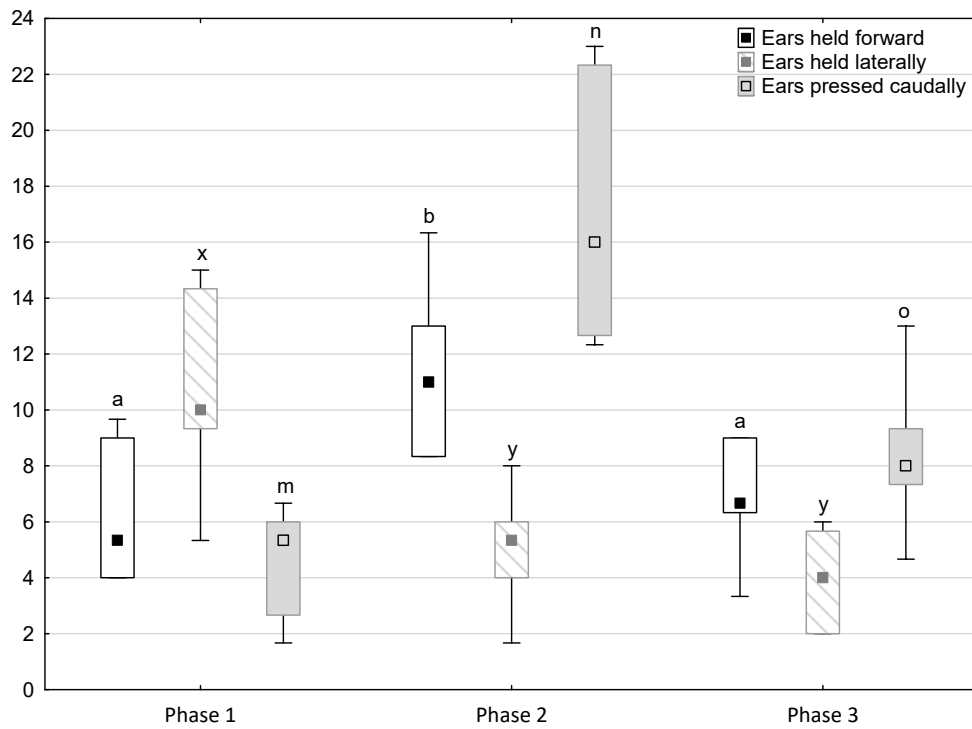


**Figure 1.** Distribution of vocalisation, high head position and high tail position rates regarding the phase of the experiment (squares show medians, boxes show lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians are marked with different letters: a, b—vocalisation; x, y, z—high head position; m, n, o—high tail position.

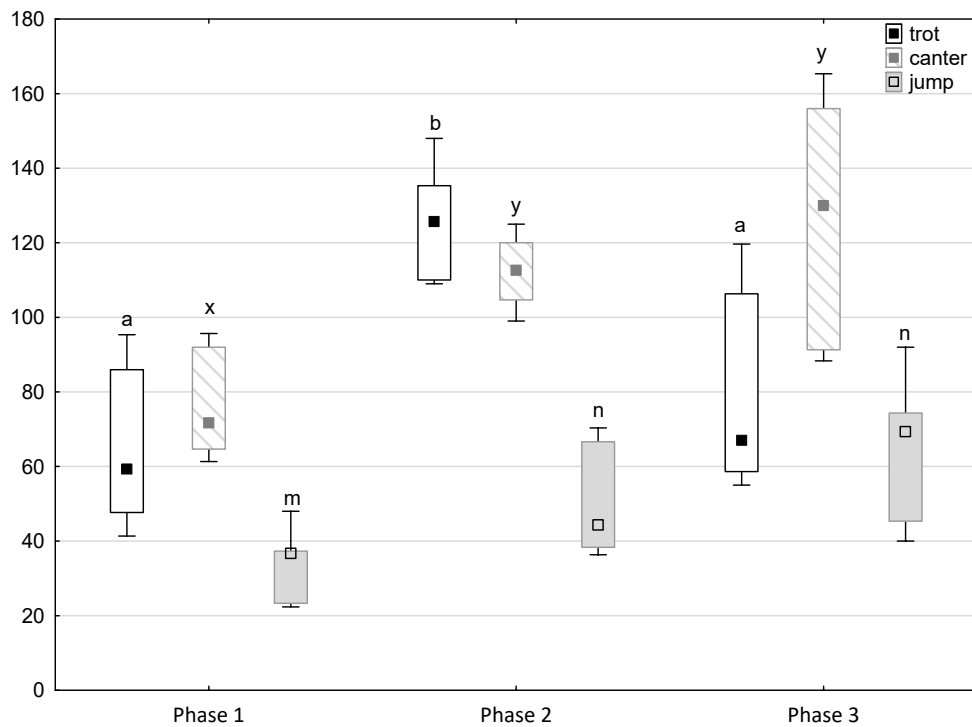


**Figure 2.** Distribution of clinging to conspecifics, aggressive posture, play and mutual grooming rates regarding the phase of the experiment (squares show medians, boxes show lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians are marked with different letters: a, b—clinging to conspecifics; x, y—aggressive posture; m, n—play; r, s—mutual grooming.

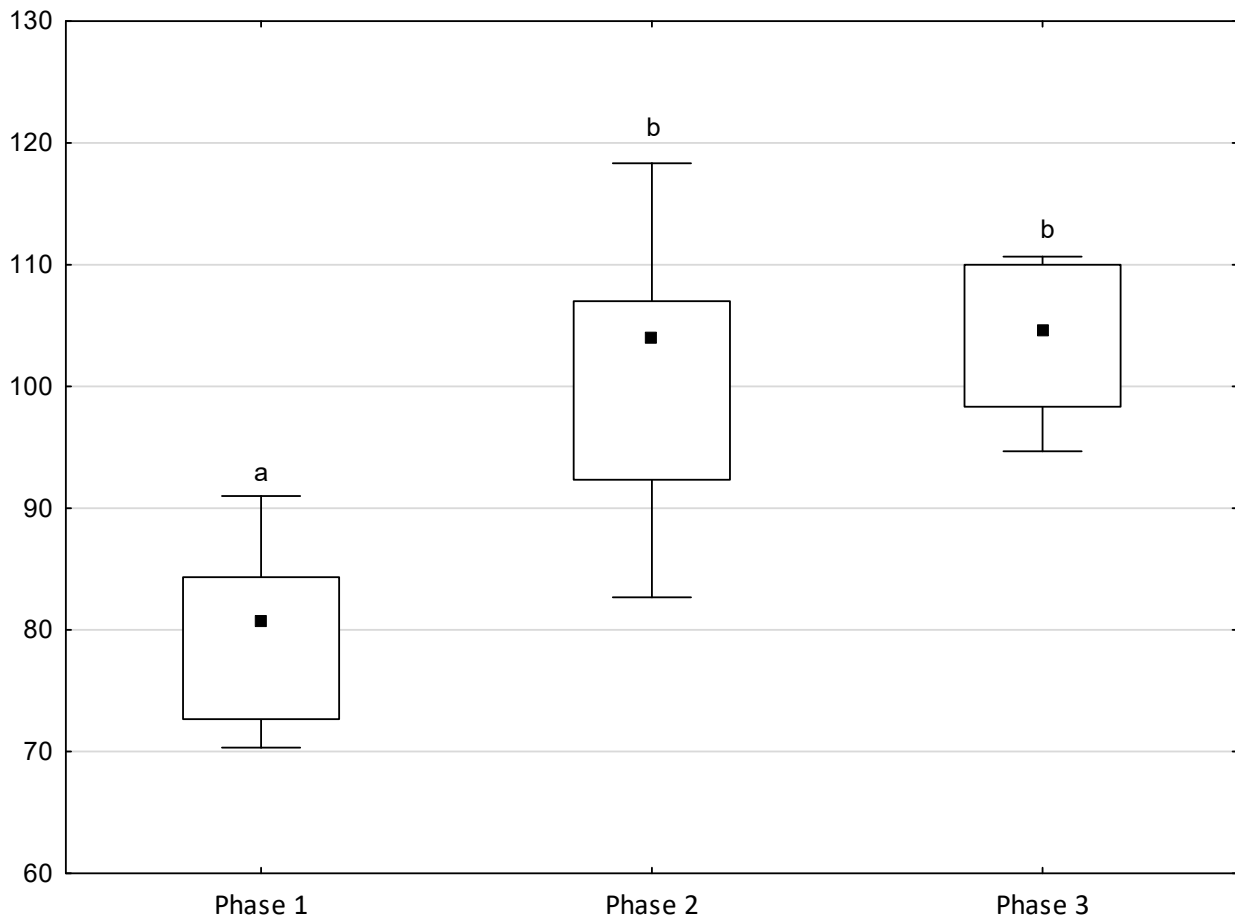




**Figure 3.** Distribution of ears held forward, ears held laterally and ears pressed caudally rates regarding the phase of the experiment (squares show medians, boxes show lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians are marked with different letters: a, b—ears held forward; x, y—ears held laterally; m, n, o—ears pressed caudally.

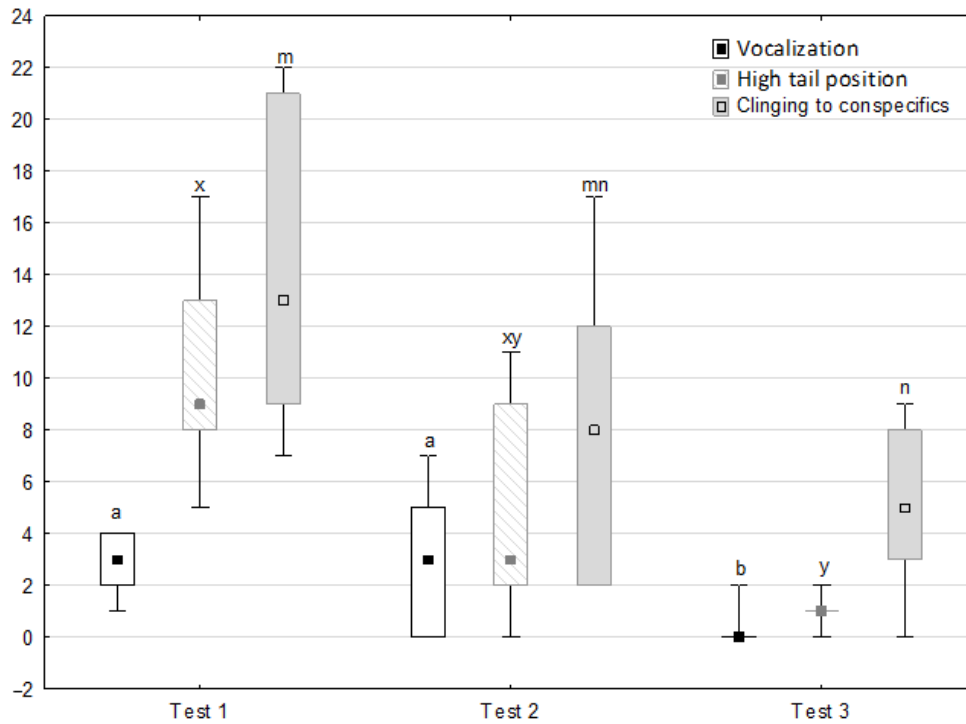


**Figure 4.** Distribution of trot, canter and jump times regarding the phase of experiment (squares show medians, boxes show lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians are marked with different letters: a, b—trot; x, y—canter; m, n—jump.

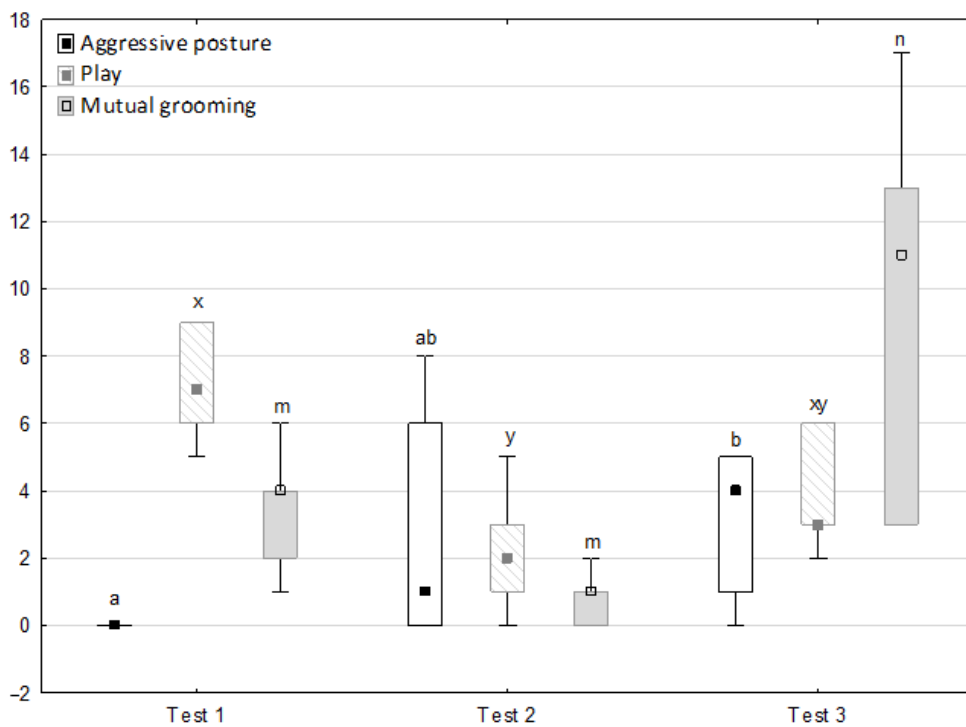


**Figure 5.** Distribution of the HR regarding the phase of the experiment (squares show means, boxes show lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between means are marked with different letters: a, b.

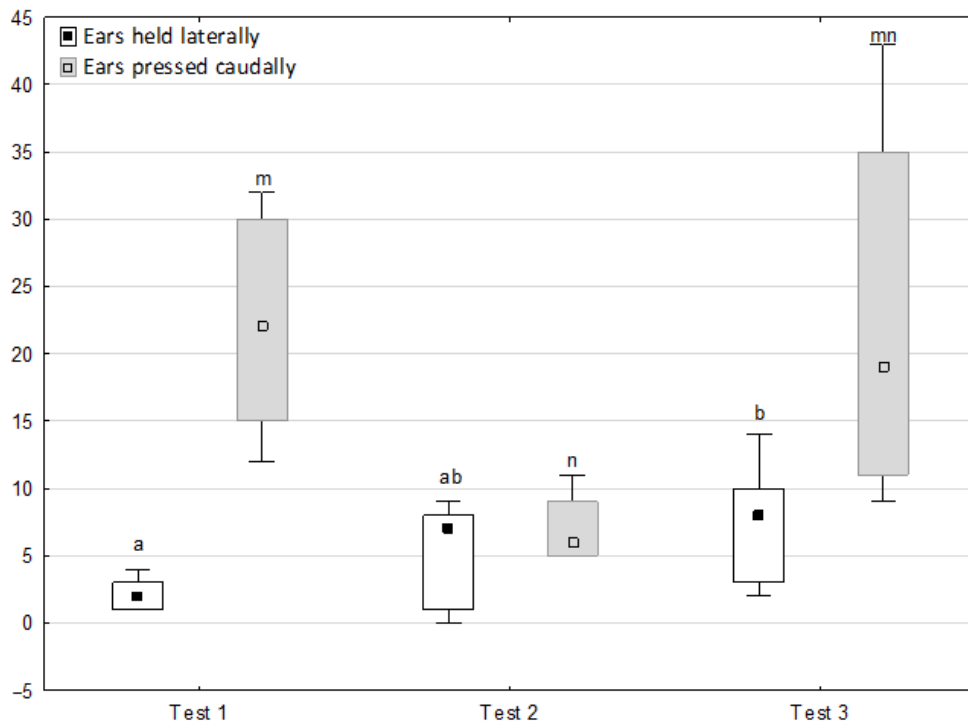
Figures 6–9 illustrate the answer to the second part of the hypothesis, i.e., whether the response of the horses included in the remaining herd was different in consecutive tests when differently ranked mares in the herd dominance hierarchy were separated during the crucial phase 2. Only those ten traits that showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians in phase 2 were considered, irrespective of the differences in phases 1 and 3. Hence, the defecation/urination, high head position, ears held forward, trot, single steps, HR and RMSSD, which did not show significant differences within phase 2, were not considered. The variables were lower in the second test compared to the first test in the case of play and ears pressed caudally, similar considering vocalisation, high tail position, clinging to conspecifics, aggressive posture, mutual grooming, ears held laterally and jump and higher for canter. The variables in the third test were similar in 70.0% cases, lower for the vocalisation and higher for mutual grooming and jump compared to the second test. The variables for play, ears pressed caudally and canter did not differ in the first and third tests, whereas those for vocalisation, high tail position and clinging to conspecifics were lower in the third test compared to the first test and higher for aggressive posture, mutual grooming, ears held laterally and jump.



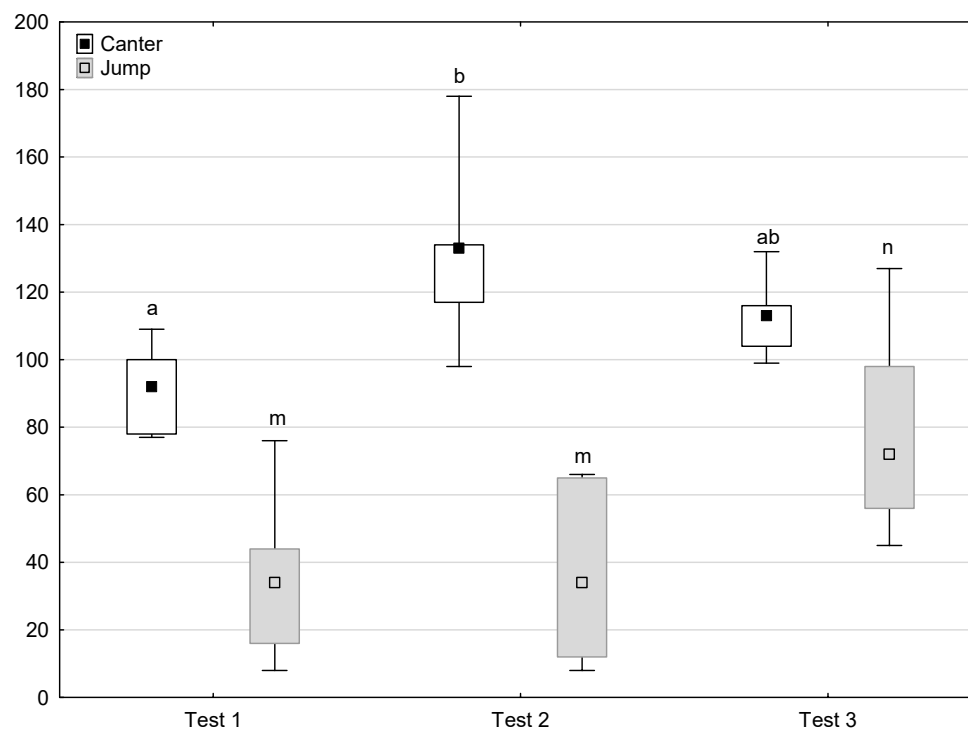
**Figure 6.** Distribution of vocalisation, high tail position and clinging to conspecifics rates during phase 2 in successive days of the experiment (squares show medians, boxes show lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians are marked with different letters: a, b—vocalisation; x, y—high tail position; m, n—clinging to conspecifics.



**Figure 7.** Distribution of aggressive posture, play and mutual grooming rates during phase 2 in successive days of the experiment (squares show medians, boxes lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians are marked with different letters: a, b—aggressive posture; x, y—play; m, n—mutual grooming.



**Figure 8.** Distribution of ears held laterally and ears pressed caudally rates during phase 2 in successive days of the experiment (squares show medians, boxes show lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians are marked with different letters: a, b—ears held laterally; m, n—ears pressed caudally.



**Figure 9.** Distribution of canter and jump times during phase 2 in successive days of the experiment (squares show medians, boxes show lower and upper quartiles and whiskers show minimum and maximum values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between medians are marked with different letters: a, b—canter; m, n—jump.

#### 4. Discussion

The results of the analysis show that the social herd was not indifferent to the separation of some individuals. The remaining horses noticed the incident and expressed their agitation with various behaviours, locomotion and changes in nervous system activity. The emotional state of the mares in the remaining herd was manifested by a higher rate of many behaviours: Vocalisation, high head and tail position, aggressive posture, play, ears held forward or pressed caudally, as well as prolonged trot, canter, jumps and an elevated HR. These behaviours, apart from play, are typical for increased vigilance and agitation [25,27]. According to McDonnell and Poulin [29], play occurs mostly in foals and young horses, whereas in adults, it is less frequent in mares than in stallions. It consists of activities having no immediate use or function to the animal but involves pleasure and surprise. Hence, it is not connected with anxiety and may show that the mares studied were not agitated. However, all other behaviours indicate an increase in emotional arousal in the herd in response to the incident. Exemplarily, ears were held forward or pressed caudally more often and held laterally more rarely in response to the separation. According to Hall et al. [26], ears pointing forwards are a sign of interest, alertness and attention, whereas ears pinned back reflect a negative affective state. Many authors describe that the act of the ears being pressed back is associated with agonistic behaviours while the ears being held laterally displays a relaxed horse (e.g., [12,23]). Hence, the increase in the rate of the ears held forward or pressed caudally and the decrease in the rate of the ears held laterally display an elevated emotional agitation in the remaining herd. The decrease in the rate of mutual grooming also corresponds with higher emotional arousal [4,13]. Hartmann et al. [22] indicate neighing, snorting, defecation, increased locomotion, pawing and taking a vigilant posture as typical behaviours associated with the separation of an individual; however, they do not describe behaviours of the remaining group. The authors emphasise that the reaction of the separated individuals varied considerably.

The HR and RMSSD show changes in the sympatho-vagal balance of the nervous system activity. An increased HR shows a shift towards the sympathetic nervous system, whereas elevated RMSSD indicates an opposite shift towards the parasympathetic system [30,31]. An increase in the sympathetic component accelerates the HR, whereas an increase in the vagal tone decelerates it and enhances the RMSSD. The predominance of the sympathetic nervous system activity over the antagonistic parasympathetic system indicates that the mares in the herd sensed the separation of some of them as a stressful situation. The RMSSD, although significantly affected by the separation, did not show any important differences between experimental phases. This suggests that the parasympathetic nervous system is less involved in the horse responses studied than the sympathetic nervous system. It is known that the RMSSD changes, for example, in response to relaxation treatment [32]. Despite the non-significant post hoc differences in the RMSSD, the significant changes in many behavioural, locomotor and HR variables in the social herd, which occurred in response to the short separation of some mares, confirm the first part of our hypothesis.

The return of the individuals after the short separation elicited a less distinct response in the herd, since the rate of behaviours reflecting the emotional arousal decreased or remained at a similar level in comparison to the phase of separation. The behaviours reflecting calmness (play, mutual grooming and ears held laterally) also remained at a similar level to that during separation. It seems that the return of the separated mares began to calm down the herd, which sensed this state as restoring normality.

The differences in the variables between the tests reveal that the composition of the group of separated mares, which differed in the dominance hierarchy, influenced the response, however inconsistently. Comparing the effect of the separation of the mixed group (second test) to the dominant group (first test) on behaviours connected to agitation, only the time of canter was higher, whereas mutual grooming and ears held laterally were at a similar level and that of play was lower within the rates of behaviours showing calmness. When comparing the separation of the submissive group (third test) with the mixed group,

the response of the herd did not consistently tend towards agitation or calmness: The increased jump time displayed when the submissive group was separated indicates a predominance of agitation but decreased vocalisation in accordance with increased mutual grooming shows a predominance of calmness. In turn, the separation of the submissive group compared to the dominant group evoked the increased rate of aggressive posture and jump time, which indicates higher emotional arousal, although simultaneously elevated rates of mutual grooming and ears held laterally as well as decreased vocalisation, high tail position and clinging to conspecifics show a tendency for calmness.

