



WYDZIAŁ  
NAUK O ZWIERZĘTACH  
I BIOGOSPODARKI

UNIwersytet PRZYRODniczy w LUBLINIE

Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki  
Dyscyplina naukowa Zootechnika i Rybactwo

Mgr inż. Katarzyna Dziki-Michalska

*Rozprawa doktorska*

**Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas  
polowań z podchodu**

*The welfare of selected cervids harvested during stalking hunts*

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Etologii Zwierząt i Łowiectwa

Promotor: dr hab. inż. Katarzyna Tajchman, profesor uczelni

Lublin, 2025

*Serdeczne podziękowania składam na ręce mojego promotora  
Dr hab. inż. Katarzyny Tajchman, profesor uczelni, której zaangażowanie i wsparcie  
merytoryczne w proces powstawania niniejszej pracy  
zawsze będą wzbudzać u mnie uznanie i podziw.  
Jestem głęboko wdzięczna za poświęcony mi czas oraz okazaną życzliwość.*

*Składam również podziękowania prof. dr. hab. Leszkowi Drozdowi,  
który rozbudził moje zainteresowania łowiectwem i wskazał odpowiedni kierunek.*

*Dziękuję również wszystkim, których wiara i wsparcie przyczyniły  
się do powstania niniejszej dysertacji - w szczególności rodzinie i przyjaciołom.*

*Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję mojej wspaniałej córce Zuzannie,  
która nigdy nie zwątpiła w moje możliwości.  
„Nic nie jest niemożliwe. Niemożliwe jest tylko dla tego, kto się poddaje!”  
- Kenneth Boegh Andersen*

### **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: Lublin, dn. 10 marca 2025 r. Podpis promotora Tejclun

### **Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej**

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów~~/~~Promotora pomocniczego~~\* 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: Lublin, dn. 10 marca 2025 r. Podpis autora Katarzyna Dębińska-Michalska

\* niepotrzebne skreślić

## Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu

**Dziki-Michalska K.**, Tajchman K., Kowalik S. 2023. Physiological response of roe deer (*Capreolus capreolus*) during stalking hunts depending on age. *BMC Vet. Res.* 19:266. DOI:10.1186/s12917-023-03833-8

Liczba punktów w roku publikacji: **MNiSW = 140; IF=2,300**

*Indywidualny wkład pracy w publikację (70%): przegląd literatury, prowadzeniu badań klinicznych, laboratoryjnych, eksperymentalnych oraz pozyskiwanie próbek i danych, wykonaniu doświadczenia, opracowałam koncepcji i zaprojektowanie badania, zinterpretowanie wyników, przygotowanie manuskryptu i zrewidowanie jego ostatecznej formy.*

**Dziki-Michalska K.**, Tajchman K., Kowalik S., Wójcik M. 2024. The levels of cortisol and selected biochemical parameters in red deer harvested during stalking hunts. *Animals* 14(7):1108. DOI: 10.3390/ani14071108

Liczba punktów w roku publikacji: **MNiSW = 100; IF=2,700**

*Indywidualny wkład pracy w publikację (70%): opracowanie koncepcji i metodologii badań, analiza formalna, zebranie materiału biologicznego, przygotowanie manuskryptu oraz przeredagowanie manuskryptu po recenzjach.*

**Dziki-Michalska K.**, Tajchman K., Staniszevska P., Strachecka A. 2024. Comparison of cortisol levels in the hair of male european roe deer at the beginning and end of the stalking hunting season. *Animals* 2024. 14(22):3184. DOI: 10.3390/ani14223184

Liczba punktów w roku publikacji: **MNiSW = 100; IF=2,700**

*Indywidualny wkład pracy w publikację (70%): opracowanie koncepcji i metodologii badań, analiza formalna, zebranie materiału biologicznego, przygotowanie manuskryptu oraz przeredagowanie manuskryptu po recenzjach.*

**Łączna liczba punktów MEiN\* = 340**

**IF (Impact Factor)\*\* = 7.300**

**Udział w publikacjach = 70%**

\* Wykaz czasopism naukowych MNiSW,

\*\* Web of Science™ – Journal Citation Reports®

## **Spis treści**

<i>Oświadczenia</i> .....	3
<i>Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu</i> .....	4
<i>Wykaz skrótów</i> .....	6
<i>Streszczenie</i> .....	7
<i>Summary</i> .....	9
<i>Wprowadzenie teoretyczne na podstawie publikacji</i> .....	11
<i>Hipoteza i cel badań</i> .....	17
<i>Cel badań</i> .....	18
<i>Materiał i metody</i> .....	19
<i>Projekty eksperymentów</i> .....	19
<i>Obszar badań</i> .....	20
<i>Zastosowane metody badawcze</i> .....	21
<i>Wyniki badań</i> .....	23
<i>Praca I</i> .....	23
<i>Praca II</i> .....	28
<i>Praca III</i> .....	34
<i>Dyskusja</i> .....	35
<i>Kortyzol w osoczu krwi</i> .....	35
<i>Kortyzol a parametry biochemiczne krwi</i> .....	37
<i>Kortyzol w sierści</i> .....	43
<i>Wnioski</i> .....	46
<i>Piśmiennictwo</i> .....	47
<i>Załączniki</i>	
<i>Załącznik 1. Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład cyklu publikacji</i>	
<i>Załącznik 2. Oświadczenia autorów publikacji dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych prac naukowych</i>	

## Wykaz skrótów

ALP: fosfataza alkaliczna (ang. alkaline phosphatase)

ALAT: aminotransferaza alaninowa (ang. alanine aminotransferase)

ASAT: aminotransferaza asparaginianowa (ang. aspartate aminotransferase)

BIL: bilirubina całkowita (ang. total bilirubin)

CORT: kortyzol (ang. cortisol)

GGTP: gamma-glutamylotranspeptydaza (ang. gamma glutamyl transpeptidase)

HDLC: cholesterol HDL (ang. cholesterol HDL)

HPA: oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis)

HSA: albuminy (ang. albumin)

LDH: dehydrogenaza mleczanowa (ang. lactate dehydrogenase)

LDLCHOL: cholesterol LDL (ang. cholesterol LDL)

M: średnia (ang. mean)

N/n: liczebność (ang. numbers)

SD: odchylenie standardowe (ang. standard deviation)

TCHOL: cholesterol całkowity (ang. total cholesterol)

TP: białko całkowite (ang. total protein)

TRIG: trójglicerydy (ang. triglyceride)

UREA: mocznik (ang. urea)

URIC: kwas moczowy (ang. uric acid)

## Streszczenie

Aktywność łowiecka jest jednym z czynników środowiskowych, które mogą wpływać na dobrostan zwierząt łownych. Jeleniowate są szczególnie wrażliwe na negatywne bodźce środowiskowe ze względu na specyfikę behawioralną charakterystyczną dla przeżuwaczy. Dobrą metodą na ocenę intensywności reakcji endokrynnej jest oznaczenie poziomu kortyzolu bądź jego metabolitów. Przeprowadzone badania miały na celu ocenę poziomów kortyzolu w osoczu saren europejskich oraz jeleni szlachetnych w sezonach najbardziej intensywnych polowań z podchodu w Polsce w zależności od płci, wieku i masy tuszy badanych zwierząt. Dodatkowo stan zdrowia zwierząt oceniano na podstawie wybranych wskaźników biochemicznych krwi, które przeanalizowano również pod kątem korelacji z poziomem kortyzolu. Analizie poddano również poziom stężenia kortyzolu w sierści samców sarny europejskiej pozyskanych na początku i na końcu sezonu łowieckiego we wschodniej Polsce w celu identyfikacji potencjalnego stresu przewlekłego indukowanego poprzez aktywność łowiecką.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że dla sarny europejskiej średnie poziomy kortyzolu wynosiły 58,066 ng/mL w grupie samców (lato) i 27,694 ng/mL w grupie samic (późna jesień). Wyższe poziomy kortyzolu były związane ze znacząco niższym poziomem cholesterolu całkowitego, dehydrogenazy mleczanowej i kwasu moczowego ( $p < 0,05$ ). Ponadto średnie stężenie kwasu moczowego było ujemnie skorelowane z poziomem kortyzolu u samców i samic ( $p < 0,05$ ). Wraz ze wzrostem średniego stężenia kortyzolu obserwowano wzrost cholesterolu HDL u wszystkich badanych zwierząt ( $p < 0,05$ ). Poziom kortyzolu wzrastał wraz z wiekiem zwierząt. Wykazano, że kwas moczowy i wiek są czynnikami warunkującymi stężenie kortyzolu w osoczu saren.

U jeleni szlachetnych średnie stężenia kortyzolu u byków i łań były na zbliżonym poziomie (odpowiednio 20,2 i 21,5 ng/mL). Wyższe wartości cholesterolu HDL stwierdzono w osoczu krwi łań ( $p < 0,05$ ). Podobnie średnie poziomy cholesterolu LDL, dehydrogenazy mleczanowej i aminotransferazy alaninowej były wyższe odpowiednio o 21%, 16% i 42% w osoczu łań. Natomiast ilości fosfatazy alkalicznej, bilirubiny i aminotransferazy asparaginianowej były wyższe u byków (odpowiednio o 30%, 49% i 36%). Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy stężeniem kortyzolu a mocznikiem i bilirubiną oraz dodatnią korelację pomiędzy kortyzolem a aminotransferazą

asparaginianową u byków ( $p < 0,05$ ). Z kolei u łań, wykazano ujemną korelację między poziomami kortyzolu i mocznika ( $p < 0,05$ ).

Uzyskane wyniki stężenia kortyzolu w sierści samców saren europejskich było istotnie wyższe w próbkach zebranych we wrześniu w porównaniu do próbek zebranych w maju ( $P > |t| = 0,0017$ ). Wiek zwierząt i masa tuszy nie miały istotnego wpływu na stężenie badanego hormonu.

Podsumowując, polowania z podchodu powodują stres u jeleniowatych, co znajduje odzwierciedlenie w zmianach poziomu kortyzolu w osoczu i wybranych parametrach biochemicznych krwi. Należy jednak pokreślić, że na zwiększone stężenie kortyzolu u jeleniowatych miał wpływ okres godowy, na który przypadał pobór prób i związane z nim bezpośrednio pobudzenie oraz uboższa dieta zwierząt. Jednakże, sezon łowiecki, czynniki klimatyczne czy wewnątrzpopulacyjne oraz niepokojenie związane z aktywnością łowiecką myśliwych nie pozostaje bez wpływu na intensyfikację stresu u wybranych jeleniowatych. Ważnym aspektem przeprowadzonych badań jest zwrócenie uwagi na potrzebę udoskonalenia metod polowań w celu zminimalizowania stresu u zwierząt łownych, ponieważ zwiększone stężenie kortyzolu może oddziaływać m. in. na zmniejszenie masy tuszy, co może prowadzić do pogorszenia kondycji fizycznej zwierząt i ubożenia populacji.

**Słowa kluczowe:** *cervidae*, presja łowiecka, parametry biochemiczne krwi, kortyzol w sierści



## Summary

Hunting activity is an environmental factor that can affect game animals' welfare. Cervids are susceptible to negative environmental stimuli due to the behavioral peculiarities characteristic of ruminants. A good method to assess the intensity of the endocrine response is to determine the levels of cortisol or its metabolites. The study was conducted to evaluate plasma cortisol levels in European roe deer and red deer during the seasons of the most intensive stalking hunts in Poland concerning sex, age and carcass mass of the studied animals. In addition, the health status of the animals was assessed on the basis of selected biochemical indicators of blood, which were also analyzed for correlation with cortisol levels. Another analyzed factor was cortisol levels in the hair of male European roe deer harvested at the beginning and end of the hunting season in eastern Poland in order to identify potential chronic stress induced by hunting activity.

The results showed that for European roe deer, average cortisol levels were 58,066 ng/mL in the male group (summer) and 27,694 ng/mL in the female group (late autumn). Higher cortisol levels were associated with significantly lower levels of total cholesterol, lactate dehydrogenase and uric acid ( $p < 0,05$ ). In addition, mean uric acid concentration was negatively correlated with cortisol levels in males and females ( $p < 0,05$ ). As the mean cortisol concentration increased, an increase in HDL cholesterol was observed in all animals tested ( $p < 0,05$ ). Cortisol levels increased with the age of the animals. It was shown that uric acid and age are determinants of plasma cortisol concentrations in roe deer.

In red deer, mean cortisol concentrations in stags and does were at similar levels (20,2 and 21,5 ng/mL, respectively). Higher HDL cholesterol values were found in females plasma ( $p < 0,05$ ). Similarly, mean levels of LDL cholesterol, lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase were higher, respectively by 21%, 16% and 42% in the plasma of swans. In contrast, the amounts of alkaline phosphatase, bilirubin and aspartate aminotransferase were higher in stags (by 30%, 49% and 36%). There was a negative correlation between cortisol levels and urea and bilirubin, and a positive correlation between cortisol and aspartate aminotransferase in males ( $p < 0,05$ ). In hinds, on the other hand, there was a negative correlation between cortisol and urea levels ( $p < 0,05$ ).

The results obtained for cortisol concentrations in the hair of male European roe deer were significantly higher in samples collected in September compared to those collected in May ( $\text{Pr.} > |t| = 0,0017$ ). Animal age and carcass mass had no significant effect on the concentration of the hormone studied.

In conclusion, stalking hunting causes stress to deer, which is reflected in changes in plasma cortisol levels and selected blood biochemical parameters. It should be noted, however, that increased cortisol concentrations in cervids were influenced by the mating season, which coincided with sampling and directly related arousal, as well as the animals' poorer diet. However, the hunting season, climatic or intrapopulation factors, as well as disturbance associated with hunting activity of hunters, are not without influence on the intensification of stress in selected cervids. An important aspect of the conducted research is to draw attention to the need to improve hunting methods in order to minimize stress in game animals, since increased cortisol concentrations can interact among other things, a decrease in carcass mass, which can lead to deterioration of the physical condition of animals and impoverishment of the population.

**Słowa kluczowe: *cervidae*, hunting pressure, blood biochemical parameters, hair cortisol**

## Wprowadzenie teoretyczne na podstawie publikacji

W Polsce jeleniowate (*Cervidae*) to najliczniejsza grupa zwierząt łownych. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego na dzień 10 marca 2024 roku liczebność jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*) szacowana była na poziomie 288 000 osobników, sarny europejskiej (*Capreolus capreolus*) 890 300 osobników, daniela zwyczajnego (*Dama dama*) 361 130 osobników i łośa euroazjatyckiego (*Alces alces*) 40 773 osobników. Analogicznie w województwie lubelskim największą liczebnością charakteryzowała się populacja sarny europejskiej (62 700 osobników), kolejno jelenia szlachetnego (13 600 osobników), łośa euroazjatyckiego (7 972 osobniki) oraz daniela zwyczajnego (746 osobniki) (GUS, 2024). Na rokrocznie planowane pozyskanie ww. gatunków wpływa wiele czynników m.in. zagęszczenie, przyrost zrealizowany, naturalna śmiertelność oraz cele wyznaczone w Wieloletnich Łowieckich Planach Hodowlanych przez Polski Związek Łowiecki na mocy obowiązującego prawa (Dz.U. 2023 poz. 1082). Pomimo, że łoś pozostaje objęty moratorium od 2001 roku (Dz.U. 2001 Nr 43, poz. 488), rodzina jeleniowatych jest najchętniej i najliczniej pozyskiwaną grupą zwierząt łownych. W Polsce w sezonie łowieckim 2023/2024 odstrzał objął 311 200 jeleniowatych, zaś w samym województwie lubelskim 25 031 (GUS, 2024).

W naszym kraju dopuszczone przez prawo łowieckie są zarówno polowania zbiorowe jak i indywidualne, a prawo do ich wykonywania mają wyłącznie członkowie zrzeszeni w Polskim Związku Łowieckim (Dz.U. 2023. Poz. 1082). Najczęściej wybieranym przez myśliwych rodzajem pozyskania jest polowanie indywidualne z podchodu. Polega ono na tak długim tropieniu i podchodzeniu zwierzyny, aby możliwe było oddanie jak najbardziej precyzyjnego i skutecznego strzału. Pomimo dużej dokładności i bardzo wysokiej precyzji prowadzonych pozyskań, polowanie jest ingerencją człowieka w naturalne habitaty zwierząt, przyczyniającą się do zwiększenia ilości negatywnych bodźców egzogennych (Tajchman i in., 2018). Ponadto aktywne pozyskanie zwierzyny łownej, a tym samym intensywne przebywanie myśliwych w siedliskach, bezdyskusyjnie oddziałuje na dobrostan zwierząt i potencjalnie jego wahania (Bateson i Bradshaw, 1997).

Fizjologia stresu jest bardzo złożona i obejmuje procesy od poziomu komórkowego do reakcji ogólnoustrojowej (Sheriff i in., 2011). Wszystkie odpowiedzi organizmu na negatywny bodziec zarówno endo- jak i egzogenny, mają na celu przywrócenie homeostazy i są kluczowe dla przeżycia zwierzęcia. Pozwalają one adaptować

się do oddziałujących na organizm negatywnych czynników (Heimbürge i in., 2019). Oczywiście jest, że krótkotrwale działający ujemny bodziec będzie wpływał mobilizująco. Obronna odpowiedź organizmu (np. ucieczka, poszukiwanie schronienia) jest niezbędna do przeżycia (Lieske i in., 2018). Reakcja organizmu zwierzęcia na stres prowadzi do wzrostu uważności, zwiększenia pojemności minutowej serca, resorpcji oraz katabolizmu (Tsigos i Chrousos, 2002). Zatem wystarczająco intensywny bodziec ujemny uaktywnia działanie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA, ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis) (Dallman i in., 1987; Korzekwa i Kotalarczyk, 2021). W efekcie następuje uwolnienie hormonów glikokortykoidowych (w tym kortyzolu) z kory nadnerczy do krwioobiegu, co finalnie przekłada się na pobudzenie organizmu do działania, skutkujące odpowiedzią behawioralną oraz fizjologiczną i mającą na celu uniknięcie bądź zneutralizowanie negatywnego zewnętrznego impulsu (Romero i Wingfield, 2001; Miller i O'Callaghan, 2002; Martin, 2009; Vilela i in., 2020). Zauważalny i możliwy do poddania pomiarom poziom kortyzolu obserwuje się od 3 do 5 minut po zadziałaniu stresującego faktora (Sheriff i in., 2011), natomiast szczytowy poziom hormon ten osiąga w ciągu 15 do 30 minut (De Kloet i in., 2005). Wykluczając kumulację bodźców, bądź ich nakładanie się na siebie organizm powraca do stanu wyjściowego po około 60-90 minutach za sprawą ujemnego sprzężenia zwrotnego (Sheriff i in., 2011; De Kloet i in., 2005). Kortyzol, jako klasyczny hormon stresu został wprowadzony jako standardowy wskaźnik w badaniach dotyczących dobrostanu zwierząt i jest powszechnie stosowany (Morton i in., 1995; Heimbürge i in., 2019). Hormon ten jest wiarygodnym wskaźnikiem, natomiast należy wspomnieć, że jest on zależny od taksonu, gatunku zwierzęcia czy też reaktywności osobniczej (Bentley, 1998; Sapolsky i in., 2000; Dickens i Romero, 2013; Heimbürge i in., 2019). Zarówno sam poziom kortyzolu czy też jego metabolitów oznaczyć możemy we krwi, osoczu, ślinie, włosach/sierści oraz kale i moczu (Cook, 2012; Christ-Crain, 2019). Analiza metabolitów kortyzolu w kale czy też w moczu jest przydatna przy określeniu nasilenia stresu w odstępie wielogodzinnym (Dziki-Michalska i in., 2024a). U sarny jest to okres od 12 (Dehnhard i in., 2001) do 18 godzin (Vilela i in., 2020), zaś u jelenia szlachetnego 18 godzin (Huber i in., 2003). Walorem analiz wydaliny w postaci kału jest pobranie próbki w sposób całkowicie nieinwazyjny i jest to cenna metoda badania zwierząt dzikich ze względu na trudne warunki terenowe (Monfort i in., 1998; Palme i in., 1999; Dziki-Michalska i in., 2024a). Jednakże problematyczny jest fakt, że ciężko przyporządkować poszczególne próbki do konkretnych

osobników. Ma to związek z dużymi obszarami zasiedlanymi przez badane gatunki. Zatem z uzyskanych wyników najlepiej wnioskować w kontekście zbiorczych danych dla całej populacji bytującej na danym obszarze. Wskazania metabolitów kortyzolu w sierści czy też włosach dotyczą przewlekłej reakcji stresowej (Burnard i in. 2017), i są wiarygodnym wskaźnikiem przewlekłej ekspozycji na stres u zwierząt dzikich (Prandi i in., 2018; Filacorda i in., 2021; Franchini i in., 2023). Ma to związek z wbudowywaniem kortyzolu w trzon włosa w fazie aktywnego wzrostu, która trwa dłużej (Meyer i in., 2012; Franchini i in., 2023). Pełny przebieg ww. procesu nie jest do końca poznany (Russell i in., 2012; Keogh i in., 2023). Trudności może nastręczyć interpretacja samych wyników dlatego, że na dzień dzisiejszy nie dysponujemy jednoznacznymi danymi dotyczącymi różnic w akumulacji kortyzolu we włosach i tempa wzrostu w kontekście dysproporcji gatunkowych (Ventrella i in., 2018; Dziki-Michalska i in., 2024a). Poziom kortyzolu oznaczany w osoczu czy też surowicy krwi oraz ślinie daje mierzalny i wiarygodny obraz intensywności stresu krótkotrwałego (Sheriff, 2011). Jednakże wyniki analizy śliny pod kątem poziomu kortyzolu nie zawsze będą miarodajne ze względu na to, że unieruchomienie i manipulacja przy zwierzętach dziko żyjących może być dla nich dodatkowym, intensywnym stresorem (LeMaho i in., 1992; Camargo i in., 2013) wpływającym na ostateczne oznaczenia. Poziom kortyzolu można oznaczyć zarówno w osoczu jak i surowicy krwi. Wyniki pozyskane z obydwu materiałów biologicznych dają tożsame rezultaty (Foster i Dunn, 1974, Sheriff i in., 2011). W przypadku zwierząt wolnożyjących wskazuje się, że najlepszym materiałem biologicznym do oznaczenia stężenia kortyzolu w odpowiedzi na intensywny, krótko działający bodziec jest krew pośmiertna pobrana w jak najkrótszym czasie (Morton i in., 1995; Mormède i in., 2007; Gentsch i in., 2018).

Zwierzęta dzikie są nierozzerwanie połączone ze środowiskiem, w którym bytują a tym samym są od niego zależne (Dziki-Michalska i in., 2024a). Zatem każda modyfikacja ekosystemu może wpływać na ich populacje. Ocenić kondycję zwierząt wolnożyjących możemy na podstawie zgromadzonych zasobów energetycznych (tkanki tłuszczowej), masy i ukształtowania poroża, struktury czy też zagęszczenia populacji. Homeostazę organizmu odzwierciedlają również parametry biochemiczne i fizjologiczne danego organizmu, które fluktuują pod wpływem czynników środowiskowych (Möstl i in., 2002; Poljičak-Milas i in., 2004; Harms i in., 2012; Mellor i in., 2020). Oznaczenie parametrów biochemicznych może służyć jako marker potencjalnie toczącej się choroby (Kotlarczyk i in., 2021), zwykle nie pozostaje

bez wpływu na behavior zwierzęcia (Möstl i Palme, 2002; Barić i in., 2011). Procesy chorobotwórcze wpływają na poziomy kortyzolu u przeżuwaczy (Forsunld i in., 2010; Barrell, 2019; Villa i in., 2021; Tajchman i in., 2023). Dodatkowo poziom warunków hodowlanych może przekładać się na poziomy hormonów czy składniki krwi (Barrell, 2019), których wahania możliwe są do wychwycenia za pomocą standardowych parametrów morfologii krwi obwodowej oraz oznaczeń jej parametrów biochemicznych (Dziki-Michalska i in., 2023).

W związku z tym, że polowania w Polsce mają charakter sezonowy ich specyfika może implikować u zwierząt nawet stres przewlekły (Vilela, 2020; Ensminger i in., 2020). Termin *stres* odnosi się do stanów/sytuacji, których nie jesteśmy w stanie przewidzieć oraz kontrolować, natomiast potencjalnie mogą one zagrażać życiu zwierząt więc ściśle związane są z pojęciem *dobrostanu* (Koolhaas i in., 2011; Gentsch, 2018). Dobrostan zwierząt dzikich jest nierozdzielnie powiązany ze środowiskiem, w którym bytują i przekłada się bezpośrednio na stan fizjologiczny zwierząt, a ich masa ciała jest podstawowym kryterium oceny dobrostanu, ze względu na to, że odzwierciedla zdolność zwierząt do przetrwania i warunkuje osiągnięcie sukcesu reprodukcyjnego (Sheriff i in., 2011). Nie jest to jednak wskaźnik jedyny i w pełni doskonały (Sheriff i in., 2011; Tajchman i in., 2018). Wskaźniki, które wyznaczają kondycję zwierząt dzikich to rezerwy tkanki tłuszczowej, ukształtowanie poroża i jego masa oraz zagęszczenie populacji wraz ze strukturą płciową i wiekową (Tajchman i in., 2018). Ewaluacja poziomu dobrostanu może się oprzeć również na parametrach biochemicznych krwi, które odzwierciedlają fizjologiczny stan każdego organizmu w odpowiedzi na negatywne bodźce pochodzenia środowiskowego (Poljičak-Milas i in., 2004; Czyżowski i in., 2013). Mogą one stanowić cenną informację w kontekście monitorowania dobrostanu jeleniowatych, jednak należy pamiętać, że mogą fluktuować w odpowiedzi na negatywny bodziec, którym niewątpliwie jest chwytanie czy unieruchamianie w celu pobrania krwi obwodowej (Sems i in., 1993). Polowanie zatem będzie miało wpływ na intensyfikację odpowiedzi endokrynnej i jest uznawane powszechnie za jeden z najsilniejszych czynników wywołujących długotrwały i powtarzający się stres (Vilela, 2020), nie mniej jednak intensywność reakcji hormonalnej będzie warunkowana rodzajem polowania (Gentsch, 2018). Gentsch wykazał, że polowanie z podchodu jest znacznie mniej stresujące dla zwierząt niż polowania zbiorowe, czy polowania z psami myśliwskimi. Warto zaznaczyć, że Ensminger i in. (2020) w swoich analizach nie wykazali takiej zależności dla łośia. W badaniu tym nie odnotowano powiązania

poziomu glikokortykoidów w kale i wzmożoną presją łowiecką. Odmienne wyniki natomiast uzyskali Bateson i Bradshaw (1997) analizując poziom kortyzolu we krwi jelenia szlachetnego. Najprawdopodobniej było to związane z pościgami długodystansowymi (ok. 19 km) z psami myśliwskimi za zwierzyną, a wysokie odczyty glikokortykoidów odpowiadały ostatniemu pościgowi (Norum i in., 2015). Nie mniej jednak mnogość i intensywność ujemnych bodźców, które generują odpowiedź stresową mogą implikować poważne, daleko idące konsekwencje. Wszystkie gatunki jeleniowatych są wrażliwe na ujemne bodźce pochodzące ze środowiska zewnętrznego (Ballesteros, 1998; Ranabir i Reetu, 2011), które w konsekwencji wywierają negatywny wpływ na ich zdrowie oraz kondycję (Barić i in., 2011; Ventrella i in., 2020). Ekspozycja organizmu na ostry stres oddziałuje na układ odpornościowy zwierząt, osłabiając jego odpowiedź immunologiczną (Shi i in., 2019; Garber i in., 2020). Oczywistym jest, że zwiększa to osobniczą skłonność do zapadania na różne choroby (Dhabhar, 2014). Badania Bubenika i in. (1999) oraz Bartoša i in. (2009) dowodzą, że wzrost poziomu hormonów glikokortykosteroidowych zakłóca cykl zrzucania poroża u mulaka białoogonowego (*Odocoileus virginianus*), jelenia szlachetnego oraz daniela zwyczajnego, a ponadto jest ujemnie skorelowany z jego wzrostem i mineralizacją (Gáspár-López i in., 2010; Dziki-Michalska i in., 2021). U zwierząt wolnożyjących w odpowiedzi na intensywny stres krótkotrwały często obserwowana jest miopatia mięśnia sercowego oraz rabdomioliza wysiłkowa (Paterson, 2014). Tego typu uszkodzenia są typowe dla krótkich, silnych negatywnych impulsów zewnętrznych zwykle powodowanych przez atak drapieżnika, transport, chwytanie czy krępowanie (Montané i in. 2002; Pereira i in., 2005; Nuvoli i in., 201; Taylor-Brown i in., 2019; Diaz i in., 2020). Negatywne oddziaływanie stresu zauważono również w kontekście utrzymania przez łanie ciąży i optymalnej regulacji cyklu rujowego (Kotlarczyk i in., 2021). Badania prowadzone przez McCorkell'a i in. (2008) wykazały, że poziom kortyzolu u jeleni szlachetnych był dodatnio skorelowany z poziomem progesteronu wydzielanego przez nadnercza. Negatywne bodźce środowiskowe nie bez wpływu pozostają również na masę ciała zwierząt wolnożyjących, która warunkuje sukces rozrodczy (Rehbinder i in., 1982; Fennessy, 1991; Sapolsky, 1992; Morton i in., 1995; Mormède i in., 2007; Dhabhar, 2014; Shi i in., 2019; Clinchy i in., 2013; Garber i in., 2020). Badania Hillman'a i in. (1973) oraz Kleerekoper'a i in. (1997) dowiodły, że wysoki poziom glikokortykosteroidów stymuluje resorpcję tkanki kostnej oraz hamuje procesy osteogenezy. Na poziom dobrostanu zwierząt wolnożyjących wpływa mnogość czynników środowiskowych

(pora roku, klimat, zagęszczenie populacji, obecność dużych drapieżników, konkurencja o zasoby) (Díaz i in., 2020). Są to główne stresory, które mają istotny wpływ na kondycję i przeżywalność naturalnych populacji zwierząt (Wingfield i Romero, 2001; Reeder i Kramer, 2011; Sheriff i in., 2011).

W Polsce jeleniowate pozyskuje się w najczęściej za pomocą polowań z podchodu. Polowania na jelenie szlachetne odbywają się w okresach od 21 sierpnia do końca lutego na dorosłe samce (byki), od 01 września do 15 stycznia na dorosłe samice (łanie) oraz od 01 września do końca lutego na cielęta. W przypadku samców sarny (kozłów) okres pozyskania trwa od 11 maja do 30 września, zaś samic (kóz) i kozłat od 01 października do 15 stycznia (<https://www.pzlow.pl/kalendarz-mysliwski/>). Wpływ polowań na jeleniowate można rozpatrywać w kontekście zarówno stresu krótkotrwałego wywołanego samym odstrzałem, jak i stresu długotrwałego spowodowanego niepokojeniem zwierząt, które wynika z intensywnej obecności myśliwych w łowiskach (Dziki-Michalska i in., 2024b). W nawiązaniu do pięciu wolności opracowanych przez Radę Do Spraw Dobrostanu Zwierząt Gospodarskich (FAWC, 2014) racjonalna gospodarka łowiecka powinna się opierać przede wszystkim na regulacji zagęszczenia zwierząt dopasowanym do potencjału zajmowanego przez nie siedliska, co zapobiega stresowi związanemu z przegęszczeniem populacji a jednocześnie zapewnia odpowiednią bazę żerową. Ponadto, istotne jest również utrzymanie różnorodności gaunkowej i dbałość o naturalne siedliska zwierząt. Nie bez wpływu pozostaje również monitoring weterynaryjny oraz wczesna diagnostyka na etapie selekcji oraz finalnego pozyskania. Kluczem do utrzymania zwierząt dzikich w stanie dobrostanu jest racjonalna minimalizacja czynników negatywnych pochodzących ze środowiska. Logicznym zatem byłoby eliminowanie polowań zbiorowych na rzecz polowań indywidualnych, co znacząco obniżyłoby ilość stresorów związanych z obecnością myśliwych w łowiskach (Tajchman i in., 2018). Do tej pory niewiele jest doniesień naukowych dotyczących wpływu polowań z podchodu na zwierzęta łowne. W związku z tym, że działalność łowiecka może wywierać wpływ na dobrostan zwierząt dzikich niezbędnym jest podjęcie się analizy powyższego zagadnienia. Wyniki bowiem przełożą się na prowadzenie racjonalnej gospodarki łowieckiej oraz pragmatyczne zarządzanie populacjami zwierząt wolnożyjących (Gentsch, 2018).