The separation turned out to be stressful for the remaining herd despite the fact that the horses might have been habituated to such a procedure within everyday routine. As mentioned in the Introduction, separations are frequent in horse management. Hence, the distinct increase in emotional arousal shows how humans' activities may be important for the horses' welfare. Opposite to evident changes towards emotional arousal elicited by the separation, the response to the separation of conspecifics variously ranked in the dominance hierarchy was not homogenous. Interestingly, whether a dominant, mixed or submissive group of mares was separated did not affect the remaining herd. It does not seem that the separations carried out according to the experimental design once every four days were anything different than usual management for the mares and, thus, that the order of separation could influence the results. The level of agitation was not differentiated, i.e., the changes did not differ consistently depending on the rank order of the individuals separated. Thus, the results of the study do not provide evidence to support the second part of the hypothesis. It may be suggested that the mares in the remaining herd were indifferent to which mares were separated. The dominance relationships could not have been changed in the herd for such a short period (10 min). Perhaps the dominant mare/mares are needed for other animals in the herd in the case of, for example, a strong alert or protection against a real threat. Presumably, the procedure of separation in our study did not evoke a sufficiently strong alert to make the remaining mares look for a leader's support. According to Hartmann et al. [22], the main value of horses and other species living in groups is the possibility of mutual vigilance and protection against predators. These authors also observed that there was no effect of social rank of a target horse that was being followed by the remaining group members and suggested that the consequences of removing either higher or lower ranked horses from their group may be overestimated by horse owners. Our results document, with a number of variables, that the rank order of separated mares is not a decisive factor for the response displayed by the remaining herd.

As was mentioned in the Introduction, studies on the horses' responses to the separation of some individuals from a herd are lacking. Jørgensen et al. [20] undertook this issue but in the context of interaction with humans when a horse was removed from its social group. Hartmann et al. [22] suggested an effect of the proportion of the group that was being removed on whether or not other horses followed the separated individuals. Our experiment was carried out in a small group of mares; however, the group was not much bigger than natural herds regarding the number of mares that develop the dominance hierarchy. Grouping mares with geldings in social herds does not interfere with usual horse behaviour [14], hence it seems that the results may be extrapolated to such groups of different genders. Summing up, humans may be unaware of how their activities affect the emotional arousal of horses. Such activities do not seem to be important, contrary to the actual influence on horses. The cognition of these phenomena may be key to understanding some unclear horse behaviours. Our results indicate horse owners should take into account agitation in the social herd during the separation of some of its members and provide peaceful conditions for such a procedure, whereas the rank of separated individuals does not have to be regarded. The herd, even created by humans, preserves the sensitivity to a temporary loss of its members. In spite of the fact that such situations are constantly repeated in practice, they are stressful for the horses. Inconsistent response to the separation of differently ranked members in the dominance hierarchy may mean that both dominant

and submissive members of the herd fulfil their roles in the hierarchy and a lack of them deranges the composition of the herd.

## 5. Conclusions

The results of the experiment reveal evident changes towards emotional arousal in the social herd elicited by a short separation of some conspecifics. The agitation in the remaining herd is elevated after the separation of some conspecifics. The response of the remaining herd is not consistently connected to the composition of the mares separated regarding their rank in the dominance hierarchy.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.S.; methodology, A.S., I.J. and, W.K.; software, A.W. and M.R.-B.; validation, A.S. and I.J.; formal analysis, A.W., W.K. and M.R.-B.; investigation, A.W., W.K. and M.R.-B.; resources, A.S. and A.W.; data curation, A.W.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, A.S. and W.K.; visualization, M.R.-B.; supervision, W.K.; project administration, I.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committee for Animal Experiments acting at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (no 27/2016; dated 13 May 2016).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Cameron, E.Z.; Setsaas, T.H.; Linklater, W.L. Social bonds between unrelated females increase reproductive success in feral horses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13850–13853. [\[CrossRef\]](#)
2. Houpt, K.A.; Keiper, R. The position of the stallion in the equine dominance hierarchy of feral and domestic ponies. *J. Anim. Sci.* **1982**, *54*, 945–950. [\[CrossRef\]](#)
3. Keiper, R.; Receveur, H. Social interactions of free-ranging Przewalski horses in semi-reserves in the Netherlands. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **1992**, *33*, 303–318. [\[CrossRef\]](#)
4. Shimada, M.; Suzuki, N. The contribution of mutual grooming to affiliative relationships in a feral Misaki horse herd. *Animals* **2020**, *10*, 1564. [\[CrossRef\]](#)
5. Giles, S.L.; Nicol, C.J.; Harris, P.A.; Rands, S.A. Dominance rank is associated with body condition in outdoor-living domestic horses (*Equus caballus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2015**, *166*, 71–79. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Linklater, W.L.; Cameron, E.Z. Tests for cooperative behaviour between stallions. *Anim. Behav.* **2000**, *60*, 731–743. [\[CrossRef\]](#)
7. Snorrason, S.; Sigurjónsdóttir, H.; Thórhallsdóttir, A.; van Dierendonck, M. Social relationships in a group of horses without a mature stallion. *Behaviour* **2003**, *140*, 783–804. [\[CrossRef\]](#)
8. Weeks, J.W.; Crowell-Davis, S.L.; Caudle, A.B.; Heusner, G.L. Aggression and social spacing in light horse (*Equus caballus*) mares and foals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2000**, *68*, 319–337. [\[CrossRef\]](#)
9. Hartmann, E.; Keeling, L.J.; Rundgren, M. Social interactions of unfamiliar horses during paired encounters: Effect of pre-exposure on aggression level and so risk of injury. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2009**, *121*, 214–221. [\[CrossRef\]](#)
10. Heitor, F.; Oom, M.M.; Vicente, L. Social relationships in a herd of Sorraia horses: Part I. Correlates of social dominance and contexts of aggression. *Behav. Processes.* **2006**, *73*, 170–177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Ransom, J.I.; Cade, B.S. Quantifying Equid Behavior—A research ethogram for free-roaming feral horses. *USGS* **2009**, *23*. [\[CrossRef\]](#)
12. Sigurjónsdóttir, H.; Haraldsson, H. Significance of group composition for the welfare of pastured horses. *Animals* **2019**, *9*, 14. [\[CrossRef\]](#)
13. van Dierendonck, M.C.; Sigurjónsdóttir, H.; Colenbrander, B.; Thorhallsdóttir, A.G. Differences in social behaviour between late pregnant, post-partum and barren mares in a herd of Icelandic horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2004**, *89*, 283–297. [\[CrossRef\]](#)
14. Jørgensen, G.H.M.; Borsheim, L.; Mejdell, C.M.; Søndergaard, E.; Bøe, K.E. Grouping horses according to gender: Effects on aggression, spacing and injuries. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2009**, *120*, 94–99. [\[CrossRef\]](#)
15. Lansade, L.; Bouissou, M.F.; Erhard, H.W. Reactivity to isolation and association with conspecifics: A temperament trait stable across time in situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *109*, 355–373. [\[CrossRef\]](#)
16. Burattini, B.; Fenner, K.; Anzulewicz, A.; Romness, N.; McKenzie, J.; Wilson, B.; McGreevy, P. Age-related changes in the behaviour of domestic horses as reported by owners. *Animals* **2020**, *10*, 2321. [\[CrossRef\]](#)

17. Lloyd, A.S.; Martin, J.E.; Bornett-Gauci, H.L.I.; Wilkinson, R.G. Horse personality: Variation between breeds. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *112*, 369–383. [[CrossRef](#)]
18. McGreevy, P.D.; Cripps, P.J.; French, N.P.; Green, L.E.; Nicol, C.J. Management factors associated with stereotypic and redirected behaviour in the Thoroughbred horse. *Equine Vet. J.* **1995**, *27*, 86–91. [[CrossRef](#)]
19. Hartmann, E.; Keeling, L.J.; Rundgren, M. Comparison of 3 methods for mixing unfamiliar horses (*Equus caballus*). *J. Vet. Behav.* **2011**, *6*, 39–49. [[CrossRef](#)]
20. Jørgensen, G.H.M.; Fremstad, K.E.; Mejdell, C.M.; Bøe, K.E. Separating a horse from the social group for riding or training purposes: A descriptive study of human–horse interactions. *Anim. Welf.* **2011**, *20*, 271–279.
21. Stachurska, A.; Róžańska-Boczula, M.; Wnuk-Pawlak, E. The difference in the locomotor activity of horses during solitary and paired release. *Pferdeheilkunde Equine Med.* **2021**, *37*, 50–54. [[CrossRef](#)]
22. Hartmann, E.; Søndergaard, E.; Keeling, L.J. Keeping horses in groups: A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2012**, *136*, 77–87. [[CrossRef](#)]
23. McDonnell, S.M.; Haviland, J.C.S. Agonistic ethogram of the equid bachelor band. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **1995**, *43*, 147–188. [[CrossRef](#)]
24. McDonnell, S. *A Practical Field Guide to Horse Behavior: The Equid Ethogram*; The Blood Horse, Inc.: Lexington, KY, USA, 2003; p. 375.
25. Christensen, J.W.; Keeling, L.J.; Nielsen, B.L. Responses of horses to novel visual, olfactory and auditory stimuli. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2005**, *93*, 53–65. [[CrossRef](#)]
26. Hall, C.; Huws, N.; White, C.; Taylor, E.; Owen, H.; McGreevy, P. Assessment of ridden horse behavior. *J. Vet. Behav.* **2013**, *8*, 62–73. [[CrossRef](#)]
27. Janczarek, I.; Stachurska, A.; Kędzierski, W.; Wiśniewska, A.; Ryzak, M.; Koziół, A. The intensity of physiological and behavioral responses of horses to predator vocalizations. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 431. [[CrossRef](#)]
28. Robilliard, J.J.; Pfau, T.; Wilson, A.M. Gait characterisation and classification in horses. *J. Exp. Biol.* **2007**, *210*, 187–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. McDonnell, S.M. Poulin A. Equid play ethogram. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2002**, *78*, 263–290. [[CrossRef](#)]
30. Rietmann, T.R.; Stuart, A.E.A.; Bernasconi, P.; Stauffacher, M.; Auer, J.A.; Weishaupt, M.A. Assessment of mental stress in warmblood horses: Heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioral parameters. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2004**, *88*, 121–136. [[CrossRef](#)]
31. Janczarek, I.; Stachurska, A.; Kędzierski, W.; Wnuk-Pawlak, E.; Wilk, I.; Zyglewska, K.; Paszkowska, A.; Ryzak, M.; Wiśniewska, A. Heart rate variability in Konik and purebred Arabian horses in response to different predator vocalisations. *Animal* **2021**, *15*, 100045. [[CrossRef](#)]
32. Kowalik, S.; Janczarek, I.; Kędzierski, W.; Stachurska, A.; Wilk, I. The effect of relaxing massage on heart rate and heart rate variability in Purebred Arabian racehorses. *Anim. Sci. J.* **2017**, *88*, 669–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Lublin, 15.03.2023r.

Prof. dr hab. Anna Stachurska  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
anna.stachurska@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybactwo  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Stachurska, A., Wiśniewska, A., Kędzierski, W., Różańska-Boczula, M., Janczarek, I. (2021). Behavioural and physiological changes in a herd of Arabian mares after the separation of individuals differently ranked within the dominance hierarchy. *Animals*, 11(9), 2694.

mój udział polegał współtworzeniu koncepcji pracy, współtworzeniu metodologii, częściowej ocenie manuskryptu, podaniu źródeł, przygotowaniu oryginalnego zarysu tekstu, napisaniu pracy, ustosunkowaniu się do części recenzji oraz wprowadzeniu niektórych zmian.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



.....  
Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Dr hab. Witold Kędzierski, prof. UP  
Katedra Biochemii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
witold.kedzierski@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Stachurska, A., Wiśniewska, A., Kędzierski, W., Różańska-Boczula, M., Janczarek, I. (2021). Behavioural and physiological changes in a herd of Arabian mares after the separation of individuals differently ranked within the dominance hierarchy. *Animals*, 11(9), 2694.

mój udział polegał na konsultacji założeń metodycznych oraz analizy formalnej, przeprowadzeniu części badań, ustosunkowaniu się do części recenzji oraz wprowadzeniu koniecznych zmian, a także nadzorze nad projektem.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



.....  
Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Dr Monika Różańska-Boczula  
Katedra Zastosowań Matematyki I Informatyki  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Głęboka 28  
20-612 Lublin  
monika.boczula@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Stachurska, A., Wiśniewska, A., Kędzierski, W., Różańska-Boczula, M., Janczarek, I. (2021). Behavioural and physiological changes in a herd of Arabian mares after the separation of individuals differently ranked within the dominance hierarchy. *Animals*, 11(9), 2694.

mój udział polegał na przygotowaniu oprogramowania, częściowej analizie formalnej, przeprowadzeniu części badań, a także wizualizacji.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.

*M. Różańska-Boczula*

Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Prof. dr hab. Iwona Janczarek  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
iwona.janczarek@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i  
Rybactwo  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Stachurska, A., Wiśniewska, A., Kędzierski, W., Różańska-Boczula, M., Janczarek, I. (2021). Behavioural and physiological changes in a herd of Arabian mares after the separation of individuals differently ranked within the dominance hierarchy. *Animals*, 11(9), 2694.

mój udział polegał na konsultacji części założeń metodycznych, ocenie części manuskryptu oraz administrowaniu projektem.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.

.....  
  
Podpis

## Article

# Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*)

Anna Wiśniewska <sup>1</sup>, Iwona Janczarek <sup>1</sup>, Izabela Wilk <sup>1</sup>, Ewelina Tkaczyk <sup>1</sup>, Martyna Mierzicka <sup>1</sup>,  
Christina R. Stanley <sup>2</sup> and Aleksandra Górecka-Bruzda <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Horse Breeding and Use, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; anna.wisniewska@up.lublin.pl (A.W.); iwona.janczarek@up.lublin.pl (I.J.); izabela.wilk@up.lublin.pl (I.W.); ewelina.tkaczyk@up.lublin.pl (E.T.); khiuk@up.lublin.pl (M.M.)

<sup>2</sup> Animal Behaviour & Welfare Research Group, Department of Biological Sciences, University of Chester, Chester CH1 4BJ, UK; christina.stanley@chester.ac.uk

<sup>3</sup> Department of Animal Behaviour and Welfare, Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, 05-552 Magdalenka, Poland

\* Correspondence: a.gorecka@igbzpan.pl; Tel.: +48-22-736-71-24; Fax: +48-22-756-14-17

**Simple Summary:** Horses lacking exposure to cattle often show a fearful response when confronted with cows. In controlled conditions, we tested the responses towards two cows and a novel moving object in twenty horses in arena and hand-leading tests. The horses avoided the proximity of all stimuli, but of one of the cows the most. However, both cows provoked a stronger cardiac response than an inanimate object. We hypothesise that this response may be due to both neophobia and heterospecific interactions.



**Citation:** Wiśniewska, A.; Janczarek, I.; Wilk, I.; Tkaczyk, E.; Mierzicka, M.; Stanley, C.R.; Górecka-Bruzda, A. Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals* **2021**, *11*, 3081. <https://doi.org/10.3390/ani11113081>

Academic Editor: Chris W. Rogers

Received: 18 October 2021

Accepted: 27 October 2021

Published: 28 October 2021

Corrected: 10 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Abstract:** Ridden horses have been reported to be fearful of cows. We tested whether cows could provoke behavioural and cardiac fear responses in horses, and whether these responses differ in magnitude to those shown to other potential dangers. Twenty horses were exposed to cow, a mobile object or no object. The time spent at different distances from the stimulus was measured. In a separate test, heart rate (HR), root mean square of successive differences between heartbeats (RMSSD) and the horses' perceived fear were assessed at various distances from the stimuli. The horses avoided the area nearest to all stimuli. During hand-leading, the cow elicited the highest HR and lowest RMSSD. Led horses' responses to the cow and box were rated as more fearful as the distance to the stimulus decreased. Mares had a higher HR than geldings across all tests. HR positively correlated with the fearfulness rating at the furthest distance from the cow and box, and RMSSD negatively correlated with this rating in cow and control conditions. Our results show that these horses' avoidance response to cows was similar or higher to that shown towards a novel moving object, demonstrating that potentially, both neophobia and heterospecific communication play a role in this reaction.

**Keywords:** fear; horse; cattle; avoidance; heterospecific interaction; sex differences



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Historically, bovines and working equines were often kept and grazed together in extensive rural systems, meaning they were habituated to each other's presence. Several projects reintroducing horses and cattle to pre-domestication, semi-natural conditions have resulted in successful, peaceful coexistence between free-roaming horses and cattle, each of them forming stable species-specific groups [1]. Despite an apparent tolerance between horses and cows when co-grazing, there have been reports from local riders to the authors (personal communications) of leisure horses showing a fearful response to cows. At present, in many countries, both species are kept in separate facilities so they rarely, or never, meet



in pastures or yards. In particular, when horses are housed for riding in suburban areas, mostly being exercised in controlled environments such as indoor or outdoor arenas, they do not experience contact with other ungulates of a similar size. When suddenly exposed to a cow during riding outside the equestrian centre, many horses thus respond with fear and avoidance behaviours.

Fearfulness varies in magnitude between individual horses. It can be defined as a “basic psychological characteristic of the individual that predisposes it to perceive and react in a similar manner to a wide range of potentially frightening events” [2]. Fear in ridden horses is often associated with a sudden stop, alarmed posture, intense staring at the novel object and, when the alarm level is high enough, it can provoke a flight response [3]. A spooked horse can be hard to control by its rider; considering the speed of escape, accidents during horse riding can put a rider in significant danger [4]. As a result of its high relevance to riders and handlers of horses, fear has been the object of several scientific studies e.g., [5]. During ridden work, horses are frequently asked to accept events and objects that they would normally avoid [6]. Specifically, the readiness to react with alarm-associated behaviour in response to unfamiliar, unexpected objects is often used to quantify fearfulness in horses during standardized tests [7]. The objects used are inanimate, often mobile, objects and have previously included, for example, rotating balloons [8], boxes with “hands and legs” and a novel surface [9], a lifted up black plastic bag [10], a plastic container filled with wooden sticks [11] or a children’s plastic playset [12] and many other. For horses, it is often not the novelty of a stimulus but the suddenness of it being introduced that is perceived as more fear-eliciting [2,12]. Therefore, mobile objects, including cars or other machines, often provoke alertness and avoidance in horses (AGB, practical observations). However, to our knowledge, the fear response to an unfamiliar, similar-sized animal has not previously been tested in horses in standardised conditions.

The aim of the present study was to investigate whether domestic horses show specific fearfulness towards cows. We tested the reaction of horses to the presence of a cow compared with a novel mobile object to elucidate whether cows can provoke behavioural and cardiac fear responses in horses, and whether these responses differ in magnitude to those shown to other potential dangers [13]. Considering that horses and ungulates such as cows or sheep commonly coexist peacefully in rural settings, and also that in evolutionary history, wild equids are likely to have formed mixed species herds with other ungulate species as protection against predators, we predict that horses are likely to be less fearful of cows than of mobile novel objects.

To assess the fear response, behavioural reactions indicative of alarm and avoidance and physiological measures of stress (heart rate, HR, and the root mean square of successive differences between heartbeats, RMSSD) were recorded, as both are confirmed indicators of the stress and flightiness e.g., [14–16]. Finally, we investigated whether human evaluation of the magnitude of a horse’s fearfulness toward an unfamiliar object correlated with physiological measures of fear; it was reported that an experienced horse handler can reliably assess fear levels [8,17]; therefore, this could have implications for rider and handler safety.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ethical Note

The study involved the analysis of observations of animals and mimicked normal conditions at an equestrian club. No invasive experimentation was performed in view of European directive 2010/63/EU and the Polish laws related to ethics in animal experimentation. The horses belonged to the University of Life Sciences in Lublin, Poland, and were maintained in a riding centre under the care of one of the authors (IJ) who monitored their welfare as assigned by the university. The procedures took place in a familiar environment and did not cause them any pain, suffering, or damage. The manager of the facility allowed the experiment to be performed since common turnout of horses and cattle was intended in future on pasture. The habituation of the two species of animals to each other became

a standard procedure at the time of the experiment. The moving box was in line with the manager's plan to habituate the horses to new objects by desensitization. In this way, horses were trained to travel outside the facility to be safer for riders.

## 2.2. Animals

Twenty riding school warmblood horses, 13 geldings and 7 mares, with a mean age of  $13 \pm 5.2$  years, were used in the study. They were housed in individual box stables with straw bedding, fed with commercial pellets and hay, and a salt block and water were available *ad libitum*. The horses were grazed in groups in paddocks for six hours daily. They were ridden for on average of seven hours per week, with an approximately equal workload in terms of physical exercise. During the study period, all horses were clinically healthy. All horses had previous incidental experience in terms of visual contact with two cows inhabiting a separate building within the riding centre (located about 200 m from stables) for five months prior to the onset of the study, but not when (infrequently) out hacking. No close contact or common pasturing was practiced between horses and cows at this centre.

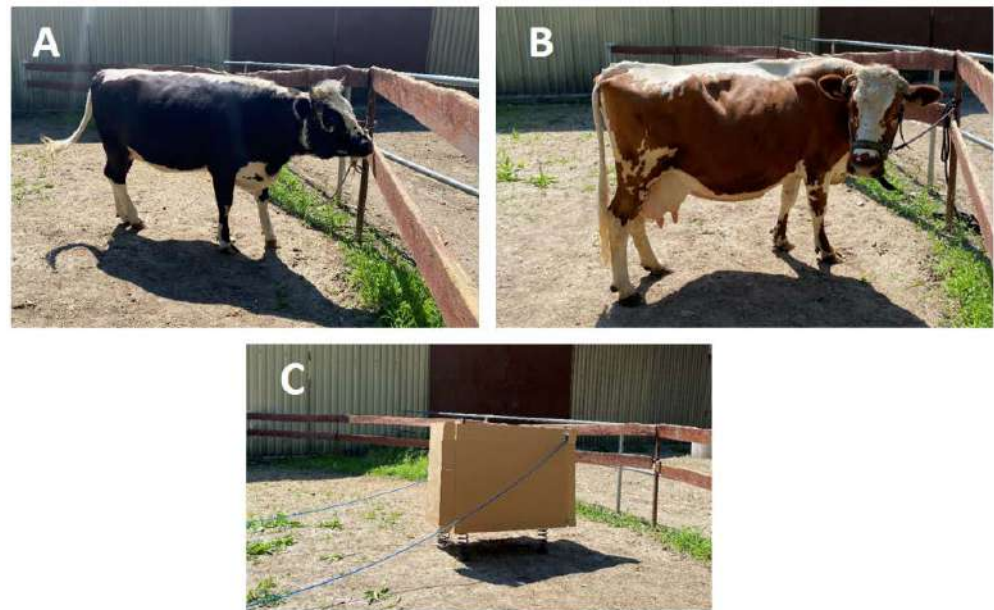
Two tests were carried out between June and September 2020 in the equestrian centre where the animals were stabled: an arena test and a hand-leading test. During the tests, the ambient temperature ranged from 19 to 24 °C.

## 2.3. Arena Test

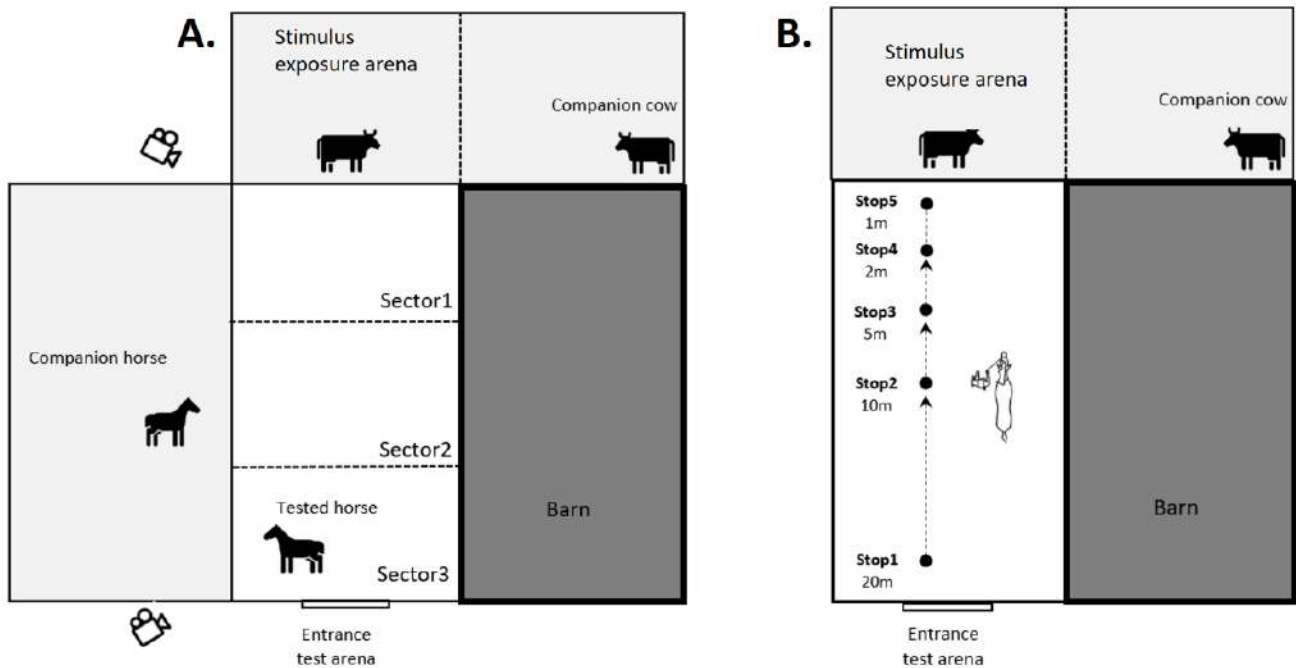
The horses were submitted to a test of their voluntary responses to freely-moving cows or a novel mobile box in the arena test. Two different cows were successively presented as stimuli to determine if each would elicit similar response in horses. During testing, care was taken for the horses not to be potentially distracted by humans, other horses or vehicles passing in close proximity. The uncovered rectangular testing arena (20 × 40 m), familiar to these horses, was divided into three sectors (marked by a line scratched on the ground); Sector1 was the nearest and Sector3 was farthest from the stimulus presentation arena (Figure 1A). On one long side of the testing arena was the wall of a building; on the other side, there was a paddock where a familiar companion horse (always the same individual) was placed during testing. The stimuli were presented on the short side of the testing arena (stimulus exposure arena, 20 × 10 m, Figure 1A). These were two cows of different sizes and colours (Cow1, height at withers 1.17 m, Polish Black White-Backed breed; Cow2, height at withers 1.23 m, Polish Red White-Backed breed, Figure 1A,B), and a novel cuboid cardboard box (1.2 × 1.8 × 0.6 m, Figure 1C), with a mechanism enabling automatic movements in four directions by approximately 15 cm in a standardized manner (Box). The arenas and paddocks were fenced to enable free contact between the animals, including tactile contact. Water was provided to cows and horses *ad libitum*.

At the start of a testing session, a horse was brought into the test arena and allowed to move freely around the arena for 30 min, while a companion horse was present in an adjoining paddock (Control Stay). After 30 min of the Control Stay condition, the stimulus (Cow1) was introduced to the neighbouring stimulus exposure arena and remained there for a further 30 min. The companion cow (Cow2) was in a separate enclosure adjoining the stimulus exposure arena, in the part not visible to the tested horse but visible to Cow1 (Figure 2A). After 30 min, Cow1 was replaced by Cow2 for another 30 min. The order in which the two cows were presented was allocated randomly amongst the horses, with half experiencing Cow1 first and half experiencing Cow2 first. After one month, the test was repeated following the same protocol, but with a novel (Box), placed in the centre of the exposure arena, replacing the cow. The box was activated before the arrival of the horse and set to move in a random order, during the duration of the test phase (30 min). Therefore, each horse was exposed to 3 different stimuli: Cow1, Cow2 and the Box, preceded by the Control Stay condition, each of duration of 30 min. Two cameras (Sanyo Xacti VPC-WH1, Moriguchi, Japan) installed on two sides of the testing arena recorded the behaviour of the horse being tested. The horse's behaviour was later scored by an experienced researcher

(AW) in terms of the duration of the stay in the chosen sector and the frequency and total duration of various “alert” behaviours (Table 1) by viewing the recorded footage.



**Figure 1.** The stimuli used in the study: Cow1 (A), Cow2 (B) and the Box (C). The cows were tethered for the photo but free to move during the study. Two electric cables power the mechanism hidden in the cardboard box.



**Figure 2.** Schematic representation of (A). Arena test and (B). Hand-leading test.



**Table 1.** The variables measured in tests.

| Measurement       | Variable     | Definition  | Unit                   |
|-------------------|--------------|---|------------------------|
| Arena test        | TimeSector   | The total percentage of time the horse spent in Sector1–3 during the Control Stay or in the presence of Cow1, Cow2 or the Box   | %                      |
|                   | Alert_occurr | The total number of occurrences of the following alert behaviours: vocalisations (whinny, neigh), snorts (loud, forceful burst of the air through the nostrils), defecations (eliminating faeces) during exposure to Control Stay, Cow1, Cow2 or Box            | count                  |
|                   | Alert_dur    | The total durations of the following alert behaviours: holding the tail high (above the horizontal line relative to its base) and the head and neck high (above the horizontal line relative to its withers) during exposure to Control Stay, Cow1, Cow2 or Box | seconds                |
| Hand-leading test | HR           | Mean heart rate during the 10 s stay at each stop   | beats per minute (bpm) |
|                   | RMSSD        | Mean RMSSD (Root mean square of successive differences between heartbeats) during the 10 s stay at each stop  | milliseconds           |
|                   | VASf         | The researcher's score of the perception of the fearfulness of the horse at stops 1–5. This was scored using a continuous scale from 0 (not at all afraid) to 100 (extremely fearful) by the researcher marking a point on a 100 mm length bar.                 | mm                     |

#### 2.4. Hand-Leading Test

Two months after the arena test with the Box, the same horses, equipped with a telemetry device (Polar RS800CX, Polar Oy, Finland) to which they were habituated during periodic standard health examination, were individually hand-led to the testing arena by a handler (always the same, experienced person). Care was taken that the horses were not exposed either to cows or to the box between these test phases. The overview of the hand-leading test is presented in Figure 2B. The horse was led into the testing arena and stopped for 10 s at five different positions (marked by a line scratched on the ground) in succession: 20 m (Stop1), 10 m (Stop2), 5 m (Stop3), 2 m (Stop4) and 1 m (Stop5) distances from the previous location of the stimuli (control lead). The handler did not use any voice command and led the horse in the manner to which they were accustomed, with only slight tension on the lead rope when encouraging the horse to approach the stimulus presentation arena. At each stop, the horse was held on a loose lead rope to enable its movement around the handler who was not allowed to interact with the horse. After one week, the hand-leading test was repeated, and half of the horses being asked to approach the cow (Cow1 or Cow2, whichever was used last in that individual horse's arena test) and the other half approaching the Box (with the horses being allocated randomly to each of these two conditions). The same day, the groups were then swapped, and individuals were asked to approach the other stimulus (Cow or Box). During the test, the experimenter (AW) observed the horses from about 10 m, standing outside the fence, at the level of Stop2.

The intensity of perceived fearfulness of the horse at each stop was scored by the experimenter during testing by them marking a point on a visual analogue scale (VASf, see Table 1). VASf rating has been used in previous studies for the assessment of subjective feelings in humans e.g., [18,19] and, in equine veterinary science, to measure the magnitude of pain in the horse e.g., [20,21]. For each stop, the heart rate (HR) and the root mean square of successive differences between heartbeats (RMSSD) in 10-s period were later extracted from the monitor's files.

The variables were analysed using Polar ProTrainer5 software. No filter level was applied since clear, almost artefact-free RR curves were recorded (in three files the % of artefacts were 0.4%; 0.7%; 1.3%) [22,23].

### 2.5. Statistical Analysis

All analyses were performed in the SAS statistical package (SAS 9.4., SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA).

The occurrences of alert behaviours and their durations were extremely low (mean ALERT-occur:  $2.90 \pm 4.83$ , and ALERT-dur:  $8.83 \pm 32.6$  s), so these variables were not further analysed. For time spent in sectors (TimeSector), the effect of the sector (Sector1, Sector2 and Sector3), the stimulus (Control Stay, Cow1, Cow2/cow, Box), the interaction of stimulus with the sector; the sex (gelding, mare) and age (below or above 10 years old) were assessed by applying generalised mixed models (GLIMMIX), assuming a binomial distribution for proportions of observed durations related to the total time of observations (for TimeSector). The HR did not follow normal distribution, and thus was log-transformed and Gaussian distribution was confirmed by a Kolmogorov–Smirnov test. For HR, RMSSD and VASf, the effect of the stop, the stimulus, the interaction of stimulus with the stop, the sex and age were assessed by applying GLIMMIX, assuming Gaussian distribution for HR and RMSSD and a Poisson distribution for VASf. All models included a random factor of animal ID and a Tukey adjustment accounting for repeated measures on the same animals. The ILINK option of SAS was used to compute the estimates and standard errors on the original scale of variables; for back-transformed values, confidence intervals were presented as a measure of variance.

To examine how well the assessment of fear is reflected by physiological measures, a Spearman’s correlation was carried out between VASf scale and either HR or RMSSD in the Control Lead condition, and when the Cow and Box was present in the hand-leading test. The analyses were performed for VASf and both cardiac variables at Stop1 (the farthest to the stimulus) and Stop5 (the nearest to the stimulus), as these two stops differed by the greatest distance.

## 3. Results

### 3.1. Arena Test

The effects of the stimuli, sectors, age and sex on TimeSector (time spent in each sector of the arena) are shown in Table 2. We did not find the age of the horse to significantly predict any of the studied variables.

**Table 2.** Statistical significance of Sector, Stimulus and the interaction of Sector and Stimulus (Sector \* Stimulus) for TimeSector (the % of total time spent in each sector).

| Variable       | Sector          | Stimulus    | Sector * Stimulus | Sex        | Age        |
|----------------|-----------------|-------------|-------------------|------------|------------|
|                |                 |             | <b>F; p</b>       |            |            |
| TimeSector (%) | 16,714.1; <0.01 | 5.18; <0.01 | 504.73; <0.01     | 0.18; 0.67 | 0.38; 0.53 |

The horses spent significantly different percentages of time in each sector according to the stimulus presented (Table 2).

Across all conditions, the horses significantly avoided Sector1 in comparison to Sector2 ( $t = 23.5$ ,  $p < 0.01$ ) and Sector3 ( $t = 142.4$ ,  $p < 0.01$ ), which was most preferred area to stay in (Sector2 vs. Sector3,  $t = 163$ ,  $p < 0.01$ ). All detailed comparisons are provided in Table 3.

**Table 3.** The time spent in Sectors 1, 2 and 3 as related to the stimulus.

| Stimulus Variable | Control Stay         | Cow1          | Cow2          | Box           |
|-------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|
|                   | Mean, Standard Error |               |               |               |
| TimeSector1 (%)   | 30.4, 0.24 AX        | 17.8, 0.20 BX | 30.6, 0.24 AX | 25.3, 0.22 CX |
| TimeSector2 (%)   | 20.7, 0.21 AY        | 24.6, 0.23 BY | 19.8, 0.21 AY | 22.7, 0.22 CY |
| TimeSector3 (%)   | 48.8, 0.26 AZ        | 58.2, 0.26 BZ | 49.6, 0.26 AZ | 52.1, 0.26 CZ |

A, B, C: means with different letters in rows differ between stimuli at  $p < 0.01$ ; X, Y, Z: means with different letters in columns differ between stimuli at  $p < 0.01$ .

Within all sectors, when comparing the times spent in the presence of different stimuli, the most avoided stimulus was Cow1, followed by Box, Cow2 and the Control Stay. The most aversive stimulus, Cow1, provoked the least time being spent in the sector nearest to the stimulus (Sector1) compared with Control Stay ( $t = 39.2, p < 0.01$ ), Cow2 ( $t = 39.7, p < 0.01$ ) or the Box ( $t = 24.2, p < 0.01$ ). The Box was less aversive than Cow1 but provoked less time to be spent in Sector1 than did Cow2 ( $t = 16.0, p < 0.01$ ), and the Control Stay ( $t = 15.5, p < 0.01$ ). Both Cow2 and Control Stay were best tolerated by horses in Sector1 ( $t = 0.46, p = 1.00$ ).

In the middle sector (Sector2), TimeSector was higher when horses were confronted with Cow1 as compared to the Box ( $t = 5.91, p < 0.01$ ), Cow2 ( $t = 15.2, p < 0.01$ ) and the Control Stay ( $t = 12.4, p < 0.01$ ), while the Box provoked more time to be spent in Sector1 than Cow2 ( $t = 9.43, p < 0.01$ , and the Control Stay ( $t = 6.32, p < 0.01$ ). Both Cow2 and Control Stay provoked the least avoidance of Sector1 ( $t = 3.12, p = 0.08$ ).

In the sector farthest from the stimulus (Sector3), again Cow1 was responsible for horses choosing this sector for longer stays as compared to the Box ( $t = 8.73, p < 0.01$ ), Cow2 ( $t = 23.0, p < 0.01$ ) and the Control Stay ( $t = 25.1, p < 0.01$ ). The Box provoked more time to be spent in Sector3 than both Cow2 ( $t = 16.4, p < 0.01$ ) and the Control Stay ( $t = 8.73, p < 0.01$ ), that did not differ in terms of TimeSector ( $t = 2.09, p = 0.63$ ).

### 3.2. Hand-Leading Test

The effects of the stimuli, stop, sex and age on HR, RMSSD and VASf are shown in Table 4.

**Table 4.** Statistical significance of Stop, Stimulus, the interaction of Stop and Stimulus (Stop \* Stimulus), Sex and Age for HR, RMSSD and VASf.

| Variable   | Stop       | Stimulus     | Stop * Stimulus | Sex        | Age        |
|------------|------------|--------------|-----------------|------------|------------|
|            |            |              | F; p            |            |            |
| HR (bpm)   | 0.29; 0.89 | 133.0; <0.01 | 0.61; 0.77      | 5.27; 0.02 | 2.42; 0.12 |
| RMSSD (ms) | 1.44; 0.22 | 25.24; <0.01 | 0.90; 0.52      | 6.48; 0.01 | 0.52; 0.47 |
| VASf (mm)  | 4.13; 0.01 | 7.78; <0.01  | 1.47; 0.17      | 0.07; 0.78 | 1.34; 0.25 |

The HR and RMSSD results in the hand-leading test are presented in Table 5. The HR differed between stimuli and sexes (Table 4). Generally, the HR increased when the Cow was presented; this resulted in a higher HR than Control Lead (by 13.9 bpm,  $t = 13.6, p < 0.01$ ) and the Box (by 14.9 bpm,  $t = 11.5, p < 0.01$ ), while the HR in response to Control Lead and Box did not differ ( $t = -1.09, p = 0.52$ ). Mares generally had a higher HR than geldings (by 6.7 bpm,  $F = 5.30, p = 0.02$ ).

Similarly, RMSSD was affected by the stimulus and the sex of the horse (Table 4). The Cow evoked a lower RMSSD than Control Lead (by 28.4 msec,  $F = 12.0, p < 0.01$ ) and the Box (39.7 msec,  $F = 14.0, p < 0.01$ ), while the last two did not differ ( $F = 0.46, p = 0.67$ ). Mares generally showed a lower RMSSD than geldings (by 28.7 msec,  $F = 6.48, p < 0.01$ ).

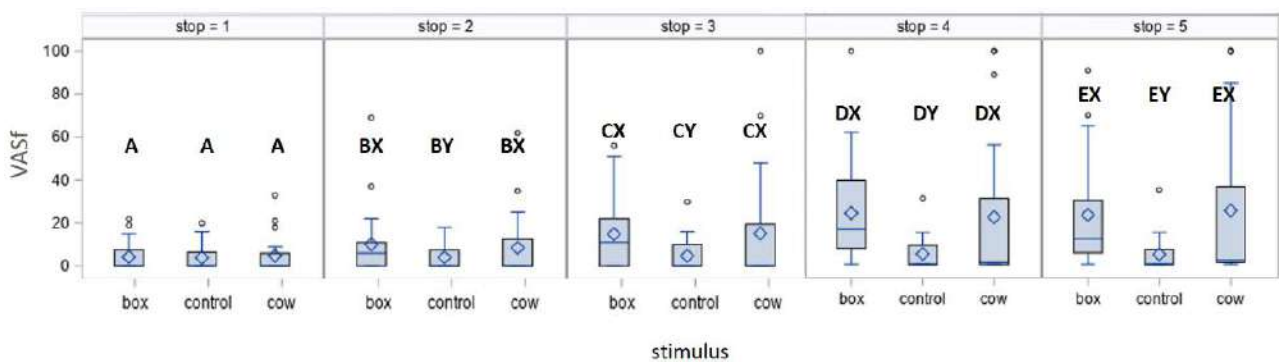
The HR and RMSSD did not differ between stops (Supplementary Material, Figures S1 and S2), while the VASf did (Table 4). The fearfulness rating differed according to the stimulus. In human assessment, the Cow and the Box caused more fearfulness at each stop (except for

Stop1) than the Control Lead (detailed comparisons in Figure 3). Except for the Control Lead, the VASf increased significantly between subsequent stops.

**Table 5.** The effect of stimulus and sex on HR (bpm) and RMSSD (msec).

| Variable | Stimulus                   |                     |                     | Sex                 |                     |
|----------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|          | Control                    | Cow                 | Box                 | Geldings            | Mares               |
|          | Mean 95% CI (Lower; Upper) |                     |                     |                     |                     |
| HR       | 50.8 (45.2; 56.7) A        | 64.7 (67.7; 72.2) B | 49.8 (44.4; 55.6) A | 51.4 (43.3; 58.1) a | 58.1 (43.0; 68.7) b |
| RMSSD    | 71.7 (52.3; 97.1) A        | 43.3 (31.8; 58.7) B | 69.9 (51.3; 94.7) A | 76.1(53.8; 107.0) A | 47.4 (29.6; 75.6) B |

A, B back-transformed means in rows for stimuli and sexes differ at  $p < 0.01$ ; a, b back-transformed means in rows for stimuli and sexes differ at  $p < 0.05$ .



**Figure 3.** The assessment of fearfulness of horses (VASf) exposed to different stimuli at stops from the furthest (Stop1) to the nearest (Stop5). Scores with A–E letters differ significantly at  $p < 0.01$  between stops; scores with X, Y letters differ significantly at  $p < 0.01$  between stimuli; values with no letter do not differ to other values. Diamonds represent median values, borders of boxes occur at upper and lower quartiles and blue lines indicate maximum and minimum values. Circles show outliers.

For all stops, VASf was significantly, but weakly, positively correlated with HR ( $r_s (n = 20) = 0.22, p < 0.01$ ) and negatively correlated with RMSSD ( $r_s (n = 20) = -0.24, p < 0.01$ ). The correlations between the HR, RMSSD and VASf at the stop the furthest from the stimulus (Stop1) and the nearest to the stimulus (Stop5) during the hand-leading test are presented in Table 6. At the farthest Stop1, the subjective (VASf) and objective (HR and RMSSD) measures were correlated for four (five including the tendency for RMSSD in Box lead) from six possible correlations, showing a moderate agreement between the handler’s assessment of the behaviour and the physiological response of the horse during the lead when the cow and the box were present. At the nearest distance (Stop5), only the RMSSD during leading towards the Box correlated negatively with VASf ( $p = 0.05$ ).

**Table 6.** Results from Spearman’s correlations between the experimenter’s rating of fearfulness (VASf) and physiological measures (HR–heart rate and RMSSD–root mean square of successive differences between heartbeats) at Stop1 and Stop5 during the hand-leading test.

|             | Stimulus | HR    |      | RMSSD |      |
|-------------|----------|-------|------|-------|------|
|             |          | $r_s$ | $p$  | $r_s$ | $p$  |
| VASf, Stop1 | Control  | 0.31  | 0.17 | −0.51 | 0.02 |
|             | Cow      | 0.48  | 0.03 | −0.50 | 0.02 |
|             | Box      | 0.59  | 0.01 | −0.41 | 0.07 |
| VASf, Stop5 | Control  | 0.04  | 0.85 | −0.22 | 0.34 |
|             | Cow      | 0.30  | 0.20 | −0.07 | 0.74 |
|             | Box      | 0.39  | 0.09 | −0.44 | 0.05 |

#### 4. Discussion

The reaction of the studied horses to both animate and inanimate stimuli, i.e., their levels of alertness and the cardiac response, did not strongly differ from those in the control stay or lead, meaning both objects were quite well tolerated. However, the avoidance of the stimuli and changes in cardiac activity (increased sympathetic and decreased parasympathetic autonomic responses) could still be observed. Our results confirmed the hypothesis that in horses that are not habituated to cows, the response is similar, or even higher, in terms of fearfulness or avoidance, as to an inanimate novel moving object. In contrast to our expectations, cows were not better tolerated by horses than a novel, mobile object. Generally, the selection of the area further from stimuli observed in the arena test was indicative of higher avoidance of, specifically, one of the cows, while the cardiac activity in the hand-leading test showed that both cows provoked an avoidance response, which was higher than in box and control treatments. However, human assessment did not differentiate the between behaviour of horses approaching the different stimuli, with the researcher perceiving the behaviour of the horses when leading towards the cows and the box as equally fearful.

Our results confirm previous findings that horses, as prey animals whose initial reaction to potential threats is often flight, are sensitive to (potentially) all unknown frightening stimuli [2], and this propensity to react with fearfulness [4], as encoded in equine temperament [24], still exists despite years of domestication and selection against fearful behaviour [11]. Instinctive reactions to mobile objects, living or not, provoke avoidance in horses [25,26]. In a ridden or hand-leading situation, in particular, when horses are restrained, the restraint per se may provoke a stress response [27]. Moreover, the emotions of riders may be transferred to horses [28,29], which can affect the perception of objects as more frightening [30]. This fact can be explanative of similar perception of the two stimuli and the experimenter's likelihood to expect a fear response when horses were led towards either stimulus.

In our tests, the examination of voluntary behaviour of horses when released in an open space of test arena showed that the horses typically did not approach the cow, except for one horse that accepted very close contact with the cow, including her licking the horse's face. In the hand-leading test, all horses, except one individual, allowed the approach to the stimulus, although they were reluctant to approach them voluntarily, which confirm Christensen's [31] results, that trained horses rather easily habituate to objects they previously avoided. Since horses, similar to other domestic animals such as dogs [32] or goats [33], seek human support when confronted with a challenging task [34], the presence of the handler could also in this case play a supportive role [35]. It seems then, that a cow is just another novel object to which the horses, when appropriately trained, can easily habituate.

In the hand-leading test, the researcher assessed the fearful response of horses to the cow and the box as being at similar levels, especially when approaching them to the closest point. This was particularly evident in the rating of behaviour during the Control Lead, where the handler did not expect any fearful reaction from horses, especially at Stop1. However, as shown by cardiac responses, the cows were perceived by horses as more frightening than another object, a mobile box. This result shows that even when alerted, horses are able to assess to some degree of level of the aversiveness of the object they are afraid of. As shown by Lansade et al. [24], some objects provoking fearful behaviour were no longer frightening after six months or longer, while the others caused still the same fearful response at each of the exposures over a two-year duration. This evidences that horses can individually assess and behave differently toward objects to which they are exposed. In particular, discrimination between individual cows, and a more fearful response to one of them, agree with previous reports that horses possess cognitive abilities that enable discrimination between conspecifics [36] or other species, such as humans [37]. These abilities are evident considering that horses are social animals, where recognition of

familiar or unfamiliar individuals is crucial for the formation of groups and for maintaining social hierarchies [38].

Despite a researcher's assessment of increasing fearfulness in horses as they approached stimuli, the HR of horses did not significantly rise when approaching the stimuli. This result was probably related to the low variability in the heart rate, which remained at the same level from the farthest to the nearest stop, indicating that the horses had already 'physiologically' reacted to the stimulus, and specifically to the cows, from the distance of 20 m. Since horse vision is characterised by low acuity [39,40], our results are explanative of the typical instantaneousness of reaction of the horses that flee long before the inspection of potentially dangerous object.

Although we showed here that in the studied horse population, cows provoked higher avoidance responses than a similar-sized inanimate mobile object, our study does not explain why this was so. Within this study, we also cannot explain why Cow1 was more frightening for the horses. It is possible that the behaviour of cows, rather than that of the box, was more unpredictable for horses. It has been shown in the previous studies [41,42] that humans and other species can discriminate and specifically react to biological motion. It is possible that the difference in the movement characteristics between the inanimate object (Box) and the cows was perceived by the horses and, consequently, their reactions were different. Despite both cows being presented in a standardized way and that they were mainly standing ruminating, we could not exclude some heterospecific communication, such as by odour, possible vocalisation and movement that could be attributed only to living organisms [43]. However, considering that voluntary mixed-species grouping and communication, for instance as an anti-predatory strategy [44], are practiced by African ungulates including equids (plains zebras, *Equus quagga*), the current practice of separating horses and cows is likely to best explain the (initial) alert and avoidance behaviour. In the long-term, as observed by Sablik et al. [45], interspecific communication during common pasturing becomes evident: alarmed horses were mostly ignored by the cattle herd, but alarmed cattle were followed by horses. We can therefore hypothesise that not only neophobia is involved in the avoidance of cows. Our results could be further enhanced by studies on familiarity and habituation to cows and other animals, which could shed more light on interspecific communication between cows and horses.