## **Hipoteza i cel badań**

### **Główna hipoteza badawcza**

Polowania z podchodu wywierają stres krótko- i długotrwały, przez co mogą zaburzać dobrostan wybranych jeleniowatych.

### **Pośrednie hipotezy badawcze**

1. Poziom kortyzolu w osoczu saren europejskich (*Capreolus capreolus*) zależy od: sezonu najbardziej intensywnych polowań z podchodu (lato vs. późna jesień), płci pozyskanych zwierząt oraz ich wieku.
2. Koncentracja kortyzolu w osoczu jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*) pozyskanych podczas polowań z podchodu zależy od płci i wieku zwierząt.
3. Wybrane parametry biochemiczne krwi saren europejskich i jeleni szlachetnych odzwierciedlają ogólny stan zdrowia zwierząt i mogą być powiązane ze stężeniem kortyzolu.
4. Poziom hormonu stresu w sierści samców saren europejskich jest istotnie wyższy u zwierząt pozyskanych na końcu okresu polowań z podchodu.

## Cel badań

Celem badań była ocena poziomu dobrostanu wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu poprzez analizę stresu krótko- i długotrwałego.

### Cele szczegółowe

1. Ocena wpływu polowań z podchodu na poziom stresu krótkotrwałego u wybranych jeleniowatych poprzez:

- określenie poziomu kortyzolu w osoczu saren europejskich (*Capreolus capreolus*) w zależności od: sezonu najbardziej intensywnych polowań z podchodu (lato vs. późna jesień), płci pozyskanych zwierząt oraz wieku,
- określenie stężenia kortyzolu w osoczu jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*) pozyskanych podczas polowań z podchodu w zależności od płci i wieku zwierząt,
- analizę wybranych parametrów biochemicznych krwi saren europejskich i jeleni szlachetnych, które odzwierciedlają ogólny stan zdrowia zwierząt i mogą być powiązane z poziomem kortyzolu.

2. Ocena wpływu polowań z podchodu na poziom stresu długotrwałego u samców saren europejskich poprzez porównanie poziomu kortyzolu w sierści zwierząt pozyskanych na początku i na końcu sezonu polowań z podchodu.

## Material i metody

Dla przejrzystości prezentowanego materiału oraz zastosowanych metod badawczych, zastosowano umowny podział odpowiadający chronologii prac badawczych zgodnie z kolejnością opublikowanych manuskryptów (Tabela 1).

**Tabela 1.** Prace, w których opublikowano prezentowane wyniki badań

Dane bibliograficzne	
<b>Praca I</b>	<b>Dziki-Michalska K.</b> , Tajchman K., Kowalik S. 2023. Physiological response of roe deer ( <i>Capreolus capreolus</i> ) during stalking hunts depending on age. <i>BMC Vet. Res.</i> 19:266. DOI:10.1186/s12917-023-03833-8
<b>Praca II</b>	<b>Dziki-Michalska K.</b> , Tajchman K., Kowalik S., Wójcik M. 2024. The levels of cortisol and selected biochemical parameters in red deer harvested during stalking hunts. <i>Animals</i> 14(7):1108. DOI:10.3390/ani14071108
<b>Praca III</b>	<b>Dziki-Michalska K.</b> , Tajchman K., Staniszevska P., Strachecka A. 2024. Comparison of cortisol levels in the hair of male european roe deer at the beginning and end of the stalking hunting season. <i>Animals.</i> 14(22):3184. DOI: 10.3390/ani14223184

## Projekty eksperymentów

Jeleniowate, od których pobrano próby materiału badawczego, pozyskano zgodnie z polskim prawem łowieckim i zasadami selekcji osobniczej w trakcie trwania sezonów łowieckich (adekwatnie do pozyskanego gatunku) w ramach zarządzania populacjami zwierząt łownych (Uchwała Naczelnej Rady Łowieckiej nr 14/2015 z dnia 15 grudnia 2015 roku). Pozyskanie miało charakter selekcyjny i było wykonywane na obszarze Nadleśnictwa Lubartów przez wykwalifikowanych myśliwych — pracowników Nadleśnictwa. W celu pozyskania zwierząt prowadzili oni indywidualne polowania piesze bez udziału psów myśliwskich, aby zminimalizować siłę negatywnych bodźców towarzyszących procedurze. Odstrzał odbywał się w godzinach wczesnoporannych. Zwierzęta zachowywały się naturalnie, nie wykazywały oznak stresu i nie były sztucznie

oddzielane od swoich stad. Próbkę pobrano od osobników, które padły bezpośrednio po pierwszym precyzyjnym strzale. Zatwierdzenie badań przez Lokalną Komisję Etyczną nie było wymagane ponieważ materiał biologiczny został pobrany pośmiertnie, a selekcja zwierząt nastąpiła zgodnie z prawem.

Wiek zwierząt oznaczono pośmiertnie metodą Eidmanna, która polega na ocenie warstw zębiny odkładających się w kanale pierwszej pary siekaczy I1, charakterystycznych cech uzębienia, stadium rozwoju oraz wymiany zębów mlecznych na stałe (Bateson i Bradshaw, 1997). Masę tuszy określono po odstrzale zwierzęcia i po wypatroszeniu w punkcie skupu zwierzyny łownej.

Materiał do badań pobrano od 117 osobników – przedstawicieli rodziny jeleniowatych:

➤ krew

- 35 saren europejskich (16 pochodzących od samców, 19 pochodzących od samic) w dwóch okresach: w miesiącu sierpniu oraz listopadzie,

- 25 jeleni szlachetnych (13 pochodzących od samców, 12 pochodzących od samic) na przełomie września i października,

➤ sierść

- 57 samców saren europejskich w maju oraz wrześniu.

## Obszar badań

Nadleśnictwo Lubartów położone jest w środkowo-wschodniej Polsce (51°27'N, 22°29'E), gdzie panuje klimat umiarkowany, ciepły, przejściowy. Lasy Nadleśnictwa znajdują się głównie w IV okręgu mazowiecko-podlaskim, V okręgu Niziny Podlaskiej i Wyżynie Siedleckiej. Rzeźba terenu jest mało urozmaicona i odznacza się płaskością. Roczne opady wynoszą 552 mm, a średnia roczna temperatura kształtuje się na poziomie +7,7 °C. Nadleśnictwo wyróżnia się dużą różnorodnością siedlisk i żyzności gleb. Lesistość regionu szacuje się na poziomie 24,9%, przy czym 49% powierzchni zajmują gatunki iglaste, a 38% zajmują lasy mieszane z gatunkami liściastymi (<https://lubartow.lublin.lasy.gov.pl>). Na terenie Nadleśnictwa Lubartów zagęszczenie jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*) wynosi 16,03 osobników/1000 ha powierzchni leśnej, saren (*Capreolus capreolus*) 2,08 osobników/1000 ha powierzchni całkowitej, a łosi (*Alces alces*) 10,15 osobników/1000 ha powierzchni leśnej i bagiennej (<https://lubartow.lublin.lasy.gov.pl>).

## Zastosowane metody badawcze

### ➤ Analiza parametrów biochemicznych krwi

Próbki krwi pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej (*vena jugularis externa*) do 10 ml próżniowych probówek EDTA (BD Vacutainer System, nr ref. 367525, Becton Dickinson, Polska, Warszawa), a następnie schłodzono do temperatury 4°C. Zanieczyszczone próbki krwi zostały odrzucone. Osocze uzyskano przez wirowanie prób krwi przy 3000 obr./min przez 10 min w laboratoryjnej wirówce MPW-350R (MPW Medical Instruments, Warszawa, Polska), w temperaturze 4°C. Zebrane osocze przechowywano w temperaturze -25°C do czasu dalszych analiz.

Poziom kortyzolu określono metodą immunoenzymatyczną (zestaw Cortisol ELISA, nr EIA-1887, DRG® International, Springfield, NJ, USA) zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. Parametry biochemiczne: cholesterol całkowity, cholesterol HDL, cholesterol LDL, trójglicerydy, dehydrogenaza mleczanowa, mocznik, aminotransferaza alaninowa, kwas moczowy, fosfataza alkaliczna, białko całkowite, albuminy, bilirubina całkowita, aminotransferaza asparaginianowa i gamma-glutamylotranspeptydaza określono przy użyciu zautomatyzowanego systemu spektrofotometrycznego (analizator biochemiczny BS-120, Mindray, Shenzhen, Chiny).

### ➤ Analiza stężenia kortyzolu w sierści

Sierść o rdzawo-brązowym kolorze pobrano w maju i we wrześniu. Była ona wycinana nożyczkami laboratoryjnymi przy skórze w okolicy grzbietowo-ogonowej. Próbki włosów pełnej długości zamrażano w najkrótszym możliwym czasie po pobraniu (do 15 min) i przechowywano w temperaturze -25 °C do czasu oznaczeń.

Zebrane włosy myto ciepłą wodą i suszono przez jeden dzień w temperaturze pokojowej (24°C) w powietrzu otoczenia, a następnie myto w 5 ml izopropanolu przez 3 minuty i suszono przez 5 dni (24°C w powietrzu otoczenia). Metoda ekstrakcji została zmodyfikowana w stosunku do metody Burnetta i in. (2014). Pełnej długości włosy przycięto nożyczkami laboratoryjnymi do długości 1–2 mm, a następnie 70 mg przyciętych włosów umieszczono w szklanej fiolce. Do pociętych włosów dodano 3,5 ml metanolu (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) i fiolki inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C z potrząsaniem. Po inkubacji supernatant przefiltrowano za pomocą filtrów strzykawkowych o średnicy 30 mm i porowatości 0,22 mm (Alfachem, Poznań, Polska)

w celu oddzielenia fazy ciekłej, a następnie umieszczono w jednorazowych szklanych probówkach hodowlanych. Supernatant odparowano w temperaturze 45°C do całkowitego wyschnięcia. Wyekstrahowane próbki kortyzolu badano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu EIA (Cortisol Enzyme Immunoassay Kit, K003-H5, Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA) zgodnie z instrukcją producenta wraz z dostarczonymi odczynnikami.

### ➤ **Analizy statystyczne**

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu Statistica 9.1. Normalność rozkładu sprawdzono za pomocą testu t-Studenta i testu Welcha. Do analizy prób niezależnych zastosowano test Manna-Whitneya oraz test Shapiro-Wilka. Wyniki wyrażono za pomocą statystyk podstawowych oraz jako wartość średnią i odchylenie standardowe zmiennych. Poziom kortyzolu w zestawieniu z poziomem parametrów biochemicznych dla każdej oddzielnej grupy został porównany przy użyciu porządku rang Spearmana. Następnie poziom kortyzolu porównano z poziomem parametrów biochemicznych w grupach ze względu na płęć i masę tuszy stosując korelację rang Spearmana. Analogiczne obliczenia oraz użycie korelacji Pearsona zastosowano w celu określenia związku wieku zwierzęcia z poziomem kortyzolu i parametrami biochemicznymi krwi. Wpływ wieku zwierzęcia i stężenia kwasu moczowego na poziomy kortyzolu oceniano przez wielowymiarową analizę regresji liniowej. Analizy przeprowadzono zarówno w grupie wszystkich zwierząt, jak i w grupach w podziale na płęć. Ponadto wykorzystano procedury GLM i CORR oprogramowania SAS (Statistical Analysis System, 9.4, 2013). Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami kortyzolu zweryfikowano za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji z testem Tukeya (procedura GLM). W modelu miesiąc pobrania próbek (2 poziomy — wrzesień i maj), wiek zwierząt (2 poziomy: 3–4 lata i 5–6 lat) oraz interakcję miesiąca pobrania próbek i wieku wykorzystano jako czynniki jakościowe, podczas gdy masa tuszy zwierząt została wykorzystana jako czynnik ilościowy. Przyjęto poziom istotności  $\leq 0,05$ , aby wskazać na istnienie statystycznie istotnych różnic lub zależności.

## Wyniki badań

### Praca I

Pierwsza praca wykazała, że średnia masa tuszy samców kształtowała się na poziomie 18,563 kg. Kozły były średnio o 2 lata starsze od samic, których średnia masa tuszy wynosiła 16,895 kg. Średni poziom CORT u samców kształtował się na poziomie 58,066 ng/mL i był około 2 razy wyższy w porównaniu z samicami (27,694 ng/mL), ale poziom LDH był wyższy u kóz (6203,895 U/L) niż u kozłów (1181,250 U/L). Nie wykazano różnic pomiędzy innymi wartościami biochemicznymi krwi samców i samic z wyjątkiem ALAT, która była wyższa u kóz (342,126 U/L) w porównaniu z kozłami (236,487 U/L) (Tab. 2).

**Tabela 2.** Średnie wartości masy tuszy, wieku i parametrów biochemicznych sarny europejskiej z podziałem na płeć

Analizowana zmienna	Samce (n = 16)		Samice (n = 19)	
	M	SD	M	SD
Masa tuszy [kg]	18,563	1,364	16,895	2,998
Wiek [lata]	5,813	2,104	3,632	1,300
CORT [ng/mL]	58,066	21,968	27,694	17,470
TCHOL [mg/dL]	61,750	12,741	65,000	15,173
HDLC [mg/dL]	21,063	7,007	17,074	8,528
TRIG [mg/dL]	185,938	71,207	200,474	58,229
LDH [U/L]	1181,250	878,189	6203,895	2402,976
UREA [mg/dL]	75,450	13,293	84,684	27,909
ALAT [U/L]	236,487	180,672	342,126	232,615
URIC [mg/dL]	6,137	3,911	7,647	3,753
ALP [U/L]	135,163	173,385	141,416	86,453
TP [g/dL]	8,063	1,0626	8,053	1,079
HSA [g/dL]	3,750	0,4472	3,632	0,496

M-średnia, SD-odchylenie standardowe

Następnie analizie poddano korelację pomiędzy CORT a wskaźnikami biochemicznymi krwi dla samców, samic oraz dla wszystkich zwierząt razem. Średni poziom TCHOL był ujemnie skorelowany z poziomem kortyzolu w osoczu wszystkich badanych zwierząt (odpowiednio:  $rs=-0,416$ ;  $p=0,012$  i  $rs=-0,381$ ;  $p=0,024$ ), jednakże poziom cholesterolu HDL wzrastał znacząco wraz ze wzrostem CORT w tej grupie ( $rs=0,445$ ;  $p=0,007$ ). Średni poziom URIC był ujemnie skorelowany z poziomami CORT u kozłów ( $rs=0,767$ ;  $p<0,001$ ), kóz ( $rs=-0,472$ ;  $p=0,040$ ) oraz u wszystkich badanych zwierząt ( $rs=-0,618$ ;  $p<0,001$ ). Ponadto wykazano ujemną korelację pomiędzy badanym hormonem a LDH w grupie wszystkich zwierząt ( $rs=-0,381$ ;  $p=0,024$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Zależność pomiędzy stężeniem kortyzolu i parametrów biochemicznych krwi u sarny europejskiej w podziale na grupy

Analizowana zmienna	Kortyzol					
	Samce (n=16)		Samice (n=19)		Zwierzęta razem (n=35)	
	rs	p	rs	p	rs	p
TCHOL [mg/dL]	-0,446	0,082	-0,356	0,134	-0,416	0,012*
HDLC [mg/dL]	0,408	0,116	0,144	0,554	0,445	0,007*
TRIG [mg/dL]	-0,312	0,239	0,173	0,477	-0,079	0,650
LDH [U/L]	0,038	0,888	0,372	0,117	-0,381	0,024*
UREA [mg/dL]	-0,100	0,712	0,307	0,201	-0,005	0,973
ALAT [U/L]	0,232	0,386	0,307	0,201	0,170	0,328
URIC [mg/dL]	-0,767	<0,001*	-0,472	0,040*	-0,618	<0,001*
ALP [U/L]	-0,382	0,143	0,008	0,971	-0,270	0,115
TP [g/dL]	-0,199	0,458	-0,367	0,121	-0,222	0,199
HSA [g/dL]	-0,375	0,151	-0,239	0,324	-0,152	0,382

rs-korelacje rang Spearmana, \* wartości istotne statystycznie przy  $p < 0,05$



W grupie wszystkich zwierząt wykazano jedynie ujemną istotną korelację pomiędzy LDH ( $r_s=-0,449$ ;  $p=0,006$ ) a wiekiem saren (Tabela 4).

**Tabela 4.** Zależność pomiędzy parametrami biochemicznymi i masą tuszy oraz wiekiem badanych saren łącznie

Analizowana zmienna	Masa tuszy		Wiek	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
CORT [ng/mL]	-0,010	0,953	0,329	0,053
TCHOL [mg/dL]	0,098	0,571	-0,108	0,534
HDLC [mg/dL]	0,064	0,711	0,142	0,414
TRIG [mg/dL]	-0,231	0,181	-0,326	0,055
LDH [U/L]	-0,328	0,054	-0,449	0,006*
UREA [mg/dL]	0,106	0,542	-0,103	0,553
ALAT [U/L]	-0,025	0,886	0,028	0,872
URIC [mg/dL]	0,097	0,575	-0,156	0,368
ALP [U/L]	-0,274	0,111	-0,184	0,288
TP [g/dL]	0,161	0,355	0,035	0,838
HSA [g/dL]	0,071	0,684	-0,065	0,707

$r_s$  - korelacja porządku rang Spearmana, \* wartości istotne statystycznie przy  $p < 0,05$

W badanej grupie samców nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy wartościami parametrów chemicznych krwi, masą tuszy i wiekiem zwierząt (Tabela 5).

**Tabela 5.** Zależność pomiędzy parametrami biochemicznymi i masą tuszy oraz wiekiem badanych kozłów

Analizowana zmienna	Masa tuszy		Wiek	
	rs	<i>p</i>	rs	<i>p</i>
CORT [ng/mL]	-0,229	0,393	0,056	0,834
TCHOL [mg/dL]	0,161	0,549	0,202	0,452
HDLC [mg/dL]	-0,077	0,775	-0,190	0,480
TRIG [mg/dL]	-0,112	0,678	-0,251	0,346
LDH [U/L]	-0,161	0,551	0,208	0,438
UREA [mg/dL]	0,441	0,087	0,380	0,146
ALAT [U/L]	-0,406	0,118	0,091	0,737
URIC [mg/dL]	0,112	0,678	0,148	0,586
ALP [U/L]	0,364	0,165	0,146	0,589
TP [g/dL]	-0,134	0,620	0,147	0,584
HSA [g/dL]	-0,145	0,591	-0,126	0,639

rs - korelacja porządku rang Spearmana, \* wartości istotne statystycznie przy  $p < 0,05$

Analogiczna analiza wykazała w grupie badanych kóz istotną ujemną korelację pomiędzy ALP a masą tuszy ( $r_s = -0,576$ ;  $p = 0,009$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Zależność pomiędzy parametrami biochemicznymi i masą tuszy oraz wiekiem badanych kóz

Analizowana zmienna	Masa tuszy		Wiek	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
CORT [ng/mL]	-0,253	0,295	-0,052	0,829
TCHOL [mg/dL]	0,124	0,611	-0,232	0,339
HDLC [mg/dL]	-0,069	0,777	0,067	0,786
TRIG [mg/dL]	-0,281	0,244	-0,317	0,186
LDH [U/L]	-0,108	0,660	-0,153	0,532
UREA [mg/dL]	0,094	0,700	-0,290	0,227
ALAT [U/L]	0,254	0,292	0,222	0,359
URIC [mg/dL]	0,227	0,350	-0,116	0,635
ALP [U/L]	-0,576	0,009*	-0,431	0,066
TP [g/dL]	0,288	0,232	-0,003	0,987
HSA [g/dL]	0,101	0,680	-0,095	0,699

$r_s$  - korelacja porządku rang Spearmana, \* wartości istotne statystycznie przy  $p < 0,05$

Aby określić wpływ wybranych zmiennych na poziom CORT, przeprowadzono analizę regresji (Tabela 7). Uzyskany model okazał się dobrze dopasowany do danych ( $F=13,024$ ;  $p < 0,001$ ). Statystycznie istotnymi predyktorami w modelu były zarówno URIC ( $\beta = -0,547$ ;  $p < 0,001$ ), jak i wiek zwierząt ( $\beta = 0,376$ ;  $p = 0,007$ ). Im wyższa wartość URIC tym niższy poziom CORT, zaś koncentracja CORT wzrastała wraz ze wzrostem wieku badanych zwierząt. Wyniki tej analizy można potraktować jako model predykcyjny. Jeżeli stężenie URIC wzrośnie o jedną jednostkę, poziom CORT ulegnie obniżeniu o 3,511 jednostki (przy założeniu, że druga zmienna pozostanie taka sama). Analogicznie jeżeli wiek wzrasta o jedną jednostkę, wartość CORT wzrasta o 4,608 jednostki (zakładając, że druga zmienna pozostaje taka sama) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Wpływ wybranych predyktorów na poziom kortyzolu u sarny europejskiej

Wybrany predyktor	Kortyzol			
	<i>B</i>	$\beta$	<i>T</i>	<i>p</i>
	$R^2 = 0,414$ $F = 13,024$ $p < 0,001$			
Wyraz wolny	44,678		4,427	< 0,001
Kwas moczowy	-3,511	-0,547	-4,164	< 0,001*
Wiek	4,608	0,376	2,865	0,007*

F,  $R^2$ , p, B,  $\beta$  – współczynniki analizy regresji liniowej

## Praca II

Jeleń szlachetny to również zwierzę łowne, najczęściej zaraz po sarnie europejskiej, pozyskiwane podczas polowań z podchodu, w związku z tym przeprowadzono tożsame analizy na tym gatunku. Uzyskane wyniki w pracy II wykazały, że średnia masa tuszy samców jelenia szlachetnego (138,429 kg) była prawie dwukrotnie wyższa niż samic (71,00 kg). Byki były starsze od łań średnio o dwa lata. Średnie poziomy CORT w osoczu samców i samic były podobne (odpowiednio: 20,216 i 21,564 ng/mL). Znacznie wyższe wartości HDLC określono w osoczu pobranym od samic (odpowiednio: samice 25,678 mg/dL i samce 9,114 mg/dL). Podobnie, średnie poziomy LDLCHOL, LDH, ALT i GGTP były odpowiednio o 21%, 16%, 42% i 39% wyższe w osoczu łań. Z kolei w osoczu pobranym od byków stwierdzono wyższe poziomy ALP, BIL i ASAT (odpowiednio o 30%, 49% i 36%) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Porównanie masy tuszy, wieku i parametrów biochemicznych w osoczu jeleni szlachetnych

Analizowana zmienna	Samce (n=13)		Samice (n=12)		T <sup>a</sup> /U <sup>b</sup>	p
	M	SD	M	SD		
Masa tuszy [kg]	138,429	20,75	71,00	11,84	8,22843 <sup>a</sup>	<0,001*
Wiek [lata]	6,000	2,050	4,000	1,000	2,48455 <sup>a</sup>	0,026 *
CORT [ng/mL]	20,216	16,747	21,564	17,325	29,000 <sup>b</sup>	0,837
TCHOL [mg/dL]	85,714	65,642	108,889	53,412	16,000 <sup>b</sup>	0,114
HDLC [mg/dL]	9,114	5,712	25,678	8,541	-4,4051 <sup>a</sup>	<0,001*
LDLCHOL [mg/dL]	20,714	20,798	25,667	10,062	17,500 <sup>b</sup>	0,141
TRIG [mg/dL]	290,429	315,265	251,333	155,251	23,000 <sup>b</sup>	0,407
LDH[U/L]	3609,714	2204,350	4160,444	3461,297	27,000 <sup>b</sup>	0,680
UREA [mg/dL]	53,629	24,231	51,889	12,212	0,188 <sup>a</sup>	0,853
ALAT [U/L]	235,714	174,545	333,378	163,478	-1,151 <sup>a</sup>	0,268
URIC [mg/dL]	21,243	23,550	18,700	17,765	26,000 <sup>b</sup>	0,606
ALP [U/L]	157,029	147,178	111,267	84,550	0,785 <sup>a</sup>	0,445
TP [g/dL]	10,571	4,826	12,000	3,969	19,500 <sup>b</sup>	0,210
HSA [g/dL]	4,286	1,254	4,333	0,707	27,500 <sup>b</sup>	0,680
BIL [mg/dL]	0,901	0,837	0,454	0,338	1,331 <sup>c</sup>	0,221
ASAT [U/L]	166,529	153,196	106,089	68,339	1,063 <sup>a</sup>	0,305
GGTP [U/L]	61,357	20,735	99,667	92,720	28,000 <sup>b</sup>	0,757

M-średnia, SD-odchylenie standardowe, <sup>a</sup>-test t Studenta, <sup>b</sup>- test Mann-Whitney, <sup>c</sup>-test t Welcha, \* wartości istotne statystycznie przy p < 0,05

Następnie przeprowadzono analizę statystyczną średniego poziomu CORT w korelacji z wartościami parametrów biochemicznych krwi pobranej od samców i samic jelena szlachetnego (Tabela 9). W osoczu krwi byków stwierdzono ujemną korelację między CORT a UREA i BIL oraz dodatnią korelację pomiędzy kortyzolem a ASAT. Z kolei w osoczu krwi łań wykazano ujemną korelację między CORT a UREA. Niezależnie od płci zwierząt stwierdzono ujemną korelację badanego hormonu z TRIG, UREA, TP oraz HSA (Tabela 9).

**Tabela 9.** Zależność stężenia kortyzolu i poziomu wskaźników biochemicznych krwi u jeleni szlachetnych

Analizowana zmienna	Kortyzol					
	Samce (n=13)		Samice (n=12)		Zwierzęta razem (n=25)	
	rs	p	rs	p	rs	p
TCHOL [mg/dL]	-0,450	0,310	-0,450	0,310	-0,441	0,086
HDLC [mg/dL]	-0,036	0,938	-0,036	0,938	0,041	0,879
LDLCHOL [mg/dL]	-0,560	0,190	-0,560	0,190	-0,384	0,141
TRIG [mg/dL]	-0,468	0,288	-0,468	0,288	-0,529	0,034*
LDH[U/L]	0,684	0,089	0,684	0,089	0,281	0,291
UREA [mg/dL]	-0,846	0,016*	-0,846	0,016*	-0,563	0,022*
ALAT [U/L]	0,234	0,613	0,234	0,613	0,022	0,935
URIC [mg/dL]	-0,594	0,159	-0,594	0,159	-0,459	0,073
ALP [U/L]	-0,234	0,086	-0,266	0,487	-0,420	0,104
TP [g/dL]	-0,441	0,613	-0,630	0,068	-0,668	0,004*
HSA [g/dL]	-0,715	0,089	-0,547	0,126	-0,615	0,011*
BIL [mg/dL]	-0,918	0,003*	0,133	0,732	-0,280	0,292
ASAT [U/L]	0,756	0,048*	-0,233	0,545	0,266	0,318
GGTP [U/L]	-0,702	0,078	-0,183	0,636	-0,400	0,124

rs-korelacja rang Spearmana, \* wartości istotne statystycznie przy  $p < 0,05$

Kolejno analizie poddano zależności wieku i masy tuszy z parametrami biochemicznymi. W grupie wszystkich zwierząt jedynie masa tuszy korelowała ujemnie z HDLC (Tabela 10).

**Tabela 10.** Zależność pomiędzy poziomem parametrów biochemicznych, masą tuszy i wiekiem w grupie jeleni szlachetnych łącznie

Analizowana zmienna	Masa tuszy		Wiek	
	r/R	p	r/R	p
CORT [ng/mL]	-0,116 <sup>a</sup>	0,666	-0,108 <sup>a</sup>	0,689
TCHOL [mg/dL]	-0,339 <sup>a</sup>	0,198	-0,057 <sup>a</sup>	0,832
HDLC [mg/dL]	-0,663 <sup>a</sup>	0,005 *	-0,442 <sup>b</sup>	0,086
LDLCHOL [mg/dL]	-0,354 <sup>a</sup>	0,177	-0,009 <sup>a</sup>	0,973
TRIG [mg/dL]	-0,131 <sup>a</sup>	0,627	0,194 <sup>a</sup>	0,470
LDH[U/L]	0,013 <sup>a</sup>	0,961	-0,044 <sup>a</sup>	0,868
UREA [mg/dL]	-0,135 <sup>a</sup>	0,615	0,103 <sup>b</sup>	0,702
ALAT [U/L]	-0,316 <sup>a</sup>	0,232	0,094 <sup>b</sup>	0,727
URIC [mg/dL]	-0,221 <sup>a</sup>	0,409	0,216 <sup>a</sup>	0,419
ALP [U/L]	-0,056 <sup>a</sup>	0,836	0,266 <sup>a</sup>	0,318
TP [g/dL]	-0,281 <sup>a</sup>	0,290	-0,003 <sup>a</sup>	0,991
HSA [g/dL]	-0,012 <sup>a</sup>	0,962	0,176 <sup>a</sup>	0,513
BIL [mg/dL]	0,207 <sup>a</sup>	0,440	0,117 <sup>a</sup>	0,665
ASAT [U/L]	0,234 <sup>a</sup>	0,381	-0,008 <sup>a</sup>	0,973
GGTP [U/L]	0,067 <sup>a</sup>	0,802	0,210 <sup>a</sup>	0,432

a— korelacja rang Spearmana, b—korelacja Pearsona, \* wartości istotne statystycznie przy  $p < 0,05$

Analogiczna analiza przeprowadzona dla grupy byków nie wykazała żadnej istotnej korelacji pomiędzy masą tuszy, wiekiem a parametrami biochemicznymi krwi (Tabela 11).

**Tabela 11.** Zależność pomiędzy parametrami biochemicznymi, masą tuszy i wiekiem w grupie byków

Analizowana zmienna	Masa tuszy		Wiek	
	rs	p	rs	p
CORT [ng/mL]	-0,018	0,969	0,284	0,536
TCHOL [mg/dL]	0,126	0,787	0,090	0,846
HDLC [mg/dL]	-0,468	0,288	-0,054	0,907
LDLCHOL [mg/dL]	0,000	1,000	0,094	0,840
TRIG [mg/dL]	0,126	0,787	0,290	0,526
LDH[U/L]	-0,090	0,847	0,436	0,327
UREA [mg/dL]	0,018	0,969	0,218	0,638
ALAT [U/L]	-0,072	0,877	0,436	0,327
URIC [mg/dL]	0,036	0,938	0,290	0,526
ALP [U/L]	-0,720	0,067	0,272	0,553
TP [g/dL]	0,336	0,460	0,169	0,715
HSA [g/dL]	0,381	0,398	-0,0481	0,918
BIL [mg/dL]	0,336	0,460	-0,110	0,814
ASAT [U/L]	0,018	0,969	-0,327	0,473
GGTP [U/L]	-0,072	0,877	-0,600	0,154

rs- korelacja rang Spearmana, \* wartości istotne statystycznie przy  $p < 0,05$



W grupie łań natomiast stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy masą tuszy a HDLC (Tabela 12).