Finally, our study indicates a stronger physiological (cardiac) response in mares during the hand-leading test. More cautious behaviour seems justified in females which, by nature, are often both pregnant and with a foal at foot. The differences in reactivity between horses of different sexes, including fearfulness, and the relative welfare of mares and geldings, are currently under scientific debate [46,47]. The confirmation of the existence of sex differences in equine fear behaviour depends on the approach, type of animal and measures used, with some studies confirming sex differences e.g., [47] and others failing to do so [16]. Sex differences in fearful behaviour have been confirmed in a range of animals, including farm e.g., [48,49] and laboratory e.g., [50] animals, meaning this should be considered when studying and responsibly using horses.

## 5. Conclusions

In this study, we found cows to be the objects that horses preferred to avoid. Although the two species studied can be successfully pastured together, it seems that in the restricted conditions of a relatively small test arena in our study, horses were not comfortable in the presence of cows. This study confirms the cows, as animate and therefore unpredictable objects, can provoke more avoidance than a mobile, yet inanimate, object. Heterospecific interactions and communication between these two species cannot be excluded as an explanation; this is an unexplored issue that deserves further investigation.

Additionally, our study, showing stronger cardiac activity during the hand-leading test in mares, indicates that sex differences in horses should be considered in temperament research and practical husbandry.



**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani11113081/s1>. Figure S1: Heart Rate (HR) in stops 1–5 when exposed to Box, Cow and in Control lead; Figure S2: Root Mean Square of Successive Differences between heartbeats (RMSSD) in stops 1–5 exposed to Box, Cow and in Control lead.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.J.; methodology, I.J., A.W. and, A.G.-B.; software, A.W. and, A.G.-B.; validation, A.W. and I.J.; formal analysis, I.W., M.M. and, A.G.-B.; investigation, E.T., I.W., and A.G.-B.; resources, A.W. and I.J.; data curation, A.G.-B.; writing—original draft preparation, A.G.-B. and C.R.S.; writing—review and editing, A.G.-B. and C.R.S.; visualization, A.G.-B.; supervision, I.J.; project administration, A.W. and I.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Ethical review and approval were waived, due to non-invasiveness of the study. The horses were subjected to non-invasive procedures in view of European directive 2010/63/EU and Polish laws related to ethics in animal experimentation (only behavioural observations, fairly elevated stress indices, at the level similar to everyday riding use of horses exposed to novelty). The horses belonged to the University of Life Sciences in Lublin, Poland and were maintained in a riding center under the care of one of the authors (I.J.) who monitored their welfare and veterinary state as assigned by the university. The procedures took place in a familiar environment that they experienced daily and did not cause them any pain, suffering, or damage. The horses were clinically healthy, with any signs of sense disorders, no clinical signs of lameness or musculoskeletal injury; they demonstrated a comparable condition and athletic ability. All procedures were conducted in accordance with the Polish Animal Protection Act (21 August 1997).

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Cromsigt, J.P.; Kemp, Y.J.; Rodriguez, E.; Kivitt, H. Rewilding Europe's large grazer community: How functionally diverse are the diets of European bison, cattle, and horses? *Rest. Ecol.* **2018**, *26*, 891–899. [[CrossRef](#)]
2. Boissy, A. Fear and fearfulness in animals. *Q. Rev. Biol.* **1995**, *70*, 165–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Christensen, J.W. Fear in Horses. Social Influence, Generalisation and Reactions to Predator Odour. Ph.D. Thesis, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, University Aarhus, Aarhus, Denmark, 2007; pp. 1–44.
4. Thomas, K.E.; Annett, J.L.; Gilchrist, J.; Bixby-Hammett, D.M. Non-fatal horse related injuries treated in emergency departments in the United States, 2001–2003. *Br. J. Sports Med.* **2006**, *40*, 619–626. [[CrossRef](#)]
5. McGreevy, P.; Christensen, J.W.; König von Borstel, U.; McLean, A.N. *Equitation Science*, 2nd ed.; Wiley-Blackwell: West Sussex, UK, 2018; pp. 1–393.
6. Górecka-Bruzda, A.; Jastrzębska, E.; Muszyńska, A.; Jędrzejewska, E.; Jaworski, Z.; Jezierski, T.; Murphy, J. To jump or not to jump? Strategies employed by leisure and sport horses. *J. Vet. Behav.* **2013**, *8*, 253–260. [[CrossRef](#)]
7. Forkman, B.; Boissy, A.; Meunier-Salaün, M.C.; Canali, E.; Jones, R.B. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol. Behav.* **2007**, *92*, 340–374. [[CrossRef](#)]
8. Momozawa, Y.; Ono, T.; Sato, F.; Kikusui, T.; Takeuchi, Y.; Mori, Y.; Kusunose, R. Assessment of equine temperament by a questionnaire survey to caretakers and evaluation of its reliability by simultaneous behavior test. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2003**, *84*, 127–138. [[CrossRef](#)]
9. Le Sclan, N.; Hausberger, M.; Wolff, A. Stability over situations in temperamental traits of horses as revealed by experimental and scoring approaches. *Behav. Process.* **1997**, *41*, 257–266. [[CrossRef](#)]
10. Christensen, J.W.; Zharkikh, T.; Ladewig, J. Do horses generalise between objects during habituation? *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *114*, 509–520. [[CrossRef](#)]
11. Górecka-Bruzda, A.; Jaworski, Z.; Suwała, M.; Boroń, M.; Ogluszka, M.; Earley, B.; Sobczyńska, M. Longitudinal study on human-related behaviour in horses—Can horses (*Equus caballus*) be de-domesticated? *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2017**, *195*, 50–59. [[CrossRef](#)]
12. Corgan, M.E.; Grandin, T.; Matlock, S. Evaluating the Reaction to a Complex Rotated Object in the American Quarter Horse (*Equus caballus*). *Animals* **2021**, *11*, 1383. [[CrossRef](#)]
13. Leiner, L.; Fendt, M. Behavioural fear and heart rate responses of horses after exposure to novel objects: Effects of habituation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2011**, *131*, 104–109. [[CrossRef](#)]

14. Visser, E.K.; Van Reenen, C.G.; Hopster, H.; Schilder, M.B.H.; Knaap, J.H.; Barneveld, A.; Blokhuis, H.J. Quantifying aspects of young horses' temperament: Consistency of behavioural variables. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2001**, *74*, 241–258. [[CrossRef](#)]
15. Visser, E.K.; van Reenen, C.G.; van der Werf, J.T.N.; Schilder, M.B.H.; Knaap, J.H.; Barneveld, A.; Blokhuis, H.J. Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses. *Phys. Behav.* **2002**, *76*, 289–296. [[CrossRef](#)]
16. Lee, K.E.; Kim, J.G.; Lee, H.; Kim, B.S. Behavioral and cardiac responses in mature horses exposed to a novel object. *J. Anim. Sci. Technol.* **2021**. [[CrossRef](#)]
17. Lloyd, A.S.; Martin, J.E.; Bornet-Gauci, H.L.I.; Wilkinson, R.G. Evaluation of a novel method of horse personality assessment: Rater-agreement and links to behavior. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2007**, *105*, 205–222. [[CrossRef](#)]
18. Hornblow, A.R.; Kidson, M.A. The visual analogue scale for anxiety: A validation study. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* **1976**, *10*, 339–341. [[CrossRef](#)]
19. van Duinen, M.; Rickelt, J.; Griez, E. Validation of the electronic visual analogue scale of anxiety. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2008**, *32*, 1045–1047. [[CrossRef](#)]
20. Sutton, G.A.; Dahan, R.; Turner, D.; Paltiel, O. A behaviour-based pain scale for horses with acute colic: Scale construction. *Vet. J.* **2013**, *196*, 394–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. De Grauw, J.C.; Van Loon, J.P.A.M. Systematic pain assessment in horses. *Vet. J.* **2016**, *209*, 14–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Von Borell, E.; Langbein, J.; Després, G.; Hansen, S.; Letterier, C.; Marchant-Forde, J.; Marchant-Forde, R.; Minero, M.; Mohr, E.; Prunier, A.; et al. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals—A review. *Physiol. Behav.* **2007**, *92*, 293–316.
23. Malik, M. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use: Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society for Pacing and Electrophysiology. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* **1996**, *1*, 151–181. [[CrossRef](#)]
24. Lansade, L.; Bouissou, M.F.; Erhard, H.W. Fearfulness in horses: A temperament trait stable across time and situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *115*, 182–200. [[CrossRef](#)]
25. Bulens, A.; Sterken, H.; Van Beirendonck, S.; Van Thielen, J.; Driessen, B. The use of different objects during a novel object test in stabled horses. *J. Vet. Behav.* **2015**, *10*, 54–58. [[CrossRef](#)]
26. Christensen, J.W.; Beblein, C.; Malmkvist, J. Development and consistency of fearfulness in horses from foal to adult. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2020**, *232*, 105106. [[CrossRef](#)]
27. Grandin, T.; Shivley, C. How farm animals react and perceive stressful situations such as handling, restraint, and transport. *Animals* **2015**, *5*, 1233–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Keeling, L.J.; Jonare, L.; Lanneborn, L. Investigating horse–human interactions: The effect of a nervous human. *Vet. J.* **2009**, *181*, 70–71. [[CrossRef](#)]
29. Scopa, C.; Contalbrigo, L.; Greco, A.; Lanatà, A.; Scilingo, E.P.; Baragli, P. Emotional transfer in human–horse interaction: New perspectives on equine assisted interventions. *Animals* **2019**, *9*, 1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Schrimpf, A.; Single, M.S.; Nawroth, C. Social Referencing in the Domestic Horse. *Animals* **2020**, *10*, 164. [[CrossRef](#)]
31. Christensen, J.W. Object habituation in horses: The effect of voluntary versus negatively reinforced approach to frightening stimuli. *Equine Vet. J.* **2013**, *45*, 298–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Topál, J.; Miklósi, Á.; Csányi, V. Dog-human relationship affects problem solving behavior in the dog. *Anthrozoös* **1997**, *10*, 214–224. [[CrossRef](#)]
33. Nawroth, C.; Brett, J.M.; McElligott, A.G. Goats display audience-dependent human-directed gazing behaviour in a problem-solving task. *Biol. Lett.* **2016**, *12*, 20160283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lesimple, C.; Sankey, C.; Richard, M.A.; Hausberger, M. Do horses expect humans to solve their problems? *Front. Psychol.* **2012**, *3*, 306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Górecka, A.; Bakuniak, M.; Chruszczewski, M.H.; Jezierski, T.A. A note on the habituation to novelty in horses: Handler effect. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2007**, *25*, 143–152.
36. Proops, L.; McComb, K.; Reby, D. Cross-modal individual recognition in domestic horses (*Equus caballus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 947–951. [[CrossRef](#)]
37. Lansade, L.; Colson, V.; Parias, C.; Trösch, M.; Reigner, F.; Calandrea, L. Female horses spontaneously identify a photograph of their keeper, last seen six months previously. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6302. [[CrossRef](#)]
38. Millman, S.T.; Duncan, I.J.H. Social Cognition of Farm Animals. In *Social Behaviour in Farm Animals*; Keeling, L.J., Gonyou, H.W., Eds.; CABI Publishing, CAB International: Oxon, UK, 2005; pp. 373–399.
39. Saslow, C.A. Factors affecting stimulus visibility for horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **1999**, *61*, 273–284. [[CrossRef](#)]
40. McGreevy, P. Equine Behavior. Perception. In *A Guide for Veterinarians and Equine Scientists*; McGreevy, P., Ed.; Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2004; pp. 37–54.
41. Vaina, L.M.; Solomon, J.; Chowdhury, S.; Sinha, P.; Belliveau, J.W. Functional neuroanatomy of biological perception in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11656–11661. [[CrossRef](#)]
42. Regolin, L.; Tommasi, L.; Vallortigara, G. Visual perception of biological motion in newly hatched chicks as revealed by an imprinting procedure. *Anim. Cognit.* **2000**, *3*, 53–60. [[CrossRef](#)]
43. Witzany, G. Why Biocommunication of Animals? In *Biocommunication of Animals*; Witzany, G., Ed.; Springer Science + Business Media: Dordrecht, The Netherlands, 2014; pp. 1–6. [[CrossRef](#)]



44. Meise, K.; Franks, D.W.; Bro-Jørgensen, J. Alarm communication networks as a driver of community structure in African savannah herbivores. *Ecol. Lett.* **2020**, *23*, 293–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sablik, P.; Kobak, P.; Biała, M.; Matkowski, D. Porównanie behawioryzmu udomowionych zwierząt roślinożernych (bydła mięsnego i koni) w naturalnych warunkach bytowania w otulinie przyrodniczego Parku Narodowego “Ujście Warty”. *Acta Sci. Pol. Zootech.* **2010**, *9*, 207–214.
46. Fenner, K.; Caspar, G.; Hyde, M.; Henshall, C.; Dhand, N.; Probyn-Rapsey, F.; Dashper, K.; McLean, A.; McGreevy, P. It’s all about the sex, or is it? Humans, horses and temperament. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Aune, A.; Fenner, K.; Wilson, B.; Cameron, E.; McLean, A.; McGreevy, P. Reported behavioural differences between geldings and mares challenge sex-driven stereotypes in ridden equine behaviour. *Animals* **2020**, *10*, 414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Schmidt, A.; Aurich, J.; Möstl, E.; Müller, J.; Aurich, C. Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-year-old sport horses. *Horm. Behav.* **2010**, *58*, 628–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Vandenheede, M.; Bouissou, M.F. Sex differences in fear reactions in sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **1993**, *37*, 39–55. [[CrossRef](#)]
50. Kokras, N.; Dalla, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. *Brit. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 4595–4619. [[CrossRef](#)]

Lublin, 15.03.2023r.

Prof. dr hab. Iwona Janczarek  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
iwona.janczarek@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Wilk, I., Tkaczyk, E., Mierzicka, M., Stanley, C. R., Górecka-Bruzda, A. (2021). Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals*, 11(11), 3081.

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, konsultacji założeń metodycznych, ocenie manuskryptu, podaniu części źródeł, nadzorze nad projektem oraz współudziale w administracji projektem.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.

  
.....  
Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Dr hab. Izabela Wilk, prof UP  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
izabela.wilk@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Wilk, I., Tkaczyk, E., Mierzicka, M., Stanley, C. R., Górecka-Bruzda, A. (2021). Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals*, 11(11), 3081.

mój udział polegał na przeprowadzeniu części badań oraz konsultacji analizy formalnej.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



.....  
Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Mgr Ewelina Tkaczyk  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
ewelina.tkaczyk@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Wilk, I., Tkaczyk, E., Mierzicka, M., Stanley, C. R., Górecka-Bruzda, A. (2021). Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals*, 11(11), 3081.

mój udział polegał na przeprowadzeniu części badań.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



.....  
Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Mgr inż. Martyna Mierzicka  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
martyna.mierzicka@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Wilk, I., Tkaczyk, E., Mierzicka, M., Stanley, C. R., Górecka-Bruzda, A. (2021). Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals*, 11(11), 3081.

mój udział polegał na analizie formalnej części manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Dr. Christina R. Stanley  
Animal Behaviour & Welfare Research Group  
Department of Biological Sciences  
University of Chester  
Chester CH1 4BJ United Kingdom  
christina.stanley@chester.ac.uk

**Discipline Council Animal Science and  
Fisheries  
of the University of Life Sciences  
in Lublin**

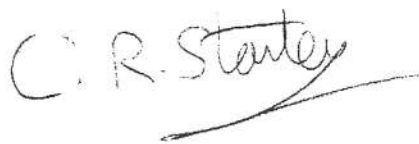
#### **Declaration of co-authorship**

I hereby declare that in the paper:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Wilk, I., Tkaczyk, E., Mierzicka, M., Stanley, C. R., & Górecka-Bruzda, A. (2021). Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals*, 11(11), 3081.

my contribution was to review and edit this manuscript for publication.

I consent to the use of this publication in the study entitled „Image of Behavioral and Physiological Reactions of Horses in Herd Life Disturbed by Separation and Social Support Introduced” constituting the doctoral dissertation of MSc. Anna Skowerska-Wiśniewska.

A handwritten signature in black ink that reads "C. R. Stanley". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke underneath the name.

Lublin, 15.03.2023r.

Prof. dr hab. Aleksandra Górecka-Bruzda  
Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN  
Ul. Postępu 36A, Jastrzębiec  
05-552 Magdalenka  
a.gorecka@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacktwo  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Wilk, I., Tkaczyk, E., Mierzicka, M., Stanley, C. R., & Górecka-Bruzda, A. (2021). Heterospecific Fear and Avoidance Behaviour in Domestic Horses (*Equus caballus*). *Animals*, 11(11), 3081.

mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu metodologii, konstrukcji bazy danych, analizie formalnej, przechowywaniu danych, oryginalnym przygotowaniu projektu, redakcji i recenzji manuskryptu oraz korekty po recenzjach.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis



## Article

# Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example

Anna Wiśniewska <sup>1</sup>, Iwona Janczarek <sup>1,\*</sup>, Ewelina Tkaczyk <sup>1</sup>, Izabela Wilk <sup>1</sup>, Wiktorija Janicka <sup>1</sup>, Tomasz Próchniak <sup>2</sup>, Beata Kaczmarek <sup>3</sup>, Elżbieta Pokora <sup>1</sup> and Jarosław Łuszczynski <sup>4</sup>

- <sup>1</sup> Department of Horse Breeding and Use, Faculty of Animal Breeding and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13 Str, 20-950 Lublin, Poland
- <sup>2</sup> Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Breeding and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13 Str, 20-950 Lublin, Poland
- <sup>3</sup> Department and Clinic of Animal Internal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13 Str, 20-950 Lublin, Poland
- <sup>4</sup> Department of Genetics, Animal Breeding and Ethology, Faculty of Animal Science, University of Agriculture in Cracow, 30-059 Cracow, Poland
- \* Correspondence: iwona.janczarek@up.lublin.pl

**Simple Summary:** This study examined whether the company of goats in a paddock helps to limit the effects of the social isolation of horses. Four short tests were performed, which examined horses in a herd without goats, horses isolated from the herd without goats, horses in a herd with goats, and horses isolated from the herd with goats. The duration of standing, walking, trotting, and cantering, and the horses' emotions were determined in each test. The results showed that the company of goats in the paddock only partially limited the effects of the social isolation of horses and reduced their restlessness. However, the horses' emotions change positively only when goats accompany horses in a herd. Therefore, goats can be used for the planned limiting of movements of isolated horses in paddocks and as an element of environment diversification for horses in a herd. The resulting relaxation helps to reduce the horses' negative behavior.

**Abstract:** This study aimed to perform a comparative analysis of the horses' heart rate parameters and locomotor activity in a herd or isolation, with or without the company of goats. Twenty horses were tested in a paddock, accompanied (or not) by three goats. The experiment comprised four tests (a control test of a herd of horses without goats, a horse isolation test without goats, a test of a herd of horses with goats and a test of an isolated horse with goats). The horse's locomotor behavior, and the HR, RR, rMSSD, LF, HF, and LF/HF were recorded. The data analysis included a 15-min rest, procedural and recovery HR/HRV periods, and a 5-min period at the beginning of the test. The duration of the horses standing in the company of goats increased significantly. The rMSSD parameter was the significantly lowest in the test of a herd of horses with goats. The company of goats in a paddock does not eliminate the emotional effects of the phenomenon. However, the locomotor behavior decreases. Goats in a paddock can provide a positive distraction for horses in a herd as a decrease in emotional excitability can be regarded as having a relaxing impact on a different animal species.

**Keywords:** horse; isolation; locomotor activity; emotional excitability; goats; paddock; heart rate variability; welfare; social interactions; behavior



**Citation:** Wiśniewska, A.; Janczarek, I.; Tkaczyk, E.; Wilk, I.; Janicka, W.; Próchniak, T.; Kaczmarek, B.; Pokora, E.; Łuszczynski, J. Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals* **2022**, *12*, 2271. <https://doi.org/10.3390/ani12172271>

Academic Editor: Harold C. McKenzie III

Received: 18 July 2022

Accepted: 29 August 2022

Published: 2 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

In both in Poland and in other European countries there is a return to sustainable agriculture [1,2]. In Poland, the activity of ecological farms and agritourism farms using



horses as the only workforce plays a significant role in terms of GDP [3]. A similar situation is observed in countries of Western and Southern Europe. It is also worth remembering that horse breeding itself plays a large role in agricultural activity [4]. This breeding is associated with various types of activities carried out by humans. Some of the activities are negative for animals' welfare, such as the necessity of social isolation [5].

Social isolation has a highly negative impact on gregarious animals [6]. It is known to induce strong stress in many species, which manifests itself in behavioral and physiological changes, e.g., increased vocalization, locomotion, heart rate, or cortisol level [7]. These changes reduce the animal's utility value and the level of human safety when handling it [8]. In consequence, they weaken the stressed animal and, ultimately, have a crippling effect on it [6,9]. In the case of many methods of horse use, isolation can be reduced the most [10,11]. However, it cannot usually be avoided. The need to isolate horses for multiple reasons results in constantly seeking methods to minimize its effects [10,12,13]. However, one should note that even partial isolation, such as keeping horses in individual boxes, has a negative impact on their welfare [8,14,15]. It does not seem possible to change this, as even a large pasture area is usually an extravagance, and horses grazing in a large group may suffer an injury, which scares their owners for multiple reasons [16,17].

It is necessary to seek new methods to prevent the effects of isolation since the current methods are not fully effective [18,19]. One should note that the social support from the herd is one of the crucial values of gregarious life [20,21]. Social support is usually defined with respect to people [22]. It protects against the health consequences of living under stress, helps to live through a crisis and accelerates the recovery process. A group making up a stable, social unit is found equally often in the animal world [23–25]. Horses also form herds with strictly defined social relations [6,26]. Therefore, vicarious social support for individuals without their own herd can be a crucial approach to promoting the physical and mental well-being of farm animals [27]. However, it should be noted that the actual social buffering takes place when the presence of one animal alleviates the stress on another experiencing an unpleasant event and/or subsequently helps the animal to regenerate after it subsides [28].

Since they are not only bred, but also trained, horses often come into relations with humans [29]. These relations take place on multiple levels and concern many disciplines [30,31]. Horses are so sensitive and respond differently to the smell of people that they carry on their clothes and hands, and even to their photographs, the position of their bodies, or the tone of voices [32–36]. They also recognize stress in humans [37]. This is because horses possess a cross-modal ability to recognize individuals based on unique auditory, visual, and olfactory information [38]. Moreover, horses can remember earlier experiences of working with humans or negative relations with them [32]. Therefore, one cannot claim that a person can replace the feeling of the presence of even a micro-herd, although the bond between a horse and a human increases in proportion to the degree of isolation from other animals of the same herd. Examples include relations in unnatural horse herds formed by humans for easier management. Hence, the human's role in improving the welfare of the horse is crucial.

Therefore, it is worth considering relations between various animal species [39,40]. Companion animals can maintain relations, with cats and dogs being examples of this [41]. Such relations also occur among farm animals, examples of which include lambs and heifers [42], or horses and sheep grazing together [43]. Domestic goats have been suggested by equestrian forums and professional websites as a species which can provide social support to horses during a period of isolation [44,45].

Therefore, a hypothesis was tested that goats decrease horses' emotional excitability, but only during a period of isolation in a paddock. However, they do not affect horses which are in a paddock in a group. Therefore, the aim of this study was to perform a comparative analysis of the horses' heart rate parameters and locomotor activity when they were in a herd or in isolation, with or without the company of goats.

## 2. Materials and Methods

The experiment was conducted at the equestrian center at the University of Life Sciences in Lublin, in the east of Poland (51°13′36.93″ N; 22°38′29.85″ E, altitude: 210 m).

### 2.1. Horses

The experiment included 20 clinically healthy, warmblood adult horses (ten geldings and ten mares). The horses had been kept for at least 36 months in one stable. Boxes with straw bedding and a size of 3.5 m × 3.5 m, with grilles in the upper parts of the walls, were situated in two rows separated by a passage corridor. Another corridor separated the stable into two sections, with each one containing two rows of five boxes, with each group of boxes opposite each other. There were geldings kept in one section and mares in the other. The horses were fed three times daily with 9 kg hay, 3 kg of a feeding mixture for recreational horses, and 100 mg of mineral and vitamin concentrate. The feed was given in three equal doses. Water and salt cubes were available ad libitum. The horses had been pastured (grazing period) or paddocked for 4–6 h daily in four groups (groups of boxes) for at least 36 months before the beginning of the experiment.

They were ridden on recreational group trips and sporadic individual riding for six days a week, 1–2 h daily. Individual riding was the only time when horses were separated from the herd. Before the tests, the horses had not had any visual or auditory contact with any other animal except dogs and cats.

### 2.2. Goats

Three two-year-old, clinically healthy, castrated goats with no horns of the Polish white breed were kept loose on straw bedding in one group in a corral with permanent access to a grassy pen. The corral was situated in a separate part of the farm, on a pasture adjacent to the paddock for mares. They had been kept in the same equestrian center as the horses for 18 months, although the horses under study had never had any contact with them. They were fed hay and commercial feed for ruminants. Water and salt cubes were available ad libitum.

### 2.3. Experiment

The horses were assigned to four groups (two groups of mares and two groups of geldings), with five horses of the same sex kept in the same group of boxes in the stable (group of horses). Therefore, those were the same groups in which the horses were usually taken to the paddock. Before the experiment started, a pentagonal corral for goats (approx. m<sup>2</sup>) was made on the trapeze-shaped, earth-and-sand paddock (728 m<sup>2</sup>) known to the horses. During that time, the horses were accustomed to the presence of the corral for goats for three days, 30 min on each day.

The experiment comprised four tests of 15 min each (Figures 1 and 2). The first test, called the horse herd control test, involved letting four fixed groups of five animals into a paddock with a corral for goats. Each of the four groups was let out alternately by sex. The second test, called the horse isolation test, started after two days. The horses were let out individually into the same paddock at different times. This period is regarded as sufficient to assess the impact of social isolation on the animals [46]. On the second day after the isolation test, three goats were let out for 60 min into the corridor of the stable where the horses were kept. The horses were accustomed to their presence during that time.

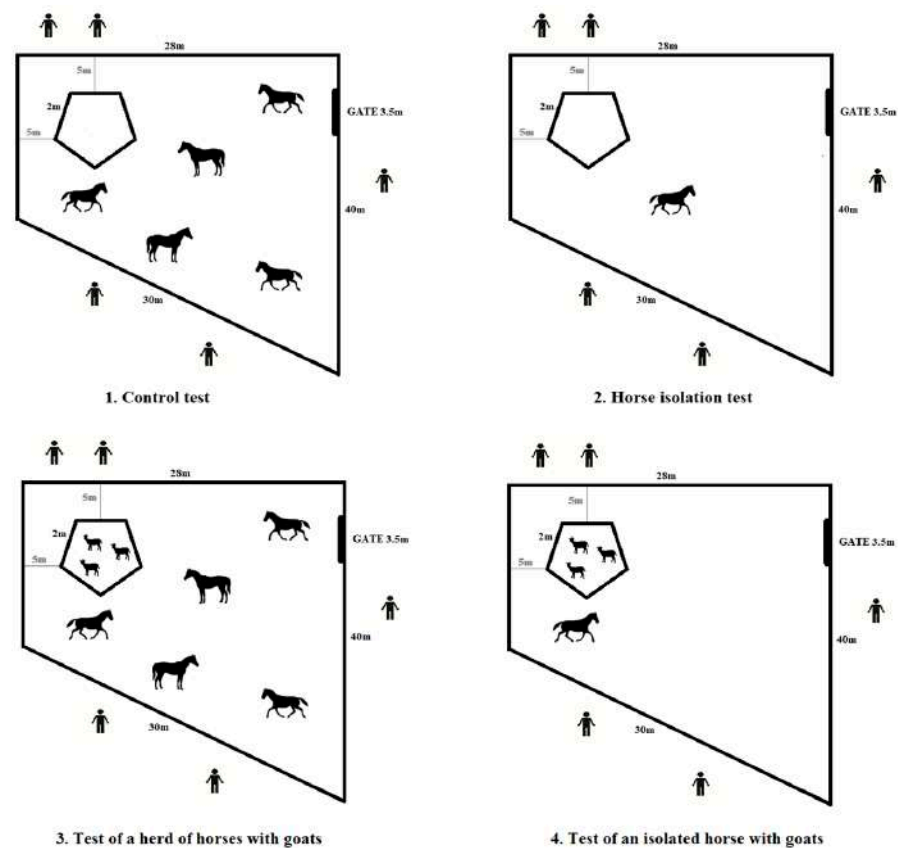


Figure 1. Course of the experiment.



Figure 2. Interactions between a horse and a goat during the experiment.

The third test, called the test of a horse herd with goats, was conducted the next day. It involved letting out all the horses in groups into the test paddock with the goats in the corral. The fourth test was called the test of an isolated horse with goats. It involved letting out individual horses in the company of goats in the corral.

All of the tests were started one hour after the morning feeding of the horses. Every effort was made to avoid the horses' eye contact with other horses or people. However, the

usual farm sounds (tractors operating, people talking, cleaning boxes, etc.) could not be avoided. No cases of the horses' anxiety, becoming interested, or any behavioral reaction to those events were observed.

#### 2.4. Locomotor Activity

The horses' locomotor activity during the tests was recorded by five observers, invisible to the horses. They were able to recognize each animal owing to specific features of their coats and white marks on their heads and legs. The horses' locomotor activities were recorded by registering all the events [47]. The total duration (s) of walking (slow, four-beat gait), trotting and cantering together (brisk, two- or three-beat gait) and the duration of standing were determined.

#### 2.5. Heart Rate and Heart Rate Variability Parameters

The horses' emotional excitability was determined by analyzing the heart rate (HR) and heart rate variability (HRV). The measurements were performed with a Polar ELECTRO OY, Kempele, Finland, RS800CX type, with an H2 transmitter. The horses were accustomed to the devices. The electrodes were fastened with a strap at the place of a girth, on the left side of the chest, at the heart level. The rubber part of the strap at the place where the electrodes were fixed was covered with large amounts of gel for ECG to optimize conduction and minimize the electric resistance [48]. Subsequently, HR/HRV (heart rate/heart rate variability) monitors, synchronized with specific transmitters, were fixed to elastic straps at the horse's breastbone level. The data recording began 15 min before the horses went out into the paddock (rest HR/HRV) during the test (procedural HR/HRV15). Additionally, the first five minutes of the test were isolated from the procedural HR/HRV period (procedural HR/HRV5). The recording was completed 15 min after the horses returned to the stable (recovery HR/HRV).

The HR monitoring data were transmitted to the computer via an IrDA USB 2.0 Adapter peripheral and subsequently analyzed in PolarProTrainer 5 (v41.2, Kempele, Finland). Low-power filters were applied to eliminate single artifacts. The following parameters were analyzed—HR (beats per minute)—heart rate, RR interval (ms)—intervals between successive R waves in the QRS complex, rMSSD (ms)—root mean square of successive differences between consecutive RR intervals: time analysis parameter, HF (ms<sup>2</sup>)—high-frequency spectrum power component (0.15–0.4 Hz), LF (ms<sup>2</sup>)—low-frequency spectrum power component (0.04–0.15 Hz), LF/HF (%)—low-frequency spectrum power to high-frequency spectrum power ratio, indicating the sympathetic/parasympathetic balance in ANS (Autonomic Nervous System) [49]. Pursuant to the recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology [50], the duration of each measurement for short-term analyses was identical. It lasted 15 min, including rest HR/HRV, procedural HR/HRV15, and recovery HR/HRV.

#### 2.6. Statistical Methods

The statistical analyses were performed with a commercial analytical software package—SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) [51].

The feature distribution analysis was based on the Kolmogorov–Smirnov, Cramer-von Mises, and Anderson–Darling tests at  $\alpha = 0.05$ . The main descriptive statistics for the features were presented: number of observations, M—arithmetic mean, SE—standard error of the mean, SD—standard deviation, V—coefficient of variance, Me—median, Min—minimal and Max—maximum value of an observation.

The significance of the impact of constant factors on the features under study was verified by the multifactorial analysis of variance (GLM procedure) with the following model:

$$Y_{ijklm} = \mu + d_i + p_j + w_k + e_{ijklm}$$

where:  $Y$  is the feature under analysis,  $\mu$  the mean for the feature,  $d$  the constant impact of the test day,  $p$  the constant impact of the animal's sex,  $w$  the constant impact of the horse's age, and  $e$  the remainder, unexplained by the experiment (error).

The significance of the differences between the means was determined with Tukey's multiple comparison test. The final results are presented as means with standard deviations of the means (SD).

### 3. Results

Table 1 presents the main descriptive statistics for each feature under analysis.

**Table 1.** Main descriptive statistics for the features under analysis.

| Variable                           | N  | M       | SE     | SD      | V             | Me     | Min     | Max     |
|------------------------------------|----|---------|--------|---------|---------------|--------|---------|---------|
| Standing (s)                       | 80 | 478.16  | 15.07  | 134.80  | 18,169.88     | 28.19  | 483.50  | 94.00   |
| Walk (s)                           | 80 | 353.34  | 12.18  | 108.92  | 11,864.15     | 30.83  | 351.50  | 129.00  |
| Trotting/cantering (s)             | 80 | 68.50   | 11.64  | 104.09  | 10,833.92     | 151.95 | 14.50   | 0.00    |
| Rest HR (b.p.m.)                   | 80 | 37.25   | 0.33   | 2.93    | 8.57          | 7.86   | 38.00   | 30.00   |
| ProceduralHR5 (b.p.m.)             | 80 | 63.59   | 2.52   | 22.52   | 506.95        | 35.41  | 56.50   | 37.00   |
| Procedural HR15 (b.p.m.)           | 80 | 62.44   | 2.29   | 20.47   | 419.10        | 32.79  | 55.00   | 37.00   |
| Recovery HR (b.p.m.)               | 80 | 55.21   | 2.01   | 17.94   | 321.92        | 32.50  | 51.00   | 34.00   |
| Rest RR (ms)                       | 80 | 1619.11 | 14.23  | 127.27  | 16,198.05     | 7.86   | 1594.00 | 1265.00 |
| ProceduralRR5 (ms)                 | 80 | 1038.00 | 32.69  | 292.42  | 85,511.47     | 28.17  | 1041.50 | 399.00  |
| Procedural RR15 (ms)               | 80 | 1057.84 | 31.57  | 282.38  | 79,738.40     | 26.69  | 1076.00 | 476.33  |
| Recovery RR (ms)                   | 80 | 1182.70 | 35.28  | 315.53  | 99,556.16     | 26.68  | 1181.00 | 507.00  |
| Rest rMSSD (ms)                    | 80 | 106.15  | 3.24   | 29.00   | 840.71        | 27.32  | 101.65  | 10.90   |
| Procedural rMSSD5 (ms)             | 80 | 77.58   | 5.51   | 49.32   | 2432.73       | 63.58  | 67.25   | 4.30    |
| Procedural rMSSD15 (ms)            | 80 | 73.99   | 4.55   | 40.74   | 1659.42       | 55.06  | 68.37   | 8.87    |
| Recovery rMSSD (ms)                | 80 | 74.97   | 4.92   | 44.02   | 1937.93       | 58.72  | 73.15   | 13.50   |
| Rest LF (ms <sup>2</sup> )         | 80 | 3931.74 | 237.03 | 2120.10 | 4,494,815.52  | 53.92  | 3533.68 | 51.15   |
| Procedural LF5 (ms <sup>2</sup> )  | 80 | 4019.45 | 391.93 | 3505.56 | 12,288,924.73 | 87.21  | 2934.98 | 43.84   |
| Procedural LF15 (ms <sup>2</sup> ) | 80 | 3895.49 | 322.25 | 2882.33 | 8,307,812.98  | 73.99  | 3046.94 | 225.38  |
| Recovery LF (ms <sup>2</sup> )     | 80 | 3612.34 | 347.24 | 3105.77 | 9,645,799.19  | 85.98  | 2906.99 | 103.90  |
| Rest HF (ms <sup>2</sup> )         | 80 | 2708.28 | 179.55 | 1605.92 | 2,578,976.32  | 59.30  | 2194.92 | 20.70   |
| ProceduralHF5 (ms <sup>2</sup> )   | 80 | 2361.73 | 388.50 | 3474.85 | 12,074,564.67 | 147.13 | 1108.59 | 9.16    |
| Procedural HF15 (ms <sup>2</sup> ) | 80 | 1972.72 | 244.08 | 2183.12 | 4,765,997.69  | 110.67 | 1226.81 | 23.89   |
| Recovery HF (ms <sup>2</sup> )     | 80 | 2256.28 | 384.77 | 3441.51 | 11,844,020.80 | 152.53 | 1354.54 | 33.52   |
| Rest LF/HF (%)                     | 80 | 148.26  | 6.57   | 58.76   | 3452.34       | 39.63  | 148.00  | 37.30   |
| Procedural LF/HF5 (%)              | 80 | 338.68  | 32.03  | 286.50  | 82,080.08     | 84.59  | 243.00  | 36.00   |
| Procedural LF/HF15 (%)             | 80 | 365.57  | 26.44  | 236.50  | 55,930.83     | 64.69  | 284.68  | 35.50   |
| Recovery LF/HF (%)                 | 80 | 359.33  | 56.37  | 504.15  | 254,166.12    | 140.30 | 230.05  | 22.20   |

For nearly 30% of the features under study, a significant impact of the subsequent test factor was present (Table 2). This group included all of the three locomotor features, three mean values of the parameters from the procedural15 period (HR—heart rate, rMSSD—root mean square of successive differences between consecutive RR intervals,



LF/HF—low-frequency spectrum power to high-frequency spectrum power ratio), three from the recovery period (HR—heart rate, rMSSD—root mean square of successive differences between consecutive RR intervals, LF—low-frequency spectrum power) and one parameter from the rest period (LF/HF—low-frequency spectrum power to high-frequency spectrum power ratio).

**Table 2.** The features for which a significant impact of the subsequent test factor was observed ( $p \leq \max 0.05$ ).

| Feature            | DF | Square Sum Type 3 | Mean Square   | Value of F | Pr. > F |
|--------------------|----|-------------------|---------------|------------|---------|
| Standing           | 3  | 328,262.2375      | 109,420.7458  | 7.69       | 0.0002  |
| Walking            | 3  | 139,415.7375      | 46,471.9125   | 4.56       | 0.0055  |
| Trotting/cantering | 3  | 571,903.3000      | 190,634.4333  | 51.74      | <0.0001 |
| Procedural HR15    | 3  | 9007.261111       | 3002.420370   | 9.69       | <0.0001 |
| Recovery HR        | 3  | 4784.437500       | 1594.812500   | 6.12       | 0.0009  |
| Procedural rMSSD15 | 3  | 14,621.69028      | 4873.89676    | 3.22       | 0.0276  |
| Recovery rMSSD     | 3  | 27,211.62250      | 9070.54083    | 5.66       | 0.0015  |
| Recovery LF        | 3  | 87,147,953.37     | 29,049,317.79 | 3.33       | 0.0241  |
| Rest LF/HF         | 3  | 41,438.38037      | 13,812.79346  | 4.65       | 0.0050  |
| Procedural LF/HF15 | 3  | 633,809.6458      | 211,269.8819  | 4.21       | 0.0083  |

The duration of standing in the paddock was the significantly longest in the test of horse herd with goats and the test of an isolated horse with goats (Table 3). This feature had the lowest value in the horse isolation test. The duration of standing in the control test had an average value. The duration of walking was significantly longer than the others during the horse herd control test, and the shortest was in the horse isolation test. The values were average in the other two tests. The trotting/cantering duration was significantly longer than the others during the horse isolation test. The differences in the other features were not significant.

**Table 3.** Locomotor features in consecutive tests.

| Feature | Standing  |        | Walking   |        | Trotting/Cantering |        |
|---------|-----------|--------|-----------|--------|--------------------|--------|
|         | Mean      | SD     | Mean      | SD     | Mean               | SD     |
| I       | 458.35 AB | 82.04  | 419.15 A  | 81.21  | 22.50 B            | 20.22  |
| II      | 381.90 B  | 144.63 | 303.20 B  | 108.79 | 214.90 A           | 111.62 |
| III     | 533.25 A  | 149.12 | 346.70 AB | 127.20 | 20.05 B            | 35.13  |
| IV      | 539.15 A  | 91.59  | 344.30 AB | 85.92  | 16.55 B            | 29.06  |

The means marked with different capital letters (A, B) are significantly different at  $\alpha = 0.01$ . I: control test of a horse herd, II: horse isolation test, III: test of a horse herd with goats, IV: test of isolated horse with goats.

The resting HR did not differ significantly during consecutive tests (Table 4). The procedural HR5 was significantly higher than the others in the horse isolation test and in the test of isolated horses with goats. The procedural HR15 was the highest in the test of isolated horses with goats. The value was similar to that in the horse isolation test. The lowest procedural HR15 was observed in the test of a horse herd with goats. It was similar to that in the horse herd control test. The values in tests I and II were also similar. The recovery HR was the highest in the test of an isolated horse with goats and in the horse isolation test. The latter value was also similar to the value observed in the horse herd control test and in the test of a horse herd with goats.

**Table 4.** HR (heart rate) during consecutive tests.

| Parameter | Rest HR |      | Procedural HR5 |       | Procedural HR15 |       | Recovery HR |       |
|-----------|---------|------|----------------|-------|-----------------|-------|-------------|-------|
|           | Mean    | SD   | Mean           | SD    | Mean            | SD    | Mean        | SD    |
| I         | 36.00   | 2.05 | 55.70 B        | 14.61 | 56.00 BC        | 9.82  | 49.85 B     | 9.04  |
| II        | 37.70   | 2.36 | 72.50 A        | 25.95 | 69.83 AB        | 22.84 | 58.80 AB    | 19.82 |
| III       | 37.15   | 2.50 | 49.65 B        | 4.61  | 48.67 C         | 4.96  | 46.20 B     | 6.35  |
| IV        | 38.15   | 4.11 | 76.50 A        | 25.90 | 75.27 A         | 25.02 | 66.00 A     | 23.91 |

The means marked with different capital letters (A, B) are significantly different at  $\alpha = 0.01$ . I: control test of a horse herd, II: horse isolation test, III: test of a horse herd with goats, IV: test of isolated horse with goats.

There were no significant differences between the rest RR in consecutive tests (Table 5). The procedural RR5 was significantly higher than the others in the horse herd control test and in the horse herd with goats test. The procedural RR15 was significantly higher than the others in the horse herd control test and in the test of horse herd with goats. The latter value was also similar to that observed during the isolated horse test. Furthermore, it was similar to the value in the test of an isolated horse with goats.

**Table 5.** RR (RR interval) during consecutive tests.

| Parameter | Rest RR |        | Procedural RR5 |        | Procedural RR15 |        | Recovery RR |        |
|-----------|---------|--------|----------------|--------|-----------------|--------|-------------|--------|
|           | Mean    | SD     | Mean           | SD     | Mean            | SD     | Mean        | SD     |
| I         | 1670.40 | 101.20 | 1142.30 A      | 277.12 | 1121.87 AB      | 194.20 | 1241.85 AB  | 225.07 |
| II        | 1595.60 | 96.80  | 928.15 B       | 310.91 | 959.80 BC       | 312.87 | 1128.65 B   | 361.71 |
| III       | 1620.55 | 121.98 | 1215.15 A      | 132.99 | 1251.50 A       | 144.96 | 1323.75 A   | 182.03 |
| IV        | 1589.90 | 169.14 | 866.40 B       | 276.07 | 898.20 C        | 306.90 | 1036.55 B   | 386.18 |

The means marked with different capital letters (A, B) are significantly different at  $\alpha = 0.01$ . I: control test of a horse herd, II: horse isolation test, III: test of a horse herd with goats, IV: test of an isolated horse with goats.

The rest rMSSD and procedural rMSSD5 did not differ significantly during consecutive tests (Table 6). For the procedural rMSSD15 and recovery rMSSD, values higher than the others were observed in the horse herd with goats test and in the horse herd control test, with the latter value also similar to those found in the isolated horse test and in the test of an isolated horse with goats.

**Table 6.** rMSSD (root mean square of successive differences between consecutive RR intervals) during consecutive tests.

| Parameter | Rest rMSSD |       | Procedural rMSSD5 |       | Procedural rMSSD15 |       | Recovery rMSSD |       |
|-----------|------------|-------|-------------------|-------|--------------------|-------|----------------|-------|
|           | Mean       | SD    | Mean              | SD    | Mean               | SD    | Mean           | SD    |
| I         | 97.74      | 23.71 | 79.19             | 33.08 | 73.14 AB           | 29.74 | 77.43 AB       | 35.01 |
| II        | 105.01     | 22.46 | 65.66             | 51.04 | 62.89 B            | 42.14 | 63.78 B        | 42.10 |
| III       | 114.92     | 38.09 | 92.51             | 37.71 | 96.33 A            | 34.76 | 103.75 A       | 42.46 |
| IV        | 106.95     | 28.64 | 72.96             | 67.71 | 63.61 B            | 47.55 | 54.94 B        | 42.71 |

The means marked with different capital letters (A, B) are significantly different at  $\alpha = 0.01$ . I: control test of a horse herd, II: horse isolation test, III: test of a horse herd with goats, IV: test of an isolated horse with goats.

The remaining LF, procedural LF5 and LF15 did not differ significantly during consecutive tests (Table 7). Significant differences were observed for the recovery LF. The value for the test of horse herd with goats was the highest, and value for the test of an isolated horse with goats was the lowest. The values of this parameter were close to the highest and the lowest values in the other two tests.

**Table 7.** LF (low-frequency spectrum power) during consecutive tests.

| Parameter | Rest LF |         | Procedural LF5 |         | Procedural LF15 |         | Recovery LF |         |
|-----------|---------|---------|----------------|---------|-----------------|---------|-------------|---------|
|           | Mean    | SD      | Mean           | SD      | Mean            | SD      | Mean        | SD      |
| I         | 3142.55 | 1919.71 | 3778.31        | 3144.74 | 3928.05         | 3131.71 | 3494.14 AB  | 3453.20 |
| II        | 3982.10 | 2053.94 | 3877.92        | 3177.72 | 3664.58         | 2627.37 | 4041.42 AB  | 3644.05 |
| III       | 4721.39 | 2313.17 | 4746.33        | 3727.34 | 4769.70         | 2791.97 | 4890.61 A   | 2445.00 |
| IV        | 3880.90 | 2029.02 | 3675.25        | 4056.18 | 3219.63         | 2948.68 | 2023.21 B   | 2082.74 |

The means marked with different capital letters (A, B) are significantly different at  $\alpha = 0.01$ . I: control test of a horse herd, II: horse isolation test, III: test of a horse herd with goats, IV: test of an isolated horse with goats.

The LF/HF value for the test of a horse herd with goats and one for the test of an isolated horse with goats was the highest (Table 8). For the latter test, this parameter was also similar to the one in the horse herd control test and in the isolated horse test.

**Table 8.** LF/HF (low-frequency spectrum power to high-frequency spectrum power ratio) during consecutive tests.

| Parameter | Rest LF/HF |       | Procedural LF/HF5 |        | Procedural LF/HF15 |        | Recovery LF/HF |        |
|-----------|------------|-------|-------------------|--------|--------------------|--------|----------------|--------|
|           | Mean       | SD    | Mean              | SD     | Mean               | SD     | Mean           | SD     |
| I         | 125.74 B   | 51.96 | 276.89            | 171.72 | 346.85 AB          | 212.12 | 274.80         | 142.77 |
| II        | 136.66 B   | 43.01 | 432.75            | 400.82 | 449.82 A           | 304.44 | 525.83         | 882.33 |
| III       | 185.91 A   | 62.51 | 243.48            | 137.85 | 227.70 B           | 68.58  | 203.28         | 97.74  |
| IV        | 144.73 AB  | 60.96 | 401.61            | 324.17 | 437.92 A           | 238.35 | 433.40         | 424.55 |

The means marked with different capital letters (A, B) are significantly different at  $\alpha = 0.01$ . I: control test of a horse herd, II: horse isolation test, III: test of a horse herd with goats, IV: test of an isolated horse with goats.

Table 9 shows the features significantly affected by the sex factor. The duration of a mare standing during the tests was significantly shorter than a gelding standing (Table 10). The duration of walking proved to be significantly longer in the mares compared with the geldings. The recovery HR (heart rate) in the mares was significantly higher than in the geldings. It was the opposite in the case of the recovery RR (RR interval).

**Table 9.** The features found to be significantly affected by the sex factor ( $p \leq 0.1$ ).

|             | DF | Square Sum Type 3 | Mean Square | Value of F | Pr. > F |
|-------------|----|-------------------|-------------|------------|---------|
| Standing    | 1  | 54,123.50         | 54,123.50   | 3.80       | 0.0550  |
| Walking     | 1  | 34,804.05         | 34,804.05   | 3.42       | 0.0686  |
| Recovery HR | 1  | 743.77            | 743.77      | 2.85       | 0.0955  |
| Recovery RR | 1  | 319,594.41        | 319,594.41  | 3.74       | 0.0570  |

**Table 10.** Significantly differing features within the sex factor.

| Feature  | Standing |        | Walking  |        | Recovery HR |       | Recovery RR |        |
|----------|----------|--------|----------|--------|-------------|-------|-------------|--------|
|          | Mean     | SD     | Mean     | SD     | Mean        | SD    | Mean        | SD     |
| Mares    | 449.45 b | 124.17 | 377.83 a | 95.54  | 59.28 a     | 19.69 | 1108.28 b   | 313.22 |
| Geldings | 506.88 a | 140.34 | 328.85 b | 116.94 | 51.15 b     | 15.19 | 1257.13 a   | 303.63 |

The means marked with different lowercase (a, b) are significantly different at  $\alpha = 0.05$ .