**Tabela 12.** Zależność poziomu parametrów biochemicznych, masy tuszy i wieku w grupie łań

Analizowana zmienna	Masa tuszy		Wiek	
	rs	p	rs	p
CORT [ng/mL]	-0,238	0,536	-0,053	0,891
TCHOL [mg/dL]	0,183	0,635	0,454	0,219
HDLC [mg/dL]	0,689	0,039 *	-0,195	0,615
LDLCHOL [mg/dL]	0,004	0,991	0,645	0,060
TRIG [mg/dL]	0,195	0,613	0,531	0,140
LDH[U/L]	-0,349	0,357	-0,354	0,348
UREA [mg/dL]	-0,170	0,661	-0,062	0,873
ALAT [U/L]	0,008	0,982	0,461	0,211
URIC [mg/dL]	-0,417	0,264	0,398	0,287
ALP [U/L]	0,008	0,982	0,328	0,388
TP [g/dL]	-0,012	0,973	0,049	0,900
HSA [g/dL]	0,081	0,834	0,315	0,407
BIL [mg/dL]	-0,212	0,582	-0,611	0,079
ASAT [U/L]	0,042	0,913	0,328	0,388
GGTP [U/L]	-0,017	0,965	0,691	0,390

rs- korelacja rang Spearmana, \* wartości istotne statystycznie przy  $p < 0,05$

### Praca III

W związku z tym, że dotychczasowe analizy bazujące na badaniach osocza krwi sarny europejskiej oraz jelenia szlachetnego wskazały na to, że polowania z podchodu mogą wywierają stres długotrwały u badanych zwierząt, niezbędne okazało się potwierdzenie tych przypuszczeń. Na kozły sarny europejskiej od maja do września poluje się wyłącznie metodą z podchodu, dlatego porównano poziom CORT w sierści samców pozyskanych na początku i na końcu sezonu. W uzyskanych wynikach w pracy III wykazano, że poziom CORT był istotnie wyższy we wrześniu w porównaniu do maja (Pr. > |t| = 0,0017). Wiek zwierząt oraz miesiąc pobierania próbek nie miały istotnego wpływu na stężenie CORT w sierści badanych zwierząt (Tabela 13).

**Tabela 13.** Statystyka opisowa analizowanych parametrów dla zwierząt pozyskanych na początku i na końcu sezonu łowieckiego

Miesiąc pobierania prób	N	Wiek (lata)	Średnia	Średnie	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	Współczynnik zmienności
			masa tuszy (kg)	stężenie kortyzolu (pg/mg)			
Maj	15	3–4	16,866	0,395 <sup>na</sup>	0,016	0,004	3,929
	11	5–6	18,000	0,397 <sup>ab</sup>	0,006	0,002	1,407
Wrzesień	17	3–4	15,882	0,418 <sup>ab</sup>	0,034	0,008	8,045
	14	5–6	18,571	0,428 <sup>b</sup>	0,041	0,011	9,658

a, b — średnie w kolumnie różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$  (test Tukeya)

## Dyskusja

### Kortyzol w osoczu krwi

W Polsce okres najintensywniejszego polowania na sarny europejskie przypada na miesiąc sierpień oraz listopad ze względu na to, że na samce tego gatunku można polować latem, zaś na samice jesienią. Zatem wyższy poziom CORT u samców pozyskanych latem w porównaniu do samic pozyskanych jesienią wynika najprawdopodobniej z pobrania prób w okresie rui i związanej z nią wzmożonej aktywności w obronie terytorium i podążaniu za samicami. Wcześniej prowadzone badania nie wykazały związku pomiędzy poziomem CORT a płcią jeleniowatych (Reinhard i in., 1990; Rehbinder, 1990; Chapple i in., 1991; Huber i in., 2003; Küker i in., 2015; Gentsch i in., 2018). Z drugiej strony wykazano, że to w okresie wyciszenia rozrodczego, w którym wzrasta nowe poroże i następuje szybki przyrost masy ciała, uzyskano wyższe średnie poziomy CORT w osoczu (Bubenik i Hundertmark, 2002). Niektórzy badacze zauważyli, że wysoka koncentracja badanego hormonu była typowa dla jeleniowatych późną jesienią i zimą (Reinhard i in., 1990; Rehbinder, 1990; Huber i in., 2003; Küker i in., 2015). Jednak biologia saren różni się od innych gatunków w tej rodzinie, ze względu na to, że wzrost poroża u sarny następuje zimą (u jelenia szlachetnego w okresie wiosenno-letnim), a okres godowy przypada na miesiące letnie (u pozostałych jeleniowatych jesienią), co może wywierać wpływ na stężenie kortyzolu. Uzyskane wyniki badań prowadzonych na sarnach europejskich były podobne do analiz na reniferach tundrowych (*Rangifer tarandus*) (Bubenik i Hundertmark, 2002), jeleniach aksis (*Axis axis*) (He i in., 2014) i jeleniach pampasowych (*Ozotoceros bezoarticus*) (Munerato i in., 2015). Jednak Gentsch i in. (2018) odnotowali niższe średnie wartości CORT w swoich badaniach prowadzonych na sarnach pozyskiwanych podczas polowań z podchodu. Co więcej, ten sam autor stwierdził, że u saren niepoddanych stresowi ( $13,63 \text{ nmol/L} \pm 2,43$  jako wartości referencyjne) poziomy CORT były 13 razy niższe u samców i 6 razy niższe u samic (Gentsch i in., 2018). Stężenie badanego hormonu stresu u samców było podobne do poziomu oznaczonego u saren pozyskanych metodą polowania z naganką, ale jednocześnie wartości CORT u samic były wyższe niż u saren pozyskanych za pomocą polowań z podchodu. Dodatkowo były niższe niż u zwierząt upolowanych w trakcie polowań z psami (Gentsch i in., 2018). Nie mniej jednak

oznaczone poziomy CORT w badaniu Montané i in. (2003) u chwytych saren były zbliżone do poziomu hormonu u samic pozyskanych na terenie Nadleśnictwa Lubartów.

Oczywistym jest, że wszystkie rodzaje polowań będą wpływać na homeostazę zwierząt łownych i jednocześnie będą postrzegane jako bodziec silnie stresujący (Vilela i in., 2020). Sheriff i in. (2011) wykazali, że zwiększona aktywność fizyczna spowodowana polowaniem wywoływała typową reakcję stresową, której towarzyszył wzrost stężenia CORT we krwi obwodowej zwierząt. Jednakże nie był on tak wysoki, jak w sytuacji poważnego urazu spowodowanego wypadkiem samochodowym, gdzie koncentracja tego hormonu była znacznie wyższa niż zgłaszane w dotychczasowych badaniach (Sheriff i in., 2011). Należy podkreślić, że na wzrost CORT wpływa również fakt, że zwierzę odczuwa dyskomfort psychiczny, skorelowany z uczuciem bólu fizycznego, strachu lub paniki w odpowiedzi na różne negatywne bodźce (Vilela i in., 2020). Ponadto badania Malherbe'a (2019) wykazały, że zwiększony poziom CORT może być nawet wynikiem zbyt bliskiego sąsiedztwa obszarów, na których bytują zwierzęta ze środowiskiem antropogenicznym (budynkami i osiedlami ludzkimi). Wyniki uzyskane w naszych badaniach prowadzonych na jeleniach szlachetnych pozyskanych podczas polowań z podchodu potwierdzają wcześniejsze doniesienia, które wykazały, że poziomy CORT nie zależy od wieku i płci zwierząt (Brown i Chapman, 1990; Huber i in., 2003; Küker i in., 2015; Caslini i in., 2016; Hart i in., 2016; Ranabir i Reetu, 2019; Azevedo i in. 2019). Może to wskazywać, że niezależnie od wieku lub płci, polowanie jest dla jeleni szlachetnych doświadczeniem stresującym. Jednak brak różnic w koncentracji CORT związanych z wiekiem podważa doniesienia wskazujące, że starsze osobniki charakteryzuje intensywniejsza odpowiedź endokrynną, a co za tym idzie wyższe poziomy CORT (Fourie, 2015; Heimbürge i in., 2019).

Warto zauważyć, że wyniki uzyskane u dzikich jeleni szlachetnych na terenie Nadleśnictwa Lubartów były wyższe w porównaniu do hodowlanych jeleni iberyjskich (*Cervus elaphus hispanicus*) w tej samej porze roku (Gaspar-López i in., 2010). Jak wskazuje dotychczasowa literatura, poziom CORT w osoczu podlega zarówno wahaniom dobowym, jak i rocznym (Suttie i in., 1995; Cassidy, 1996; Ingram i in., 1999). Ingram i in. (1999) wykazali sezonowe wahania poziomu CORT w dość szerokim zakresie od 1,9 do 22,5 ng/mL u niekrępowanych hodowlanych jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*), przy czym wyższe poziomy odnotowano w listopadzie w okresie intensywnego przyrostu masy ciała po sezonie godowym. Obserwacje te potwierdzają wcześniejsze ustalenia zgłoszone przez Saltza i Whiteya (1991). Nasze wyniki są również

zgodne z wynikami uzyskanymi przez Ingrama i in. (1999), mieszczą się jednak w górnych granicach i najprawdopodobniej jest to związane z okresem godowym, a nie przyrostem masy ciała. Ponadto należy podkreślić, że specyfika gatunku i jego środowisko życia mogą wpływać na poziomy CORT, a tym samym na siłę reakcji endokrynej (Gentsch i in., 2018; Ingram i in., 1999). Może to wyjaśniać rozbieżności w kontekście wyników innych autorów. Dotychczasowe badania nie potwierdziły związku pomiędzy poziomem CORT a wiekiem jeleniowatych (Reinhardt i in., 1990; Rehbinder, 1990; Chapple i in., 1991; Huber i in., 2003; Küker i in., 2015; Barrell, 2019). Jednakże uzyskane wyniki u danieli fermowych wykazały, że starsze samce mają wyższy poziomy kortyzolu we krwi (Dziki-Michalska i in., 2021) co potwierdzają nasze badania przeprowadzone na sarnach europejskich (Dziki-Michalska i in., 2023).

## **Kortyzol a parametry biochemiczne krwi**

Wiadomo, że stres ma bezpośredni wpływ na zdrowie zwierząt, co może znaleźć swoje odzwierciedlenie w wynikach pomiarów wskaźników biochemicznych krwi (Žele i Vengušt, 2020). Ponadto, jak już wspomniano, poziom badanego CORT zależy również od ogólnego stanu zdrowia. Uzyskane przez nas wyniki analizowanych parametrów biochemicznych oraz badanie pośmiertne wykonane przez lekarza weterynarii nie wykazały żadnych stanów patologicznych/chorobowych u badanych zwierząt. Przyjmując za punkt odniesienia wartości uzyskane od saren pozyskanych na tym samym obszarze, ale poza sezonem łowieckim, samce charakteryzowały się o 16% wyższym poziomem TCHOL, 11% wyższym poziomem UREA, 70% wyższym poziomem ALAT i 27% wyższym poziomem TP. U samic zaś, wykazano wyższy o 20% poziom TCHOL, 20% wyższy poziom UREA, 79% wyższy poziom ALAT i 27% wyższy poziom TP (Karpiński i in., 2023). Średni poziom LDH i TP u badanych saren był wyższy w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez Montané i in. (2003), gdzie chwymano zwierzęta za pomocą sieci. Średni poziom ALAT był niższy, zaś URIC był podobny do poziomów oznaczonych u saren, których nie poddano działaniu chemicznych środków uspokajających (Montané, 2003; Žele i Vengušt, 2012). Poziom ALP był porównywalny do tego oznaczonego przez Žele i Vengušta (2012) oraz przez Montané i in. (2003). Średnie stężenie HSA w osoczu było nieznacznie wyższe od wartości podanych przez Ursache i in. (1980) u jeleni, przez Pav i in. (1975) oraz Žele i Vengušta (2012). Uzyskane średnie wartości parametrów biochemicznych krwi saren były zauważalnie wyższe niż u łosia (*Alces alces*) (Rostal i in., 2012) i jelenia axis (*Axis axis*)

(Rehbinder, 1990), ale niższe niż u jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*) (Marco i Lavin 1999). W badaniach na sarnach wykazano ujemną korelację pomiędzy TCHOL i CORT, podczas gdy w grupie wszystkich zwierząt stężenie HDLC było wysokie.

Wysoki poziom TCHOL u jeleniowatych może prowadzić do chorób układu krążenia (Fourie i le Ouwerkerk, 1984). Ponadto TCHOL odgrywa kluczową rolę w buforowaniu płynności zwierzęcych błon komórkowych i wewnątrzkomórkowych, co może wpływać na funkcje komórkowe kluczowych narządów, w tym mózgu. Zaobserwowano, że poziom TCHOL może wpływać na funkcję serotoniny (Möstl i Palme, 2002). Hormony steroidowe, w tym testosteron, progesteron i estrogeny, są również syntetyzowane z cholesterolu na poziomie biochemicznym (Sasaki i in., 2006; Kuru i in., 2018), co z kolei jest ściśle związane z sukcesem reprodukcyjnym i tworzeniem poroża u samców (Schnare i Fischer, 1987) oraz utrzymaniem ciąży u samic (Sasaki i in., 2006). Ponadto wysoki poziom glukokortykoidów jest ważnym czynnikiem stymulującym resorpcję tkanki kostnej i hamującym proces osteogenezy (Hillman i in., 1973; Kleerekoper i in., 1997). Należy jednak podkreślić, że poziomy enzymów wątrobowych uznaje się za wskaźniki fazy ostrej, a poziomy niektórych lipidów (np. TRIG) ulegają szybkim fluktuacjom w sytuacji stresowej (Dziki-Michalska i in., 2023). Wpływ różnych czynników na wahania poziomów TCHOL i URIC w osoczu krwi zwierząt nie jest w pełni poznany. Wiadomo, że na stężenie TCHOL w osoczu wpływają również stresory emocjonalne, powodując jego znaczny wzrost. Zatem wahania poziomu TCHOL w surowicy mogą być regulowane przez nastrój depresyjny bądź agresję (Tochigi i in., 2022). Wysoki poziom LDH w osoczu badanych saren nie jest zaskakujący, ponieważ jest to parametr szeroko stosowany jako marker diagnozujący przyczynę i miejsce uszkodzenia tkanek, a zwierzęta były pozyskane na drodze odstrzału. Wcześniej wskaźnik ten był również stosowany jako kryterium diagnostyczne podczas monitorowania zawału mięśnia sercowego (Kaneko i in., 2008). LDH jest jednym z najbardziej specyficznych markerów uszkodzenia mięśni szkieletowych u zwierząt, dlatego też wzrost jej aktywności w osoczu saren jest użytecznym markerem uszkodzenia mięśni po strzale (Karpínski i in., 2023; Goddard i in., 1997). Dotychczasowe doniesienia wskazują, że aktywność enzymów mięśniowych: ALAT, ASAT oraz LDH wzrasta podczas chwytania i manipulacji u dzikich zwierząt kopytnych w wyniku zwiększonej przepuszczalności komórek mięśniowych i ich uszkodzenia (He i in., 2014; Bender, 2003; López-Olvera i in., 2007). Z uwagi na wymienione czynniki, istotne jest rozważenie metod unieruchamiania zwierząt oraz metodyki i czasu pobierania próbek krwi do analizy

biochemicznych (Johnson i in., 2010). Należy jednak podkreślić, że zarówno zmiany endokrynologiczne jak i metaboliczne mogły być efektem stresu i odpowiedzi organizmu na intensywny bodziec negatywny, którym może być polowanie z podchodu oraz fizyczny ból związany z postrzałem przekładający się na śmierć organizmu (Goddard i in., 1997; Dziki-Michalska i in., 2023).

Średnie poziomy większości parametrów biochemicznych nie różniły się istotnie pomiędzy grupami badanych jeleni szlachetnych. Istotną różnicę stwierdzono w średnim poziomie HDLC, który był prawie trzykrotnie wyższy u łań. Z kolei wyższe poziomy LDLCHOL, LDH, ALAT i GGTP w osoczu krwi łań niż we krwi byków nie różniły się istotnie statystycznie. Nieznaczne różnice stwierdzono w poziomach ALP, BIL i ASAT, które były wyższe w próbkach krwi byków. Wysoki poziom frakcji cholesterolu może być związany z faktem, że związki te biorą udział w syntezie hormonów steroidowych, które są ważnym ogniwem w regulacji procesów fizjologicznych w organizmie (Miller, 2010; Yi i in., 2020). Badania przeprowadzone na samcach jelenia iberyjskiego (*Cervus elaphus hispanicus*) w dwóch różnych populacjach o wysokim i niskim poziomie konkurencji wewnątrzplciowej wykazały dodatnią korelację pomiędzy poziomami testosteronu i metabolitów kortyzolu w kale, ale także znaczącą interakcję wskazującą, że związek ten występuje intensywniej w populacji charakteryzującej się wysokim poziomem konkurencji o partnerkę. Wyniki te potwierdzają pozytywną relację pomiędzy obydwoma hormonami w warunkach naturalnych i jednocześnie, że powodem tego jest konkurencja między samcami o łanie (De la Peña i in., 2021). Należy zauważyć, że jelenie szlachetne w naszym badaniu pozyskiwano w okresie godowym, co niewątpliwie miało wpływ na poziomy parametrów biochemicznych krwi. Poziom testosteronu w jądrach dzikich jeleni we wrześniu jest 1000-krotnie wyższy niż w pozostałych miesiącach (Lincoln, 1971). Fizjologicznie testosteron jest syntetyzowany z cholesterolu. Dotychczas wykazano, że te dwa parametry są ze sobą dodatnio skorelowane (Gutai i in., 1981; Freedman i in., 1991). Z kolei wysokie stężenia poszczególnych frakcji cholesterolu w osoczu jelenia szlachetnego mogą powodować poważne konsekwencje zdrowotne (Kawtikwar i in., 2010). Wreszcie utrzymanie dominującej pozycji samca w stadzie generuje bardzo silną reakcję stresową (Bartoš i Bubenik, 2010), co może mieć odzwierciedlenie w analizowanych parametrach.

Podwyższone poziomy CORT i LDH wskazują na potencjalne uszkodzenia mięśni spowodowane urazem (Ursache i in., 1980; Nuvoli i in., 2014). Ponadto na poziom parametrów biochemicznych może wpływać odżywianie jeleniowatych

(Catanese i in., 2013). Jelenie szlachetne pozyskiwano w czasie rykowiska — okresie godowym, w którym drastycznie ograniczają one spożycie pokarmu (Carranza i in., 1996). Ten wymuszony post najprawdopodobniej prowadzi do spadku niektórych parametrów biochemicznych (TCHOL, HDLC, LDLCHOL, LDH, TP, GGTP) u byków, ale nie u łąń, które nie przejawiają typowego dla samców zachowania (Mysterud i in., 2008). Ponadto należy podkreślić, że różnica w czasie od odstrzału do śmierci zwierząt może mieć wpływ na wyniki parametrów biochemicznych w surowicy krwi. Wykazane w naszym badaniu wartości poszczególnych parametrów u jeleni szlachetnych były wyższe niż te podane przez innych badaczy dla jeleni szlachetnych utrzymywanych fermowo (Barić i in., 2011; Szabó i in., 2013; Abdulkareem i in., 2020; Tajchman i in., 2023) i zależały od rodzaju zastosowanej metody znieczulenia/unieruchomienia i/lub zastosowanych środków uspokajających użytych do ich obezwładnienia (Marco i Lavín, 1999). Nasze wyniki nie są zgodne z wartościami uzyskanymi przez Rosef i in. (2004), którzy wykazali wyższe poziomy ALAT, GGTP, LDH, UREA, TCHOL i TRIG oraz niższe poziomy TP, HSA i BIL u dzikiego *Cervus elaphus atlanticus*, którego poddano farmakologicznemu unieruchomieniu. Uzyskane wyniki wykazały, że poziom CORT w osoczu był ujemnie skorelowany z poziomem UREA oraz BIL w grupie samców, a tylko z UREA w grupie samic. Warto zauważyć, że poziom UREA może być pośrednio zależny od pory roku, a bezpośrednio od braku dostępu do pokarmu, co wykazano wcześniej zarówno u owiec (Cocimano i Leng, 1967), jak i u jeleniowatych (DelGiudice i Seal, 1988; Saltz i White, 1991). Niedożywienie prowadzi do katabolizmu białek i rozpadu tkanek, co odzwierciedla się we wzroście poziomu UREA we krwi zwierząt (Nieminen i Timisjärvi; 1983). W naszym badaniu uzyskano znacznie wyższe wartości UREA u wszystkich analizowanych jeleni szlachetnych w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez Rosef i in. (2004) dla zwierząt żyjących na wolności, co może być związane z ubogim spożyciem białka na skutek braku pobierania pokarmu w okresie godowym (Feng i in., 2022).

Fizjologicznie wzrost poziomu UREA obserwowany jest w reakcji organizmu na stres, zwiększonego katabolizmu oraz stanów pourazowych (Winnicka, 2015). Jednak w naszych badaniach zaobserwowano niższe wartości UREA, co może wskazywać na to, że reakcja poziomu tego parametru w odpowiedzi na stres spowodowany polowaniem jest wolniejsza w porównaniu do szybkiego wzrostu poziomu CORT. Inną przyczyną niskich wartości UREA może być sezonowa zmiana diety zwierząt przed okresem zimowym, kiedy dominuje roślinność uboga w białko i bogata w węglowodany, a jak powszechnie



wiadomo, poziom białka paszy wpływa na poziom plazmatycznego UREA. Udokumentowano również, że w czasie ciąży wzrasta współczynnik filtracji kłębuszkowej nerek, co powoduje zwiększoną produkcję tego parametru (Mamoulakis i in., 2024). W badaniu tym nie oceniano statusu fizjologicznego w kontekście potencjalnej ciąży samic, jednakże biorąc pod uwagę okres rykowiska, można założyć, że ponad 80% samic mogło być w ciąży (Vilela i in., 2020). Stres żywieniowy może mieć również wpływ na poziom BIL, co wykazano w badaniach na zającu wielkouchym (*Lepus californicus*) (Henke i Demarais, 2016). Dodatkowo uzyskane wyniki wykazały silną ujemną korelację pomiędzy analizowanymi parametrami biochemicznymi we krwi jeleni. Wzrostowi poziomowi CORT towarzyszył spadek poziomu BIL. W grupie jeleni stwierdzono również dodatnią korelację między CORT i ASAT. ASAT jest enzymem bezpośrednio powiązany z tkanką mięśniową. Jego zwiększona aktywność jest związana z uszkodzeniem mięśni (Fitte, 2017; Simeonova i Kalkanov, 2020). Enzym ten wskazuje również choroby wątroby, ponieważ jego poziom wzrasta przy jej marskości, co staje się widoczne w badaniach klinicznych (Craig i in., 1991). Wzrost poziomu ASAT może być spowodowany zaprzestaniem pobierania paszy przez jelenie w okresie godowym (Dziki-Michalska i in., 2024a). W badaniach nad jeleniami szlachetnymi niski poziom TP i TRIG potwierdzają zmniejszone pobieranie pokarmu przez zwierzęta w okresie godowym, ponieważ oba te parametry są uważane za markery niedożywienia (Soveri i in., 1992; Serrano i in., 2008; Kamphues i in., 2014). Również ujemna korelacja między CORT a UREA w grupach jeleni, łań i w grupie wszystkich zwierząt razem nie jest zaskakująca, ponieważ UREA jest uważany za marker długotrwałego stresu (Glantzounis i in., 2005). Należy podkreślić, że wyniki te są bezpośrednio powiązane z okresem godowym, tj. okresem pobierania próbek, który był długotrwałym negatywnym bodźcem dla zwierząt. W grupie badanych łań stwierdzono ujemną korelację między BIL a ich wiekiem. Niemniej jednak stężenie BIL było podobne do tego określonego przez Alhuaya i in. (2011) u jelenia wirginijskiego (*Odocoileus virginianus*), lecz niższe od określonego przez standard ISIS (International Species Information System, 1999). Jednakże poziomy BIL zależy od wielu czynników, np. szerokości geograficznej, klimatu czy metod oznaczania (Alhuay i in., 2011).

Podsumowując, poziom dobrostanu zwierząt dzikich zależy od mnogości czynników zewnętrznych i wewnętrznych. Czynniki wewnętrzne obejmują ogólny stan zdrowia zwierzęcia i wpływ stresorów środowiskowych, np. pora roku, dostępność pożywienia, rozród, obecność drapieżników czy aktywność łowiecką

(Ranabir i Reetu, 2011). Zatem różnice w poszczególnych wartościach mogą wynikać nie tylko z fluktuacji CORT we krwi, ale także z ogólnej wrażliwości gatunku czy osobnika oraz wpływu klimatu, w którym żyją badane zwierzęta (Vilela i in., 2020). Czynniki te mogą wpływać na skład biochemiczny krwi oraz szlaki metaboliczne, osłabiając siłę odpowiedzi immunologicznej i tym samym zwiększając ryzyko chorób zakaźnych. Dlatego zarówno niedobór, jak i nadmiar CORT mają negatywny wpływ na stan fizjologiczny zwierząt (Koolhaas i in., 1999; Cockrem, 2012). Niemniej jednak należy wziąć pod uwagę, że rozbieżności w poszczególnych badaniach mogą wynikać z różnic w czynnikach środowiskowych, np. klimatu panującego w siedliskach badanych populacji, metod pobierania materiału biologicznego do analiz (Ballesteros, 1998; Huber i in., 2003; Topal i in., 2010) czy też zagęszczenia populacji zwierząt dzikich (Caslini i in., 2016).

W badaniu prowadzonym na sarnach na uwagę zasługuje korelacja pomiędzy masą tuszy a ALP u samic. Wiadomo, że wyższe poziomy ALP są typowe dla młodych, rosnących zwierząt (Knowles i in., 2000). Możliwe są zatem dwa wyjaśnienia uzyskanego wyniku: samice sarny były młodsze od samców i jest wysoce prawdopodobne, że większość z nich mogła być w ciąży (Kunkel i in., 1953). Nie możemy potwierdzić z całą pewnością ciąży u samic ponieważ u saren występuje tzw. ciąża utajona w początkowym jej okresie trwania (Sirotkin, 2016).

Dotychczas przeprowadzone badania nie potwierdziły związku pomiędzy poziomem CORT a wiekiem jeleniowatych (Reinhardt i in., 1990; Rehbinder, 1990; Chapple i in., 1991; Huber i in., 2003; Küker i in., 2015; Barrell, 2019). Jednakże badania na danielach hodowlanych (*Dama dama*) wykazały, że starsze samce mają wyższe poziomy CORT we krwi, co potwierdzają nasze badania na dzikich sarnach (Dziki-Michalska i in., 2023). Ponadto specyfika gatunku i jego środowisko życia mogą wpływać na poziomy CORT, a tym samym na siłę reakcji endokrynnej (Ingram i in., 1999; Gentsch i in., 2018), co może wyjaśniać rozbieżności w wynikach uzyskanych przez innych autorów.

W badaniu prowadzonym na jeleniach szlachetnych analizie również poddano wiek i masę tuszy w odniesieniu do parametrów biochemicznych. W grupie badanych łań stwierdzono dodatnią korelację masy tuszy oraz HDLC. Jest to zjawisko niepokojące, gdyż badane łanie były stosunkowo młode, a wiadomo, że hormony steroidowe żeńskie są syntetyzowane z cholesterolu, którego odpowiedni poziom wpływa na prawidłowe procesy rozrodu u tego gatunku (Kuru i in., 2018; Kotlarczyk i in., 2021). Dodatkowo

ujemna korelacja CORT z masą tuszy wskazuje, że im wyższe stężenie CORT we krwi jelenia szlachetnego, tym niższa masa tuszy, co może mieć bezpośredni wpływ na kondycję zwierząt (Möstl i Palme, 2002).

W badaniu prowadzonym na samcach sarny europejskiej, gdzie analizowano poziom CORT w sierści potwierdzono brak związku pomiędzy masą tuszy zwierząt, wiekiem i poziomem CORT w sierści, co było już wskazywane przez innych badaczy (Ventrella i in., 2018; Caslini i in., 2016).

## **Kortyzol w sierści**

Uzyskane wyniki analizy stężenia CORT w sierści saren europejskich zebranych w maju są zgodne ze średnimi wynikami uzyskanymi przez Ventrella i in. (2020) w czerwcu. Jednak koncentracja CORT w okrywie włosowej zebranej we wrześniu różniła się od tego doniesienia (Ventrella, 2020). Nasze badania wskazały na znacznie wyższy poziom CORT w sierści saren pod koniec sezonu łowieckiego i jednocześnie po zakończeniu sezonu godowego, który przypada na przełom lipca i sierpnia. Tożsame wyniki odnotowano również u innych gatunków (Martin i Réale, 2008). Z kolei badania przeprowadzone we Włoszech na sarnach, które poniosły śmierć wskutek zderzeń z samochodami, nie wykazały żadnej korelacji pomiędzy miesiącem pobrania próby a poziomem CORT w sierści tych zwierząt, jednocześnie wyniki były nieznacznie wyższe od uzyskanych w naszych własnych badaniach (Franchini i in., 2023).

Należy podkreślić, że obecnie nie ma wartości referencyjnych, do których można by odnieść wyniki uzyskane w naszym badaniu. Jednakże inni badacze wykazali znacznie wyższe stężenia CORT w sierści jelenia szlachetnego (Caslini i in., 2016) lub łosia (Keogh i in., 2023). Rozbieżności te wynikają najprawdopodobniej z różnic gatunkowych, a także czynników środowiskowych, takich jak klimat, zwiększona presja drapieżników lub zagęszczenie populacji na obszarze, na którym bytują zwierzęta (Caslini i in., 2016). Franchini i in. (2023) wskazali, że wyższe stężenia CORT późnym latem i jesienią mogą być charakterystyczne dla obszarów o zimnym klimacie, a Huber i in. (2003) potwierdzili w swoich badaniach wyższy poziom CORT w miesiącach charakteryzujących się niższymi temperaturami. Rakic i in. (2023) podkreślili, że koncentracja CORT w sierści zwierząt waha się w ciągu roku i jest zależna od czasu zmian okrywy włosowej - zwiększa się, gdy włosy nie rosną (faza spoczynku), co potwierdziły badania przeprowadzone na wilkach szarych (*Canis lupus*) (Pereira i in., 2022) i zającach amerykańskich (*Lepus americanus*) (Lavergne i in., 2020). Nasze badania wskazują jednak, że poziom

CORT był istotnie wyższy we wrześniu w porównaniu z miesiącem majem. Podstawowym czynnikiem, który może mieć wpływ na wzrost poziomu stresu u samców sarny, oprócz trwającego sezonu łowieckiego, jest okres godowy. Zachowania terytorialne u sarny europejskiej pojawiają się wraz z nadejściem wiosny, osiągając szczyt w okresie rui. Wówczas samce wykazują nasilone zachowania terytorialne, charakteryzujące się zwiększoną agresją (Hoem i in., 2007), co może mieć wpływ na nasze wyniki. Dotychczasowe badania przeprowadzone na jeleniowatych potwierdzają, że ruja jest dla nich okresem szczególnie stresującym (Rehbinder i in., 1982; Huber i in., 2003; Gentsch i in., 2018). Na wzrost CORT w sierści mogą mieć również wpływ negatywne czynniki środowiskowe, w tym klimat, temperatura otoczenia czy duże zagęszczenie gatunku na danym terenie (Malherbe, 2019; Caslini i in., 2016; Spong i in., 2020; Tajchman i in., 2020; Tajchman i in., 2021). W badanym rejonie średnie temperatury dla miesięcy objętych analizami wynosiły: maj: 9–16°C, czerwiec: 16–26°C, lipiec: 15–23°C, sierpień: 10–32°C, wrzesień: 9–19°C (<https://www.meteoatlas.pl/polska/kozlowka>). Można zatem wnioskować, że wartość temperatury dla wyżej wymienionych miesięcy mogła być dodatkowym negatywnym czynnikiem powodującym stres cieplny (Boon, 2019), ponieważ w przypadku łośa (*Alces alces*) górna granica temperatury, która nie powoduje stresu cieplnego u tego gatunku wynosi 14°C w miesiącach letnich (Renecker i Hudson, 1986), a łoś jest doskonałym przykładem zwierzęcia wrażliwego na maksymalne temperatury w każdej porze roku (Boone, 2019).

Ważnym czynnikiem wpływającym na dobrostan sarny jest również zagęszczenie populacji jelenia szlachetnego w jej siedliskach. Wielu autorów wskazuje, że wysokie zagęszczenie tego gatunku może negatywnie wpływać na populację sarny, przede wszystkim przez wzgląd na konkurencję pokarmową (Storms i in., 2008; Richard i in., 2010; Borkowski, 2021). Należy zatem wziąć pod uwagę, że potencjalne interakcje tych dwóch gatunków mogą prowadzić do zwiększonego wyrzutu kortyzolu u sarny, zwłaszcza gdy oba gatunki dzielą te same siedliska (Franchini i in., 2023). Jednak na badanym terenie zagęszczenie jelenia prawdopodobnie nie miało negatywnego wpływu na populację sarny europejskiej, gdyż kształtowało się na poziomie 16,03 osobników na 1000 ha powierzchni leśnej (<https://lubartow.lublin.lasy.gov.pl/>). Zgodnie z zaleceniami Polskiego Związku Łowieckiego powinno ono oscylować w granicach 15–35 osobników na 1000 ha powierzchni leśnej — takie wartości pozwalają na prowadzenie racjonalnej gospodarki łowieckiej (Polskie Prawo Łowieckie). Warto podkreślić, że niższe poziomy

CORT u różnych gatunków, w tym saren, są typowe dla cieplejszych miesięcy — stężenie CORT wzrasta od wczesnej wiosny do późnego lata (Bacci i in., 2014; Ventrella i in., 2020; Borkowski i in., 2021), co kontrastuje z naszymi wynikami. Ważnym jest również, że wysokie stężenie androgenów w okresie rui u saren może mieć wpływ na poziomy CORT wywołane stresem (Boswell i in., 1994; Handa i Weiser, 2014), chociaż związek pomiędzy CORT a testosteronem może być zauważalny ze względu na sezonowe wahania obu tych hormonów (Ventrella i in., 2020).

Wysoka średnia wartość CORT u samców w okresie letnim była najprawdopodobniej spowodowana sezonem godowym i towarzyszącym mu charakterystycznym zachowaniem seksualnym zwierząt. Dwoma silniejszymi predyktorami poziomów CORT u saren były wiek i stężenie URIC. Jednak wnioski muszą zostać rozszerzone o dalsze badania. Okres godowy, który charakteryzuje się zwiększoną aktywnością oraz zmianą diety i stanu fizjologicznego zwierząt miał dodatkowy wpływ na niektóre parametry biochemiczne. Wyższe stężenie CORT wywarło negatywny wpływ na masę tuszy, co może determinować pogorszenie ogólnego stanu zdrowia zwierząt. Stężenie CORT w sierści samców sarny europejskiej było istotnie wyższe u zwierząt pozyskanych pod koniec sezonu polowań z podchodu, jednak nie korelowało z wiekiem ani masą tuszy. Zatem powtarzające się narażenie populacji jeleniowatych na aktywność łowiecką przekłada się na intensyfikację stresu, co może mieć istotne implikacje dla zrównoważonego rozwoju i ochrony tej rodziny zwierząt. Zarówno stres ostry jak i przewlekły może wpływać na dynamikę populacji poprzez zmianę zachowań związanych z karmieniem i rozrodem, dobrostan zwierząt, a ostatecznie wypaczać procesy ewolucyjne, zmieniając indywidualną adaptację i selekcję.

Warto podkreślić, że badania na zwierzętach łownych są limitowane ze względu na sezon polowań – pozyskanie zwierząt dzikich jest możliwe jedynie zgodnie z kalendarzem polowań, a każdy sposób unieruchomiania zwierząt dzikich będzie powodował stres, stąd brak jest odniesień do warunków bezstresowych (grupa kontrolna jest niemożliwa do utworzenia).

## **Wnioski**

### **Badania potwierdziły założoną hipotezę badawczą.**

Sezon polowań z podchodu wywiera stres krótko- i długotrwały u wybranych jeleniowatych, w wyniku czego następuje zaburzenie dobrostanu badanych zwierząt.

### **Wnioski szczegółowe**

1. Wysokie średnie wartości CORT u samców saren europejskich pozyskanych w okresie letnim (58,066 ng/mL) w porównaniu z samicami pozyskanymi jesienią (27,694 ng/mL) wynikały najprawdopodobniej z okresu godowego i związanych z nim charakterystycznych zachowań zwierząt.
2. Poziom CORT w osoczu jeleni szlachetnych pozyskanych podczas polowań z podchodu był zbliżony zarówno u samców i samic (odpowiednio: 20,216 ng/mL i 21,564 ng/mL).
3. Wzrost stężenia CORT u saren europejskich i jeleni szlachetnych wpływał na wybrane parametry biochemiczne krwi, co wskazuje na wrażliwość badanych gatunków na czynniki stresowe.
4. Dwa z silniejszych predyktorów poziomu CORT u saren europejskich to wiek i stężenie kwasu moczowego.
5. Wyższe stężenie CORT wpływało niekorzystnie na masę tusz saren europejskich i jeleni szlachetnych, co może wskazywać na pogorszenie kondycji ogólnej zwierząt.
6. U saren wykazano działanie stresu długotrwałego pod koniec okresu polowań z podchodu.

## Piśmiennictwo

1. Abdulkareem T.A.; Eidan S.J.; Shubber A.M.H.; Ibrahim F.F.; Ali M.D.; Mohammed O.A. Reference Physiological Values in Different Animal Species; Department of Animal Production, College of Agricultural Engineering Sciences, University of Baghdad: Baghdad, Iraq, 2020. p. 124.
2. Alhuay A.D.; Li E.O.; Alvarado S.A.; Falcón P.N.; Ríos M.P.; Rojas M.G. Perfil bioquímico sanguíneo hepático de venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) criados en cautiverio. *Rev. Investig. Vet. Perú (RIVEP)* 2011. 22, 138–143.
3. Azevedo A.; Bailey L.; Bandeira V.; Dehnhard M.; Fonseca C.; de Sousa L.; Jewgenow K. Age, sex and storage time influence hair cortisol levels in a wild mammal population. *PLoS ONE* 2019. 14, e0221124. doi.org/10.1371/journal.pone.0222963
4. Bacci M.L.; Nannoni E.; Govoni N.; Scorrano F.; Zannoni A.; Forni M.; Martelli G.; Sardi L. Hair cortisol determination in sows in two consecutive reproductive cycles. *Reprod. Biol.* 2014. 14, 218–223. doi.org/10.1016/j.repbio.2014.06.001
5. Ballesteros F. Las especies de caza en España. In *Biología, Ecología y Conservación; Estudio y Gestión del Medio*: Oviedo, Spain, 1998.
6. Barić R.R.; Tončić J.; Vicković I.; Šoštarić B. Haematological and biochemical values of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Arh.* 2011. 81, 513–523. <https://hrcak.srce.hr/70942>
7. Barrell G.K. An Appraisal of Methods for Measuring Welfare of Grazing Ruminants. *Front. Vet. Sci.* 2019. 6, 289. doi.org/10.3389/fvets.2019.00289
8. Bartoš L.; Bubenik B. Relationships between rank-related behaviour, antler cycle timing and antler growth in deer: behavioural aspects. *Animal Production Science*, 2010, 51(4) 303-310. doi.org/10.1071/AN10195
9. Bateson P.; Bradshaw E.L. Physiological effects of hunting red deer (*Cervus elaphus*). *Proc. Biol. Sci.* 1997. 264, 1707–1714. doi.org/10.1098/rspb.1997.0237
10. Bender H.S. Muscle. In: Latimer K.S.; Mahaffey E.A.; Prasse K.W. editors. *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology*. 4th ed. Ames, IA: The Iowa State University Press; 2003. pp. 260–9.

11. Bentley P.J. Comparative vertebrate endocrinology, 3rd edn. Cambridge University Press; 1998. Cambridge.
12. Boone R.B. Weather and Climate Impacts on Browsing and Grazing Ungulates. In *The Ecology of Browsing and Grazing II*; Gordon, I.J., Prins, H.H.T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019.
13. Borkowski J.; Banul R.; Jurkiewicz-Azab J.; Hołdyński C.; Świączkowska J.; Nasiadko M.; Załuski D. There is only one winner: The negative impact of red deer density on roe deer numbers and distribution in the Słowiński National Park and its vicinity. *Ecol. Evol.* 2021. 11, 6889–6899. doi.org/10.1002/ece3.7538
14. Boswell T.; Woods, S.C.; Kenagy G.J. Seasonal Changes in Body Mass, Insulin, and Glucocorticoids of Free-Living Golden-Mantled Ground Squirrels. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1994. 96, 339–346. doi.org/10.1006/gcen.1994.1189
15. Brown W.A.B.; Chapman N.G. The dentition of fallow deer (*Dama dama*): A scoring scheme to assess age from wear of the permanent molariform teeth. *J. Zool.* 1990. 22, 659–682. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1990.tb04023.x
16. Bubenik G.A.; Brown R.D.; Schams D.; Bartos L. The effect of ACTH on the GnRH-induced release of LH and testosterone in male white-tailed deer. *Comp. Biochem. Physiol. Part. C* 1999. 122, 173–179. doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10101-9
17. Bubenik G.A.; Hundertmark K.J. Accessory antlers in male *Cervidae*. *Z für Jagdwissenschaft.* 2002. 48, 10–21. doi.org/10.1007/BF02285353
18. Burnard C.; Ralph C.; Hynd P.; Edwards J.H.; Tilbrook A. Hair cortisol and its potential value as a physiological measure of stress response in human and non-human animals. *Anim Prod Sci.* 2017. 57, 401–14. doi.org/10.1071/AN15622
19. Burnett T.A.; Madureira A.M.L.; Silper B.F.; Nadalin A.; Tahmasbi A.; Veira D.M.; Cerri R.L.A. Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2014. 97, 7685–7690. doi.org/10.3168/jds.2014-8444
20. Camargo C.M.S.; Duarte J.M.B.; Fagliari J.J.; Santana A.M.; Simplicio K.M.M.G.; Santana A.E.; Santana S.A.E. Effect of sex and seasons of the year on hematologic and serum biochemical variables of captive brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) pesq. *Vet. Bras.* 2013. 33(11), 1364–70. doi.org/10.1590/S0100-736X2013001100013



21. Carranza J.; Fernandez-Llario P.; Gomendio M. Correlates of territoriality in rutting Red Deer. *Ethology*. 1996. 102, 793–805. doi.org/10.1111/j.1439-0310.1996.tb01201.x
22. Caslini C.; Comin A.; Peric T.; Prandi A.; Pedrotti L.; Mattiello S. Use of hair cortisol analysis for comparing population status in wild red deer (*Cervus elaphus*) living in areas with different characteristics. *Eur. J. Wildl. Res.* 2016. 62, 713–723. DOI 10.1007/s10344-016-1049-2
23. Cassidy A.M. The Relationship between Behaviour and Adrenocortical Response to Administration of Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) in Farmed Red Deer (*Cervus elaphus*). Master's Thesis, University of Otago, Dunedin, New Zealand, 1996.
24. Catanese F.; Obelar M.; Villalba J.J.; Distel R.A. The importance of diet choice on stress-related responses by lambs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2013, 148, 37–45. doi.org/10.1016/j.applanim.2013.07.005
25. Chapple S.; English A.W.; Mulley R.C.; Lephherd E.E. Haematology and serum biochemistry of captive unsedated chital deer (*Axis axis*) in Australia. *R J Wildl Dis.* 1991. 27(3), 396–406. doi.org/10.7589/0090-3558-27.3.396
26. Christ-Crain M. Vasopressin and Copeptin in health and disease. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2019. 20, 283–294. doi.org/10.1007/s11154-019-09509-9
27. Clinchy M.; Sheriff M.J.; Zanette L.Y. Predator-induced stress and the ecology of fear. *Oecologia*. 2013. 27(1), 56–65. doi.org/10.1111/1365-2435.12007
28. Cocimano M.; Leng R. Metabolism of urea in sheep. *Br. J. Nutr.* 1967. 21, 353–371. doi.org/10.1079/BJN19670037
29. Cockrem J.F. Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *Gen Comp Endocrinol.* 2013. 181, 45–58. doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.025
30. Cook N.J. Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals can. *J Anim Sci.* 2012. 92, 227–59. doi.org/10.4141/cjas2012-045
31. Craig A.M.; Pearson M.S.; Meyer C.; Schmitz J.A. Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed *Senecio jacobaea* toxicosis. *Am. J. Vet. Res.* 1991. 52, 1969–1978. doi.org/10.2460/ajvr.1991.52.12.1969

32. Czyżowski P.; Karpiński M.; Drozd L.; Goleman M.; Sykut M. The use of body mass analysis and creatinine level in assessing the condition of individual farm fallow deer. *Med. Vet.* 2013. 69 (5), 294–297.
33. Dallman M.F.; Akana S.F.; Cascio C.S.; Darlington D.N.; Jacobson L.; Levin N. Regulation of ACTH secretion: Variations on a theme of B. *Recent Prog. Horm. Res.* 1987. 43, 113–173. doi.org/10.1016/B978-0-12-571143-2.50010-1
34. De Kloet E.R.; Sibug R.M.; Helmerhorst F.M.; Schmidt M. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005. 29(2), 271–281. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.10.008
35. Dehnhard M.; Clauss M.; Lechner-Doll M.; Meyer H.H.D.; Palme R. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites. *Gen Comp Endocrinol.* 2001. 123(1), 111–20. doi.org/10.1006/gcen.2001.7656
36. De la Peña E.; Barja I.; Carranza J. Social environment with high intrasexual competition enhances the positive relationship between faecal testosterone and cortisol metabolite levels in red deer. *Mamm. Biol.* 2021. 101, 207–215. doi.org/10.1007/s42991-021-00100-x
37. DelGiudice G.D.; Seal U.S. Classifying winter undernutrition in deer via serum and urinary urea nitrogen. *Wildl. Sue Bull.* 1988, 16, 27–32. www.jstor.org/stable/3782348
38. Dhabhar F.S. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res.* 2014. 58, 193–210. doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0
39. Díaz E.A.; Donoso G.; Sáenz C.; Dueñas I.; Cabrera F. Clinical and pathological findings in a Dwarf Red Brocket *Mazama rufina* (Mammalia: Cetartiodactyla: Cervidae) attacked by dogs. *Journal of Threatened Taxa.* 2020. 12(13), 16885–16890. doi.org/10.11609/jott.5552.12.13.16885-16890
40. Dickens M.J.; Romero L.M. A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013. 191, 177–189. doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.014
41. Dz.U. 2001 Nr 43, poz. 488. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 10 kwietnia 2001 r. w sprawie ustalenia listy gatunków zwierząt łownych oraz określenia okresów polowań na te zwierzęta.

42. Dz.U. 2023 poz. 1082. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 17 kwietnia 2023 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy - Prawo łowieckie.
43. Dziki-Michalska K.; Tajchman K.; Kowalik S.; Bogdaszewski M. Relationship between plasma cortisol level and bodyweight and antler size in farmed fallow deer. *South African Journal of Animal Science*. 2021. 51(3), 355-367. DOI: 10.4314/sajas.v51i3.9
44. Dziki-Michalska K.; Tajchman K.; Kowalik S. Physiological response of roe deer (*Capreolus capreolus*) during stalking hunts depending on age. *BMC Vet. Res.* 2023. 19, 266. doi.org/10.1186/s12917-023-03833-8
45. Dziki-Michalska K.; Tajchman K.; Kowalik S.; Wójcik M. The Levels of Cortisol and Selected Biochemical Parameters in Red Deer Harvested During Stalking Hunts. *Animals* 2024a. 14, 1108. doi.org/10.3390/ani14071108
46. Dziki-Michalska K.; Tajchman K.; Staniszevska P.; Strachecka A. Comparison of Cortisol Levels in the Hair of Male European Roe Deer at the Beginning and End of the Stalking Hunting Season. *Animals* 2024b. 14, 3184. doi.org/10.3390/ani14223184
47. Ensminger D.C.; Pritchard C.; Langkilde T.; Gingery T.; Banfield J.E.; Walter W.D. The influence of hunting pressure and ecological factors on fecal glucocorticoid metabolites in wild elk. *Wildl. Biol.* 2020. 2020, 2, 1-7. doi.org/10.2981/wlb.00683
48. FAWC, 2014. Five Freedoms. Farm Animal Welfare Council, <http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm> (dostęp z dnia 3.03.2025)
49. Feng S.; Wu S.; Xie F.; Yang C.S.; Shao P. Natural compounds lower uric acid levels and hyperuricemia: Molecular mechanisms and prospective. *Trends Food Sci. Technol.* 2022. 123, 87–102. doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.002
50. Fennessy P.F.; Thompson J.M.; Suttie J.M. Season and growth strategy in red deer: evolutionary implications and nutritional management. In: Renecker L.A, Hudson R.J, editors. *Wildlife Production: Conservation and Sustainable Development*. Fairbanks, Alaska: AFES Miscellaneous Publications 91 – 6, University of Alaska; 1991. 495–501.

51. Filacorda S.; Comin A.; Franchini M.; Frangini L.; Pesaro S.; Pezzin E.N.; Prandi A. Cortisol in hair: Do habitat fragmentation and competition with golden jackal (*Canis aureus*) measurably affect the long-term physiological response in European wildcat (*Felis silvestris*)? *Ann. Zool. Fennici*. 2021. 59, 1–16. doi.org/10.5735/086.059.0101
52. Fitte A. Determination of the Pathophysiological Consequences of Capture and Capture-Induced Hyperthermia in Blesbok. Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa, 2017. Available online: [https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/60285/Fitte\\_Determination\\_2017.pdf?sequence=1](https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/60285/Fitte_Determination_2017.pdf?sequence=1) (accessed on 28 February 2024).
53. Forsunld K.B.; Ljungvall O.A.; Jones B.V.; Low cortisol levels in blood from dairy cows with ketosis: a field study. *Acta Vet Scand*. 2010. 52, 31. doi.org/10.1186/1751-0147-52-31
54. Foster L.B.; Dunn R.T.; Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma. *Clin Chem*. 1974. 20, 365–368. doi.org/10.1093/clinchem/20.3.365
55. Fourie N.H.; Jolly C.J.; Phillips-Conroy J.E.; Brown J.L.; Bernstein R.M. Variation of hair cortisol concentrations among wild populations of two baboon species (*Papio anubis*, *Papio hamadryas*) and a population of their natural hybrids. *Primates*. 2015. 56, 259–272. doi.org/10.1007/s10329-015-0469-z
56. Fourie F.; le Ouwerkerk R.M.T. The effect of stress and season on some Haematological and Biochemical parameters of three antelope species in the Kalahari Gemsbok National Park. *Supplement to Koedoe*. 1984. 295–305. doi.org/10.4102/koedoe.v27i2.587
57. Franchini M.; Peric T.; Frangini L.; Prandi A.; Comin A.; Rota M.; Filacorda S. You're stressing me out! Effect of interspecific competition from red deer on roe deer physiological stress response. *J. Zool*. 2023. 320, 63–74. doi.org/10.1111/jzo.13058
58. Freedman D.S.; O'Brien T.R.; Flanders W.D.; DeStefano F.; Barboriak J.J. Relation of serum testosterone levels to high density lipoprotein cholesterol and other characteristics in men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1991. 11, 307–315. DOI: 10.1161/01.atv.11.2.307

59. Garber P.A.; McKenney A.; Bartling-John E.; Bicca-Marques J.C.; De la Fuente M.F.; Abreu F.; Schiel N.; Souto A.; Phillips K.A. Life in a harsh environment: the effects of age, sex, reproductive condition, and season on hair cortisol concentration in a wild non-human primate. *Peer J.* 2020;8:e9365. doi.org/10.7717/peerj.9365
60. Gaspar-López E.; Landete-Castillejos T.; Estevez J.A.; Ceacer O.F.; Gallego L.; García L.A. Biometrics, Testosterone, Cortisol and Antler Growth Cycle in Iberian Red Deer Stags (*Cervus elaphus hispanicus*). *Reprod Domest Anim.* 2010. 45(2), 243-9. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01271.x
61. Gentsch R.P.; Kjellander P.; Röken B.O. Cortisol response of wild ungulates to trauma situations: Hunting is not necessarily the worst stressor. *Eur. J. Wildl. Res.* 2018. 64, 11. doi.org/10.1007/s10344-018-1171-4
62. Glantzounis G.K.; Tsimoyiannis E.C.; Kappas A.M.; Galaris D.A. Uric acid and oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.* 2005. 11, 4145–4151. doi.org/10.2174/138161205774913255
63. Główny Urząd Statystyczny. Rocznik statystyczny leśnictwa. 2024. www.stat.gov.pl (udostępniono 30 listopada 2024).
64. Goddard P.J.; Keay G.; Grigor P.N. Lactate dehydrogenase quantification and isoenzyme distribution in physiological response to stress in red deer (*Cervus elaphus*). *Res Vet Sci.* 1997. 63, 119–22. doi.org/10.1016/S0034-5288(97)90003-5
65. Gutai J.; Laporte R.; Kuller L.; Dai W.; Falvo-Gerard L.; Caggiula A. Plasma testosterone, high density lipoprotein cholesterol and other lipoprotein fractions. *Am. J. Cardiol.* 1981. 48, 897–902. doi.org/10.1016/0002-9149(81)90356-8
66. Handa R.J.; Weiser M.J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Front. Neuroendocrinol.* 2014. 35, 197–220. DOI: 10.1016/j.yfrne.2013.11.001
67. Harms N.J.; Elkin B.T.; Gunn A.; Tracz B.; Adamczewski J.; Flood P.; Leighton F.A. Serum biochemistry and serum cortisol levels of immobilized and hunted muskoxen (*Ovibos moschatus*) from northern Canada. *Arctic* 2012. 1, 401–410. DOI: 10.14430/arctic4238

68. Hart K.A.; Wochele D.M.; Norton N.A.; McFarlane D.; Wooldridge A.A.; Frank N. Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 2016. 30, 653–663. DOI: 10.1111/jvim.13839
69. He L.; Wang W.X.; Li L.H.; Liu B.Q.; Liu G.; Liu S.Q.; Qi L.; Hu D.F. Effects of crowding and sex on fecal cortisol levels of captive forest musk deer. *Biol Res.* 2014. 47–8. doi.org/10.1186/0717-6287-47-48
70. Heimbürge S.; Kanitz E.; Otten W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2019. 1, 10–17. DOI: 10.1016/j.ygcen.2018.09.016
71. Henke S.E.; Demarais S. Effect of diet on vitreous humor and serum in black-tailed jackrabbits. *Tex. J. Agric. Nat. Resour.* 2016. 14, 13–20.
72. Hillman J.R.; Davis R.W.; Abdelbaki Y.Z. Cyclic bone remodeling in deer. *Calcif Tissue Res.* 1973. 2, 323–30. doi.org/10.1007/BF02013745
73. Hoem S.A.; Melis C.; Linnell J.D.C.; Reidar A. Fighting behaviour in territorial male roe deer *Capreolus capreolus*: The effects of antler size and residence. *Eur. J. Wildl. Res.* 2007. 53, 1–8. doi.org/10.1007/s10344-006-0053-3
74. Huber S.; Palme R.; Arnold W. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2003. 130, 48–54. doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00535-X
75. Ingram J.R.; Crockford J.N.; Matthews L.R. Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *J. Endocrinol.* 1999. 162, 289–300. <http://www.endocrinology.org> 0022-0795/99/0162-289
76. ISIS, International Species Information System. Reference Ranges for Physiological Data Values. *Clinical Pathology Records Report-ISIS/In House Reference Values Mammals.* 1999. Dostęp online: [www.worldzoo.org](http://www.worldzoo.org)
77. Kamphues J.; Wolf P.; Coenen M.; Eder K.; Iben C.; Kienzle E.; Liesegang A.; Männer K.; Zebeli Q.; Zentek J. *Supplemente zur Tierernährung; Schlütersche: Hannover, Germany.* 2014. 7–9.
78. Kaneko J.; Harvey J.; Bruss M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 6th Edition, Elsevier. 2008.

79. Karpiński M.; Czyżowski P.; Beeger S.; Flis M. Hematological and serum biochemical values of free-ranging Roe deer (*Capreolus capreolus*) in Poland. *Animals* 2023. 13, 242. doi.org/10.3390/ani13020242
80. Kawtikwar P.S.; Bhagwat D.A.; Sakarkar D.M. Deer antlers—Traditional use and future perspectives. *Indian J. Tradit. Knowl.* 2010. 9, 245–251.
81. Keogh M.J.; Thompson D.P.; Crouse J.A. Tracking reproductive events: Hoof growth and steroid hormone concentrations in hair and hoof tissues in moose (*Alces alces*). *Conserv. Physiol.* 2023. 11(1), coad097. doi.org/10.1093/conphys/coad097
82. Kleerekoper M.; Schiebinger R.; Gutai J.P.; Steroid therapy for adrenal disorders – getting the dose right. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997. 82, 3923–5. doi.org/10.1210/jcem.82.12.4473
83. Knowles T.G.; Edwards J.E.; Bazeley K.J.; Brown S.N.; Butterworth A.; Warriss P.D. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet Rec.* 2000. 147, 593–598. https://doi.org/10.1136/vr.147.21.593
84. Koolhaas J.M.; Bartolomucci A.; Buwalda B.; de Boer S.F.; Flugge G.; Korte S.M.; Meerlo P.; Murison R.; Olivier B.; Palanza P. et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011. 35(5), 1291–1301. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003
85. Koolhaas J.M.; Korte S.M.; De Boer S.F.; Van Der Vegt B.J.; Van Reenen C.G.; Hopster H.; De Jong I.C.; Ruis M.A.; Blokhuis H.J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999. 23(7), 925–35. doi.org/10.1016/s0149-7634(99)00026-3
86. Korzekwa A.J.; Kotlarczyk A.M. Artificial reproductive technology (ART) applied to female cervids adapted from domestic ruminants. *Animals.* 2021. 11, 2933. doi.org/10.3390/ani11102933
87. Kotlarczyk A.M.; Grzyb M.; Korzekwa A.J. Regulation of uterine function during estrous cycle, anestrus phase and pregnancy by steroids in red deer (*Cervus elaphus* L.). *Sci Rep.* 2021. 11:20109. doi.org/10.1038/s41598-021-99601-5

88. Kunkel H.O.; Stokes D.K.; Anthony W.B.; Futrell M.F. Serum alkaline phosphatase activity in European and Brahman Breeds of Cattle and their crossbreed types. *J Anim Sci.* 1953. 12(4), 765–70. doi.org/10.2527/jas1953.124765x
89. Kuru M.; Kükürt A.; Oral H.; Öğün M. Clinical Use of Progesterone and Its Relation to Oxidative Stress in Ruminants. In: Drevensek G, editor. *Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases* 2018. doi.org/10.5772/intechopen.73311.
90. Küker S.; Huber N.; Evans A.; Kjellander P.; Bergvall U.A.; Jones K.L.; Arnemo J.M. Hematology, serum chemistry, and serum protein electrophoresis ranges for free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden. *J Wildl Dis.* 2015. 51(1), 269–73. doi.org/10.7589/2014-02-025.
91. Lavergne S.G.; Peers M.J.L.; Mastromonaco G.; Majchrzak Y.N.; Nair A.; Boutin S.; Boonstra R. Hair cortisol as a reliable indicator of stress physiology in the snowshoe hare: Influence of body region, sex, season, and predator–prey population dynamics. *Gen. Comp. Endo.* 2020. 294, 113471. doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113471
92. LeMaho Y.; Karmann H.; Briot D.; Handrich Y. Stress in birds due to routine handling and a technique to avoid it. *Am J Physiol.* 1992. 263, 775–81. doi.org/10.1152/ajpregu.1992.263.4.R775
93. Lieske C.L.; Beckmen K.B.; Lewis L.L. Physiological responses in Reindeer to the application of a conducted electrical weapon. *Hum-Wildl Interact.* 2018. 12(2), 160–70. digitalcommons.usu.edu/hwi
94. Lincoln G.A. The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *J. Zool.* 1971. 163, 105–123. doi.org/10.1111/j.1469-7998.1971.tb04527.x
95. López-Olvera J.R.; Marco I.; Montané J.; Casas-Díaz E.; Lavín S. Effects of acepromazine on the stress response in Southern Chamois (*Rupicapra pyrenaica*) captured by means of drive-nets. *Can J Vet Res.* 2007. 71, 41–51.
96. Malherbe J.C. Influence of Environmental and Individual Characteristics on Baseline Stress Levels, and Consequences in a Large Mammal, the Roe Deer *Capreolus capreolus*. Ecology, Environment. Ph.D. Thesis, Université Paul Sabatier, Toulouse, France. 2019.



97. Mamoulakis C.; Georgiadis G.; Fragkiadoulaki E. Urea. In Encyclopedia of Toxicology, 4th ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA. 2024. 685–692. ISBN 9780323854344.
98. Marco I.; Lavin S. Effect of the method of capture on the haematology and blood chemistry of red deer (*Cervus elaphus*). Res Vet Sci 66. 1999. 2, 81–84. doi.org/10.1053/rvsc.1998.0248
99. Martin L.B. Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. Gen. Comp. Endocrinol. 2009. 163, 70–76. doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.008
100. Martin J.G.A.; Réale D. Animal temperament and human disturbance: Implications for the response of wildlife to tourism. Behav. Process. 2008. 77, 66–72.
101. Mellor D.J.; Beausoleil N.J.; Littlewood K.E.; McLean A.N.; McGreevy P.D.; Jones B.; Wilkins C. The 2020 Five Domains Model: Including Human-Animal Interactions in Assessments of Animal Welfare. Animals 2020. 10, 1870. doi.org/10.3390/ani10101870
102. McCorkell R.B.; Woodbury M.R.; Adams G.P. Induction of ovarian follicular wave emergence in wapiti (*Cervus elaphus*). Theriogenology. 2008. 70(7), 1017-1023. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.030
103. Miller D.B.; O’Callaghan J.P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. Metabolis. 2002. 51, 5–10. doi.org/10.1053/meta.2002.33184
104. Miller W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr. Rev. 2010. 9, 295–318. doi.org/10.1210/edrv-9-3-295
105. Monfort S.L.; Mashburn D.V.K.L.; Brewer B.A.; Creel S.R. Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. J. Zoo Wildl. Med. 1998. 29, 129–133. https://www.jstor.org/stable/20095734
106. Montané J.; Marco I.; Manteca X.; López L.; Lavin S. Delayed acute capture myopathy in three roe deer. Journal of Veterinary Medicine Series A. 2002. 49(2), 93–98. doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.jv409.x
107. Montané J.; Marco I.; López-Olvera J.; Perpinán D.; Manteca X.; Lavín S. Effects of acepromazine on capture stress in roe deer (*Capreolus capreolus*). J Wildl Dis. 2003. 39(2), 375–86. doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.375

108. Mormède P.; Andanson S.; Aupérin B.; Beerda B.; Guémené D.; Malmkvist J.; Manteca X.; Manteuffel G.; Prunet P.; Van Reenen C.G.; Richard S. Veissier I. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate Animal Welfare. *Physiol Behav.* 2007. 92(3), 317–39. doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003
109. Morton D.J.; Anderson E.; Foggin C.M.; Kock M.D.; Tiran E.P. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Vet Rec.* 1995. 136(3), 60–3. doi.org/10.1136/vr.136.3.60
110. Möstl E.; Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2002. 23, 67–74. doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00146-7
111. Munerato M.S.; Marques J.A.; Caulkett N.A.; Tomás W.; Zanetti E.S.; Trovati R.G.; Pereira G.T.; Palme R. Hormonal and behavioural stress responses to capture and radio-collar fitting in free-ranging pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Anim Welf.* 2015. 24, 437–46. doi.org/10.7120/09627286.24.4.437
112. Mysterud A.; Bonenfant C.; Loe L.E.; Langvatna R.; Yoccoz N.G.; Stenseth N.C. Age-specific feeding cessation in male red deer during rut. *J. Zool.* 2008. 275, 407–412. doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00453.
113. Nieminen M.; Timisjärvi J. Blood composition of the reindeer. II. Blood chemistry. *Rangifer.* 1983. 3, 16–32. doi.org/10.7557/2.3.1.464
114. Norum J.K.; Lone K.; Linnell J.D.C.; Odden J.; Loe L.E.; Mysterud A. Landscape of risk to roe deer imposed by lynx and different human hunting tactics. *Eur. J. Wildl. Res.* 2015. 61, 831–840. doi.org/10.1007/s10344-015-0959-8
115. Nuvoli S.; Burrari G.P.; Secci F.; Columbano N.; Careddu G.M.; Mandas L.; Sanna M.A.; Pirino S.; Antuofermo E. Capture myopathy in a corsican red deer *Cervus elaphus corsicanus* (Ungulata: Cervidae), *Italian Journal of Zoology.* 2014. 8(3), 457-462. DOI: 10.1080/11250003.2014.942712
116. Palme R.; Robia C.; Messmann S.; Hofer J.; Möstl E. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: A non-invasive parameter of adrenal function. *Wien Tierarztl. Monat.* 1999. 86, 237–241.
117. Paterson J. Capture myopathy, 171–179. In: West, G., D. Heard & N. Caulkett (eds). *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia.* 1st Edition. John Wiley and Sons, Ames, Iowa, 2014.