#### 4. Discussion

The experimental design applied in the study significantly diversified the locomotor activity of the horses. The presence of goats in the paddock prolonged the standing duration



of horses, regardless of whether the horses were in a herd or isolated. This time was the shortest when horses were isolated without the company of goats. The walking duration was the shortest when the horses were isolated without the company of goats. As expected, the trotting and cantering duration was then much longer than in the other situations. Interestingly, horses in a herd with or without goats, or isolated horses with goats, walked, trotted, or cantered during a comparable time. On the other hand, no impact of the goats on the locomotor activity of horses in a herd was observed. This may mean that the presence of other animals of the same species is essential. Therefore, it could be hypothesized that the company of goats can reduce horses' locomotor activity, but only during their isolation. However, it seems that these findings can be seen as satisfactory in minimizing the effects of social isolation of horses. Krueger et al. [52] report that social isolation is disadvantageous to gregarious animals. Specific behavior then becomes more intensive, such behavior including increased locomotor activity, among many features. Let it be emphasized at this stage of research that an analysis of the locomotor features provides grounds for suggesting a positive impact of the goat company on minimizing the effects of horse social isolation.

However, it seems interesting how the experiment proposed in this study affected the horses' emotional excitability. Social isolation triggers negative emotions, which manifest themselves mainly by an HR (heart rate) increase and a decrease in the parameters indicative of parasympathetic activity of the ANS (Autonomic Nervous System) [53]. These findings proved to be partially different from those presented for the locomotor features. The difference is visible for the HR (heart rate) and RR (intervals between successive R waves in the QRS complex). Social isolation caused unwanted changes in these parameters regardless of whether the company of goats was present or not. This was the most manifest during the first five minutes of the horses' stay in the paddock. The parameters from 15 min of the test and from the recovery period were not so unambiguous, although they confirmed the differences present during the five minutes. Therefore, it may be suggested that the animals experience strong emotions during the first moments of isolation, which is confirmed by the findings of studies conducted by Moons et al. [54] and Mal et al. [55]. The horses' emotional excitability is stabilized during subsequent minutes, although the stabilization is not significant enough to bring the organism to the resting state during the 15 min of the recovery period. Therefore, it can be claimed that the company of goats does not block the growth of the emotional excitability in isolated horses. Perhaps a longer time spent with goats by the isolated horses than that used in the study would have given different results. However, our research initially focused on the phenomenon of short-term social isolation. Interestingly, the goats' company calms horses in a herd. Horses probably perceive those animals as a type of distraction from the pasture behavior. Patkowski et al. [56] are of a similar opinion.

Regarding the study hypothesis, it can be partially corroborated at this stage. The company of goats certainly limits the locomotor activity of the isolated horses, although, unfortunately, it does not decrease the emotional excitability, which is a consequence of isolation. The current findings are consistent with those published by other authors, who point out the discrepancies between the situational behavior demonstrated by horses and the emotions experienced at the time [57,58]. Moreover, according to Lenoir et al. [59] and Rietmann et al. [60], HR (heart rate) and RR (intervals between successive R waves in the QRS complex) are sometimes difficult to interpret due to factors other than emotional factors, which can change the values under study. In contrast, the parameters which clearly show the activity of both components of the autonomic nervous system are beneficial in this case [49]. Not all the HRV (heart rate variability) parameters may have been significantly different with respect to the subsequent test factor, but the findings allow for a sufficiently detailed analysis of the changes in this regard. First of all, the factor in question diversified the rMSSD (root mean square of successive differences between consecutive RR intervals), i.e., the parameter indicating the activity of the parasympathetic part of the ANS (Autonomic Nervous System), and also LF (low-frequency spectrum power), which indicates the activity of the sympathetic part of the ANS [53]. This group also

included LF/HF (low-frequency spectrum power to high-frequency spectrum power ratio) as information on the balance of the ANS [61]. The sympathetic system activity increases considerably under stress, and it is associated with adrenaline and noradrenalin secretion, which accelerate the heart rate. Acetylcholine, whose level grows with increasing activity of the parasympathetic nervous system, has the opposite action [62]. Therefore, hormonal reactions are accompanied by an increase in the sympathetic system's advantage over the parasympathetic system, which manifests itself as an increase in the LF/HF ratio.

Therefore, the group of HRV (heart rate variability) parameters examined in this study can be regarded as sufficient to determine the horses' emotional excitability in different variants of this experiment. At the start of discussing those parameters from rMSSD (root mean square of successive differences between consecutive RR intervals), one should emphasize that significant differences were present only within the procedural and recovery periods. It is manifest that the horse isolation, regardless of whether it was with or without the company of goats, reduced the sympathetic activity of the ANS (Autonomic Nervous System) considerably. Therefore, one cannot confirm the positive impact of goats on horses' emotions during the latter's isolation, which should be regarded as an extremely disadvantageous phenomenon in horses' lives. This finding has been corroborated by other authors [63]. The current study found similar results in the LF/HF (low-frequency spectrum power to high-frequency spectrum power ratio), but only for the whole test. It is notable that the company of goats had a noticeable, positive impact on the emotions of horses staying in a herd in the paddock. The rMSSD had the highest values during the test and after it was completed, which may be indicative of the considerable relaxation of the horses. Although the findings may not corroborate the hypothesis proposed in this study, they shed new light on the positive impact on the horses' emotions. Introducing new animal species into a herd of horses can alleviate bad emotions, tension, and hierarchical disturbances.

Therefore, social support provided by goats to animals in a herd formed by humans to make its management easier is possible. Problems related to the isolation of horses are not solved in an emotional sphere, although the effect is noticeable from the behavioral point of view. The results may be interpreted in this manner, although they are not fully confirmed for LF (low-frequency spectrum power). First, the differences appeared only during the recovery period. Second, the highest value was observed (paradoxically) during the test of the herd with goats, and the lowest value was observed during the test of an isolated horse with goats. This result is therefore confirmed by those concerning locomotor features. At the same time, it is completely inconsistent with the other heart rate parameters when it is analyzed as a determinant of excitation from the sympathetic part of the ANS (Autonomic Nervous System) [64]. However, when this parameter is analyzed with respect to the excitation both of the sympathetic and parasympathetic systems [65], the results can be regarded as largely consistent with those concerning the other parameters.

## 5. Conclusions

The company of goats in a paddock does not provide full social support for isolated horses, as it does not eliminate the emotional effects of the phenomenon. The locomotor behavior decreases, which may contribute to planned restriction of horse movements when they have to be kept in a paddock individually. Goats in a corral in a paddock can provide a positive distraction for horses in a herd. A decrease in emotional excitability, which is then observed, can be regarded as a relaxing impact on a different animal species.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.W.; methodology, I.J. and A.W.; software, E.T. and E.P.; validation, I.W.; formal analysis, B.K.; investigation, E.T.; resources, I.W.; data curation, T.P.; writing original draft preparation, A.W.; writing, review and editing, I.J.; visualization, W.J. and E.T.; supervision, I.J. and J.L.; project administration, I.J.; funding acquisition, J.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Local Ethics Committee for Animal Experiments acting at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (no 51/2021; dated 19 July 2021).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Hammer, M.; Bonow, M.; Petersson, M. The role of horse keeping in transforming peri-urban landscapes: A case study from metropolitan Stockholm, Sweden. *Nor. Geogr. Tidsskr. Nor. J. Geogr.* **2017**, *71*, 146–158. [[CrossRef](#)]
2. Jezierska-Thöle, A.; Gwiażdźńska-Goraj, M.; Wiśniewski, Ł. Current Status and Prospects for Organic Agriculture in Poland. *Quaest. Geogr.* **2017**, *36*, 23–36. [[CrossRef](#)]
3. Topczewska, J.; Rogowska, A.K.; Ormian, M. A study into horses use in organic farming in the context of sustainable development in south-east Poland. *Roczniki* **2017**, *2016*, 1230–2017–441. [[CrossRef](#)]
4. Rzekęć, A.; Vial, C.; Bigot, G. Green Assets of Equines in the European Context of the Ecological Transition of Agriculture. *Animals* **2020**, *10*, 106. [[CrossRef](#)]
5. Carroll, S.L.; Sykes, B.W.; Mills, P.C. An online survey investigating perceived prevalence and treatment options for stereotypic behaviours in horses and undesirable behaviours associated with handling and riding. *Equine Vet. Educ.* **2020**, *32*, 71–81. [[CrossRef](#)]
6. Henderson, A.J.Z. Don't Fence Me In: Managing Psychological Well Being for Elite Performance Horses. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* **2007**, *10*, 309–329. [[CrossRef](#)]
7. Lansade, L.; Bouissou, M.-F.; Erhard, H.W. Reactivity to isolation and association with conspecifics: A temperament trait stable across time and situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *109*, 355–373. [[CrossRef](#)]
8. Yarnell, K.; Hall, C.; Royle, C.; Walker, S.L. Domesticated horses differ in their behavioural and physiological responses to isolated and group housing. *Physiol. Behav.* **2015**, *143*, 51–57. [[CrossRef](#)]
9. Roberts, K.; Hemmings, A.J.; McBride, S.D.; Parker, M.O. Causal factors of oral versus locomotor stereotypy in the horse. *J. Vet. Behav.* **2017**, *20*, 37–43. [[CrossRef](#)]
10. Jørgensen, G.H.; Fremstad, K.E.; Mejdell, C.M.; Bøe, K.E. Separating a horse from the social group for riding or training purposes: A descriptive study of human-horse interactions. *Anim. Welf.* **2011**, *20*, 271–279.
11. Bourjade, M.; Moulinot, M.; Henry, S.; Richard-Yris, M.-A.; Hausberger, M. Could adults be used to improve social skills of young horses, *Equus caballus*? *Dev. Psychobiol.* **2008**, *50*, 408–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. McAfee, L.M.; Mills, D.S.; Cooper, J.J. The use of mirrors for the control of stereotypic weaving behaviour in the stabled horse. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2002**, *78*, 159–173. [[CrossRef](#)]
13. Mills, D.; Davenport, K. The effect of a neighbouring conspecific *versus* the use of a mirror for the control of stereotypic weaving behaviour in the stabled horse. *Anim. Sci.* **2002**, *74*, 95–101. [[CrossRef](#)]
14. Keeling, L.; Bøe, K.; Christensen, J.; Hyyppä, S.; Jansson, H.; Jørgensen, G.; Ladewig, J.; Mejdell, C.; Särkijärvi, S.; Søndergaard, E.; et al. Injury incidence, reactivity and ease of handling of horses kept in groups: A matched case control study in four Nordic countries. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2016**, *185*, 59–65. [[CrossRef](#)]
15. Erber, R.; Wulf, M.; Aurich, J.; Rose-Meierhöfer, S.; Hoffmann, G.; von Lewinski, M.; Möstl, E.; Aurich, C. Stress Response of Three-year-old Horse Mares to Changes in Husbandry System During Initial Equestrian Training. *J. Equine Vet. Sci.* **2013**, *33*, 1088–1094. [[CrossRef](#)]
16. Winskill, L.; Waran, N.K.; Channing, C.; Young, R. Stereotypies in the stabled horse: Causes, treatments and prevention. *Curr. Sci.* **1995**, *69*, 310–316.
17. Luescher, U.A.; McKeown, D.B.; Halip, J. Reviewing the causes of obsessive-compulsive disorders in horses. *Vet. Med.* **1991**, *86*, 527–530.
18. Bulens, A.; Van Beirendonck, S.; Van Thielen, J.; Driessen, B. The enriching effect of non-commercial items in stabled horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2013**, *143*, 46–51. [[CrossRef](#)]
19. Cooper, J.; McGreevy, P. Stereotypic behaviour in the stabled horse: Causes, effects and prevention without compromising horse welfare. In *The Welfare of Horses*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 99–124.
20. Stanley, C.R.; Mettke-Hofmann, C.; Hager, R.; Shultz, S. Social stability in semiferal ponies: Networks show interannual stability alongside seasonal flexibility. *Anim. Behav.* **2018**, *136*, 175–184. [[CrossRef](#)]
21. Krueger, K. Social ecology of horses. In *Ecology of Social Evolution*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2008; pp. 195–206.
22. Cobb, S. Social Support as a Moderator of Life Stress. *Psychosom. Med.* **1976**, *38*, 300–314. [[CrossRef](#)]
23. Fischer, J.; Kopp, G.H.; Pesco, F.D.; Goffe, A.; Hammerschmidt, K.; Kalbitzer, U.; Klapproth, M.; Maciej, P.; Ndao, I.; Patzelt, A.; et al. Charting the neglected West: The social system of Guinea baboons. *Am. J. Phys. Anthropol.* **2017**, *162*, 15–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Gero, S.; Gordon, J.; Whitehead, H. Individualized social preferences and long-term social fidelity between social units of sperm whales. *Anim. Behav.* **2015**, *102*, 15–23. [[CrossRef](#)]
25. Wittemyer, G.; Douglas-Hamilton, I.; Getz, W. The socioecology of elephants: Analysis of the processes creating multitiered social structures. *Anim. Behav.* **2005**, *69*, 1357–1371. [[CrossRef](#)]
26. Hartmann, E.; Søndergaard, E.; Keeling, L.J. Keeping horses in groups: A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2012**, *136*, 77–87. [[CrossRef](#)]
27. Rault, J.-L. Friends with benefits: Social support and its relevance for farm animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2012**, *136*, 1–14. [[CrossRef](#)]
28. Ricci-Bonot, C.; Romero, T.; Nicol, C.; Mills, D. Social buffering in horses is influenced by context but not by the familiarity and habituation of a companion. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 8862. [[CrossRef](#)]
29. Adamczyk, K. Dairy cattle welfare as a result of human-animal relationship—A review. *Ann. Anim. Sci.* **2018**, *18*, 601–622. [[CrossRef](#)]
30. Gepts, P.; Famula, T.R.; Bettinger, R.L.; Brush, S.B.; Damania, A.B.; Mc Guire, P.E.; Qualset, C.O. (Eds.) *Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution, and Sustainability*, 1st ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2012; 606p.
31. Alcorta, C.S.; Sosis, R. Ritual, emotion, and sacred symbols. *Hum. Nat.* **2005**, *16*, 323–359. [[CrossRef](#)]
32. Merkies, K.; Franzin, O. Enhanced Understanding of Horse–Human Interactions to Optimize Welfare. *Animals* **2021**, *11*, 1347. [[CrossRef](#)]
33. Sabiniewicz, A.; Tarnowska, K.; Świątek, R.; Sorokowski, P.; Laska, M. Olfactory-based interspecific recognition of human emotions: Horses (*Equus ferus caballus*) can recognize fear and happiness body odour from humans (*Homo sapiens*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2020**, *230*, 105072. [[CrossRef](#)]
34. Trösch, M.; Cuzol, F.; Parias, C.; Calandreau, L.; Nowak, R.; Lansade, L. Horses Categorize Human Emotions Cross-Modally Based on Facial Expression and Non-Verbal Vocalizations. *Animals* **2019**, *9*, 862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Proops, L.; Grounds, K.; Smith, A.V.; McComb, K. Animals Remember Previous Facial Expressions that Specific Humans Have Exhibited. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 1428–1432.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Smith, A.V.; Proops, L.; Grounds, K.; Wathan, J.; McComb, K. Functionally relevant responses to human facial expressions of emotion in the domestic horse (*Equus caballus*). *Biol. Lett.* **2016**, *12*, 20150907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Merkies, K.; McKechnie, M.J.; Zakrajsek, E. Behavioural and physiological responses of therapy horses to mentally traumatized humans. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2018**, *205*, 61–67. [[CrossRef](#)]
38. Proops, L.; McComb, K.; Reby, D. Cross-modal individual recognition in domestic horses (*Equus caballus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 947–951. [[CrossRef](#)]
39. Kiffner, C.; Kioko, J.; Leweri, C.; Krause, S. Seasonal Patterns of Mixed Species Groups in Large East African Mammals. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113446. [[CrossRef](#)]
40. Schmitt, M.H.; Stears, K.; Wilmers, C.C.; Shrader, A.M. Determining the relative importance of dilution and detection for zebra foraging in mixed-species herds. *Anim. Behav.* **2014**, *96*, 151–158. [[CrossRef](#)]
41. Feuerstein, N.; Terkel, J. Interrelationships of dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus* L.) living under the same roof. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *113*, 150–165. [[CrossRef](#)]
42. Anderson, D.; Hulet, C.; Smith, J.; Shupe, W.; Murray, L. Bonding of young sheep to heifers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **1987**, *19*, 31–40. [[CrossRef](#)]
43. Pluta, M.; Patkowski, K.; Gasinska, B.; Bryczek, E. Behavior and interactions in and between herds of Polish Konik horse and Uhruska sheep during mixed-species grazing practice. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Sect. EE Zootech.* **2013**, *31*, 49–58.
44. Diedericks, A.; Are Goats Good Companions for Horses. Equestrian Space. 2020. Available online: <https://equestrianspace.com/are-goats-good-companions-for-horses/> (accessed on 28 May 2022).
45. FEI. A Horse’s Best Friend. 2018. Available online: <https://www.fei.org/stories/lifestyle/my-equestrian-life/horses-animal-companions> (accessed on 30 May 2022).
46. Young, T.; Creighton, E.; Smith, T.; Hosie, C. A novel scale of behavioural indicators of stress for use with domestic horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2012**, *140*, 33–43. [[CrossRef](#)]
47. Martin, P.; Bateson, P.P.G. *Measuring Behaviour: An Introductory Guide*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2007. [[CrossRef](#)]
48. Kovács, L.; Tózsér, J.; Kézér, F.; Ruff, F.; Aubin-Wodala, M.; Albert, E.; Choukeir, A.; Szelényi, Z.; Szenci, O. Heart rate and heart rate variability in multiparous dairy cows with unassisted calvings in the periparturient period. *Physiol. Behav.* **2015**, *139*, 281–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. von Borell, E.; Langbein, J.; Després, G.; Hansen, S.; Leterrier, C.; Marchant-Forde, J.; Marchant-Forde, R.; Minero, M.; Mohr, E.; Prunier, A.; et al. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals—A review. *Physiol. Behav.* **2007**, *92*, 293–316. [[CrossRef](#)]
50. Laborde, S.; Mosley, E.; Thayer, J.F. Heart Rate Variability and Cardiac Vagal Tone in Psychophysiological Research—Recommendations for Experiment Planning, Data Analysis, and Data Reporting. *Front. Psychol.* **2017**, *8*, 213. [[CrossRef](#)]
51. SAS 9.4, version 9.4; SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA, 2021.
52. Krueger, K.; Esch, L.; Farmer, K.; Marr, I. Basic Needs in Horses?—A Literature Review. *Animals* **2021**, *11*, 1798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Malik, M. Heart rate variability. *Curr. Opin. Cardiol.* **1998**, *13*, 36–44. [[CrossRef](#)]
54. Moons, C.; Laughlin, K.; Zanella, A. Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2005**, *91*, 321–335. [[CrossRef](#)]
55. Mal, M.; Friend, T.; Lay, D.; Vogelsang, S.; Jenkins, O. Physiological responses of mares to short term confinement and social isolation. *J. Equine Vet. Sci.* **1991**, *11*, 96–102. [[CrossRef](#)]
56. Patkowski, K.; Pluta, M.; Lipiec, A.; Greguła-Kania, M.; Gruszecki, T.M. Foraging Behavior Patterns of Sheep and Horses Under a Mixed Species Grazing System. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* **2019**, *22*, 357–363. [[CrossRef](#)]
57. Janczarek, I.; Wilk, I.; Stachurska, A.; Krakowski, L.; Liss, M. Cardiac activity and salivary cortisol concentration of leisure horses in response to the presence of an audience in the arena. *J. Vet. Behav.* **2019**, *29*, 31–39. [[CrossRef](#)]
58. Wilk, I.; Janczarek, I. Relationship between behavior and cardiac response to round pen training. *J. Vet. Behav.* **2015**, *10*, 231–236. [[CrossRef](#)]
59. Lenoir, A.; Trachsel, D.S.; Younes, M.; Barrey, E.; Robert, C. Agreement between Electrocardiogram and Heart Rate Meter Is Low for the Measurement of Heart Rate Variability during Exercise in Young Endurance Horses. *Front. Vet. Sci.* **2017**, *4*, 170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Rietmann, T.; Stuart, A.; Bernasconi, P.; Stauffacher, M.; Auer, J.; Weishaupt, M. Assessment of mental stress in warmblood horses: Heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2004**, *88*, 121–136. [[CrossRef](#)]
61. Janczarek, I.; Kędzierski, W.; Wilk, I.; Kolstrung, R.; Strzelec, K.; Stachurska, A. Autonomic nervous system activity in purebred Arabian horses evaluated according to the low frequency and high frequency spectrum versus racing performance. *Acta Vet. Brno* **2017**, *85*, 355–362. [[CrossRef](#)]
62. Lindh, B.; Hökfelt, T. Chapter 20 Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system. *Prog. Brain Res.* **1990**, *84*, 175–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kay, R.; Hall, C. The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2009**, *116*, 237–243. [[CrossRef](#)]
64. Appelhans, B.M.; Luecken, L.J. Heart Rate Variability as an Index of Regulated Emotional Responding. *Rev. Gen. Psychol.* **2006**, *10*, 229–240. [[CrossRef](#)]
65. Pumprla, J.; Howorka, K.; Groves, D.; Chester, M.; Nolan, J. Functional assessment of heart rate variability: Physiological basis and practical applications. *Int. J. Cardiol.* **2002**, *84*, 1–14. [[CrossRef](#)]



Lublin, 15.03.2023r.

Prof. dr hab. Iwona Janczarek  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
iwona.janczarek@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek B., Pokora E., Łuszczyński, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271.

mój udział polegał na konsultacji założeń metodycznych, ustosunkowaniu się do recenzji, wprowadzeniu koniecznych poprawek po recenzji, częściowym nadzorze nad projektem oraz administracją projektu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.

  
.....  
Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Mgr Ewelina Tkaczyk  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
ewelina.tkaczyk@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek B., Pokora E., Łuszczynski, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271.

mój udział polegał na przygotowaniu części oprogramowania, przeprowadzeniu zakresu badań oraz częściowej wizualizacji projektu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Dr. hab. Izabela Wilk, prof uczelni  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
izabela.wilk@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek B., Pokora E., Łuszczynski, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271.

mój udział polegał na ocenie pracy oraz podaniu źródeł.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis



Lublin, 15.03.2023r.

Mgr inż. Wiktoria Janicka  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
wiktoria.janicka@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

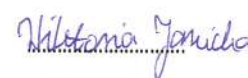
### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek B., Pokora E., Łuszczynski, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271.

mój udział polegał na częściowej wizualizacji projektu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Dr inż. Tomasz Próchniak  
Instytutu Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
tomasz.prochniak@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybactwo  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek B., Pokora E., Łuszczyński, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271.

mój udział polegał na statystycznej weryfikacji wyników oraz korekcie pracy po recenzji.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



.....  
Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Dr n. wet. Beata Kaczmarek  
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Głęboka 30  
20-612 Lublin  
beatakaczmar1@gmail.com

**Rada Dyscypliny Zootechniki i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek B., Pokora E., Łuszczynski, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271.

mój udział polegał na analizie formalnej projektu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

inż. Elżbieta Pokora  
student kierunku Hipologia i Jeździectwo  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
epokora99@gmail.com

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek B., Pokora E., Łuszczynski, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271.

mój udział polegał na przygotowaniu oprogramowania.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

dr hab. inż. Jarosław Łuszczynski, prof. URK  
Katedra Genetyki, Hodowli i Etologii Zwierząt  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
al. Mickiewicza 24/28  
30-059 Kraków  
jaroslaw.luszczynski@urk.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybactwo  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wiśniewska, A., Janczarek, I., Tkaczyk, E., Wilk, I., Janicka, W., Próchniak, T., Kaczmarek B., Pokora E., Łuszczynski, J. (2022). Minimizing the Effects of Social Isolation of Horses by Contact with Animals of a Different Species: The Domestic Goat as an Example. *Animals*, 12(17), 2271.

mój udział polegał na nadzorowaniu projektu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis

# Effect of selected factors on features of short-term social isolation of horses: a pilot study\*

© EWA JASTRZĘBSKA<sup>1</sup>, © ANNA WIŚNIEWSKA<sup>2</sup>, © IZABELA WILK<sup>2</sup>,  
© TOMASZ PRÓCHNIAK<sup>3</sup>, © IWONA JANCZAREK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Horse Breeding and Riding, Faculty of Animal Bioengineering,  
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, Poland

<sup>2</sup>Department of Horse Breeding and Use, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy,  
University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

<sup>3</sup>Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy,  
University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

Received 03.11.2022

Accepted 30.12.2022

Jastrzębska E., Wiśniewska A., Wilk I., Próchniak T., Janczarek I.