118. Pav J.; Zajiček D.; Dvorak M. Clinical examination of the blood of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) and fallow deer (*Dama dama* L.) naturally invaded by parasites (in Czech). *Vet Med (Praha)*. 1975. 20, 215–21. PMID: 809892
119. Pereira R.J.G., Barbanti Duarte J.M., Negrão J.A. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Theriogenology*. 2005. 63, 2113–2125. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.014
120. Pereira P.; Esteruelas N.F.; Nakamura M.; Rio-Maior H.; Krofel M.; Di Blasio A.; Zoppi S.; Robetto S.; Llaneza L.; García E. Hair cortisol concentration reflects the life cycle and management of grey wolves across four european populations. *Sci. Rep.* 2022. 12, 5697. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09711-x>
121. Poljičak-Milas N.; Slavica A.; Janicki Z.; Robić M.; Belić M.; Milinković-Tur S. Serum biochemical values in fallow deer (*Dama dama* L.) from different habitats in Croatia. *Eur. J. Wildl. Res.* 2004. 50, 7–12. doi.org/10.1007/s10344-003-0003-2
122. Prandi A.; Peric T.; Corazzin M.; Comin A.; Colitti M. A first survey on hair cortisol of an alpine ibex (*Capra ibex ibex*) population. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2018. 36, 57–74.
123. Ranabir S. Reetu K. Stress and hormones. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2011. 15, 18–22.
124. Rakic F.; Fernandez-Aguilar X.; Pruvot M.; Whiteside D.; Mastromonaco G.; Leclerc L.; Jutha N.; Kutz S. Variation of hair cortisol in two herds of migratory caribou (*Rangifer tarandus*): Implications for health monitoring. *Conserv. Physio.* 2023. 11, coad030. doi.org/10.1093/conphys/coad030
125. Reeder D.M.; Kramer K.M. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. *J Mammal.* 2005. 86, 225–235. doi.org/10.1644/BHE-003.1
126. Reinhardt V.; Cowley J.; Scheffler J.; Vertain R.; Wegner F. Cortisol response of female rhesus monkeys to venipuncture in homecage vs. venipuncture in restraint apparatus. *J Med Primatol.* 1990;19:601–6. [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2246780/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2246780/)
127. Reh binder C.; Edqvist L.E.; Lundström K.; Villafañe F. A field study of management stress in reindeer (*Rangifer tarandus* L.). *Rangifer.* 1982. 2, 2-21. doi.org/10.7557/2.2.2.404

128. Rehbinder C. Management stress in reindeer. *Rangifer*. 1990. 10(3), 267–88. doi.org/10.7557/2.10.3.868.
129. Renecker L.A.; Hudson R.J. Seasonal energy expenditures and thermoregulatory responses of moose. *Can. J. Zool.* 1986. 64, 322–327. doi.org/10.1139/z86-052
130. Richard E.; Gaillard J.M.; Saïd S.; Hamann J.L.; Klein F. High red deer density depresses body mass of roe deer fawns. *Oecologia* 2010. 163, 91–97. doi.org/10.1007/s00442-009-1538-z
131. Romero L.; Wingfield J. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in free-living pigeons. *J Comp Physiol B*. 2001. 171, 231–5. https://doi.org/10.1007/s003600000167
132. Rosef O.; Nystøyl H.L.; Solenes T.; Arnemo J.M. Haematological and serum biochemical reference values in free-ranging red deer (*Cervus elaphus atlanticus*). *Rangifer* 2004. 24, 79–85.
133. Rostal M.K.; Evans A.L.; Solberg E.J.; Arnemo J.M. Hematology and serum chemistry reference ranges of free-ranging moose (*Alces alces*) in Norway. *J Wildl Dis*. 2012. 48(3), 548–59. doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.548
134. Russell E.; Koren G.; Rieder M.; Van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*. 2012. 37, 589–601. doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009
135. Saltz D.; White G.C. Urinary cortisol and urea nitrogen responses to winter stress in mule deer. *J. Wildl. Manag.* 1991. 55, 1–16. doi.org/10.2307/3809235
136. Sapolsky R.M. *Stress, the aging brain and the mechanisms of Neuron Death*. Cambridge: MIT Press. 1992. 429. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588844/
137. Sapolsky R.M.; Romero L.M.; Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 2000. 21, 55–89. /doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389
138. Sasaki M.; Yamada J.; Endo H.; Kimura J.; Rerkamnuaychoke W.; Agungpriyono S.; Tsubota T.; Hayakawa D.; Kitamura N.; Fukuta K. Immunohistochemical detection of the steroidogenic enzymes and steroid receptors in the testis of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*). *Chulalongkorn Uni Fac of Vet Sc.* 2006. 66, 26–9. doi.org/10.1292/jvms.66.1463

139. Sems M.G.; Lochmiller R.L.; Qualls Jr. C.W.; Leslie Jr. D.M.; Clinical Blood Profiles of Stressed White-tailed Deer: Drop-net versus Harvest. Proceedings of the annual conference Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies. 1993. 47, 198–210.
140. Serrano E.; González F.J.; Granados J.E.; Moço G.; Fandos P.; Soriguer R.C.; Pérez J.M. The use of total serum proteins and triglycerides for monitoring body condition in the iberian wild goat (*Capra pyrenaica*). J. Zoo Wildl. Med. 2008. 39, 646–649. doi.org/10.1638/2007-0088.1
141. Sheriff M.J.; Dantzer B.; Delehanty B.; Palme R.; Boonstra R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. Oecologia. 2011. 166(4), 869–887. doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y
142. Shi D.; Bai L.; Qu Q.; Zhou S.; Yang M.; Guo S.; Li Q.; Liu C. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. Poult Sci. 2019. 98(6), 2405–2413. doi.org/10.3382/ps/pez026
143. Simeonova G.; Kalkanov I. Exertional rhabdomyolysis in a fallow deer (*Cervus dama*). Bulg. J. Vet. Med. 2020. 26, 295–304. DOI: 10.15547/bjvm.2352
144. Sirotkin A.V.; Oravcova M.; Slamec K.A.J.; Harrath A.H. Inter relationships between reproductive cycle, age, body weight and steroid hormones in roe deer females (*Capreolus capreolus*). Folia Zool. 2016. 65(1), 59–64. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900432744>
145. Soveri T.; Sankari S.; Nieminen M. Blood chemistry of reindeer calves (*Rangifer tarandus*) during the winter season. Comp. Biochem. Physiol. A 1992. 102, 191–196. doi.org/10.1016/0300-9629(92)90033-M
146. Spong G.; Gould N.P.; Sahlén E.; Cromsigt J.P.; Kindberg J.; DePerno C.S. Large-scale spatial variation of chronic stress signals in moose. PLoS ONE 2020. 15, e0225990. doi.org/10.1371/journal.pone.0225990
147. Storms D.; Aubry P.; Haman J.C.; Saïd S.; Fritz H.; Saint-Andrieux C.; Klein F. Seasonal variation in diet composition and similarity of sympatric red deer *Cervus elaphus* and roe deer *Capreolus capreolus*. Wildl. Biol. 2008. 14, 237–250. doi.org/10.2981/0909-6396(2008)14[237:SVIDCA]2.0.CO;2
148. Suttie J.M.; Fennessy P.F.; Lapwood K.R.; Corson I.D. Role of steroids in antler growth of red deer stags. J. Exp. Zool. 1995. 271, 120–130. doi.org/10.1002/jez.1402710207

149. Szabó A.; Nagy B.J.; Fébel H.; Romvári H.; Jónás D.; Mezőszentgyörgyi D.; Horn P. Clinical chemistry of farmed red deer (*Cervus elaphus*) yearling hinds reared on grass or papilionaceous pasture paddocks in Hungary. Arch. Anim. Breed. 2013, 56, 443–454. doi.org/10.7482/0003-9438-56-043
150. Schnare H.; Fischer K. Secondary sex characteristics and connected physiological values in male fallow deer (*Dama dama* L.) and their relationship to changes of the annual photoperiod: doubling the frequency. J Exp Zool. 1987. 244(3), 463–71. doi.org/10.1002/jez.1402440312
151. Tajchman K.; Czyżowski P.; Drozd L.; Karpiński M.; Wojtaś J. Sustainable game management as one of the determinants of the welfare of hunting animals. Journal of Animal Science, Biology and Bioeconomy. 2018. 36(1), 19–30. doi.org/10.24326/jasbbx.2018.1.2
152. Tajchman K.; Czyżowski P.; Drozd L.; Karpiński M.; Wojtaś J. Sustainable game management as one of the determinants of the welfare of hunting animals. Annales UMCS sectio EE Zoot. 2018. 36(1), 19-30. DOI: 10.24326/jasbbx.2018.1.2
153. Tajchman K.; Bogdaszewski, M.; Kowalczyk-Vasilev, E. Effects of supplementation with different levels of calcium and phosphorus on mineral content of first antler, bone, muscle, and liver of farmed fallow deer (*Dama dama*). Can. J. Anim. Sci. 2020. 100, 17–26. doi.org/10.1139/cjas-2018-0234
154. Tajchman K.; Ukalska-Jaruga A.; Bogdaszewski M.; Pecio M.; Janiszewski P. Comparison of the accumulation of macro- and microelements in the bone marrow and bone of wild and farmed red deer (*Cervus elaphus*). BMC Vet. Res. 2021. 17, 324. doi.org/10.1186/s12917-021-03041-2
155. Tajchman K.; Kowalik S.; Janiszewski P.; Licznarska K.; Bogdaszewski P. Basic haematological and biochemical parameters of farmed red deer and fallow deer. Med. Wet. 2023. 79, 286–290. DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.6775
156. Taylor-Brown A.; Booth R.; Gillett A.; Mealy E.; Ogbourne S.M.; Polkinghorne A.; Conroy G.C. The impact of human activities on Australian wildlife. PloS One. 2019. 14(1), e0206958. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206958
157. Tochigi M.; Umekage T.; Otani T.; Kato T.; Iwanami A.; Asukai N.; Sasaki T.; Kato N. Serum cholesterol, uric acid and cholinesterase in victims of the Tokyo subway sarin Poisoning: a relation with post-traumatic stress disorder. Neurosci Res. 2022. 44(3), 267–72. doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00146-3.

158. Topal A.; Gul N.Y.; Yanik K. Effect of Capture Method on Hematological and Serum Biochemical Values of Red Deer (*Cervus elaphus*) in Turkey. *J. Anim. Vet. Adv.* 2010. 9, 1227–1231.
159. Tsigos C.; Chrousos G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 2002. 53, 865–871. doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4
160. Uchwała Naczelnej Rady Łowieckiej nr 582 z dnia 15 lutego 2023 roku. [https://www.pzlow.pl/wp-content/uploads/2023/03/582-nowe-zasady-selekcji-populacyjnej-i-osobniczej\\_compressed.pdf](https://www.pzlow.pl/wp-content/uploads/2023/03/582-nowe-zasady-selekcji-populacyjnej-i-osobniczej_compressed.pdf)
161. Ursache O.; Chevrier L.; Blancou J.M.; Jaouen M. Value of haematological and biochemical parameters in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Rev Med Vet.* 1980. 131, 547–52.
162. Ventrella D.; Elmi A.; Barone F.; Carnevali G.; Govoni, N.; Bacci M.L. Hair Testosterone and Cortisol Concentrations in Pre- and Post-Rut Roe Deer Bucks: Correlations with Blood Levels and Testicular Morphometric Parameters. *Animals* 2018. 8(7), 113. doi.org/10.3390/ani8070113
163. Ventrella D.; Elmi A.; Bertocchi M.; Anibaldi C.; Parmeggiani A.; Govoni N.; Bacci ML. Progesterone and cortisol levels in blood and hair of wild pregnant red deer (*Cervus elaphus*) hinds. *Animals.* 2020. 10, 143. doi.org/10.3390/ani10010143
164. Vilela S.; Alves da Silva A.; Palme R.; Ruckstuhl K.E.; Sousa J.P.; Alves J. Physiological Stress Reactions in Red Deer Induced by Hunting Activities. *Animals.* 2020. 10(6), 1003. doi.org/10.3390/ani10061003
165. Villa L.; Gazzonis A.L.; Zanzani S.A.; Mazzola S.; Giordano A.; Manfredi M.T. Exploring alterations in hematological and biochemical parameters, enzyme actives and serum cortisol in Besnoitia besnoiti naturally infected dairy cattle. *Parasit Vectors.* 2021. 14, 154. doi.org/10.1186/s13071-021-04626-4
166. Wingfield J.C.; Romero L.M. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. In: McEwen BS (ed) *Handbook of physiology, section 7: the endocrine system. Coping with the environment: neural and endocrine mechanisms.* Oxford University Press, Oxford, 2001. 211–236.
167. Winnicka A. *Reference Values for Basic Laboratory Tests in Veterinary Medicine.* Publishing House SGGW: Warsaw, Poland, 2015.

168. Yi L.; Dalai M.; Su R.; Lin W.; Erdenedalai M.; Luvsantseren B.; Chimedtseren C.; Wang Z.; Hasi S. Whole-genome sequencing of wild Siberian musk deer (*Moschus moschiferus*) provides insights into its genetic features. BMC Genom. 2020. 21, 108.
169. Žele D.; Vengušt G. Biochemical indicators in serum of free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) in Slovenia. Acta Vet Brno. 2012. 81, 377–81. doi.org/10.2754/avb201281040377
170. <https://www.lubartow.lublin.lasy.gov.pl/> (dostęp online z dnia 28 lutego 2024 roku).
171. <https://www.meteoatlas.pl/polska/kozlowka> (dostęp z dnia 30 listopada 2023 roku)
172. <https://www.pzlow.pl/kalendarz-mysliwski/> (dostęp z dnia 5 stycznia 2024 roku)



# **Załączniki**

## **Załącznik 1**

### **Kopie opublikowanych prac**

## **Praca I**

**Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S.** 2023. Physiological response of roe deer (*Capreolus capreolus*) during stalking hunts depending on age. BMC Vet. Res. 19:266. DOI:10.1186/s12917-023-03833-8

Liczba punktów w roku publikacji: MNiSW = 140; IF=2,300

RESEARCH

Open Access



# Physiological response of roe deer (*Capreolus capreolus*) during stalking hunts depending on age

Katarzyna Dziki-Michalska<sup>1</sup>, Katarzyna Tajchman<sup>1\*</sup> and Sylwester Kowalik<sup>2</sup>

## Abstract

**Background** The European roe deer (*Capreolus capreolus*) is a species particularly reactive to all kinds of negative stimuli. Hunting activity is one of the most potent stressors that disturbs the welfare of wild animals. During stress, various endocrine responses are elicited to improve the physical performance of the affected individual. A commonly assessed hormone for overcoming stressful situations is cortisol (CORT). In this study, plasma CORT levels in roe deer were assessed during the season of the most intense stalking hunts in Poland (summer vs. late autumn), the sex of the harvested animals (males vs. females), and age of harvest animal. In addition, the health status of the roe doe was evaluated on the basis of selected indices of blood chemistry, which could be associated with circulating cortisol levels.

**Results** The mean cortisol levels were 58.066 ng/ml in the male group (summer) and 27.694 ng/ml in the female group (late autumn). Higher CORT levels were associated with a significantly lower of total cholesterol, lactate dehydrogenase, and uric acid ( $p < 0.05$ ). Moreover, the mean concentration of uric acid was negatively correlated with the level of CORT in the male and female groups ( $p < 0.05$ ). Together with the increase in mean CORT level, the HDL cholesterol of all the tested animals increased significantly ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions** Higher CORT in males during the summer than in females during the late autumn were most likely due to the arousal with the mating season. The level of CORT increased with the animals' age. Uric acid and age are both predictors of roe deer's serum CORT level.

**Keywords** *Capreolus capreolus*, Rapid stress response, Hormone response, Blood chemistry indices

\*Correspondence:

Katarzyna Tajchman  
katarzyna.tajchman@up.lublin.pl

<sup>1</sup>Department of Animal Ethology and Wildlife Management, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, Lublin 20-950, Poland

<sup>2</sup>Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, Lublin 20-033, Poland



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## Background

The European roe deer population is large (over 900.000 individuals in the 2021/22 season) [1], and it is a popular species for hunting in Poland (over 200.000 individuals shot in the 2021/22 season) [1]. In the face of situations perceived as a threat, its behavioral response includes increased vigilance, immobility, and escape. Vertebrates are sensitive to all kinds of stress stimuli, to which they show a neuroendocrine response. Reimosers' [2] research showed that the reactions of roe deer towards such stimuli were brief and strong, whereas red deer showed less obvious but persisting reactions. In addition, roe deer show greater impetuosity compared to other cervidae [3, 4]. Negative events, including both endogenous and exogenous stimuli, can activate an endocrine response, which includes the release of corticosteroid hormones from the adrenal cortex into the bloodstream. This enables the body to take quick action aimed at eliminating and avoiding the impact of the stimulus [5–7]. It is well-known that a short-term stressor has a mobilizing effect (e.g., escaping a predator, moving toward a refuge) on the body and is essential for survival in times of danger [8]. Cortisol (CORT) is one of the most common stress markers in animals. There are many ways to measure this hormone, including in saliva, blood, feces, urine, or hair [9]. However, with hair we can characterize only long-term stress [10, 11], and in feces only an integrated measurement over a certain amount of time of stressor reaction can be acquired; for roe deer, this can be 18 h [12] or 12 h [13]. The analysis of saliva and blood allows us to obtain reliable information to determine worsening short-term stress. However, collecting saliva from free-living animals is problematic because the effect of immobilization would likely increase the stress response [14–16]. A good method is rapid postmortem blood sampling, in which the CORT level reflects the severity of stress [7, 17–19]. The level of CORT in the bloodstream directly affects the blood's biochemical parameters, and these, in turn, reflect the animal's welfare state. Previous studies confirmed that exposure of an organism to acute stress negatively affects the immune system [20, 21], which in turn increases its susceptibility to various diseases [22]. Hunting is widely recognized as one of the most potent factors which causes repeated and long-term stress in animals [12]. Consequently, all such negative stimulators can affect their growth and development and thus transpose into their individual reproductive success [18–20, 23–25]. It is therefore vital that the subject of welfare is no longer considered only in the context of farm animals, but also applied to free-living animals, especially in relation to rationally conducted hunting management [17].

The results of the research that has been conducted on the seasonality of changes in CORT levels are divergent.

In cervids, increased CORT levels are typical in the winter [15, 24, 26–29]. However, recent reports indicate an increased concentration of this hormone in deer during the growth and mineralization of antlers, i.e., in early spring and late summer [30–32]. It is likely related to species differences and sensitivity to climatic factors [26]. The effects of sex and age on CORT levels and blood biochemistry remain unresolved. Comparative studies do not show a statistically significant difference in CORT levels between female and male deer [15, 26, 33–35]. It is presumed that negative environmental stimuli are more important for CORT fluctuations [17]. Moreover, some pathological conditions, such as the clinical and subclinical states of many diseases, affect the levels of CORT in ruminants [36–39]. Similarly, as shown previously, the differences in breeding conditions of farmed deer significantly influence a number of blood constituents and hormones [36]. Importantly, in all cases, the most commonly used methods of their detection are blood tests, e.g., the level of selected morphological and biochemical parameters.

Collective or individual hunting, as well as frequent presence of hunters on the hunting grounds, directly influences the intensity of the hormonal reaction in cervids [12], which may have a negative impact on their welfare. Bateson and Bradshaw [40] showed that hunting arrows cause physiological effects in red deer (*Cervus elaphus*), such as an increase in the level of markers of skeletal muscle damage and changes in the concentration of  $\beta$ -endorphin.

Active hunting events using hounds or involving large numbers of hunters generate a more intense endocrine reactions and metabolic demands on the body. Current research clearly shows that stalking is the least stressful deer hunting technique, where one well-aimed shot can result in the quick death of the animal [12, 17, 41], but there are few reports on its impact on roe deer, the species that is the least resistant to stress among game animals.

This research aimed to assess plasma CORT levels in roe deer (*Capreolus capreolus*) depending on: (1) the season of the most intense stalking hunts in Poland (summer vs. late autumn); (2) related to the hunting season sex of the harvested animals (males vs. females) related to the hunting season; and (3) the age of the harvested animals. In addition, the fourth aim was to evaluate several indices blood chemistry, which reflect the animal's general health and may be associated with the circulating level of cortisol.

## Results

Males had a mean carcass mass of 18.563 kg and were on average 2 years older than females, whose average carcass mass was 16.895. The mean CORT level in males

**Table 1** Carcass mass, age, and blood chemistry indices males and females roe deer

Indicator	Males (n = 16)		Females (n = 19)	
	M	SD	M	SD
CM [kg]	18.563	1.364	16.895	2.998
A [years]	5.813	2.104	3.632	1.300
CORT [ng/ml]	58.066	21.968	27.694	17.470
TCHOL [mg/dL]	61.750	12.741	65.000	15.173
HDLC [mg/dL]	21.063	7.007	17.074	8.528
TRIG [mg/dL]	185.938	71.207	200.474	58.229
LDH [U/L]	1181.250	878.189	6203.895	2402.976
UREA [mg/dL]	75.450	13.293	84.684	27.909
ALT [U/L]	236.487	180.672	342.126	232.615
URIC [mg/dL]	6.137	3.911	7.647	3.753
ALP [U/L]	135.163	173.385	141.416	86.453
TP [g/dL]	8.063	1.0626	8.053	1.079
HSA [g/dL]	3.750	0.4472	3.632	0.496

CM- carcass mass, A- age, CORT- cortisol, TCHOL- total cholesterol, HDLC- cholesterol HDL, TRIG- triglycerides, LDH- lactate dehydrogenase, UREA- urea, ALT- alanine aminotransferase, URIC- uric acid, ALP- alkaline phosphatase, TP- total protein, HSA- albumin, M-mean, SD- standard deviation

was 58.066 ng/mL, approximately 2 times higher than in females (27.694 ng/mL), but the lactate dehydrogenase (LDH) level was higher in females (6203.895 U/L) than in males (1181.250 U/L). There were no differences in the other blood chemical values between males and females, except for alanine aminotransferase (ALT) being higher in females (342.126 U/L) than in males (236.487 U/L) (Table 1).

The strength of the association between CORT and the blood chemistry was examined for all deer considering the data from both females and males. Mean total cholesterol (TCHOL) and LDH decreased significantly with increased CORT in plasma from all roe deer (respectively,  $r_s = -0.416, p=0.012$  and  $r_s = -0.381, p=0.024$ ), but mean cholesterol HDL (HDLC) increased significantly ( $r_s=0.445, p=0.007$ ). The mean uric acid (URIC)

**Table 3** Lack of association of the levels of blood chemistry indices with carcass mass and age of roe deer in total

Analyzed parameters	Carcass mass		Age	
	rs	p	rs	p
CORT [ng/ml]	-0.010	0.953	0.329	0.053
TCHOL [mg/dL]	0.099	0.572	-0.108	0.534
HDLC [mg/dL]	0.064	0.712	0.142	0.414
TRIG [mg/dL]	-0.231	0.181	-0.326	0.055
LDH [U/L]	-0.328	0.054	-0.449	0.006*
UREA [mg/dL]	0.106	0.542	-0.103	0.553
ALT [U/L]	-0.025	0.886	-0.028	0.872
URIC [mg/dL]	0.097	0.575	-0.156	0.368
ALP [U/L]	-0.274	0.111	-0.184	0.288
TP [g/dL]	0.161	0.355	0.035	0.838
HSA [g/dL]	0.071	0.685	-0.065	0.707

CORT- cortisol, TCHOL- total cholesterol, HDLC- cholesterol HDL, TRIG- triglycerides, LDH- lactate dehydrogenase, UREA- urea, ALT- alanine aminotransferase, URIC- uric acid, ALP- alkaline phosphatase, TP- total protein, HSA- albumin, rs- Spearman rank-order correlations, \* statistically significant values at  $p<0.05$

concentration was significantly negatively correlated with CORT levels in males ( $r_s = -0.767, p<0.001$ ) and females ( $r_s = -0.472, p=0.040$ ), and in all animals tested together ( $r_s = -0.618, p<0.001$ ) (Table 2).

The mean level of LDH decreased with increasing age ( $r_s = -0.449, p=0.006$ ) in the researched animals (Table 3).

There was no significant relationship between blood chemistry values, carcass mass and age in the male group (Table 4).

In the group of females, a significant decrease in mean alkaline phosphatase (ALP) concentration was noted with increased carcass mass ( $r_s = -0.576, p=0.009$ ) (Table 5).

In order to determine the influence of selected variables on the CORT concentration, a regression analysis was performed (Table 6). The resulting model was found to be a good fit to the data ( $F=13.024, p<0.001$ ). Statistically significant predictors in the model were both URIC

**Table 2** Association of cortisol and blood biochemistry in roe deer

Analyzed parameters	CORT					
	Males (n = 16)		Females (n = 19)		All animals (n = 35)	
	rs	p	rs	p	rs	p
TCHOL [mg/dL]	-0.446	0.082	-0.356	0.134	-0.416	0.012*
HDLC [mg/dL]	0.408	0.116	0.144	0.554	0.445	0.007*
TRIG [mg/dL]	-0.312	0.239	0.173	0.477	-0.079	0.650
LDH [U/L]	0.038	0.888	0.372	0.117	-0.381	0.024*
UREA [mg/dL]	-0.100	0.712	0.307	0.201	-0.005	0.973
ALT [U/L]	0.232	0.386	0.307	0.201	0.170	0.328
URIC [mg/dL]	-0.767	<0.001*	-0.472	0.040*	-0.618	<0.001*
ALP [U/L]	-0.382	0.143	0.008	0.971	-0.270	0.115
TP [g/dL]	-0.199	0.458	-0.367	0.121	-0.222	0.199
HSA [g/dL]	-0.375	0.151	-0.239	0.324	-0.152	0.382

CORT- cortisol, TCHOL- total cholesterol, HDLC- cholesterol HDL, TRIG- triglycerides, LDH- lactate dehydrogenase, UREA- urea, ALT- alanine aminotransferase, URIC- uric acid, ALP- alkaline phosphatase, TP- total protein, HSA- albumin, rs- Spearman rank-order correlations, \* statistically significant values at  $p<0.05$

**Table 4** Association of the levels of blood chemistry indices and carcass mass and age of males

Analyzed parameters	Carcass mass		Age	
	rs	p	rs	p
CORT [ng/ml]	-0.229	0.393	0.056	0.834
TCHOL [mg/dL]	0.161	0.549	0.202	0.452
HDLCHOL [mg/dL]	-0.077	0.775	-0.190	0.480
TRIG [mg/dL]	-0.112	0.678	-0.251	0.346
LDH [U/L]	-0.161	0.551	0.208	0.438
UREA [mg/dL]	0.441	0.087	0.380	0.146
ALT [U/L]	-0.406	0.118	0.091	0.737
URIC [mg/dL]	0.112	0.678	0.148	0.586
ALP [U/L]	0.364	0.165	0.146	0.589
TP [g/dL]	-0.134	0.620	0.147	0.584
HSA [g/dL]	-0.145	0.591	-0.126	0.639

CORT- cortisol, TCHOL- total cholesterol, HDLC- cholesterol HDL, TRIG- triglycerides, LDH- lactate dehydrogenase, UREA- urea, ALT- alanine aminotransferase, URIC- uric acid, ALP- alkaline phosphatase, TP- total protein, HSA- albumin, rs- Spearman rank-order correlations, \* statistically significant values at  $p < 0.05$

**Table 5** Relationship between blood chemistry indices, carcass mass, and age of females

Analyzed parameters	Carcass mass		Age	
	rs	p	rs	p
CORT [ng/ml]	-0.253	0.295	-0.052	0.829
TCHOL [mg/dL]	0.124	0.611	-0.232	0.339
HDLC [mg/dL]	-0.069	0.777	0.067	0.786
TRIG [mg/dL]	-0.281	0.244	-0.317	0.186
LDH [U/L]	-0.108	0.660	-0.153	0.532
UREA [mg/dL]	0.094	0.700	-0.290	0.227
ALT [U/L]	0.254	0.292	0.222	0.359
URIC [mg/dL]	0.227	0.350	-0.116	0.635
ALP [U/L]	-0.576	0.009*	-0.431	0.066
TP [g/dL]	0.288	0.232	-0.003	0.987
HSA [g/dL]	0.101	0.680	-0.095	0.699

CORT- cortisol, TCHOL- total cholesterol, HDLC- cholesterol HDL, TRIG- triglycerides, LDH- lactate dehydrogenase, UREA- urea, ALT- alanine aminotransferase, URIC- uric acid, ALP- alkaline phosphatase, TP- total protein, HSA- albumin, rs- Spearman rank-order correlations, \* statistically significant values at  $p < 0.05$

**Table 6** The influence of selected predictors on the level of cortisol in roe deer

Chosen predictors	CORT			
	B	$\beta$	t	p
Word free	44.678		4.427	< 0.001
URIC	-3.511	-0.547	-4.164	< 0.001*
A	4.608	0.376	2.865	0.007*

F,  $R^2$ , p, B,  $\beta$  – linear regression analysis coefficients, CORT- cortisol, URIC – uric acid, A- age

( $\beta = -0.547$ ,  $p < 0.001$ ) and age (A) ( $\beta = 0.376$ ,  $p = 0.007$ ). The higher the URIC value, the lower the CORT level (assuming that the second variable did not change) and the CORT level increased with increasing A (assuming that the second variable did not change). Such an analysis

can be treated as a predictive model. If the URIC concentration increases by one unit, the CORT concentration decreases by 3.511 units (assuming the second variable remains the same). In addition, if age increases by one unit, the CORT value increases by 4.608 units (assuming the other variable remains the same).

## Discussion

### Season of the stalking hunts and sex of the roe deer

In Poland, the most intense roe deer stalking hunting period is in August and November. Due to the Polish Hunting Law, the sex of hunted animals is dependent on the season because male deer may be hunted in summer only, while females may only be hunted in autumn. Season and sex will certainly have an effect on serum CORT levels in animals. The higher level of CORT in males obtained in summer compared to females in autumn is probably due to the occurrence of estrus and the ensuing increased activity in defending their territory and following females, because earlier studies have not shown a relationship between the level of CORT and the sex of cervids [15, 17, 26, 33–35]. On the other hand, it was shown that it was in the period of reproductive quiescence, during which new antler growth and rapid weight gain occur, that higher mean plasma CORT levels were obtained [41]. Some authors [15, 26, 33, 35] have shown that high CORT levels are typical of cervidae in the late autumn and winter. However, the biology of roe deer differs from other species of cervids, because their antlers grow in winter and their mating season occurs in summer, which can both affect CORT levels. Results of studies on roe deer have been similar to those obtained in studies on *Rangifer tarandus* [41], *Axis axis* [42], and *Ozotoceros bezoarticus* [43]. However, Gentsch et al. [17] noted lower mean CORT values in their research on roe deer harvested by stalking hunts. Moreover, the same author [17] found in non-stressed roe deer ( $13.63 \text{ nmol/L} \pm 2.43$  as reference values) the levels of CORT were 13 times lower compared to males and 6 times lower compared to females. Male CORT level was similar to roe deer harvested by battue, but female CORT value was higher than roe deer harvested by stalking hunts but lower than roe deer harvested by hunting with dogs [17]. On the other hand, the observed CORT levels in the study by Montané et al. [44] in *Capreolus capreolus* under capture stress were similar to females in our study. However, it should be emphasized that the level of CORT also depends on the characteristics of the behavior of individual animals. Shy or reactive individuals generally respond by expressing higher hypothalamic–pituitary–adrenal axis reactivity (i.e., a higher plasma corticosterone response and body temperature) but lower testosterone activity, characteristic of individuals with low activity and low aggression levels and that are less willing to take risks [3, 45].