## Effect of selected factors on features of short-term social isolation of horses: a pilot study

### Summary

This study analysed the effect of the sex of the horses as well as the type of their maintenance and use at the centre on the behavioural and physiological expression of short-term social isolation, which was assessed on the basis of heart and respiratory rates. A total of 27 clinically healthy horses were examined. The horses had social contact of various durations, were used with different regularity and were not equally accustomed to isolation. An isolation test was conducted. The heart and respiratory rates were measured at rest and after isolation, and the differences between the values were calculated. Moreover, points were assigned for the effect of isolation. The behaviour in subsequent stages of isolation was also observed. It was found that the sex of the horses, the period spent daily in the paddock in the herd, the regularity of use and habituation to staying in isolation can all be classified as factors that have no effect on the heart rate, respiratory rate or behaviour during short-term isolation. It was suggested that the resting respiratory rate and the effect of isolation could be classified as features that are potentially useful in assessing horses' adaptability to short-term social isolation.

**Keywords:** horse, isolation, heart rate, breaths, behaviour

The basic needs of horses include free movement, access to bulky feed and, importantly, social contact (8, 23). Not only does satisfying these needs affect the mental and physical comfort of animals, but it also helps humans to train them. It is believed that keeping horses in groups optimally satisfies their physical and behavioural needs, especially the need for social contact with other horses (15). It also has a beneficial effect on interactions between the horse and humans during training. Horses should be released into paddocks every day in order to make their living conditions as similar to natural conditions as possible. These measures are essential to their welfare. Staying on paddocks offers horses a sense of freedom and enables them to relax, reducing the risk of behavioural disorders, such as stereotypies (15, 30, 40).

\*Project financially supported by the Minister of Education and Science (Poland) under the 418 program entitled „Regional Initiative of Excellence” for the years 2019-2023, Project No. 419 010/RID/2018/19, amount of funding 12.000.000 PLN.

Unfortunately, social isolation is one of major problems that currently affect horses (4). During the foaling period, the effects of longing for the mother are alleviated by allowing adult, balanced horses near the weaned foals. Positive social behaviours then intensify, while agonistic interactions decrease. A young, socially unstable individual is thus given support in the form of the herd leader. It is commonly known that during the successive stages of the development of horses in the process of domestication, they are often isolated or form small groups of the same sex, breed and age, which may serve to reduce the occurrence of injuries. Keeling et al. (22) only note the advisability of limiting the breed diversity in horse herds. They also demonstrated that the sex and age of horses had no effect on the frequency of injuries among them.

This finding is of particular importance, as according to Stanley et al. (41) the current practice of keeping horses in herds of unrelated individuals may provide sufficient benefits in terms of social support.



This can, therefore, be comparable to relationships in a natural horse herd, especially because the social system of horses is atypical of ungulates, but similar to that of some primate species, e.g. the gorilla (5, as cited in 27). Membership in the herd is so stable that some mares live in the same group for most of their adult lives. Similar to highly social primates, horses also have a good ability to recognise other individuals (5, as cited in: 28). Linklater and Cameron (27) are of a similar opinion and note that horses (*E. przewalskii*, *E. caballus*) and certain zebra populations (*E. zebra*, *E. burchelli*) are structured by long-term social and reproductive relationships in polygamous groups (26). These relationships are long-term in relation to reproductive life, and membership in the group is stable compared with that of other polygamous ungulates. However, with regard to herds of unrelated horses, it is important to add a new horse to a group of individuals already known to each other so as to reduce stress to the minimum (14). It is therefore suggested that a new horse be incorporated into the group of all horses staying together in the pasture because aggression towards an unknown horse is then minimised thanks to the singularity effect.

Horses need at least auditory and olfactory contact with companions (43). Since it is common practice to keep horses in single stalls, these contacts must be ensured as a substitute for a real social life. However, according to Yarnell et al. (45), stalls result in semi-isolation and limit social interactions to such an extent that they pose a serious hazard to the welfare of horses. Therefore, isolation-induced stress emerges in young horses that are moved from collective rooms to individual stalls (9). Any events that result in separation or confrontation with conspecifics can induce severe psychological stress, which manifests itself in behavioural and physiological changes, including an increased number of vocalisations, accelerated heart and respiratory rates or elevated plasma cortisol levels (23, 24). Opinions on changes in locomotor activity, however, are divided (24, 40). The anxiety associated with social isolation can also disturb the expression and interpretation of behaviours related to suffering (35). Moreover, social isolation is such a significant stressor for a horse that it can actually moderate the behaviour and changes in the heart rate associated with mild somatic pain.

It is also important to note that any movement stereotypies, such as pawing at the litter, walking around the stall or weaving, can be triggered by separation-induced stress (29, 42). When this happens, the animal puts excessive strain on its joints, bones and muscles, which may lead to lameness. In the paddock, on the other hand, the horse starts to run restlessly along the fence while calling nervously to the other individuals (45). Moreover, intensified movement stimulates intestinal peristalsis, which results in defecation, and the elevated body temperature causes sweating, which

can even lead to dehydration. However, cribbing may result in problems with colic and bloating (44). In extreme cases, isolation-induced stress can also lead to self-harm and other abnormal behaviours (11).

The modern use of horses makes isolation unavoidable (20). However, the proper management of horses can help them endure this distressing situation in a relatively safe and trouble-free manner. Not only proper management, but also hanging toys, photographs of other horses and mirrors in the stalls are recommended to reduce isolation-induced stress (7, 21, 29).

The study assumed that the features of a short-term social isolation of horses depend on their sex (mares and geldings), the maintenance method at the centre (duration of social contact with the herd, regularity of use, degree of being accustomed to isolation) and the type of use (regular use for sports and regular or non-regular leisure use). It was also assumed that typical features of the isolation-induced behaviour of horses had an effect on their heart rate and respiration rate at that time. Moreover, the heart rate and respiration rate at rest can be determinants of the features of short-term isolation of horses (18-20).

The present study aimed to analyse the effect of the sex, the maintenance method at the centre, and the type of use on the behavioural and physiological expression of stress related to short-term social isolation. We also sought to assess features of this isolation using the heart rate and respiratory rate.

## Material and methods

The project was financially supported by the Minister of Education and Science under the program „Regional Initiative of Excellence” for the years 2019-2022 (project no. 010/RID/2018/19, amount of funding 12.000.000 PLN).

The research material consisted of 27 clinically healthy Polish Warmblood sports and leisure horses (16 and 11 animals, respectively). The study group comprised 15 mares and 12 geldings. The horses did not exhibit behavioural abnormalities, which was determined by one of the authors through an interview with the keeper of the horses. Before the study, a behaviourist conducted a passive human test (12). The results did not differentiate the horses: all animals approached a human with confidence immediately after the beginning of the test.

The horses stayed at three different centres under similar atmospheric conditions: average annual air temperature of  $8.2 \pm 0.29^\circ\text{C}$  (centre 1 –  $8.0^\circ\text{C}$ , centre 2 –  $8.2^\circ\text{C}$ , centre 3 –  $7.8^\circ\text{C}$ ), atmospheric pressure of  $104.97 \pm 2.12$  hPa (centre 1 –  $103.0$  hPa, centre 2 –  $107.2$  hPa, centre 3 –  $104.7$  hPa), and precipitation of  $609.67 \pm 10.34$  mm (centre 1 –  $612.9$  mm, centre 2 –  $597.6$  mm; centre 3 –  $618.3$  mm) (<https://klimat.imgw.pl/pl/biuletyn-monitoring/#2021/rok>, 2022). Horse management was generally similar at all centres. The stalls in the stables had an area of approximately  $12\text{ m}^2$ , with wall dimensions of  $3 \times 4$  m or  $3.5 \times 3.5$  m, and were equipped with a feeding trough, an automatic watering trough, and a salt-lick on a stand. The horses were fed three times a day with meadow hay and nutritive fodder (a mixture of oats and industrial feed granules). Once a day, they were admin-

Tab. 1. Differences in horse maintenance at the centres

| Centre | Type of use | The duration (h) of social contact with the herd (the time spent in the paddock by day) | Number of horses | Age  | Breed                                      | Regularity of use   | Habituation to social isolation             |
|--------|-------------|---|------------------|------|--|---|---|
| 1      | leisure     | 6-7   | 8                | 4-12 | Polish warmblood, Wielkopolski, Hanoverian | moderately regular (holidays, weekends, occasionally on other days) | occasional (a maximum of 2-3 times a month) |
| 2      | leisure     | 8-12  | 9                | 5-15 | Polish warmblood, Hanoverian               | irregular (only during holidays)                                    | occasional (a maximum of 2-3 times a month) |
| 3      | sports      | 2-3   | 10               | 5-14 | Polish warmblood, Oldenburger              | regular (6 days each week)  | frequently (at least 5-6 times a week)      |

istered a vitamin mixture designed for horses. The quantity of the feed given was determined by individual needs of each animal. The authors described the condition of each horse as very good.

The differences in horse maintenance concerned the duration of social contact with the herd, the regularity of use and the degree of habituation to social isolation (Tab. 1).

**Isolation test.** The horses were released into rectangular-shaped paddocks, which were similar at all centres with the following dimensions: 176 m<sup>2</sup> (centre 1), 182 m<sup>2</sup> (centre 2), and 175 m<sup>2</sup> (centre 3). The horses were then left in the paddocks without human interference for 60 minutes after the release. This was followed by an isolation test, which involved walking each horse separately from the paddock

to the stable located 90-120 m away from the paddock exit (depending on the centre). Each horse was walked to its own stall by the keeper. No other horses were present in the stable. The horse stayed in the stable in silence for five minutes. There was no feed in the stall during the test. While the horse was in the stall, only an experimenter was present in the stable corridor, at a distance of 5 m from the stall. After five minutes of isolation, the horse was led out to the stable corridor by the keeper. It was then led out from the stable and let loose on a path leading to the paddock, so that it could return to the herd. Another keeper was waiting for the horse near the paddock and opened the gate at the right moment to allow the horse to rejoin the herd. After 20 minutes, another horse was subjected to the same isolation test. Figure 1 shows the course of the isolation test.

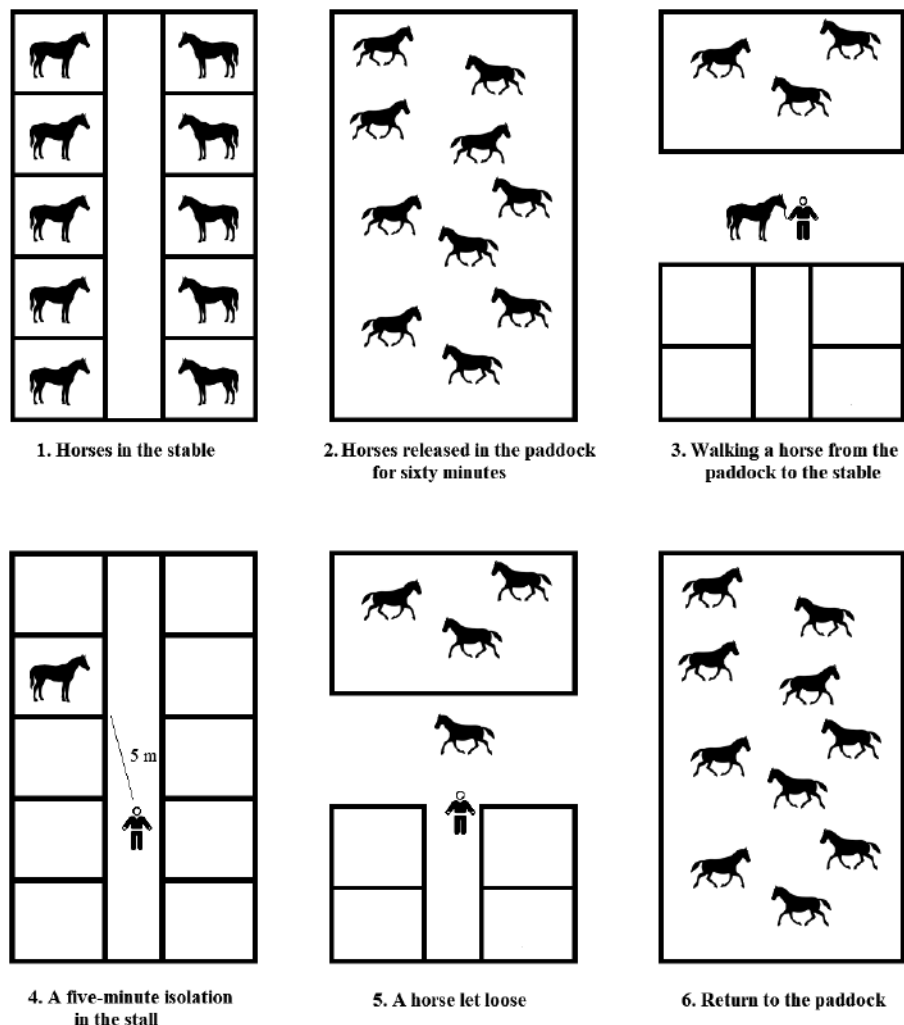


Fig. 1. The course of the isolation test

#### Measurement of the heart rate and respiratory rate.

The heart rate and respiratory rate were measured twice. The first series of measurements (resting heart rate and resting respiratory rate) were carried out on the day of the isolation test, 30 minutes after the first feeding, which took place in the morning, between 06:00 AM and 08:00 AM, depending on the centre. The second series of measurements (heart rate after isolation and respiratory rate after isolation) were carried out in the stable corridor following the five minutes of isolation in a stall. The rising of the sides of the horse's body was observed at a point behind the ribs, and breaths taken during one minute were counted to determine the respiratory rate. The heart rate was measured with a stethoscope at a point behind the horse's elbow on the left side of the body. Based on the values obtained, the following indicators were calculated: the difference in the heart rate, i.e. the difference between the heart rate after isolation and the resting heart rate, and the difference in the respiratory rate, i.e. the difference between the respiratory rate after isolation and the resting respiratory rate. These indicators made it possible to consider individual physiological differences in determining the resting level of the parameters examined (18).

**Time measurements and behavioural observations.** The time between



**Tab. 2. Points assigned to the horses for behaviour noted during isolating a horse from the herd and the time needed for this isolation (the effect of isolation)**

| Score | Behaviour  |
|-------|--|
| 0     | the horse escapes at a trot or a canter, does not allow the human to approach; catching and leading the horse away from the herd is impossible at six attempts   |
| 1     | upon the approach of the human, the horse runs a few steps away at a trot or a canter, allows itself to be caught at the fifth attempt, walks or trots towards the exit with resistance, tries to stop or break free, looks back at the herd and vocalises |
| 2     | upon the approach of the human, the horse runs a few steps away at a trot, allows itself to be caught at the fourth attempt, walks or trots towards the exit with resistance, tries to stop or break free gently, looks back at the herd, and vocalises    |
| 3     | upon the approach of the human, the horse walks or trots a few steps away, allows itself to be caught at the third attempt, walks towards the exit with no resistance, looks back at the herd, and vocalises   |
| 4     | upon the approach of the human, the horse walks a few steps away, allows itself to be caught at the second attempt, walks towards the exit with no resistance, looks back at the herd, and does not vocalise   |
| 5     | upon the approach of the human, the horse stands still, allows itself to be caught at the first attempt, walks towards the exit with no resistance, does not look back at the herd, and does not vocalise  |
| Score | Time (s) needed for isolating a horse from the herd (value interval)   |
| 0     | ≥ 900  |
| 1     | 600-899  |
| 2     | 300-599  |
| 3     | 120-299  |
| 4     | 60-119   |
| 5     | 0-59   |

the moment the keeper entered the paddock through the gate to catch the horse and walk it to the gate and the moment of exiting the paddock was measured. The behaviourist also assessed the horses' behaviour during that time. The results of time measurements and behavioural observations were grouped into value intervals, and points ranging from 0 to 5 were then assigned (Tab. 2). The final score was the sum of the points assigned, so the horse could obtain from 0 to 10 points. This feature was described as the effect of isolation.

From the moment the horse was led out of the paddock to the moment of return into the paddock, its behaviour was observed, including the number of defecations and vocalisations. During the horse's stay in the stall, the number of acts of pawing at the ground with the front leg and walking around the stall was determined, noting the short-term occurrence of this feature, i.e. not exceeding 150 s (less than half of the time spent in isolation – short-term activity) and the continuous occurrence of the feature, i.e. exceeding 150 s (more than half of the time spent in isolation – continuous activity). The prevailing type of gait during the return of the loose horse from the stable to the paddock gate (the manner of returning to the herd) was also noted: walk, trot, canter (over 50% of the distance) or failure to join the herd by the horse's choice.

**Statistical methods.** The following fixed factors were defined: sex (two levels), centre (three levels), type of use (two levels) and, additionally (for selected models): the manner of returning to the herd (three levels), the occurrence

of defecation (two levels), short-term activity (two levels), continuous activity (two levels), pawing at the ground and walking around the stall (two levels). The variability of the following characteristics was analysed: resting heart rate, heart rate after isolation, difference in the heart rate, resting respiratory rate, respiratory rate after isolation, difference in the respiratory rate, the score for the so-called effect of isolation, and the number of vocalisations. The last two features were not used in all calculations, because of the data structure.

Statistical calculations were performed using the SAS 9.4 package (38). In order to select the optimum data analysis method, the distribution of features was analysed on the basis of the Kolmogorov-Smirnov test.

The effect of isolation on the change in the heart rate and respiratory rate was analysed on the basis of Student's *t*-test for the dependent variables. Coefficients of Spearman rank correlation between the following features were then calculated along with their significance ( $\alpha = 0.05$ ): resting heart rate, heart rate after isolation, difference in the heart rate, resting respiratory rate, respiratory rate after isolation, difference in the respiratory rate, the score for the so-called effect of isolation, and the number of vocalisations. We then examined the impact of the sex, centre, type of use, manner of returning to the herd, occurrence of defecation, short-term activity, continuous activity and pawing at the ground on the values of the resting heart rate, heart rate after isolation, difference in the heart rate, resting respiratory rate, respiratory rate after isolation and difference in the respiratory rate. The analysis included the Wilcoxon (rank-sum) test and the Chi<sup>2</sup> Kruskal-Wallis test. For fixed effects with a significant impact on the level of the features analysed (the score for the so-called effect of isolation, defecation, short-term activity, continuous activity and pawing at the ground), an even analysis of multiple two-sided comparisons was conducted by the Dwass, Steel and Critchlow-Fligner method.

## Results and discussion

Significant differences were found between the heart rate and respiratory rate measured after isolation and at rest (Tab. 3).

**Tab. 3. The effect of isolation on the heart rate and respiratory rate**

| Difference in the parameter value after isolation and at rest | $\mu$ | SE   | t value | Pr. >  t |
|---|-------|------|---------|----------|
| Heart rate  | -4.38 | 0.79 | -5.57   | < 0.01   |
| Respiratory rate  | -1.42 | 0.23 | -6.19   | < 0.01   |

The coefficients of correlation between the features analysed proved to be statistically significant in almost 68% (Tab. 4). In the group of significant correlations, 26% were negative. The resting respiratory rate and resting heart rate were correlated with the other features in the smallest number of cases, while the respiratory rate after isolation was significantly correlated with all of the features. The score for the so-called effect of isolation was the only feature to correlate negatively with the other features.

Tab. 4. Coefficients of Spearman rank correlation between the features

| Feature                                | (2)   | (3)   | (4)   | (5)   | (6)   | (7)    | (8)    |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| (1) Resting heart rate                 | 0.72* | 0.29  | 0.49* | 0.48* | 0.29  | -0.13  | 0.27   |
| (2) Heart rate after isolation         |       | 0.83* | 0.25  | 0.68* | 0.79* | -0.58* | 0.68*  |
| (3) Difference in the heart rate       |       |       | 0.01  | 0.56* | 0.89* | -0.63* | 0.80*  |
| (4) Resting respiratory rate           |       |       |       | 0.73* | 0.06  | -0.18  | 0.08   |
| (5) Respiratory rate after isolation   |       |       |       |       | 0.69* | -0.59* | 0.59*  |
| (6) Difference in the respiratory rate |       |       |       |       |       | -0.67* | 0.79*  |
| (7) Score for the effect of isolation  |       |       |       |       |       |        | -0.53* |
| (8) Number of vocalisations            |       |       |       |       |       |        |        |

Explanations: \* a significant correlation at  $\alpha = 0.05$

Tab. 5. Analysis of the impact of fixed effects on the value of the features analysed

| Feature                            | Factor | Sex              |                       | Centre           |                       | Type of use      |                       |
|------------------------------------|--------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
|                                    |        | Chi <sup>2</sup> | Pr > Chi <sup>2</sup> | Chi <sup>2</sup> | Pr > Chi <sup>2</sup> | Chi <sup>2</sup> | Pr > Chi <sup>2</sup> |
| Resting heart rate                 |        | 0.51             | 0.47                  | 4.11             | 0.25                  | 0.96             | 0.32                  |
| Heart rate after isolation         |        | 0.02             | 0.96                  | 1.50             | 0.66                  | 0.61             | 0.43                  |
| Difference in the heart rate       |        | 0.77             | 0.38                  | 0.62             | 0.89                  | 0.04             | 0.85                  |
| Resting respiratory rate           |        | 0.01             | 0.92                  | 1.68             | 0.64                  | 3.58             | 0.06                  |
| Respiratory rate after isolation   |        | 0.04             | 0.83                  | 1.50             | 0.68                  | 3.04             | 0.08                  |
| Difference in the respiratory rate |        | 0.07             | 0.87                  | 0.90             | 0.82                  | 0.04             | 0.85                  |

Tab. 6. Analysis of the dependence of the factor “the manner of returning to the herd” on the value of the features analysed

| Feature                            | Chi <sup>2</sup> | Pr > Chi <sup>2</sup> | Multiple comparisons |                     |                    |
|------------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
|                                    |                  |                       | Walk (n = 2)         | Trot (n = 14)       | Canter (n = 11)    |
| Resting heart rate                 | 5.69             | 0.13                  | 26.00                | 27.15               | 28.40              |
| Heart rate after isolation         | 7.23             | 0.04                  | 29.00 <sup>a</sup>   | 30.31 <sup>ab</sup> | 35.00 <sup>b</sup> |
| Difference in the heart rate       | 4.79             | 0.19                  | 3.00                 | 3.15                | 6.60               |
| Resting respiratory rate           | 9.88             | 0.02                  | 7.50 <sup>a</sup>    | 8.62 <sup>a</sup>   | 9.70 <sup>b</sup>  |
| Respiratory rate after isolation   | 14.17            | < 0.01                | 8.50 <sup>a</sup>    | 9.62 <sup>a</sup>   | 11.90 <sup>b</sup> |
| Difference in the respiratory rate | 7.58             | 0.04                  | 1.00 <sup>a</sup>    | 1.00 <sup>a</sup>   | 2.20 <sup>b</sup>  |

Explanations: a, b – the values marked with different letters differ significantly at  $\alpha = 0.05$

No significant impact of fixed effects, such as the sex, centre or type of use, on the value of the features analysed was observed (Tab. 5).

The values of the resting respiratory rate, respiratory rate after isolation and the difference in the respiratory rate were significantly higher for horses which cantered to the herd than they were for horses which walked or trotted to the herd. The heart rate after isolation only varied between horses returning to the herd at a walk compared with those returning at a canter (Tab. 6).

Multiple comparisons for the fixed effects are presented in Tables 7-10, including the arithmetic means of the features analysed, where 1 denotes the occurrence of the factor, and 0 denotes its non-occurrence.

The heart rate after isolation, difference in the heart rate and difference in the respiratory rate were significantly higher for horses which defecated during isolation than they were for horses which did not defecate (Tab. 7). In the other cases, this factor did not

significantly differentiate the values of the features analysed.

The resting heart rate and the heart rate after isolation were significantly lower in horses with “short-term activity” noted, as compared to the horses in which no effect of this factor occurred (Tab. 8).