Often, the reaction to stress is also a trait related to species, physiological state, living environment, or personality [46]. In studies on roe deer, the range and variability of samples were large, which suggests that the reactivity of a given individual, i.e., individual resistance to stress and the duration of time the subject was exposed to the stimulus, was responsible for the level of the hormone release and may also be an individual trait.

#### Blood chemistry indices vs. cortisol level

It is known that stress has a direct impact on animal health, which can be reflected in the levels of blood chemistry measures [46]. In addition, the level of CORT tested also depends on the general state of health, as previously mentioned. The biochemical parameters results obtained by us and the veterinarian's postmortem inspection did not indicate any pathological conditions in the researched roe deer. When assuming as reference the values obtained from roe deer harvested in the same area but outside the hunting season males obtained during stalking hunts showed 16% higher TCHOL, 11% UREA, 70% ALT and 27% total protein (TP); while in females higher by 20% TCHOL, 20% UREA, 79% ALT and 27% TP [47]. Mean level LDH and TP in the studied roe deer were higher also than those obtained in the study by Montané et al. [44] in *Capreolus capreolus* under capture stress. Mean ALT concentration was lower but urea was similar to roe deer without the effects of sedatives [44, 46]. The concentration of ALP was comparable to that reported by Žele and Vengušt [46] in shot roe deer and by Montané et al. [44] in captured roe deer. Mean serum albumin (HAS) concentration was slightly higher than the values reported by Ursache et al. [48] in captured deer and by Pav et al. [49] and Žele and Vengušt [46] in shot roe deer. The obtained mean values of blood chemistry in roe deer were noticeably higher than in *Alces alces* [50] or *Axis axis* [33], but lower than in *Cervus elaphus* [51]. Variation in these measures may result not only from changes in blood cortisol level, but also from a general sensitivity and the influence of the climate where the tested animals live [12]. These conditions can impact blood chemistry and metabolic pathways, undermining immunological vigor and increasing the risk for infectious disease. Therefore, both a deficiency and an excess of CORT have negative effects on the physiological condition of animals [52, 53].

In studies on roe deer, a negative correlation between TCHOL and CORT was demonstrated, while in all animals tested, the HDLC concentration was high. High cholesterol levels in cervids may lead to cardiovascular diseases [54]. Moreover, TCHOL has a crucial role in cellular and intracellular membranes, which might influence cellular functions in key organs, including the brain. It has been observed that TCHOL level might influence

serotonin function [55]. Steroid hormones, including testosterone, progesterone, and estrogens, are also synthesized from cholesterol at the biochemical level [56, 57], which in turn is closely related to reproductive success and the formation of antlers in males [58], and to maintaining pregnancy in females [56]. Moreover, high glucocorticoid level is an important factor in stimulating bone tissue resorption and inhibiting the osteogenesis process [59, 60]. However, it should be emphasized that, for example, liver enzymes can be considered to be acute phase reactants and the levels of some lipids, such as triglycerides, also can change quickly.

The influence of various factors on the fluctuations of the TCHOL and URIC levels in the blood plasma of animals are not fully understood. It is known that serum concentrations of TCHOL are affected by emotional stressors, causing its concentration to increase significantly in the blood. In contrast, serum TCHOL may be decreased by depressive mood or aggression. A change of serum URIC has also been intensively studied as a factor that plays an important role as a stress marker [61, 62].

The high LDH concentration in the plasma of tested roe deer should not be surprising, because LDH is widely used as a marker to diagnose the cause and the site of tissue damage, and the animals were hunted. Previously, this parameter has also been used as a diagnostic criterion when monitoring myocardial infarction [63]. LDH is one of the most specific markers of skeletal muscle damage in animals; therefore, an increase in LDH activity in roe deer plasma may be a useful in vivo marker of post-shooting muscle damage [47, 64]. The activity of ALT, aspartate aminotransferase and LDH muscle enzymes has been reported to increase during capture and handling operations in stressed wild ungulates and animals suffering from capture myopathy, as a result of increased muscle cell permeability or cell damage [42, 65, 66]. Similarly, a gunshot wound might cause increased enzyme activity. Due to these factors, it is essential to consider the method of capture of the animals and how and when the blood is taken for analysis of biochemical composition [67]. However, it should be emphasized that both the endocrine and metabolic changes may have occurred simultaneously in response to the stress of being stalked, the pain of being shot, and the tissue damages associated with death.

The correlation between carcass mass (CM) and ALP in female deer is also noteworthy. It is well-known that higher levels of ALP are observed in young growing animals, which are mainly dependent on bone isoform, that exceed 50–60% of the entire amount of alkaline phosphatase [68]. Thus, two explanations for this result are possible: the female roe deer were younger than males, and it is highly probable that most of them were pregnant [69]. It is possible that the studied individuals could have been



pregnant, but we are not sure, because in roe deer, latent pregnancy is usually observed in its initial period [70].

#### Animal age vs. cortisol level

The studies conducted so far have not confirmed a relationship between CORT level and the age of cervids [15, 26, 33–36]. However, studies on farm fallow deer (*Dama dama*) have shown that older males have higher blood CORT levels, similar to these animals, with large changes in CORT level between analyzed periods and lower weight gain [32], which is confirmed by studies on wild roe deer. In addition, the specificity of the species and their living environment may affect CORT levels and thus the strength of the endocrine response [17, 45], which may explain the discrepancies in the results obtained by other authors.

#### Limitations

The analysis of blood samples from different hunting seasons and the association of the sex of the hunted animal with the hunting season limited the conclusions that can be drawn from our data. Additional research will be needed to provide a more complete context, especially given the complexity of the animals' stress reactions to stalking hunts.

#### Conclusions

To conclude, high mean CORT value in males during the summer period were most likely due to the mating season and the associated characteristic sexual behavior of the animals. The increase in CORT in the examined animals were associated with HDL cholesterol, while correlated with lower total cholesterol, lactate dehydrogenase, and uric acid in all the researched roe deer. High levels of lactate dehydrogenase may have been caused by tissue rupture after the shot. The level of the CORT increased with the animals' age, and increased carcass mass was linked with decreased alkaline phosphatase in females. Two of the stronger predictors of CORT levels in roe deer were age and uric acid concentrations. However, the conclusions need to be extended by further studies.

#### Methods

##### Study design

Roe deer were harvested during the hunting period in accordance with the principles of population and individual selection of game animals in Poland (Hunting Law, Annex to Resolution No. 57/2005 of February 22, 2005) during stalking hunts in the Lubartów forest district, central Poland (51° 27' N, 22° 29' E). The region has 24.9% forest cover, 49% of the area is coniferous, and 38% is mixed forests with deciduous species [71].

#### Sampling

Blood samples were collected immediately after shooting from 16 males in August and 19 females in November, due to the fact that in Poland, roe deer are hunted during two periods only: males from May 11th to the end of September and females from September 1st to January 15th (Journal of Laws No. 43, item 488). Blood was collected from the jugular vein (*vena jugularis externa*) into 10 mL vacuum tubes with EDTA anticoagulant (BD Vacutainer, No. ref. 367,525), which cooled (4–8 °C) within 15 min of collection. Blood samples contaminated by rumen, stomach, or intestinal contents were discarded. The plasma for analysis was obtained by centrifugation of whole blood at 3000 rpm for 10 min in an MPW-350R laboratory centrifuge (MPW Medical Instruments, Warsaw, Poland) at a temperature of 4 °C. Centrifuged plasma was frozen at -25 °C until testing. CORT level was determined by enzyme immunoassay (Immulite 2000 Cortisol, Siemens, UK) according to the manufacturer's recommended protocol. Selected biochemical parameters (total cholesterol (TCHOL), HDL cholesterol (HDLC), triglycerides (TRIG), lactate dehydrogenase (LHD), urea (UREA), alanine aminotransferase (ALT), uric acid (URIC), alkaline phosphatase (ALP), total protein (TP), and albumin (HSA) were determined with an automated spectrophotometric system (Chemical Autoanalyzer BS-120, Mindray, Shenzhen, China).

The age (A) of the animals was determined posthumously by their dentition using the Eidelman method. This involves assessing the dentin layers deposited in the canal of the incisors of the first I1 pair, and the characteristic features indicate the stage of development and permanent replacement of deciduous teeth [72]. Carcass mass (CM) (without guts) was determined after the animal was shot and after evisceration at a game collection point.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistica 9.1 package. The results are expressed as the mean value and standard deviation of the variables. The level of CORT with the level of biochemical parameters for each separate group was then compared using Spearman's rank order. Then, using the same method, correlations between the carcass mass of harvested animals and the CORT level and biochemical parameters were calculated. Equivalent calculations were used for the relationship between the age of roe deer and the CORT levels and blood chemistry values. The effect of animal age and uric acid concentration on CORT levels was assessed by multivariate linear regression analysis. The results of all correlations were estimated at a significance level of  $p < 0.05$ . Due to bias related to the period of sampling, we



## abstained from statistical significance tests comparing data of males versus females.

### Abbreviations

CORT	cortisol
TCHOL	total cholesterol
HDLC	cholesterol HDL
TRIG	triglycerides
LDH	lactate dehydrogenase
UREA	urea
ALT	alanine aminotransferase
URIC	uric acid
ALP	alkaline phosphatase
TP	total protein
HSA	albumin
A	age
CM	carcass mass

### Acknowledgements

The authors thank the employees of the Lubartów Forest District for their help during collected samples.

### Author contributions

All authors have read and approved the manuscript. KDzM undertook literature search, clinical studies, experimental studies and data acquisition. KDzM, KT, SK conceptualised and designed the study, interpreted the results, prepared and edited the manuscript. KDzM, SK collected samples, performed the experiments. KDzM, KT conceptualised the study and reviewed the final manuscript.

### Funding

Department of Animal Ethology and Wildlife Management, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin financed laboratory determinations in roe deer tissues.

### Data Availability

The datasets used and analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

Ethical review and approval does not apply for this study, due to roe deer (*Capreolus capreolus*) were harvested during the hunting period in accordance with the principles of population and individual selection of game animals in Poland (Polish Hunting Law, Annex to Resolution No. 57/2005 of February 22, 2005). Therefore, the study has been granted an exemption from requiring ethics approval by the Animal Welfare Commission, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy at the University of Life Sciences in Lublin (according with document no. ZdsDZ/4/2022 from 15/07/2022).

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Received: 4 July 2022 / Accepted: 29 November 2023

Published online: 09 December 2023

### References

- Central Statistical Office. 2023. <https://stat.gov.pl/> Accessed 11 Jan. 2023.
- Reimoser S. Influence of anthropogenic disturbances on activity, Behavior and Heart Rate of Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*), in Context of their daily and yearly patterns. In: Cahler AA, Marsten JP, editors. Deer: Habitat, Behavior and Conservation. Nova Science Publishers; 2014. pp. 1–79.
- Bonnot N, Verheyden H, Blanchard P, Cote J, Debeffe L, Cargnelutti B, Klein F, Hewison AJM, Morellet N. Interindividual variability in habitat use: evidence for a risk management syndrome in roe deer? *Behav Ecol*. 2015;26(1):105–14. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru169>.
- Ranabir S, Reetu K, Stress. *Horm Indian J Endocrinol Metab*. 2011;15:18–22. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.77573>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3079864/>.
- Romero L, Wingfield J. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in free-living pigeons. *J Comp Physiol B*. 2001;171:231–5. <https://doi.org/10.1007/s003600000167>.
- Miller DB, O'Callaghan JP. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolis*. 2002;51:5–10. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.33184>.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecolog*. 2011;166:869–87. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>.
- Lieske CL, Beckmen KB, Lewis LL. Physiological responses in Reindeer to the application of a conducted electric AI weapon. *Hum-Wildl Interact*. 2018;12(2):160–70. [digitalcommons.usu.edu/hwi](https://doi.org/10.1007/s003600000167).
- Cook NJ. Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals can. *J Anim Sci*. 2012;92:227–59. <https://doi.org/10.4141/cjas2012-045>.
- Burnard C, Ralph C, Hynd P, Edwards JH, Tilbrook A. Hair cortisol and its potential value as a physiological measure of stress response in human and non-human animals. *Anim Prod Sci*. 2017;57:401–14. <https://doi.org/10.1071/AN15622>.
- Heimbürge S, Kanitz E, Otten W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen Comp Endocrinol*. 2019;270:10–7. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.09.016>.
- Vilela S, Alves da Silva A, Palme R, Ruckstuhl KE, Sousa JP, Alves J. Physiological stress reactions in red deer Induced by Hunting activities. *Animals*. 2020;10(6):1003. <https://doi.org/10.3390/ani10061003>.
- Dehnhard M, Clauss M, Lechner-Doll M, Meyer HHD, Palme R. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites. *Gen Comp Endocrinol*. 2001;123(1):111–20.
- LeMaho Y, Karmann H, Briot D, Handrich Y. Stress in birds due to routine handling and a technique to avoid it. *Am J Physiol*. 1992;263:775–81. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.263.4.R775>.
- Reinhardt V, Cowley J, Scheffler J, Vertain R, Wegner F. Cortisol response of female rhesus monkeys to venipuncture in homecage vs. venipuncture in restraint apparatus. *J Med Primatol*. 1990;19:601–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2246780/>.
- Camargo CMS, Duarte JMB, Fagliari JJ, Santana AM, Simplício KMMG, Santana AE, Santana SAE. Effect of sex and seasons of the year on hematologic and serum biochemical variables of captive brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) pesq. *Vet. Bras*. 2013;33(11):1364–70. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001100013>.
- Gentsch RP, Kjellander P, Röken BO. Cortisol response of wild ungulates to trauma situations: hunting is not necessarily the worst stressor. *Eur J Wildl Res*. 2018;64:11. <https://doi.org/10.1007/s10344-018-1171-4>.
- Morton DJ, Anderson E, Foggin CM, Kock MD, Tiran EP. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Vet Rec*. 1995;136(3):60–3. <https://doi.org/10.1136/vr.136.3.60>.
- Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate Animal Welfare. *Physiol Behav*. 2007;92(3):317–39. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>.
- Shi D, Bai L, Qu Q, Zhou S, Yang M, Guo S, Li Q, Liu C. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. *Poult Sci*. 2019;98(6):2405–13. <https://doi.org/10.3382/ps/pez026>.
- Garber PA, McKenney A, Bartling-John E, Bicca-Marques JC, De la Fuente MF, Abreu F, Schiel N, Souto A, Phillips KA. Life in a harsh environment: the effects of age, sex, reproductive condition, and season on hair cortisol concentration in a wild non-human primate. *Peer J*. 2020;8:e9365. <https://doi.org/10.7717/peerj.9365>.
- Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res*. 2014;58:193–210. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0>.
- Fennessy PF, Thompson JM, Suttie JM. Season and growth strategy in red deer: evolutionary implications and nutritional management. In: Renecker LA, Hudson RJ, editors. *Wildlife Production: Conservation and Sustainable*

- Development. Fairbanks, Alaska: AFES Miscellaneous Publications 91 – 6, University of Alaska; 1991:495–501.
24. Sapolsky RM. Stress, the aging brain and the mechanisms of Neuron Death. Cambridge: MIT Press; 1992. p. 429. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588844/>.
  25. Clinchy M, Sheriff MJ, Zanette LY. Predator-induced stress and the ecology of fear. *Oecologia*. 2013;27(1):56–65. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12007>.
  26. Huber S, Palme R, Arnold W. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen Comp Endocrinol*. 2003;130(1):48–54. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00535-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00535-X).
  27. Bubenik GA, Bubenik AB, Schams D, Leatherland JF. Circadian and circannual rhythms of LH, FSH, testosterone (T), prolactin, cortisol, T3 and T4 in plasma of mature, male white-tailed deer. *Comp Biochem Physiol*. 1983;76(1):37–45. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90289-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90289-X).
  28. Monfort SL, Brown JL, Wildt DE. Episodic and seasonal rhythms of cortisol secretion in male Eld's deer (*Cervus eldi thamin*). *J Endocrinol*. 1993;138(1):41–9. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1380041>.
  29. Balifanz F, Beiglböck CH, Huber S, Palme R, Arnold W. The influence of season, food intake and social rank on cortisol secretion in red deer (*Cervus elaphus*). European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, 6th Scientific Meeting, Budapest, Hungary. 2006 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001100013>.
  30. Gaspar-López E, Landete-Castillejos T, Estevez JA, Ceacero F, Gallego L, García AJ, Biometrics. Testosterone, Cortisol and Antler Growth cycle in Iberian red deer stags (*Cervus elaphus hispanicus*). *Reprod Domest Anim*. 2010;45(2):243–9. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01271.x>.
  31. Bartoš L, Bubenik GA. Relationships between rank-related behavior, antler cycle timing and antler growth in deer: behavioural aspects. *Anim Prod Sci*. 2011;51(4):303–10. <https://doi.org/10.1071/AN10195>.
  32. Dziki-Michalska K, Tajchman K, Kowalik S, Bogdaszewski M. Relationship between plasma cortisol level and bodyweight and antler size in farmed fallow deer. *S Afr J Anim Sci*. 2021;51(3):355–61. <https://doi.org/10.4314/sajas.v51i3.9>.
  33. Rehbindler C. Management stress in reindeer. *Rangifer*. 1990;10(3):267–88. <https://doi.org/10.7557/2.10.3.868>.
  34. Chapple S, English AW, Mulley RC, Lephred EE. Haematology and serum biochemistry of captive unsedated chital deer (*Axis axis*) in Australia. *J Wildl Dis*. 1991;27(3):396–406. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-27.3.396>.
  35. Küker S, Huber N, Evans A, Kjellander P, Bergvall UA, Jones KL, Arnemo JM. Hematology, serum chemistry, and serum protein electrophoresis ranges for free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden. *J Wildl Dis*. 2015;51(1):269–73. <https://doi.org/10.7589/2014-02-025>.
  36. Barrell GK. 2019. An Appraisal of Methods for Measuring Welfare of Grazing Ruminants. *Front. Vet. Sci*. 2019;6:289. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00289>.
  37. Villa L, Gazzonis AL, Zanzani SA, Mazzola S, Giordano A, Manfredi MT. Exploring alterations in hematological and biochemical parameters, enzyme actives and serum cortisol in *Besnoitia besnoiti* naturally infected dairy cattle. *Parasit Vectors*. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04626-4>. 14, 154.
  38. Forsunld KB, Ljungvall OA, Jones BV. Low cortisol levels in blood from dairy cows with ketosis: a field study. *Acta Vet Scand*. 2010;52:31. <http://www.actavetscand.com/content/52/1/31>.
  39. Tajchman K, Kowalik S, Janiszewski P, Licznarska K, Bogdaszewski P. Basic haematological and biochemical parameters of farmed red deer and fallow deer. *Vet Med*. 2023 (in press).
  40. Bradshaw EL, Bateson P. Welfare implications of culling red deer (*Cervus elaphus*). *Anim Welf*. 2000;9(1):3–24. [https://www.researchgate.net/publication/233661622\\_Welfare\\_Implications\\_of\\_Culling\\_Red\\_Deer\\_Cervus\\_Elaphus](https://www.researchgate.net/publication/233661622_Welfare_Implications_of_Culling_Red_Deer_Cervus_Elaphus).
  41. Bubenik GA, Hundertmark KJ. Accessory antlers in male Cervidae. *Z für Jagdwissenschaft*. 2002;48:10–21. <https://doi.org/10.1007/BF02285353>.
  42. He L, Wang WX, Li LH, Liu BQ, Liu G, Liu SQ, Qi L, Hu DF. Effects of crowding and sex on fecal cortisol levels of captive forest musk deer. *Biol Res*. 2014;47–8. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-48>. <https://biolres.biomedcentral.com/articles/>.
  43. Munerato MS, Marques JA, Caulkett NA, Tomás W, Zanetti ES, Trovati RG, Pereira GT, Palme R. Hormonal and behavioural stress responses to capture and radio-collar fitting in free-ranging pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Anim Welf*. 2015;24:437–46. <https://doi.org/10.7120/09627286.24.4.437>.
  44. Montané J, Marco I, López-Olvera J, Perpinán D, Manteca X, Lavín S. Effects of acepromazine on capture stress in roe deer (*Capreolus capreolus*). *J Wildl Dis*. 2003;39(2):375–86. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.375>.
  45. Ingram JR, Crockford JN, Matthews LR. Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and Yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *J Endocrinol*. 1999;162:289–300. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1620289>.
  46. Žele D, Vengušt G. Biochemical indicators in serum of free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) in Slovenia. *Acta Vet Brno*. 2012;81:377–81. <https://doi.org/10.2754/avb201281040377>.
  47. Karpiński M, Czyżowski P, Beegee S, Flis M. Hematological and serum biochemical values of free-ranging Roe deer (*Capreolus capreolus*) in Poland. *Animals* 2023;13:242. <https://doi.org/10.3390/ani13020242>.
  48. Ursache O, Chevrier L, Blancou JM, Jaouen M. Value of haematological and biochemical parameters in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Rev Med Vet*. 1980;131:547–52.
  49. Pav J, Zajiček D, Dvorak M. Clinical examination of the blood of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) and fallow deer (*Dama dama* L.) naturally invaded by parasites (in Czech). *Vet Med (Praha)*. 1975;20:215–21.
  50. Rostal MK, Evans AL, Solberg EJ, Arnemo JM. Hematology and serum chemistry reference ranges of free-ranging moose (*Alces alces*) in Norway. *J Wildl Dis*. 2012;48(3):548–59. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.548>.
  51. Marco I, Lavín S. Effect of the method of capture on the haematology and blood chemistry of red deer (*Cervus elaphus*). *Res Vet Sci* 66. 1999;2:81–4. <https://doi.org/10.1053/rvsc.1998.0248>.
  52. Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MA, Blokhuis HJ. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999;23(7):925–35. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3).
  53. Cockrem JF. Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;181:45–58. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.025>.
  54. Fourie F, le Ouwerkerk R. MT. The effect of stress and season on some Haematological and Biochemical parameters of three antelope species in the Kalahari Gemsbok National Park. Supplement to Koedoe. 1984;295–305. [https://www.researchgate.net/publication/47296204\\_The\\_effect\\_of\\_stress\\_and\\_season\\_on\\_some\\_Haematological\\_and\\_Biochemical\\_parameters\\_of\\_three\\_antelope\\_species\\_in\\_the\\_Kalahari\\_Gemsbok\\_National\\_Park/fulltext/57e9fb8f08ae113df5208dbb/The-effect-of-stress-and-season-on-some-Haematological-and-Biochemical-parameters-of-three-antelope-species-in-the-Kalahari-Gemsbok-National-Park.pdf](https://www.researchgate.net/publication/47296204_The_effect_of_stress_and_season_on_some_Haematological_and_Biochemical_parameters_of_three_antelope_species_in_the_Kalahari_Gemsbok_National_Park/fulltext/57e9fb8f08ae113df5208dbb/The-effect-of-stress-and-season-on-some-Haematological-and-Biochemical-parameters-of-three-antelope-species-in-the-Kalahari-Gemsbok-National-Park.pdf).
  55. Möstl E, Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;23:67–74. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(02\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00146-7).
  56. Sasaki M, Yamada J, Endo H, Kimura J, Rerkamnuaychoke W, Agungpriyono S, Tsubota T, Hayakawa D, Kitamura N, Fukuta. Immunohistochemical detection of the steroidogenic enzymes and steroid receptors in the testis of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*). *Chulalongkorn Uni Fac of Vet Sc*. 2006;66:26–9. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1463>.
  57. Kuru M, Kükürt A, Oral H, Ögün M. Clinical Use of Progesterone and Its Relation to Oxidative Stress in Ruminants. In: Drevensek G, edotor. *Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases* 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73311>.
  58. Schnare H, Fischer K. Secondary sex characteristics and connected physiological values in male fallow deer (*Dama dama* L.) and their relationship to changes of the annual photoperiod: doubling the frequency. *J Exp Zool*. 1987;244(3):463–71. <https://doi.org/10.1002/jez.1402440312>.
  59. Hillman JR, Davis RW, Abdelbaki YZ. Cyclic bone remodeling in deer. *Calcif Tissue Res*. 1973;2:323–30. <https://doi.org/10.1007/BF02013745>.
  60. Kleerekoper M, Schiebinger R, Gutai JP. Steroid therapy for adrenal disorders – getting the dose right. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3923–5. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.12.4473>.
  61. Tochigi M, Umekage T, Otani T, Kato T, Iwanami A, Asukai N, Sasaki T, Kato N. Serum cholesterol, uric acid and cholinesterase in victims of the Tokyo subway sarin Poisoning: a relation with post-traumatic stress disorder. *Neurosci Res*. 2022;44(3):267–72. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00146-3](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00146-3).
  62. Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des*. 2005;11(32):4145–51. <https://doi.org/10.2174/138161205774913255>.
  63. Kaneko J, Harvey J, Bruss M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th Edition, Elsevier. 2008.

64. Goddard PJ, Keay G, Grigor PN. Lactate dehydrogenase quantification and isoenzyme distribution in physiological response to stress in red deer (*Cervus elaphus*). *Res Vet Sci*. 1997;63:119–22.
65. Bender HS. Muscle. In: Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW, editors. *Veterinary Laboratory Medicine/Clinical Pathology*. 4th ed. Ames, IA: The Iowa State University Press; 2003. pp. 260–9.
66. López-Olvera JR, Marco I, Montané J, Casas-Díaz E, Lavín S. Effects of acepromazine on the stress response in Southern Chamois (*Rupicapra pyrenaica*) captured by means of drive-nets. *Can J Vet Res*. 2007;71:41–51.
67. Johnson D, Harms NJ, Larter NC, Elkin BT, Tabel H, Wei G. Serum biochemistry, serology, and parasitology of boreal caribou (*Rangifer tarandus caribou*) in the Northwest Territories, Canada. *J Wildl Dis*. 2010;46:1096–107.
68. Knowles TG, Edwards JE, Bazeley KJ, Brown SN, Butterworth A, Warriss PD. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet Rec*. 2000;147:593–8. <https://doi.org/10.1136/vr.147.21.593>.
69. Kunkel HO, Stokes DK, Anthony WB, Futrell MF. Serum alkaline phosphatase activity in European and Brahman Breeds of Cattle and their crossbreed types. *J Anim Sci*. 1953;12(4):765–70. <https://doi.org/10.2527/jas1953.124765x>.
70. Sirotkin AV, Oravcova M, Slamec KAJ, Harrath AH. Inter relationships between reproductive cycle, age, body weight and steroid hormones in roe deer females (*Capreolus capreolus*). *Folia Zool*. 2016;65(1):59–64. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900432744>.
71. <https://lubartow.lublin.lasy.gov.pl/> (Access 04/07/2022).
72. Brown WAB, Chapman NG. The dentition of fallow deer (*Dama dama*): a scoring scheme to assess age from wear of the permanent molariform teeth. *J Zool*. 1990;221(4):659–82. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1990.tb04023.x>.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.




## **Praca II**

**Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S., Wójcik M.** 2024. The levels of cortisol and selected biochemical parameters in red deer harvested during stalking hunts. *Animals* 14(7):1108. DOI: 10.3390/ani14071108

Liczba punktów w roku publikacji: MNiSW = 100; IF=2,700

## Article

# The Levels of Cortisol and Selected Biochemical Parameters in Red Deer Harvested during Stalking Hunts

Katarzyna Dziki-Michalska <sup>1</sup>, Katarzyna Tajchman <sup>1,\*</sup>, Sylwester Kowalik <sup>2,\*</sup> and Maciej Wójcik <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Ethology and Wildlife Management, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; katarzyna.michalska@up.lublin.pl

<sup>2</sup> Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

<sup>3</sup> Regional Directorate of the State Forests in Lublin, Czechowska 4, 20-950 Lublin, Poland; maciej.wojcik@lublin.lasy.gov.pl

\* Correspondence: katarzyna.tajchman@up.lublin.pl (K.T.); sylwester.kowalik@up.lublin.pl (S.K.)

**Simple Summary:** The period of intense stalking hunting is recognized as a strong stress factor for game animals. Therefore, the level of stress hormone—cortisol, as well as other selected biochemical parameters—was assessed in the blood plasma of male and female red deer (*Cervus elaphus*) harvested during stalking hunts. It has been shown that this hunting method has a similar impact on cortisol levels in both bulls and hinds, and age did not affect its magnitude. However, there was an increase in some biochemical parameters (HDL cholesterol, lactate dehydrogenase, and alanine aminotransferase) in the blood of hinds and (alkaline phosphatase, bilirubin, aspartate aminotransferase) in the blood of bulls. It was also found that an increase in the concentration of stress hormone contributes to a reduction in carcass weight, which may suggest that increased stress negatively affects the body condition of game animals. To sum up, stalking hunts cause stress in red deer, which is reflected in changes in the plasmatic level of cortisol and some biochemical blood parameters. An additional important aspect of this research is to draw attention to the need to improve hunting methods in order to minimize stress in game animals as much as possible.

**Abstract:** As a reactive species, the red deer is sensitive to both negative exogenous and endogenous stimuli. An intensive hunting period may have a particularly negative impact on game animals. The aim of this study was to determine the plasma cortisol level and biochemical parameters in 25 wild red deer (*Cervus elaphus*) harvested during stalking hunts in correlation with the sex and age of the animals. The mean cortisol concentrations in the stags and hinds analyzed in this study were similar (20.2 and 21.5 ng/mL, respectively). Higher HDL cholesterol values were found in the blood of the hinds than in stags ( $p < 0.05$ ). Similarly, the mean levels of LDL cholesterol, lactate dehydrogenase, and alanine aminotransferase were higher by 21%, 16%, and 42%, respectively, in the blood of the hinds. In contrast, the levels of alkaline phosphatase, bilirubin, and aspartate aminotransferase were higher in the stags (by 30%, 49%, and 36%, respectively). There was a negative correlation of the cortisol concentration with urea and bilirubin and a positive correlation between cortisol and aspartate aminotransferase in the stags ( $p < 0.05$ ). In turn, a negative correlation was found between the cortisol and urea levels in the hinds ( $p < 0.05$ ). In summary, the stress caused by stalking hunts and the characteristic behavior of red deer during the mating season had an impact on chosen biochemical parameters. The increased concentration of cortisol resulted in a decrease in the carcass mass, which may lead to the deterioration of the physical condition of animals on hunting grounds.

**Keywords:** *Cervus elaphus*; stress response; stress hormone; biochemical parameters



**Citation:** Dziki-Michalska, K.; Tajchman, K.; Kowalik, S.; Wójcik, M. The Levels of Cortisol and Selected Biochemical Parameters in Red Deer Harvested during Stalking Hunts. *Animals* **2024**, *14*, 1108. <https://doi.org/10.3390/ani14071108>

Academic Editor: Edward Narayan

Received: 29 February 2024

Revised: 26 March 2024

Accepted: 3 April 2024

Published: 4 April 2024



**Copyright:** © 2024 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

Deer hunting plays a multifaceted role in the USA and EU. Wildlife managers depend on hunting to manage the size of deer herds. Due to many causes, the deer numbers in some regions of the EU and USA have been increasing for years. Deer hunting also makes an important contribution to the economies of rural communities in the USA and Europe. The U.S. Fish and Wildlife Service has estimated that hunting and fishing generate more than 3 billion dollars in economic activity annually in New York (1996), but the EU estimated that hunting is worth about €16 billion annually (2008) [1,2].

There are four species of deer in Poland, and each of the following is a game species. The largest representative is the moose (*Alces alces*), which numbers 37,493 individuals. In turn, the most numerous cervid in Poland is the European roe deer (*Capreolus capreolus*), which numbers 893,200 individuals. The least numerous species observed and monitored in Poland is the fallow deer (*Dama dama*). The current population of red deer (*Cervus elaphus*) in Poland comprises 292,000 individuals [3]. Over the past five decades, the European population size and harvesting of this species have been increasing [3]. The red deer is represented by many subspecies inhabiting various ecosystems [4]. All cervids are sensitive to strong negative stimuli from the external environment [3–5], which exert a negative effect on the health and condition of these animals [6–9]. The impact of negative factors on the animal's organism can be analyzed via the determination of the concentration of cortisol (CORT), a hormone associated with general stress reaction [10]. The welfare of deer is influenced by many exogenous factors, including climate, season, population density in a given area (which translates into access to food), or the presence of large predators hunting deer in the natural environment. Previous research has clearly shown that estrus is a particularly stressful period for deer due to the need for males to defend their territory and constant competition for females [11–13]. Negative stimuli also affect the growth and mineralization of antlers [14–16]. Nevertheless, animals subjected to selective culling are usually in good physical condition, even though they are constantly exposed to negative stimuli from the external environment. Gentsch et al. [11] indicate that although negative factors may accumulate and promote increased CORT release, the stimuli that determine the strength of the hormonal reaction during hunting are the short period before shooting (e.g., without long-time tracking) and the time from the hit to the death of the animal.

The concentration of CORT in hair, feces, urine, saliva, or plasma is frequently determined to assess the level of stress in animals [17]. Determining plasmatic CORT levels is widely used in monitoring acute stress reactions, whereas excretions (feces, urine) are more useful in the case of chronic, long-term stress reactions. The undoubted advantage of measuring the level of glucocorticoids in feces is the ability to collect a sample without the need to capture animals, which in turn eliminates unnecessary stress associated with immobilizing them or vein-puncturing to draw blood samples. Therefore, determining the concentration of cortisol metabolites in feces seems to be the most valuable method for studies on wild animals, where such procedures in the field may be difficult to perform [18,19]. Despite its advantages, this method also has some limitations, as it is often not possible to attribute feces to particular individuals, especially those living in large areas, without close monitoring. Therefore, if it is not possible to examine select individuals, the results obtained should be treated as collective for the population of animals inhabiting a given area. In red deer, maximum levels of CORT metabolites are usually measured after 18 h of stressor exposure based on fecal samples [12]. CORT can also be determined from animal hair samples as an indicator of stress conditions. However, it should be remembered that the level of glucocorticoid metabolites in hairs increases quite slowly, i.e., several weeks or months, depending on the species studied [20–25]. Hence, due to the limitations described above, in hunted animals, the best method seems to be rapid post-mortem blood collection, in which the CORT level shows the severity of acute stress [7,26–29].

Studies of wild animals are particularly difficult due to the fact that there are many factors that may affect the level of glucocorticoids obtained in the samples tested, such as ambient temperature (climate), food availability, and season [3,30,31]. These conditions,



in turn, significantly affect the body's energy balance, a key determinant influencing the animal's ability to effectively respond to various stressors [32]. On the other hand, accumulated energy resources improve the physical condition and health status of animals, which can also influence the level of CORT [33,34].

CORT represents a group of steroid hormones and is released from the adrenal cortex in response to a negative stimulus through the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis [35]. Changes in the circulatory concentration of CORT in red deer may have far-reaching effects [4,36]. One of the negative effects of stress may include deterioration of immunity [6,37], worsening of general condition, and enhancement of the susceptibility of the animal to various diseases [38]. An increase in the level of glucocorticosteroid hormones also disturbs the antler-shedding cycle in red deer [39,40] and is associated with proper antler growth [15,16]. Additionally, it may lead to myocardial myopathy and exercise-induced rhabdomyolysis, which is often documented in wild animals [41]. Other conditions that may affect CORT release may be related to intense short-term stress from transportation, immobilization, or predator attacks [42–46]. Stress also exerts an adverse effect on an animal's body weight, which is one of the most important determinants of reproductive success [47]. Stress in hinds may have negative effects on the normal regulation of the estrus cycle and maintenance of pregnancy [48]. As demonstrated in studies on Canadian red deer (*Cervus elaphus canadensis*), CORT is positively linked with the level of progesterone secreted from adrenal glands in response to short-term stress [49].

Game animals are dependent on the natural environment because they are inextricably linked to it, and any change in their natural environment immediately affects the populations they create. Energy resources in the form of adipose tissue, antler mass, population density, and structure, but also biochemical and physiological parameters of the body, reflect the body's internal balance and thus allow for maintaining good well-being, which is influenced by various factors of the external environment [50–53]. Blood biochemical parameters act as markers of potential disease because their fluctuations outside the reference limits indicate disturbances in the body's homeostasis, which may be related to the ongoing disease process [4,48] and the impact on the behavior and mental state of the animal, i.e., [6,52]. It is generally known that hunting is a strong stressor in wild animals, which is associated with short-term (fight-or-flight) stress responses [54]. However, due to the seasonality of hunting and the related intensification of human activity in the cervid ecosystem, wild animals may be affected by chronic stress [55,56]. Some authors find that the stress response of the animal organism depends on the type of hunting [11,55]. However, it is worth noting that Ensminger et al. [56] found no evidence of increased fecal glucocorticoids in association with the number of days of hunting, even though fecal glucocorticoids concentration increased with hunting pressure index, as previously shown in *Cervus elaphus* [57]. On the other hand, Bateson and Bradshaw's [57] study was conducted during long red deer pursuits (about 19 km) using hunting dogs, and the increased glucocorticoid levels in the collected blood samples likely reflected the last pursuit [58]. In our research, hunters may have harvested a *Cervus elaphus* soon after observing it on the first day without the use of dogs or actively driving it into the hunting ground [57,58]. These studies make it possible to compare the impact of indirect and long-term hunting with direct, short-term hunting on the CORT level in the feces and blood serum of game animals. It made it possible to compare the indirect and prolonged impacts of hunting pressure on red deer, as indicated by fecal glucocorticoids [59–61].

In Poland, red deer, in addition to collective hunting, are quite often obtained by stalking. The impact of these hunts can be considered at two levels: short-term stress caused at the time of the shooting and long-term stress caused by the frequent presence of hunters in the hunting ground. The impact of stalking has rarely been studied until now. Therefore, the aim of this study was to determine the plasma cortisol level in wild red deer (*Cervus elaphus*) harvested during stalking hunts in relation to the sex and age of the animals. In addition, the health status of the red deer was determined on the basis of

selected blood biochemical parameters, which may affect the level of circulatory cortisol and vice versa.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Design

The tested red deer were hunted in accordance with Polish Hunting Law and the principles of individual selection during the hunting season as part of population management. This law states that red deer stags can be hunted from 1 August to the end of February and hinds from 1 September to 15 January. The individuals covered by the research were obtained in the period from 1 September to 31 October 2022, and the shooting of animals had a selective purpose and was carried out by qualified hunters—employees of the National Lubartów Forests District. In order to obtain animals, individual hunts were carried out, which involved approaching the deer unnoticed at a distance, allowing for a precise shot without the battue or hunting dogs. The hunting took place in the early morning hours, during which the animals behaved naturally, showed no signs of stress, and were not artificially separated from the herd. The animals selected for this study were individuals that died immediately after the first precise shot.

The Lubartów Forest District is located in central–eastern Poland (51°27' N, 22°29' E). The terrain of the district is flat rather than varied and has a temperate to warm and transitional climate. Annual rainfall is 552 mm, and the average annual temperature is +7.7 °C. The forest district is characterized by a large diversity of habitats and soil fertility. The forest cover of the region is estimated at 24.9%, including 49% of the area covered by coniferous species and 38% covered by mixed forests with deciduous species [62].

In the study area, the density of red deer was 16.03 individuals per 1000 ha of forest area, the density of roe deer was 2.08 individuals per 1000 ha of total area, and the density of moose was 10.15 individuals per 1000 ha of forest and swampy areas (as of 31 January 2017) [62].

As was previously mentioned, stalked animals were shot in accordance with the Polish Hunting Law (annex to Resolution No. 57/2005 of 22 February 2005). Due to the fact that all hunting procedures took place as part of hunting management in the areas managed by the State Forest District in Lubartów, no additional experimental procedures were performed that would pose a threat to animal welfare. Therefore, this study did not require individual consent from the Local Ethics Committee (Animal Welfare Committee Regulations, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, ZdsDz/6/2023).

### 2.2. Sampling

Blood samples were collected from 13 stags and 12 hinds immediately after shooting and up to five minutes after death. Venous blood samples were drawn from the external jugular vein (vena jugularis externa) into 10 mL EDTA vacuum tubes (BD Vacutainer System, Ref. No. 367525, Becton Dickinson, Poland, Warsaw) and then cooled to 4 °C. Contaminated blood samples were discarded. Plasma was obtained by centrifugation of the blood samples at 3000 rpm for 10 min in a laboratory centrifuge, MPW-350R (MPW Medical Instruments, Warsaw, Poland), at 4 °C. Harvested plasma was stored at −25 °C until further analyses. CORT concentration was determined using the immunoenzymatic method (Cortisol ELISA Kit, No. EIA-1887, DRG® International, Springfield, NJ, USA) in accordance with the protocol recommended by the manufacturer. Biochemical parameters: total cholesterol (TCHOL), HDL cholesterol (HDLCHOL), LDL cholesterol (LDLCHOL), triglycerides (TRIG), lactate dehydrogenase (LDH), urea (UREA), alanine aminotransferase (ALAT), uric acid (URIC), phosphatase alkaline (ALP), total protein (TP), albumin (HSA), bilirubin (BIL), aspartate aminotransferase (ASAT), and gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP) were determined using an automated spectrophotometric system (Biochemical analyzer BS-120, Mindray, Shenzhen, China). The age (A) of the animals was determined post-mortem using the Eidmann method. It consisted of an assessment of the layers of dentin deposited in the canal of the first pair of incisors I1 and the characteristic features



of the dentition, i.e., the stage of development and the replacement of primary with permanent teeth [57]. Carcass mass (CM) was measured after the animals were harvested and eviscerated at a game collection center.

### 2.3. Statistical Analysis

The statistical analyses were conducted using the Statistica 9.1 software (StatSoft, Kraków, Poland). A significance level of  $p < 0.05$  was adopted to indicate the existence of statistically significant differences or relationships. The normality of the distribution was tested using the Student's *t*-test and the Welch test. The Mann–Whitney test was used for the analysis of independent samples. The results were expressed as the mean value (M) and standard deviation (SD) of the variables. Next, the CORT concentration was compared with the level of biochemical parameters in the sex-related groups and in the group of all animals using Spearman's rank–order correlation. Subsequently, the correlations of the carcass mass of the harvested red deer with the level of CORT and biochemical parameters were calculated using an analogous method. Similar calculations were conducted to determine the relationship of the animal age with the concentration of CORT and the biochemical blood parameters. The analyses were carried out both in the group of all animals and in the sex-related groups.

### 3. Results

The mean CM of the stags (138.429 kg) was almost twice as high as that of the hinds (71.000 kg). The stags were aged from 5 to 8 years, while the hinds were aged from 3 to 5 years, with an average age of 6 and 4 years, respectively. The average CORT concentration in the plasma of the stags and hinds was similar (20.216 and 21.564 ng/mL, respectively). Significantly higher HDLCHOL values were determined in the plasma collected from the hinds than stags (25.678 and 9.114 mg/dL, respectively). Similarly, the mean levels of LDLCHOL, LDH, ALAT, and GGTP were 21%, 16%, 42%, and 39% higher, respectively, in the plasma of the hinds. In turn, the levels of ALP, BIL, and ASAT were higher (by 30%, 49%, and 36%, respectively) in the plasma collected from the stags (Table 1).

**Table 1.** Dependence of the carcass mass (CM), age (A), and biochemical parameters in plasma on the sex of the red deer.

Indicator	Short	Male (n = 13)		Female (n = 12)		T <sup>a</sup> /U <sup>b</sup>	p
		M	SD	M	SD		
Carcass mass [kg]	CM	138.42	20.75	71.00	11.84	8.22843 <sup>a</sup>	<0.001 *
Age [years]	A	6	2.050	4	1.000	2.48455 <sup>a</sup>	0.026 *
Cortisol [ng/mL]	CORT	20.216	16.747	21.564	17.325	29.000 <sup>b</sup>	0.837
Total cholesterol [mg/dL]	TCHOL	85.714	65.642	108.889	53.412	16.000 <sup>b</sup>	0.114
Cholesterol HDL [mg/dL]	HDLCHOL	9.114	5.712	25.678	8.541	−4.4051 <sup>a</sup>	<0.001 *
Cholesterol LDL [mg/dL]	LDLCHOL	20.714	20.798	25.667	10.062	17.500 <sup>b</sup>	0.141
Triglycerides [mg/dL]	TRIG	290.429	315.265	251.333	155.251	23.000 <sup>b</sup>	0.407
Lactate dehydrogenase [U/L]	LDH	3609.714	2204.350	4160.444	3461.297	27.000 <sup>b</sup>	0.680
Urea [mg/dL]	UREA	53.629	24.231	51.889	12.212	0.188 <sup>a</sup>	0.853
Alanine aminotransferase [U/L]	ALAT	235.714	174.545	333.378	163.478	−1.151 <sup>a</sup>	0.268
Uric acid [mg/dL]	URIC	21.243	23.550	18.700	17.765	26.000 <sup>b</sup>	0.606
Alkaline phosphatase. [U/L]	ALP	157.029	147.178	111.267	84.550	0.785 <sup>a</sup>	0.445
Total protein [g/dL]	TP	10.571	4.826	12.000	3.969	19.500 <sup>b</sup>	0.210
Albumin [g/dL]	HSA	4.286	1.254	4.333	0.707	27.500 <sup>b</sup>	0.680
Bilirubin [mg/dL]	BIL	0.901	0.837	0.454	0.338	1.331 <sup>c</sup>	0.221
Animottransferaza asparaginianowa [U/L]	ASAT	166.529	153.196	106.089	68.339	1.063 <sup>a</sup>	0.305
Gamma-glutamylotranspeptydaza [U/L]	GGTP	61.357	20.735	99.667	92.720	28.000 <sup>b</sup>	0.757

M—mean; SD—standard deviation; <sup>a</sup>—the Student's *t*-test result; <sup>b</sup>—Mann–Whitney test results; <sup>c</sup>—Welch's *t*-test results; \* statistically significant values at  $p < 0.05$ .

Next, the mean level of cortisol in correlation with the values of the biochemical parameters of the blood collected from the stags and hinds was analyzed statistically (Table 2). In the stag blood, there was a negative relationship between CORT with UREA and BIL ( $p < 0.05$ ) and a positive correlation between CORT and ASAT ( $p < 0.05$ ). In turn,

a negative correlation was found between CORT and UREA in the hind blood ( $p < 0.05$ ). Regardless of the sex of the animals, there was a negative correlation of CORT with TRIG, UREA, TP, and HSA ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** Relationship between the cortisol concentration and the biochemical parameters of the blood of the analyzed animals.

Analyzed Parameters	CORT		
	Male (n = 13)	Female (n = 12)	All Animals (n = 25)
	r-Spearman's rank-order correlations; <i>p</i> -Value		
TCHOL [mg/dL]	−0.450; 0.310	−0.450; 0.310	−0.441; 0.086
HDLCHOL [mg/dL]	−0.036; 0.938	−0.036; 0.938	0.041; 0.879
LDLCHOL [mg/dL]	−0.560; 0.190	−0.560; 0.190	−0.384; 0.141
TRIG [mg/dL]	−0.468; 0.288	−0.468; 0.288	−0.529; 0.034 *
LDH [U/L]	0.684; 0.089	0.684; 0.089	0.281; 0.291
UREA [mg/dL]	−0.846; 0.016 *	−0.846; 0.016 *	−0.563; 0.022 *
ALAT [U/L]	0.234; 0.613	0.234; 0.613	0.022; 0.935
URIC [mg/dL]	−0.594; 0.159	−0.594; 0.159	−0.459; 0.073
ALP [U/L]	−0.234; 0.086	−0.266; 0.487	−0.420; 0.104
TP [g/dL]	−0.441; 0.613	−0.630; 0.068	−0.668; 0.004 *
HSA [g/dL]	−0.715; 0.089	−0.547; 0.126	−0.615; 0.011 *
BIL [mg/dL]	−0.918; 0.003 *	0.133; 0.732	−0.280; 0.292
ASAT [U/L]	0.756; 0.048 *	−0.233; 0.545	0.266; 0.318
GGTP [U/L]	−0.702; 0.078	−0.183; 0.636	−0.400; 0.124

\* statistically significant values at  $p < 0.05$ .

The next step consisted of the analysis of the relationship of the age (A) and carcass mass (CM) with the biochemical parameters (Table 3). In the group of all animals, only CM and HDLCHOL exhibited a negative correlation ( $p < 0.05$ ) (Table 3).

**Table 3.** Relationship between the level of biochemical parameters, carcass mass, and age in the group of all animals.

Analyzed Parameters	Carcass Mass (CM)	Age (A)
	r/R; <i>p</i> -Value	
CORT [ng/mL]	−0.116 <sup>a</sup> ; 0.666	−0.108 <sup>a</sup> ; 0.689
TCHOL [mg/dL]	−0.339 <sup>a</sup> ; 0.198	−0.057 <sup>a</sup> ; 0.832
HDLCHOL [mg/dL]	−0.663 <sup>a</sup> ; 0.005 *	−0.442 <sup>b</sup> ; 0.086
LDLCHOL [mg/dL]	−0.354 <sup>a</sup> ; 0.177	−0.009 <sup>a</sup> ; 0.973
TRIG [mg/dL]	−0.131 <sup>a</sup> ; 0.627	0.194 <sup>a</sup> ; 0.470
LDH [U/L]	0.013 <sup>a</sup> ; 0.961	−0.044 <sup>a</sup> ; 0.868
UREA [mg/dL]	−0.135 <sup>a</sup> ; 0.615	0.103 <sup>b</sup> ; 0.702
ALAT [U/L]	−0.316 <sup>a</sup> ; 0.232	0.094 <sup>b</sup> ; 0.727
URIC [mg/dL]	−0.221 <sup>a</sup> ; 0.409	0.216 <sup>a</sup> ; 0.419
ALP [U/L]	−0.056 <sup>a</sup> ; 0.836	0.266 <sup>a</sup> ; 0.318
TP [g/dL]	−0.281 <sup>a</sup> ; 0.290	−0.003 <sup>a</sup> ; 0.991
HSA [g/dL]	−0.012 <sup>a</sup> ; 0.962	0.176 <sup>a</sup> ; 0.513
BIL [mg/dL]	0.207 <sup>a</sup> ; 0.440	0.117 <sup>a</sup> ; 0.665
ASAT [U/L]	0.234 <sup>a</sup> ; 0.381	−0.008 <sup>a</sup> ; 0.973
GGTP [U/L]	0.067 <sup>a</sup> ; 0.802	0.210 <sup>a</sup> ; 0.432

<sup>a</sup>—Spearman's rank-order correlations; <sup>b</sup>—Pearson r correlations; \* statistically significant values at  $p < 0.05$ .

No statistical correlations between CM, A, and biochemical parameters were found in the group of stags (Table 4).

**Table 4.** Relationship between the level of biochemical parameters, carcass mass, and age in the group of stags (group I).

Analyzed Parameters	Carcass Mass (CM)	Age (A)
CORT [ng/mL]	−0.018; 0.969	0.284; 0.536
TCHOL [mg/dL]	0.126; 0.787	0.090; 0.846
HDLCHOL [mg/dL]	−0.468; 0.288	−0.054; 0.907
LDLCHOL [mg/dL]	0.000; 1.000	0.094; 0.840
TRIG [mg/dL]	0.126; 0.787	0.290; 0.526
LDH [U/L]	−0.090; 0.847	0.436; 0.327
UREA [mg/dL]	0.018; 0.969	0.218; 0.638
ALAT [U/L]	−0.072; 0.877	0.436; 0.327
URIC [mg/dL]	0.036; 0.938	0.290; 0.526
ALP [U/L]	−0.720; 0.067	0.272; 0.553
TP [g/dL]	0.336; 0.460	0.169; 0.715
HSA [g/dL]	0.381; 0.398	−0.0481; 0.918
BIL [mg/dL]	0.336; 0.460	−0.110; 0.814
ASAT [U/L]	0.018; 0.969	−0.327; 0.473
GGTP [U/L]	−0.072; 0.877	−0.600; 0.154

A positive correlation between CM and HDLCHOL was found in the group of hinds ( $p < 0.05$ ) (Table 5).

**Table 5.** Relationship between the level of biochemical parameters, carcass mass, and age in the group of hinds (group II).

Analyzed Parameters	Carcass Mass (CM)	Age (A)
CORT [ng/mL]	−0.238; 0.536	−0.053; 0.891
TCHOL [mg/dL]	0.183; 0.635	0.454; 0.219
HDLCHOL [mg/dL]	0.689; 0.039 *	−0.195; 0.615
LDLCHOL [mg/dL]	0.004; 0.991	0.645; 0.060
TRIG [mg/dL]	0.195; 0.613	0.531; 0.140
LDH [U/L]	−0.349; 0.357	−0.354; 0.348
UREA [mg/dL]	−0.170; 0.661	−0.062; 0.873
ALAT [U/L]	0.008; 0.982	0.461; 0.211
URIC [mg/dL]	−0.417; 0.264	0.398; 0.287
ALP [U/L]	0.008; 0.982	0.328; 0.388
TP [g/dL]	−0.012; 0.973	0.049; 0.900
HSA [g/dL]	0.081; 0.834	0.315; 0.407
BIL [mg/dL]	−0.212; 0.582	−0.611; 0.079
ASAT [U/L]	0.042; 0.913	0.328; 0.388
GGTP [U/L]	−0.017; 0.965	0.691; 0.390

\* statistically significant values at  $p < 0.05$ .

#### 4. Discussion

All types of hunting affect the homeostasis of game animals and are perceived as a highly stressful stimulus [55]. Sheriff et al. [27] reported that increased physical activity in animals that were hunted evoked a typical stress response accompanied by an increase in the blood CORT concentration. However, this increase was not as high as in the case of a severe injury inflicted by a car collision, where the concentration of this hormone was significantly higher than that reported in previous studies [27]. It should be emphasized that the increase in CORT is also influenced by the fact that the animal feels mental discomfort, correlated with the feeling of physical pain, fear, or panic in response to various negative stimuli [55]. Moreover, research by Malherbe [63] showed that an increased level of CORT may even be the result of being too close in proximity to the anthropogenic environment

(buildings and human settlements). The results obtained in the present study on red deer harvested during stalking hunts confirm previous reports showing that CORT levels do not depend on the age and sex of animals [5,12,64–68]. It could indicate that, regardless of age or sex, being hunted is a stressful experience for red deer. However, the absence of age-related differences in the CORT concentrations calls into question the reports indicating that older stages have higher CORT levels [23,69]. The mean CORT level shown in the present study was higher than that presented by Gaspar-López et al. [16] in farmed Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in the same season of the year. As reported in the literature, the concentration of plasma CORT is subject to both diurnal and annual fluctuations [70–72]. Ingram et al. [72] showed seasonal fluctuations in the CORT concentration in a fairly wide range from 1.9 to 22.5 ng/mL in unrestrained farmed red deer (*Cervus elaphus*), with higher levels recorded in November during the period of intensive weight gain after the mating season. These observations confirm earlier findings reported by Saltz and Whitey [4]. Our results are also consistent with those obtained by Ingram et al. [72], but they are more within their upper limits, which may be related to the mating season and not to body weight gain.

The mean levels of most biochemical parameters did not differ significantly between the groups of the stages and hinds. There was a significant difference in the average level of HDL CHOL, which was almost threefold higher in the hinds. In turn, the higher levels of LDLCHOL, LDH, ALAT, and GGTP in the hind blood plasma than those in the blood of stags did not significantly differ statistically. Slight differences were found in the ALP, BIL, and ASAT levels, which were higher in the blood samples from the stags. The high level of cholesterol fractions may be associated with the fact that these compounds are involved in the synthesis of steroid hormones, which are an important link in the regulation of physiological processes in the organism [73,74]. Studies conducted on male Iberian deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in two different populations with high and low levels of intrasexual competition showed a positive relationship between the levels of testosterone and cortisol metabolites in feces but also a meaningful interaction, showing that this relationship occurs more intensely within a population characterized by high level of competition for mating. These results confirm a positive relationship between both hormones in natural conditions and that the reason for this is competition by male-to-male competition for mates [75].

It should be noted that the red deer were harvested during the mating season, which undoubtedly had an impact on the concentrations of the biochemical parameters determined in this study. The level of testosterone in the testicles of wild stags in September is 1000-fold higher than in the other months [76]. Physiologically, testosterone is synthesized from cholesterol; thus, these parameters have been reported in the literature to be significantly positively correlated [77,78]. In turn, high concentrations of individual cholesterol fractions in red deer plasma may cause serious health consequences [79]. Finally, the maintenance of the dominant male position in a herd of farmed hinds also generates a strong stress reaction [80], which may be reflected in the parameters studied.

Elevated CORT and LDH levels indicate potential muscle damage caused by various trauma factors [44,81]. Furthermore, the level of biochemical parameters may be influenced by cervid nutrition [82]. The red deer were harvested during the mating season—a period when they drastically reduce food intake [83]. Fasting, in turn, most likely leads to a decrease in some biochemical parameters (TCHOL, HDLCHOL, LDLCHOL, LDH, TP, GGTP) in stags but not in hinds, which do not exhibit such behavior [84]. Moreover, it should be noted, however, that the difference in time from shooting to death of the animals may affect the results of biochemical parameters of the blood serum.

Generally, the welfare of free-living animals depends on exogenous and endogenous factors. The endogenous factors include the general health status of the animal and the impact of environmental stressors, e.g., the season of the year, food availability, reproduction, predators, and hunting [5]. The levels of blood biochemical parameters demonstrated in the present study were higher than those reported by other researchers in their stud-

ies on farmed red deer (*Cervus elaphus*) [6,85–87] and were also dependent on the type of physical or chemical anesthetic used and/or sedation agents used to subdue the animals [88] (Table 6). Our results do not align with the ranges indicated by Rosef et al. [89], who reported higher levels of AST, GGTP, LDH, UREA, TCHOL, and TRIG and lower levels of TP, HAS, and BIL in wild *Cervus elaphus atlanticus* pharmacologically immobilized. Nevertheless, it should be taken into account that these discrepancies may stem from the differences in environmental factors, e.g., the climate prevailing in the habitats of the analyzed populations, the methods (pharmacologically, physically immobilized, or shot) for collection of biological material for analyses [4,12,90], and the higher wild animal population density [67] (Table 6).

**Table 6.** Biochemical parameters value in the earlier studies.

Analyzed Parameters	Wild Red Deer [90]		Chemically Immobilized Free-Ranging Red Deer at Winter Feeding Sites [89]	Farmed Red Deer		Wild Red Deer Harvested during Stalking Hunts (Our Study)	
	Physical Capture	Chemical Capture		[6]	[87]	Male	Female
TCHOL [mg/dL]	55.44 ± 14.93	50.25 ± 19.63	41.76–50.65	57.61 ± 13.14	59.9 ± 3.18	85.714	108.889
HDLCHOL [mg/dL]	34.44 ± 9.27	31.75 ± 10.30	-	-	41.58 ± 2.80	9.114	25.678
LDLCHOL [mg/dL]	3.75 ± 1.70	2.0 ± 1.0	-	-	15.00 ± 3.13	20.714	25.667
TRIG [mg/dL]	18.50 ± 7.41	7.88 ± 6.77	8.75–10.50	19.25 ± 9.62	16.90 ± 4.15	290.429	251.333
LDH [U/L]	511.75 ± 93.89	404.33 ± 120.35	672.5–741.2	-	-	3609.714	4160.444
UREA [mg/dL]	-	-	5.76–6.78	66.66 ± 19.09	-	53.629	51.889
ALAT [U/L]	-	-	51.7–56.7	33.5 ± 8.66	-	235.714	333.378
URIC [mg/dL]	0.32 ± 0.18	0.21 ± 0.03	-	-	0.37 ± 0.13	21.243	18.700
ALP [U/L]	144.550 ± 25.26	104.33 ± 20.24	195.5–252.1	31.6 ± 10.71	-	157.029	111.267
TP [g/dL]	6.77 ± 0.79	6.77 ± 0.99	6.36–6.63	8.08 ± 10.70	6.26 ± 0.36	10.571	12.000
HSA [g/dL]	-	-	3.57–3.75	2.15 ± 2.93	-	4.286	4.333
BIL [mg/dL]	0.12 ± 0.05	0.06 ± 0.04	47.95–64.96	599.38 ± 154.29	-	0.901	0.454
ASAT [U/L]	-	-	55.0–63.3	250.5 ± 117.44	-	166.529	106.089
GGTP [U/L]	20.77 ± 5.86	19.25 ± 4.57	18.4–22.4	15.5 ± 9.82	-	61.357	99.667

The obtained results showed that the CORT concentration in the plasma was negatively correlated with UREA and BIL in the group of stags and only with UREA in the group of hinds. It is worth noting that the level of UREA may be influenced indirectly by the season of the year and directly by the inaccessibility of food, as demonstrated in sheep [91] as well as in cervids [30,92]. Malnutrition leads to protein catabolism and tissue disintegration, which is reflected in an increase in UREA levels in animal blood [93]. In the present study, much higher values in the UREA of all the analyzed red deer were obtained compared to the results obtained by Rosef et al. [89] for free-ranging animals, which may be related to the insufficient protein intake due to the reduction of appetite during the mating season [94]. Physiologically, an increase in UREA is observed during stress, increased catabolism, and post-traumatic conditions [95]. However, in our studies, lower UREA values were observed, which may indicate that the response of this parameter to hunting is a slower reaction compared to the rapid increase in CORT. Another reason for low UREA values may be the seasonal change of animals' diet to winter when vegetation low in protein and rich in carbohydrates dominates, and as it is generally known, the level of feed protein affects the level of plasmatic UREA. It has also been documented that during pregnancy, the renal glomerular filtration rate increases, which causes increased secretion of UREA in relation to its production [96]. This study did not assess the reproductive status of females; however, considering the fertile period of cervids, it can be assumed that over 80% of females could have been pregnant [55]. Nutritional stress may also have an impact on the level of BIL, as shown in studies on *Lepus californicus* [97]. In addition, the obtained results showed a strong negative correlation between the parameters in the blood of the stags, e.g., an increase in the CORT concentration was accompanied by a decrease in the BIL level. A positive correlation between CORT and ASAT was found in the group of stags as well. ASAT is a muscle tissue-specific enzyme. Its increased activity is directly related to muscle damage [98,99]. ASAT also serves as an indicator of liver disease, as its levels increase



before liver degeneration, which becomes apparent in clinical trials [100], and the increase may be caused by the cessation of feed intake by stags during the rutting season.

In studies on red deer, low TP and TRIG confirm the reduced food intake by the animals during the mating season, as both of these parameters are considered markers of malnutrition [101–103]. Also, the negative correlation between CORT and URIC in the groups of stags, hinds, and all animals taken together is not surprising, as URIC is considered a marker of long-term stress [104]. Moreover, these results were directly linked to the rutting season, i.e., the sampling period, which was a long-term negative stimulus for the animals. A negative correlation between BIL and A was found in the group of the studied hinds. Nevertheless, the BIL concentration was similar to that determined by Alhuay et al. [105] in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) but lower than that specified by the ISIS standard [106]. However, the concentration of BIL depends on many factors, e.g., the latitude, climate, and determination methods [105].

Also, the analyses of A and CM were performed with reference to the biochemical parameters. A positive correlation between CM and HDLCHOL was demonstrated in the group of hinds. This is a disturbing phenomenon, as the examined hinds were relatively young, and female steroid hormones are known to be synthesized from CHOL, whose proper level has an impact on the proper reproduction processes of this species [48,107]. Additionally, the negative correlation of CORT with CM indicates that the higher the cortisol concentration in red deer blood, the lower the carcass mass, which may directly influence the condition of these animals [52]. However, this assumption should still be confirmed by methods relating to long-term stress, e.g., measuring the level of glucocorticoid metabolites in animal hair [108].

## 5. Conclusions

Plasma CORT levels in red deer harvested during stalking hunts were similar in males and females and amounted to an average of 20.216 ng/mL and 21.564 ng/mL, respectively. The variability of the analyzed blood biochemical parameters was probably associated with the increased concentration of the CORT and, thus, the sensitivity of the species regardless of age or sex. The mating season, which is known for increased activity, changed the diet and physiological state of animals and had an additional effect on some biochemical parameters (TCHOL, HDLCHOL, LDLCHOL, LDH, TP, GGTP). Moreover, with the increase in CORT and UREA and decrease in BIL, ASAT increased in red deer in the study period. The higher concentration of cortisol exerted a negative impact on carcass mass, which may determine the deterioration of the general condition of the red deer.