For horses with the “continuous activity” noted, the values of the heart rate after isolation, the difference in the heart rate, the resting respiratory rate, the respiratory rate after isolation and the difference in the respiratory rate were significantly higher than the values noted when no “continuous activity” occurred (Tab. 9).

The horses showing the feature of “pawing at the ground” were characterised by higher values of the heart rate after isolation, the difference in the heart rate, the respiratory rate after isolation and the difference in the respiratory rate compared to the horses that did not paw at the ground (Tab. 10). The modern use of horses requires that these animals be isolated for shorter or longer terms (16). Social isolation undermines the principle of the five freedoms, which are the foundation of welfare (33). However, for working animals,

such as horses, isolation appears to be unavoidable. Moreover, it appears that at least some horses (e.g. sports horses) may become accustomed to even prolonged social isolation (16).

Nevertheless, this is not always the case, as evidenced by various scientifically described effects of separation, for example, stress expressed in physiological and behavioural changes (32). This bipolarity in horses' response to isolation indicates the need to answer the question as to what determines tolerance or intolerance of this condition. Is it merely the proper horse management when preparing an animal for isolation, or is it individual factors that determine the final effect? Is it possible to predict which horses will cope with isolation better and which worse?

Some of the parameters tested in this study (resting heart rate and respiratory rate, heart rate and respiratory rate after isolation, difference in the heart rate and respiratory rate, points assigned for the so-called effect

of isolation, and the number of vocalisations) were most frequently correlated with each other. Actually, in most cases, these correlations were positive. This

result is not surprising, as according to Hothersall and Casey (17), changes in the level of each of the features analysed here can be regarded as a typical picture of isolation-induced stress. However, the small number of significant correlations (compared to the others) between the resting heart and respiratory rates and the other features appears to be explainable. Not only are these parameters an expression of emotional excitability, but they also indicate individual physiological properties of the body or simply the physical fitness level (1). It can therefore be suggested that an early assessment of the adaptability of specific horses to isolation should be based on other parameters. This study looks at the difference between the resting and post-isolation values of the parameters. It appears that these values can most effectively assess response to isolation, as they will show the actual condition of the animal after isolation while considering the resting parameter values. The resting parameter values (although they are characterised by low variability, which makes it difficult to assess a specific response of the body to a particular phenomenon) generally determine basic emotional excitability (19). Therefore, they should not be completely disregarded.

**Tab. 7. Analysis of the effect of the factor “defecation” on the value of the features analysed**

| Feature                            | Chi <sup>2</sup> | Pr > Chi <sup>2</sup> | Multiple comparisons |                    |
|------------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
|                                    |                  |                       | 0 (n = 18)           | 1 (n = 9)          |
| Resting heart rate                 | 1.18             | 0.27                  | 27.06                | 28.00              |
| Heart rate after isolation         | 4.70             | 0.03                  | 30.35 <sup>b</sup>   | 34.44 <sup>a</sup> |
| Difference in the heart rate       | 4.35             | 0.04                  | 3.29 <sup>b</sup>    | 6.44 <sup>a</sup>  |
| Resting respiratory rate           | 0.04             | 0.84                  | 8.82                 | 9.00               |
| Respiratory rate after isolation   | 1.96             | 0.16                  | 9.88                 | 11.11              |
| Difference in the respiratory rate | 5.00             | 0.03                  | 1.06 <sup>b</sup>    | 2.11 <sup>a</sup>  |

Explanations: 0/1 – no occurrence of the effect/occurrence of the effect; a, b – the values marked with different letters differ significantly at  $\alpha = 0.05$

**Tab. 8. Analysis of the effect of the factor “short-term activity” on the value of the features analysed**

| Feature                            | Chi <sup>2</sup> | Pr > Chi <sup>2</sup> | Multiple comparisons |                    |
|------------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
|                                    |                  |                       | 0 (n = 16)           | 1 (n = 11)         |
| Resting heart rate                 | 0.61             | 0.04                  | 27.93 <sup>a</sup>   | 26.73 <sup>b</sup> |
| Heart rate after isolation         | 4.57             | 0.04                  | 31.87 <sup>a</sup>   | 30.24 <sup>b</sup> |
| Difference in the heart rate       | 0.07             | 0.79                  | 4.73                 | 3.91               |
| Resting respiratory rate           | 0.20             | 0.65                  | 9.00                 | 8.73               |
| Respiratory rate after isolation   | 0.02             | 0.89                  | 10.40                | 10.18              |
| Difference in the respiratory rate | 0.04             | 0.85                  | 1.40                 | 1.45               |

Explanations: as in Tab. 7

**Tab. 9. Analysis of the effect of the factor “continuous activity” on the value of the features analysed**

| Feature                            | Chi <sup>2</sup> | Pr > Chi <sup>2</sup> | Multiple comparisons |                    |
|------------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
|                                    |                  |                       | 0 (n = 18)           | 1 (n = 9)          |
| Resting heart rate                 | 1.13             | 0.29                  | 27.00                | 28.11              |
| Heart rate after isolation         | 4.02             | 0.04                  | 29.94 <sup>b</sup>   | 35.22 <sup>a</sup> |
| Difference in the heart rate       | 6.55             | 0.01                  | 2.94 <sup>b</sup>    | 7.11 <sup>a</sup>  |
| Resting respiratory rate           | 3.37             | 0.04                  | 8.53 <sup>b</sup>    | 9.56 <sup>a</sup>  |
| Respiratory rate after isolation   | 6.10             | 0.01                  | 9.59 <sup>b</sup>    | 11.67 <sup>a</sup> |
| Difference in the respiratory rate | 4.63             | 0.03                  | 1.06 <sup>b</sup>    | 2.11 <sup>a</sup>  |

Explanations: as in Tab. 7

**Tab. 10. Analysis of the effect of the factor “pawing at the ground” on the value of the features analysed**

| Feature                            | Chi <sup>2</sup> | Pr > Chi <sup>2</sup> | Multiple comparisons |                    |
|------------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
|                                    |                  |                       | 0 (n = 17)           | 1 (n = 10)         |
| Resting heart rate                 | 3.47             | 0.06                  | 26.69                | 28.50              |
| Heart rate after isolation         | 8.35             | < 0.01                | 29.50 <sup>b</sup>   | 35.40 <sup>a</sup> |
| Difference in the heart rate       | 5.22             | 0.02                  | 2.81 <sup>b</sup>    | 6.90 <sup>a</sup>  |
| Resting respiratory rate           | 3.60             | 0.06                  | 8.50                 | 9.50               |
| Respiratory rate after isolation   | 11.62            | < 0.01                | 9.31 <sup>b</sup>    | 11.90 <sup>a</sup> |
| Difference in the respiratory rate | 11.12            | < 0.01                | 0.81 <sup>b</sup>    | 2.40 <sup>a</sup>  |

Explanations: as in Tab. 7

Interestingly, negative correlations were noted when comparing the score for the so-called effect of isolation with the heart rate and respiratory rate after isolation, the difference in the heart rate and respiratory rate and the number of vocalisations. It means that individuals that tried to avoid isolation had an elevated heart rate, respiratory rate and number of vocalisations after isolation. The horses which better accepted being led away from the herd also better accepted spending time in isolation. Thus, the course of isolating the horse from the herd (effect of isolation) indicates the level of isolation-induced stress.

It also appears that neither the sex of the horses nor the type of use had any effect on the values of the physiological features under study. However, this should come as a surprise. As far as the sex is concerned, mares are expected to respond to isolation more negatively than geldings. Natural horse herds show that it is mares that establish close social relationships (37). Males, at most, live in more or less permanent bachelor groups or serve reproductive and protective functions in a herd of mares and their offspring (13). Therefore, the different functions that horses play in the herd suggested a hypothesis about the effect of the sex on horses' physiological response to isolation, which was rejected in the current study.



Another factor that had been expected to differentiate the horses was the centre where they were kept, since different durations of social contact in the paddock, degrees of habituation to isolation and regularity of use were regarded as highly relevant to the problem analysed in this study. According to Cooper et al. (6), a long period of staying in the herd provides an opportunity to establish actual social bonds. It was therefore reasonable to assume that horses that stayed in the paddock for a limited period of time would tolerate isolation more readily. Moreover, just as in the current study, those horses were additionally accustomed to isolation due to their being used for sports purposes (the type-of-use factor). It turned out, however, that this aspect did not differentiate the results either. This is rather surprising, but may be variously explained. For example, social relationships are often discussed on the basis of natural horse herds (31). However, good horse management reduces the effects of isolation (25). Moreover, psychological traits of horses correlate with isolation-induced stress level (2). It is therefore difficult to assess what in the present study contributed to such findings. Perhaps it was the psychological traits of the horses that played a decisive role.

Important results were also obtained from the analysis of features which, due to their very low variability, could only be regarded as factors. It should be emphasised that the authors are aware of the limitation of the study, namely, the small number of horses examined, especially considering the number of factors analysed. It appears, however, that the statistical analysis rejected two previously analysed features, namely, the points assigned for the so-called effect of isolation and the number of vocalisations. The number of vocalizations was positively correlated with the heart rate after isolation, difference in the heart rate, respiratory rate after isolation and difference in the respiratory rate, which may indicate greater emotional reaction in horses during isolation. For this reason, they were regarded as factors for the analysis of the other features. However, there is one interesting example in the results regarding the previously mentioned resting values of these parameters. The respiration rate at rest was actually significantly higher in horses cantering to the herd than it was in those walking or trotting. The results were confirmed for the analysis of the “continuous activity,” which was also noted in horses with a significantly higher resting respiratory rate. However, since it is only a single parameter in this paper, and the result did not concern all of the behavioural features analysed, it can only be hypothesised that horses with an increased resting respiratory rate can tolerate social isolation less readily. Freeman (10) took a similar view when he concluded that this could have been related to a greater demand for oxygen and increased gas exchange.

Another noteworthy fact is that the occurrence of the behavioural features was often associated with significantly higher values of heart and respiratory rates after isolation and of the difference in the heart and respiratory rates. For example, horses which defecated had a higher heart rate after isolation and higher differences in the heart rate and the respiration rate. Moreover, horses which pawed at the ground during their stay in the stall also had a higher respiratory rate after isolation than did the other horses. Continuous activity in the stall resulted in a significant increase in almost all parameters. Short-term activity, on the other hand, did not result in such an increase, as, surprisingly, a lower value of the heart rate after isolation was noted in horses in which this feature had occurred. Horses studied by Baragli et al. (3) showed low HRs in response to stressful situations despite looking slightly agitated when their behaviour was being analysed. Moreover, Minero et al. (34) found that the HR response to restraint by covering a horse's head with a solid hood was lower in sport horses than in therapeutic riding horses. These observations indicate that some horses can react to stressful stimuli by changing their behaviour or they may mask their reactions, but the heart rate increases. Thus, the low level of excitability observed in some horses is not a genetic or general feature, but rather a result of previous experience and training. However, the other parameters did not differ significantly. Most probably, the horses discharged their emotions in this way. A similar claim was made by Ricci-Bonot et al. (36), who called it behavioural buffering.

Therefore, it appears that the willingness of breeding horses to socialise can be significantly limited and that it cannot be compared to social relationships in a herd of free-living horses. Unnatural maintenance conditions and the nature of use change horses' behaviour irreversibly. Silk (39) takes a similar view, claiming that sociality evolves when the direct benefits of a close relationship with other individuals exceed the costs borne by the body. Humans increasingly do not favour the horses' sociality, which may result in these animals having to learn how to function “normally” without a herd.

The sex of the horses, procedures followed at the horse maintenance centre associated with different durations of daily social contact (horses' habituation to solitude) and the regularity and type of use can be classified as factors that have no effect on the heart rate, the number of breaths or the behaviour during short-term isolation. It can also be suggested that the resting respiratory rate and the effect of isolation (i.e. the time needed for isolating a horse from the herd and the horse's behaviour at that time) can most probably be classified as potentially useful in the assessment of horses' adaptability to social isolation. However, due to the limitations of the present study, this claim is only a hypothesis.

## References

1. Aerts J. M., Gebruers F., Van Camp E., Berckmans D.: Controlling horse heart rate as a basis for training improvement. *Computers and electronics in Agriculture* 2008, 64 (1), 78-84, doi: 10.1016/j.compag.2008.05.001.
2. Arena I., Marliani G., Sabioni S., Gabai G., Bucci D., Accorsi P. A.: Assessment of horses' welfare: Behavioral, hormonal, and husbandry aspects. *J. Vet. Behav.* 2021, 41, 82-90, doi: 10.1016/j.jveb.2021.01.006.
3. Baragli P., Vitale V., Banti L., Bergero D.: Life experience and object-directed emotions in horses. *J. Vet. Behav.* 2013, 8, e2, doi: 10.1016/j.jveb.2012.12.005.
4. Bourjade M., Moulinot M., Henry S., Richard-Yris M.-A., Hausberger M.: Could adults be used to improve social skills of young horses, *Equus caballus*? *Dev. Psychobiol.* 2008, 50, 408-417, doi: 10.1002/dev.20301.
5. Cameron E. Z., Setsaas T. H., Linklater W. L.: Social bonds between unrelated females increase reproductive success in feral horses. *Proc. of the National Academy of Sciences* 2009, 106 (33), 13850-13853, doi: 10.1073/pnas.0900639106.
6. Cooper J. J., McDonald L., Mills D. S.: The effect of increasing visual horizons on stereotypic weaving: implications for the social housing of stabled horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2000, 69 (1), 67-83, doi: 10.1016/S0168-1591(00)00115-5.
7. Cooper J., McGreevy P.: Stereotypic behaviour in the stabled horse: causes, effects and prevention without compromising horse welfare. *The welfare of horses*. Springer, Dordrecht 2007, p. 99-124.
8. Dierendonck M. C. van.: The importance of social relationships in horses. Utrecht University 2006.
9. Erber R., Wulf M., Aurich J., Rose-Meierhöfer S., Hoffmann G., von Lewinski M., Aurich C.: Stress response of three-year-old horse mares to changes in husbandry system during initial equestrian training. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33 (12), 1088-1094, doi: 10.1016/j.jevs.2013.04.008.
10. Freeman D. W.: Physical conditioning of horses. *Oklahoma Cooperative Extension Service ANSI-398*, 2008, 1-6.
11. Fureix C., Bourjade M., Henry S., Sankey C., Hausberger M.: Exploring aggression regulation in managed groups of horses *Equus caballus*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2012, 138 (3-4), 216-228, doi: 10.1016/j.applanim.2012.02.009.
12. Fureix C., Jego P., Sankey C., Hausberger M.: How horses (*Equus caballus*) see the world: humans as significant "objects". *Animal Cognition* 2009, 12 (4), 643-654, doi: 10.1007/s10071-009-0223-2.
13. Granquist S. M., Thorhallsdottir A. G., Sigurjonsdottir H.: The effect of stallions on social interactions in domestic and semi-feral harems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2012, 141 (1-2), 49-56, doi: 10.1016/j.applanim.2012.07.001.
14. Hartmann E., Keeling L. J., Rundgren M.: Comparison of 3 methods for mixing unfamiliar horses (*Equus caballus*). *J. Vet. Behav.* 2011, 6 (1), 39-49, doi: 10.1016/j.jveb.2010.09.023.
15. Hartmann E., Søndergaard E., Keeling L. J.: Keeping horses in groups: A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2012, 136 (2-4), 77-87, doi: 10.1016/j.applanim.2011.10.004.
16. Henderson A. J.: Don't fence me in: managing psychological well being for elite performance horses. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 2007, 10 (4), 309-329, doi: 10.1080/10888700701555576.
17. Hotherhall B., Casey R.: Undesired behaviour in horses: A review of their development, prevention, management and association with welfare. *Equine Vet. Educ.* 2012, 24 (9), 479-485, doi: 10.1111/j.2042-3292.2011.00296.x.
18. Janczarek I., Kedzierski W., Stachurska A., Wilk I.: Can releasing racehorses to paddocks be beneficial? Heart rate analysis-preliminary study. *Ann. Anim. Sci.* 2016, 16 (1), 87, doi: 10.1515/aoas-2015-0049.
19. Janczarek I., Stachurska A., Wilk I., Krakowski L., Przetacznik M., Zastrzeżyńska M., Kuna-Brzostowska I.: Emotional excitability and behaviour of horses in response to stroking various regions of the body. *Anim. Sci. J.* 2018, 89 (11), 1599-1608, doi: 10.1111/asj.13104.
20. Jørgensen G. H., Fremstad K. E., Mejdell C. M., Bøe K. E.: Separating a horse from the social group for riding or training purposes: a descriptive study of human-horse interactions. *Animal Welfare* 2011, 20 (2), 271-279.
21. Kay R., Hall C.: The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2009, 116 (2-4), 237-243, doi: 10.1016/j.applanim.2008.08.013.
22. Keeling L. J., Bøe K. E., Christensen J. W., Hyyppä S., Jansson H., Jørgensen G. H., Hartmann E.: Injury incidence, reactivity and ease of handling of horses kept in groups: A matched case-control study in four Nordic countries. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2016, 185, 59-65, doi: 10.1016/j.applanim.2016.10.006.
23. Krueger K., Esch L., Farmer K., Marr I.: Basic Needs in Horses? – A Literature Review. *Animals* 2021, 11 (6), 1798, doi: 10.3390/ani11061798.
24. Lansade L., Bouissou M. F., Erhard H. W.: Reactivity to isolation and association with conspecifics: A temperament trait stable across time and situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2008, 109 (2-4), 355-373, doi: 10.1016/j.applanim.2007.03.003.
25. Lesimple C., Poissonnet A., Hausberger M.: How to keep your horse safe? An epidemiological study about management practices. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2016, 181, 105-114, doi: 10.1016/j.applanim.2016.04.015.
26. Linklater W. L.: Adaptive explanation in socio-ecology: lessons from the Equidae. *Biological reviews* 2000, 75 (1), 1-20.
27. Linklater W. L., Cameron E. Z.: Social dispersal but with philopatry reveals incest avoidance in a polygynous ungulate. *Anim. Behav.* 2009, 77 (5), 1085-1093, doi: 10.1016/j.anbehav.2009.01.017.
28. Linklater W. L., Cameron E. Z., Stafford K. J., Veltman C. J.: Social and spatial structure and range use by Kaimanawa wild horses (*Equus caballus*: Equidae). *New Zealand Journal of Ecology* 2000, 139-152.
29. McAfee L. M., Mills D. S., Cooper J. J.: The use of mirrors for the control of stereotypic weaving behaviour in the stabled horse. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2002, 78 (2-4), 159-173, doi: 10.1016/S0168-1591(02)00086-2.
30. McGreevy P.: *Equine behavior: a guide for veterinarians and equine scientists*. Elsevier Health Sciences 2012.
31. Mendonça R. S., Pinto P., Inoue S., Ringhofer M., Godinho R., Hirata S.: Social determinants of affiliation and cohesion in a population of feral horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2021, 245, 105496, doi: 10.1016/j.applanim.2021.105496.
32. Mendonça T., Bienboire-Frosini C., Kowalczyk I., Leclercq J., Arroub S., Pageat P.: Equine activities influence horses' responses to different stimuli: Could this have an impact on equine welfare? *Animals* 2019, 9 (6), 290, doi: 10.3390/ani9060290.
33. Mills D. S., Clarke A.: Housing, management and welfare. *The welfare of horses*. Springer, Dordrecht 2007, p. 77-97.
34. Minero M., Zucca D., Canali E.: A note on reaction to novel stimulus and restraint by therapeutic riding horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2006, 97, 335-342, doi: 10.1016/j.applanim.2005.07.004.
35. Reid K., Rogers C. W., Gronqvist G., Gee E. K., Bolwell C. F.: Anxiety and pain in horses measured by heart rate variability and behavior. *J. Vet. Behav.* 2017, 22, 1-6, doi: 10.1016/j.jveb.2017.09.002.
36. Ricci-Bonot C., Romero T., Nicol C., Mills D.: Social buffering in horses is influenced by context but not by the familiarity and habituation of a companion. *Scientific reports* 2021, 11 (1), 1-10, doi: 10.1038/s41598-021-88319-z.
37. Rutberg A. T., Greenberg S. A.: Dominance, aggression frequencies and modes of aggressive competition in feral pony mares. *Animal Behav.* 1990, 40 (2), 322-331, doi: 10.1016/S0003-3472(05)80927-3.
38. SAS 9.4 version 9.4 by SAS Institute Inc. Cary, NC.
39. Silk J. B.: The adaptive value of sociality in mammalian groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2007, 362 (1480), 539-559, doi: 10.1098/rstb.2006.1994.
40. Stachurska A., Różańska-Boczula M., Wnuk-Pawlak E.: The difference in the locomotor activity of horses during solitary and paired release. *Pferdeheilkunde Equine Med.* 2021, 37, 50-54, doi: 10.21836/PEM20210107.
41. Stanley C. R., Mettke-Hofmann C., Hager R., Shultz S.: Social stability in semiferal ponies: networks show interannual stability alongside seasonal flexibility. *Anim. Behav.* 2018, 136, 175-184, doi: 10.1016/j.anbehav.2017.04.013.
42. Waran N. K.: *The social behaviour of horses. Social Behaviour in Farm Animals*. Keeling L. J., Gonyou H. W. (eds.). CAB International, Wallingford, Oxon 2001, p. 247-274.
43. Werhahn H., Hessel E. F., Van den Weghe H. F.: Competition horses housed in single stalls (I): behavior and activity patterns during free exercise according to its configuration. *J. Equine Vet. Sci.* 2012, 32 (1), 45-52, doi: 10.1016/j.jevs.2011.06.007.
44. Wickens C. L., Heleski C. R.: Crib-biting behavior in horses: A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2010, 128 (1-4), 1-9, doi: 10.1016/j.applanim.2010.07.002.
45. Yarnell K., Hall C., Royle C., Walker S. L.: Domesticated horses differ in their behavioural and physiological responses to isolated and group housing. *Physiology & Behavior* 2015, 143, 51-57, doi: 10.1016/j.physbeh.2015.02.040.

**Corresponding authors: Anna Wiśniewska, DSc, Department of Horse Breeding and Use, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; e-mail: anna.wisniewska@up.lublin.pl**  
**Ewa Jastrzębska, MSc, Ing., prof. UWM, Department of Horse Breeding and Riding, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, Poland; e-mail: e.jastrzebska@uwm.edu.pl**

Lublin, 15.03.2023r.

dr hab. inż. Ewa Jastrzębska, prof. UWM  
Katedra Hodowli Koni i Jeździectwa  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
ul. Oczapowskiego 5  
10-719 Olsztyn  
e.jastrzebska@uwm.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Jastrzębska, E. Wiśniewska, A., Wilk, I., Próchniak, T., Janczarek, I. (2023) – Effect of Selected Factors on Features of Short-Term Social Isolation of Horses: A Pilot Study, Med. Weter. 79 (3), 134-141.

mój udział polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczenia, gromadzeniu i analizie danych.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis

Lublin, 15.03.2023r.

Dr. hab. Izabela Wilk, prof uczelni  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
izabela.wilk@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacktwo  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Jastrzębska, E. Wiśniewska, A., Wilk, I., Próchniak, T., Janczarek, I. (2023) – Effect of Selected Factors on Features of Short-Term Social Isolation of Horses: A Pilot Study, Med. Weter. 79 (3), 134-141.

mój udział polegał na przygotowaniu przeglądu literatury.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



Podpis



Lublin, 15.03.2023r.

Dr inż. Tomasz Próchniak  
Instytutu Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
tomasz.prochniak@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Jastrzębska, E. Wiśniewska, A., Wilk, I., Próchniak, T., Janczarek, I. (2023) – Effect of Selected Factors on Features of Short-Term Social Isolation of Horses: A Pilot Study, Med. Weter. 79 (3), 134-141.

mój udział polegał na przeprowadzeniu analiz statystycznych.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.



.....  
Podpis



Lublin, 15.03.2023r.

Prof. dr hab. Iwona Janczarek  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13  
20-950 Lublin  
iwona.janczarek@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i  
Rybacko  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

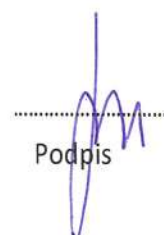
### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Jastrzębska, E. Wiśniewska, A., Wilk, I., Próchniak, T., Janczarek, I. (2023) – Effect of Selected Factors on Features of Short-Term Social Isolation of Horses: A Pilot Study, Med. Weter. 79 (3), 134-141.

mój udział polegał na podaniu źródeł.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt: „Obraz reakcji behawioralno-fizjologicznych koni w warunkach zaburzonego życia stadnego i wsparcia socjalnego podczas izolacji” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Skowerskiej-Wiśniewskiej.

  
.....  
Podpis