Repeated exposure of red deer populations to game hunting has an impact on stress levels, which may have important implications for the sustainability and conservation of this species. In particular, stress can influence population dynamics by altering feeding and breeding behavior, animal welfare, and, ultimately, evolutionary processes, altering individual adaptation and selection.

**Author Contributions:** Conceptualisation: K.D.-M. and K.T.; methodology: K.D.-M. and K.T.; laboratory analysis: S.K.; formal analysis: K.D.-M. and K.T.; collection of biological material: K.D.-M. and M.W.; writing—original draft preparation: K.D.-M. and K.T., writing—review and editing: K.D.-M., K.T. and S.K.; supervision: K.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

**Institutional Review Board Statement:** Ethical review and approval do not apply to this study due to the fact that biological material from red deer was harvested during the hunting period (from 1 September to 31 December 2022) in accordance with the principles of population and individual selection of game animals in Poland (Polish Hunting Law, Annex to Resolution No. 57/2005 of 22 February 2005).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all individual participants involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** This article will be part of K. Dziki-Michalska's PhD thesis. The authors thank the employees of the Lubartów Forest District for their help in collecting biological material.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Abbreviations

CORT: cortisol; TCHOL: total cholesterol; HDLCHOL: cholesterol HDL; TRIG: triglycerides; UREA: urea; ALAT: alanine aminotransferase; URIC: uric acid; ALP: alkaline phosphatase; TP: total protein; HSA: albumin; A: age; CM: carcass mass

### References

1. Middleton, A. The Economics of Hunting in Europe. Towards a Conceptual Framework. Final Report FACE. 2008. Available online: [https://face.eu/sites/default/files/attachments/framework\\_for\\_assessing\\_the\\_economics\\_of\\_hunting\\_final\\_en\\_pdf](https://face.eu/sites/default/files/attachments/framework_for_assessing_the_economics_of_hunting_final_en_pdf) (accessed on 28 February 2024).
2. Lauber, T.B.; Brown, T.L. Deer Hunting and Deer Hunting Trends in New York State. HDRU Series No 00-1. 2000. Available online: <https://ecommons.cornell.edu/server/api/core/bitstreams/73fce465-ae06-40a6-9302-1cc8f23d6ed8/content> (accessed on 28 February 2024).
3. CSO (Central Statistical Office). Available online: <https://stat.gov.pl/> (accessed on 30 November 2022).
4. Ballesteros, F. Las especies de caza en Espana. In *Biología, Ecología y Conservación; Estudio y Gestión del Medio*: Oviedo, Spain, 1998.
5. Ranabir, S.; Reetu, K. Stress and hormones. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2011**, *15*, 18–22. [CrossRef]
6. Barić Rafaj, R.; Tončić, J.; Vicković, I.; Šoštarić, B. Haematological and biochemical values of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Arh.* **2011**, *81*, 513–523.
7. Ventrella, D.; Elmi, A.; Bertocchi, M.; Anibaldi, C.; Parmeggiani, A.; Govoni, N.; Bacci, M.L. Progesterone and cortisol levels in blood and hair of wild pregnant red deer (*Cervus elaphus*) hinds. *Animals* **2020**, *10*, 143. [CrossRef]
8. Garber, P.A.; McKenney, A.; Bartling, J.E.; Bicca-Marques, J.C.; De la Fuente, M.F.; Abreu, F.; Schiel, N.; Souto, A.; Phillips, K.A. Life in a harsh environment: The effects of age, sex, reproductive condition, and season on hair cortisol concentration in a wild non-human primate. *PeerJ* **2020**, *8*, e9365. [CrossRef]
9. Carbillat, J.; Rey, B.; Palme, R.; Morellet, N.; Bonnot, N.; Chaval, Y.; Cargnelutti, B.; Hewison, A.J.M.; Gilot-Fromont, E.; Verheyden, H. Under cover of the night: Context-dependency of anthropogenic disturbance on stress levels of wild roe deer *Capreolus capreolus*. *Conserv. Physiol.* **2020**, *8*, coaa086. [CrossRef]
10. Shah, A.M.H.; Rafi, U.; Yasmeen, R.; Ahmad, M. Monitoring of cortisol levels in hog deer with varying environment exposure. *Int. J. Innov. Sci. Technol.* **2022**, *4*, 919–928. [CrossRef]
11. Gentsch, R.P.; Kjellander, P.; Röken, B.O. Cortisol response of wild ungulates to trauma situations: Hunting is not necessarily the worst stressor. *Eur. J. Wildl. Res.* **2018**, *64*, 11. [CrossRef]
12. Huber, S.; Palme, R.; Arnold, W. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2003**, *130*, 48–54. [CrossRef]
13. Rehbinder, C. Management stress in reindeer. *Rangifer* **1990**, *10*, 267–288. [CrossRef]
14. Bubenik, G.A. All you need to know about growing antlers: Why, where, when and how they grow. In Proceedings of the Third World Deer Farming Congress, Austin, TX, USA, February 2002; pp. 163–176.
15. Dziki-Michalska, K.; Tajchman, K.; Kowalik, S.; Bogdaszewski, M. Relationship between plasma cortisol level and bodyweight and antler size in farmed fallow deer. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2021**, *51*, 355–361. [CrossRef]
16. Gaspar-López, E.; Landete-Castillejos, T.; Estevez, J.A.; Ceacer, O.F.; Gallego, L.; García, L.A. Biometrics, testosterone, cortisol and antler growth cycle in iberian red deer stags (*Cervus elaphus hispanicus*). *Reprod. Domest. Anim.* **2010**, *45*, 243–249. [CrossRef] [PubMed]
17. Christ-Crain, M. Vasopressin and Copeptin in health and disease. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2019**, *20*, 283–294. [CrossRef] [PubMed]
18. Monfort, S.L.; Mashburn, D.V.K.L.; Brewer, B.A.; Creel, S.R. Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *J. Zoo Wildl. Med.* **1998**, *29*, 129–133. Available online: <https://www.jstor.org/stable/20095734> (accessed on 28 February 2024). [PubMed]
19. Palme, R.; Robia, C.; Messmann, S.; Hofer, J.; Möstl, E. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: A non-invasive parameter of adrenal function. *Wien Tierarztl. Monat.* **1999**, *86*, 237–241.
20. Macbeth, B.J.; Cattet, M.R.L.; Stenhouse, G.B.; Gibeau, M.L.; Janz, D.M. Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging grizzly bears (*Ursus arctos*): Considerations with implications for other wildlife. *Can. J. Zool.* **2010**, *88*, 935–949. [CrossRef]

21. Potratz, E.J.B.J.S.; Gallo, T.; Anchor, C.; Santymire, R.M. Effects of demography and urbanization on stress and body condition in urban white-tailed deer. *Urban. Ecosyst.* **2019**, *22*, 807–816. [[CrossRef](#)]
22. Dulude-de Broin, F.; Côté, S.D.; Whiteside, D.P.; Mastromonaco, G.F. Faecal metabolites and hair cortisol as biological markers of HPA-axis activity in the Rocky mountain goat. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2019**, *199*, 229–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Otten, W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2019**, *270*, 10–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Russell, E.; Koren, G.; Rieder, M.; Van Uum, S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 589–601. [[CrossRef](#)]
25. Kalliokoski, O.; Jellestad, F.K.; Murison, R. A systematic review of studies utilizing hair glucocorticoids as a measure of stress suggests the marker is more appropriate for quantifying short-term stressors. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11997. [[CrossRef](#)]
26. Dżiki-Michalska, K.; Tajchman, K.; Kowalik, S. Physiological response of roe deer (*Capreolus capreolus*) during stalking hunts depending on age. *BMC Vet. Res.* **2023**, *19*, 266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sheriff, M.J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* **2011**, *166*, 869–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Morton, D.J.; Anderson, E.; Foggin, C.M.; Kock, M.D.; Tiran, E.P. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Vet. Rec.* **1995**, *136*, 60–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; Beerda, B.; Guémené, D.; Malmkvist, J.; Manteca, X.; Manteuffel, G.; Prunet, P.; Van Reenen, C.G.; et al. Exploration of the hypothalamic pituitary adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* **2007**, *92*, 317–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Saltz, D.; White, G.C. Urinary cortisol and urea nitrogen responses to winter stress in mule deer. *J. Wildl. Manag.* **1991**, *55*, 1–16. [[CrossRef](#)]
31. Dantzer, B.; McAdam, A.G.; Palme, R.; Boutin, S.; Boonstra, R. How does diet affect fecal steroid hormone metabolite concentrations? An experimental examination in red squirrels. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2011**, *174*, 124–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. McEwen, B.S.; Wingfield, J.C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* **2003**, *43*, 2–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Da Silva Alves, J.A. Ecological Assessment of the Red Deer Population in the Lous Lousã Mountain. Ph.D. Thesis, University of Aveiro, Aveiro, Portugal, 2013.
34. Fuller, T.K.; Coy, P.L.; Peterson, W.J. Marrow fat relationships among leg bones of white-tailed deer. *Wildl. Soc. Bull.* **1986**, *14*, 73–75.
35. Korzekwa, A.J.; Kotlarczyk, A.M. Artificial reproductive technology (ART) applied to female cervids adapted from domestic ruminants. *Animals* **2021**, *11*, 2933. [[CrossRef](#)]
36. Bonnot, N.; Verheyden, H.; Blanchard, P.; Cote, J.; Debeffe, L.; Cargnelutti, B.; Klein, F.; Hewison, A.J.M.; Morellet, N. Interindividual variability in habitat use: Evidence for a risk management syndrome in roe deer? *Behav. Ecol.* **2015**, *26*, 105–114. [[CrossRef](#)]
37. Shi, D.; Bai, L.; Qu, Q.; Zhou, S.; Yang, M.; Guo, S.; Li, Q.; Liu, C. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 2405–2413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dhabhar, F.S. Effects of stress on immune function: The good, the bad, and the beautiful. *Immunol. Res.* **2014**, *58*, 193–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bubenik, G.A.; Brown, R.D.; Schams, D.; Bartos, L. The effect of ACTH on the GnRH-induced release of LH and testosterone in male white-tailed deer. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **1999**, *122*, 173–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Bartoš, L.; Schams, D.; Bubenik, G.A. Testosterone, but not IGF-1, LH, prolactin or cortisol, may serve as antlerstimulating hormone in red deer stags (*Cervus elaphus*). *Bone* **2009**, *44*, 691–698. [[CrossRef](#)]
41. Paterson, J. Capture myopathy. In *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*, 1st ed.; West, G., Heard, D., Caulkett, N., Eds.; John Wiley and Sons: Ames, IO, USA, 2014; pp. 171–179.
42. Montané, J.; Marco, I.; Manteca, X.; López, L.; Lavin, S. Delayed acute capture myopathy in three roe deer. *J. Vet. Med. A* **2002**, *49*, 93–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pereira, R.J.G.; Barbanti Duarte, J.M.; Negrão, J.A. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Theriogenology* **2005**, *63*, 2113–2125. [[CrossRef](#)]
44. Nuvoli, S.; Burrai, G.P.; Secci, F.; Columbano, N.; Careddu, G.M.; Mandas, L.; Sanna, M.A.; Pirino, S.; Antuofermo, E. Capture myopathy in a corsican red deer *Cervus elaphus corsicanus* (Ungulata: Cervidae). *Ital. J. Zool.* **2014**, *8*, 457–462. [[CrossRef](#)]
45. Taylor-Brown, A.; Booth, R.; Gillett, A.; Mealy, E.; Ogbourne, S.M.; Polkinghorne, A.; Conroy, G.C. The impact of human activities on Australian wildlife. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0206958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Díaz, E.A.; Donoso, G.; Sáenz, C.; Dueñas, I.; Cabrera, F. Clinical and pathological findings in a Dwarf Red Brocket Mazama rufina (Mammalia: Cetartiodactyla: Cervidae) attacked by dogs. *JoTT* **2020**, *12*, 16885–16890. [[CrossRef](#)]
47. Reh binder, C.; Edqvist, L.E.; Lundström, K.; Villafañe, F. Field study of management stress in reindeer (*Rangifer tarandus* L.). *Rangifer* **1982**, *2*, 2–21. [[CrossRef](#)]
48. Kotlarczyk, A.M.; Grzyb, M.; Korzekwa, A.J. Regulation of uterine function during estrous cycle, anestrus phase and pregnancy by steroids in red deer (*Cervus elaphus* L.). *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



49. McCorkell, R.B.; Woodbury, M.R.; Adams, G.P. Induction of ovarian follicular wave emergence in wapiti (*Cervus elaphus*). *Theriogenology* **2008**, *70*, 1017–1023. [CrossRef] [PubMed]
50. Poljičak-Milas, N.; Slavica, A.; Janicki, Z.; Robić, M.; Belić, M.; Milinković-Tur, S. Serum biochemical values in fallow deer (*Dama dama* L.) from different habitats in Croatia. *Eur. J. Wildl. Res.* **2004**, *50*, 7–12. [CrossRef]
51. Harms, N.J.; Elkin, B.T.; Gunn, A.; Tracz, B.; Adamczewski, J.; Flood, P.; Leighton, F.A. Serum biochemistry and serum cortisol levels of immobilized and hunted muskoxen (*Ovibos moschatus*) from northern Canada. *Arctic* **2012**, *1*, 401–410. [CrossRef]
52. Möstl, E.; Palme, R. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2002**, *23*, 67–74. [CrossRef] [PubMed]
53. Mellor, D.J.; Beausoleil, N.J.; Littlewood, K.E.; McLean, A.N.; McGreevy, P.D.; Jones, B.; Wilkins, C. The 2020 Five Domains Model: Including Human-Animal Interactions in Assessments of Animal Welfare. *Animals* **2020**, *10*, 1870. [CrossRef]
54. Tajchman, K.; Czyżowski, P.; Drozd, L.; Karpiński, M.; Wojtaś, J. Sustainable game management as one of the determinants of the welfare of hunting animals. *J. Anim. Sci. Biol. Bioecon.* **2018**, *36*, 19–30. [CrossRef]
55. Vilela, S.; Alves da Silva, A.; Palme, R.; Ruckstuhl, K.E.; Sousa, J.P.; Alves, J. Physiological stress reactions in red deer induced by hunting activities. *Animals* **2020**, *10*, 1003. [CrossRef]
56. Ensminger, D.C.; Pritchard, C.; Langkilde, T.; Gingery, T.; Banfield, J.E.; Walter, W.D. The influence of hunting pressure and ecological factors on fecal glucocorticoid metabolites in wild elk. *Wildl. Biol.* **2020**, *2020*, 00683. [CrossRef]
57. Bateson, P.; Bradshaw, E.L. Physiological effects of hunting red deer (*Cervus elaphus*). *Proc. Biol. Sci.* **1997**, *264*, 1707–1714. [CrossRef]
58. Norum, J.K.; Lone, K.; Linnell, J.D.C.; Odden, J.; Loe, L.E.; Mysterud, A. Landscape of risk to roe deer imposed by lynx and different human hunting tactics. *Eur. J. Wildl. Res.* **2015**, *61*, 831–840. [CrossRef]
59. Millspaugh, J.J.; Brundige, G.C.; Gitzen, R.A.; Raedeke, K.J. Elk and Hunter Space-Use Sharing in South Dakota. *J. Wildl. Manag.* **2000**, *64*, 994–1003. [CrossRef]
60. Möstl, E.; Rettenbacher, S.; Palme, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1046*, 17–34. [CrossRef] [PubMed]
61. Palme, R.; Rettenbacher, S.; Touma, C.; El-Bahr, S.M.; Möstl, E. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1040*, 162–171. [CrossRef] [PubMed]
62. Forest District Lubartów. Available online: <https://lubartow.lublin.lasy.gov.pl/> (accessed on 28 February 2024).
63. Malherbe, J.C. Influence of Environmental and Individual Characteristics on Baseline Stress Levels, and Consequences in a Large Mammal, the Roe Deer *Capreolus capreolus*. Ecology, Environment. Ph.D. Thesis, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 2019.
64. Brown, W.A.B.; Chapman, N.G. The dentition of fallow deer (*Dama dama*): A scoring scheme to assess age from wear of the permanent molariform teeth. *J. Zool.* **1990**, *22*, 659–682. [CrossRef]
65. Küker, S.; Huber, N.; Evans, A.; Kjellander, P.; Bergvall, U.A.; Jones, K.L.; Arnemo, J.M. Hematology, serum chemistry, and serum protein electrophoresis ranges for free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden. *J. Wildl. Dis.* **2015**, *51*, 269–273. [CrossRef] [PubMed]
66. Hart, K.A.; Wochele, D.M.; Norton, N.A.; McFarlane, D.; Wooldridge, A.A.; Frank, N. Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 653–663. [CrossRef]
67. Caslini, C.; Comin, A.; Peric, T.; Prandi, A.; Pedrotti, L.; Mattiello, S. Use of hair cortisol analysis for comparing population status in wild red deer (*Cervus elaphus*) living in areas with different characteristics. *Eur. J. Wildl. Res.* **2016**, *62*, 713–723. [CrossRef]
68. Azevedo, A.; Bailey, L.; Bandeira, V.; Dehnhard, M.; Fonseca, C.; de Sousa, L.; Jewgenow, K. Age, sex and storage time influence hair cortisol levels in a wild mammal population. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0221124. [CrossRef]
69. Fourie, N.H.; Jolly, C.J.; Phillips-Conroy, J.E.; Brown, J.L.; Bernstein, R.M. Variation of hair cortisol concentrations among wild populations of two baboon species (*Papio anubis*, *P. hamadryas*) and a population of their natural hybrids. *Primates* **2015**, *56*, 259–272. [CrossRef]
70. Suttie, J.M.; Fennessy, P.F.; Lapwood, K.R.; Corson, I.D. Role of steroids in antler growth of red deer stags. *J. Exp. Zool.* **1995**, *271*, 120–130. [CrossRef] [PubMed]
71. Cassidy, A.M. The Relationship between Behaviour and Adrenocortical Response to Administration of Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) in Farmed Red Deer (*Cervus elaphus*). Master's Thesis, University of Otago, Dunedin, New Zealand, 1996.
72. Ingram, J.R.; Crockford, J.N.; Matthews, L.R. Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *J. Endocrinol.* **1999**, *162*, 289–300. [CrossRef] [PubMed]
73. Miller, W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* **2010**, *9*, 295–318. [CrossRef] [PubMed]
74. Yi, L.; Dalai, M.; Su, R.; Lin, W.; Erdenedalai, M.; Luvsantseren, B.; Chimedtseren, C.; Wang, Z.; Hasi, S. Whole-genome sequencing of wild Siberian musk deer (*Moschus moschiferus*) provides insights into its genetic features. *BMC Genom.* **2020**, *21*, 108. [CrossRef] [PubMed]
75. De la Peña, E.; Barja, I.; Carranza, J. Social environment with high intrasexual competition enhances the positive relationship between faecal testosterone and cortisol metabolite levels in red deer. *Mamm. Biol.* **2021**, *101*, 207–215. [CrossRef]
76. Lincoln, G.A. The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *J. Zool.* **1971**, *163*, 105–123. [CrossRef]

77. Gutai, J.; Laporte, R.; Kuller, L.; Dai, W.; Falvo-Gerard, L.; Caggiula, A. Plasma testosterone, high density lipoprotein cholesterol and other lipoprotein fractions. *Am. J. Cardiol.* **1981**, *48*, 897–902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Freedman, D.S.; O'Brien, T.R.; Flanders, W.D.; DeStefano, F.; Barboriak, J.J. Relation of serum testosterone levels to high density lipoprotein cholesterol and other characteristics in men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1991**, *11*, 307–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Kawtikwar, P.S.; Bhagwat, D.A.; Sakarkar, D.M. Deer antlers—Traditional use and future perspectives. *Indian J. Tradit. Knowl.* **2010**, *9*, 245–251. [[CrossRef](#)]
80. Bartoš, L.; Bubenik, B. Relationships between rank-related behaviour, antler cycle timing and antler growth in deer: Behavioural aspects. *Anim. Prod. Sci.* **2010**, *51*, 303–310. [[CrossRef](#)]
81. Ursache, O.; Chevrier, L.; Blancou, J.M.; Jaouen, M. Value of haematological and biochemical parameters in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Rev. Med. Vet.* **1980**, *131*, 547–552.
82. Catanese, F.; Obelar, M.; Villalba, J.J.; Distel, R.A. The importance of diet choice on stress-related responses by lambs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2013**, *148*, 37–45. [[CrossRef](#)]
83. Carranza, J.; Fernandez-Llario, P.; Gomendio, M. Correlates of territoriality in rutting Red Deer. *Ethology* **1996**, *102*, 793–805. [[CrossRef](#)]
84. Mysterud, A.; Bonenfant, C.; Loe, L.E.; Langvatna, R.; Yoccoz, N.G.; Stenseth, N.C. Age-specific feeding cessation in male red deer during rut. *J. Zool.* **2008**, *275*, 407–412. [[CrossRef](#)]
85. Szabó, A.; Nagy, B.J.; Fébel, H.; Romvári, H.; Jónás, D.; Mezőszentgyörgyi, D.; Horn, P. Clinical chemistry of farmed red deer (*Cervus elaphus*) yearling hinds reared on grass or papillonaceous pasture paddocks in Hungary. *Arch. Anim. Breed.* **2013**, *56*, 443–454. [[CrossRef](#)]
86. Abdulkareem, T.A.; Eidan, S.J.; Shubber, A.M.H.; Ibrahim, F.F.; Ali, M.D.; Mohammed, O.A. *Reference Physiological Values in Different Animal Species*; Department of Animal Production, College of Agricultural Engineering Sciences, University of Baghdad: Baghdad, Iraq, 2020; p. 124.
87. Tajchman, K.; Kowalik, S.; Janiszewski, P.; Licznarska, K.; Bogdaszewski, P. Basic haematological and biochemical parameters of farmed red deer and fallow deer bolld. *Med. Wet.* **2023**, *79*, 286–290. [[CrossRef](#)]
88. Marco, I.; Lavín, S. Effect of the method of capture on the haematology and blood chemistry of red deer (*Cervus elaphus*). *Res. Vet. Sci.* **1999**, *66*, 81–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Rosef, O.; Nystøyl, H.L.; Solenes, T.; Arnemo, J.M. Haematological and serum biochemical reference values in free-ranging red deer (*Cervus elaphus atlanticus*). *Rangifer* **2004**, *24*, 79–85. [[CrossRef](#)]
90. Topal, A.; Gul, N.Y.; Yanik, K. Effect of Capture Method on Hematological and Serum Biochemical Values of Red Deer (*Cervus elaphus*) in Turkey. *J. Anim. Vet. Adv.* **2010**, *9*, 1227–1231. [[CrossRef](#)]
91. Cocimano, M.; Leng, R. Metabolism of urea in sheep. *Br. J. Nutr.* **1967**, *21*, 353–371. [[CrossRef](#)]
92. DelGiudice, G.D.; Seal, U.S. Classifying winter undernutrition in deer via serum and urinary urea nitrogen. *Wildl. Sue Bull.* **1988**, *16*, 27–32.
93. Nieminen, M.; Timisjärvi, J. Blood composition of the reindeer. II. Blood chemistry. *Rangifer* **1983**, *3*, 16–32. [[CrossRef](#)]
94. Feng, S.; Wu, S.; Xie, F.; Yang, C.S.; Shao, P. Natural compounds lower uric acid levels and hyperuricemia: Molecular mechanisms and prospective. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *123*, 87–102. [[CrossRef](#)]
95. Winnicka, A. *Reference Values for Basic Laboratory Tests in Veterinary Medicine*; Publishing House SGGW: Warsaw, Poland, 2015.
96. Mamoulakis, C.; Georgiadis, G.; Fragkiadoulaki, E. Urea. In *Encyclopedia of Toxicology*, 4th ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2024; pp. 685–692. ISBN 9780323854344. [[CrossRef](#)]
97. Henke, S.E.; Demarais, S. Effect of diet on vitreous humor and serum in black-tailed jackrabbits. *Tex. J. Agric. Nat. Resour.* **2016**, *14*, 13–20.
98. Fitte, A. Determination of the Pathophysiological Consequences of Capture and Capture-Induced Hyperthermia in Blesbok. Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa, 2017. Available online: [https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/60285/Fitte\\_Determination\\_2017.pdf?sequence=1](https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/60285/Fitte_Determination_2017.pdf?sequence=1) (accessed on 28 February 2024).
99. Simeonova, G.; Kalkanov, I. Exertional rhabdomyolysis in a fallow deer (*Cervus dama*). *Bulg. J. Vet. Med.* **2020**, *26*, 295–304. [[CrossRef](#)]
100. Craig, A.M.; Pearson, M.S.; Meyer, C.; Schmitz, J.A. Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed Senecio jacobaea toxicosis. *Am. J. Vet. Res.* **1991**, *52*, 1969–1978. [[CrossRef](#)]
101. Kamphues, J.; Wolf, P.; Coenen, M.; Eder, K.; Iben, C.; Kienzle, E.; Liesegang, A.; Männer, K.; Zebeli, Q.; Zentek, J. *Supplemente zur Tierernährung*; Schlütersche: Hannover, Germany, 2014; pp. 7–9.
102. Soveri, T.; Sankari, S.; Nieminen, M. Blood chemistry of reindeer calves (*Rangifer tarandus*) during the winter season. *Comp. Biochem. Physiol. A* **1992**, *102*, 191–196. [[CrossRef](#)]
103. Serrano, E.; González, F.J.; Granados, J.E.; Moço, G.; Fandos, P.; Soriguer, R.C.; Pérez, J.M. The use of total serum proteins and triglycerides for monitoring body condition in the iberian wild goat (*Capra pyrenaica*). *J. Zoo Wildl. Med.* **2008**, *39*, 646–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Glantzounis, G.K.; Tsimoyiannis, E.C.; Kappas, A.M.; Galaris, D.A. Uric acid and oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 4145–4151. [[CrossRef](#)]
105. Alhuay, A.D.; Li, E.O.; Alvarado, S.A.; Falcón, P.N.; Ríos, M.P.; Rojas, M.G. Perfil bioquímico sanguíneo hepático de venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) criados en cautiverio. *Rev. Investig. Vet. Perú (RIVEP)* **2011**, *22*, 138–143. [[CrossRef](#)]

106. ISIS, International Species Information System. Reference Ranges for Physiological Data Values. Clinical Pathology Records Report-ISIS/In House Reference Values Mammals. 1999. Available online: [www.worldzoo.org](http://www.worldzoo.org) (accessed on 28 February 2024).
107. Kuru, M.; Kükürt, A.; Oral, H.; Öğün, M. Clinical use of progesterone and its relation to oxidative stress in ruminants. In *Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases*; Drevensek, G., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2018. [[CrossRef](#)]
108. Meyer, J.S.; Novak, M.A. Minireview: Hair cortisol: A novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4120–4127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### **Praca III**

**Dziki-Michalska K., Tajchman K., Staniszewska P., Strachecka A. 2024.**  
Comparison of cortisol levels in the hair of male european roe deer  
at the beginning and end of the stalking hunting season. *Animals* 2024.  
14(22):3184. DOI: 10.3390/ani14223184

Liczba punktów w roku publikacji: MNiSW = 100; IF=2,700



## Article

# Comparison of Cortisol Levels in the Hair of Male European Roe Deer at the Beginning and End of the Stalking Hunting Season

Katarzyna Dziki-Michalska <sup>1</sup>, Katarzyna Tajchman <sup>1,\*</sup> , Patrycja Staniszevska <sup>2</sup> and Aneta Strachecka <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Ethology and Wildlife Management, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; katarzyna.michalska@up.lublin.pl

<sup>2</sup> Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 50A Doświadczalna Street, 20-280 Lublin, Poland; patrycja.staniszevska@up.lublin.pl (P.S.); aneta.strachecka@up.lublin.pl (A.S.)

\* Correspondence: katarzyna.tajchman@up.lublin.pl

**Simple Summary:** Hunting is one of the environmental factors that can affect the welfare of game animals. Glucocorticoid hormone measurement can be a reliable indicator of stress response. To assess the intensity of the endocrine response, the level of cortisol concentration in the hair of male European roe deer obtained at the beginning and the end of the hunting season in eastern Poland was analyzed. It was shown that the cortisol concentration was significantly higher in males obtained at the end of the hunting season, but not affected in the carcass mass of the animals studied. To sum up, the hunting season or other factors (climatic or intra-population) influence the stress levels of young male European roe deer.

**Abstract:** Roe deer (*Capreolus capreolus*), as a representative of the Cervidae family, are particularly sensitive to negative environmental stimuli due to their need to maintain increased vigilance during feeding. Intensive hunting seasons are undoubtedly also a stressful factor for this species. The aim of this study was to analyze the cortisol levels in the hair of male roe deer collected at the beginning and the end of the hunting season in eastern Poland. In total, hair samples from 26 individuals collected in May and 31 individuals collected in September were analyzed. The concentration of cortisol in the hair was determined using the EIA kit. It was shown that the concentration of cortisol was significantly higher in samples collected in September compared to those collected in May (Pr. > |t| = 0.0017). Moreover, the age of animals and carcass mass did not significantly affect the concentration of the tested hormone. In summary, the concentration of cortisol in the fur of male roe deer depended on the season and was not influenced by the carcass mass or age of the animals studied.

**Keywords:** *Capreolus capreolus*; environmental pressure; hair cortisol



**Citation:** Dziki-Michalska, K.; Tajchman, K.; Staniszevska, P.; Strachecka, A. Comparison of Cortisol Levels in the Hair of Male European Roe Deer at the Beginning and End of the Stalking Hunting Season. *Animals* **2024**, *14*, 3184. <https://doi.org/10.3390/ani14223184>

Academic Editor: Juan Carlos Illera del Portal

Received: 23 September 2024

Revised: 29 October 2024

Accepted: 5 November 2024

Published: 6 November 2024



**Copyright:** © 2024 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

The European roe deer (*Capreolus capreolus*) is the most numerous species of cervid in Poland. The Central Statistical Office estimates its population at 918,500 individuals [1]. Compared to 1990, the population of this species has almost doubled, and consequently, it is increasingly hunted in Poland [1]. Researchers indicate that animals from the cervid group are characterized by high sensitivity to negative environmental factors [2–5]. There is no doubt that the high reactivity of roe deer, in combination with the multitude of exogenous negative stimuli, has a negative impact on their health and individual conditions [6]. The animals are not indifferent to stress, which can lead to several undesirable effects [7,8]. Each negative factor, both endogenous and exogenous, causes the release of glucocorticosteroids from the adrenal cortex into the blood [9]. They enable the animal organism to take rapid actions aimed at eliminating and avoiding the impact of the stimulus. The body's quick and

short-term response to stress has a mobilizing effect on the body and is important for survival in times of danger [10]. The negative effects of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis include, among others, decreased individual immunity [11,12] and, consequently, increased susceptibility of the organism to diseases [13]. High cortisol (CORT) levels are associated with behavioral, physiological, and nutritional disorders [14,15]; therefore, the analysis of the impact of predictable negative stimuli on wild animals is justified [16]. Hunting, as an element of reasonably conducted game management, has an impact on the welfare of game animals [4,5].

A sufficiently strong and short-lasting negative stimulus activates the HPA axis [17,18], which translates into a release of glucocorticoids and mobilizes the body to the appropriate behavioral and physiological response, which is aimed at restoring the body to a state of complete balance [19–21]. The animal's body's response to stress leads to increased attention, cardiac minute capacity, resorption, and catabolism [22]. A commonly used indicator of stress response intensity is cortisol (CORT) [4,5,23]. CORT is considered a reliable indicator of stress, but its concentration is species- and individual-dependent [23–25]. CORT and its metabolites are most often measured in the blood, plasma, saliva, feces, and urine [26]. Nevertheless, the results of the tests only concern the body's reactions occurring in a relatively short period, from a few minutes to a maximum of two days before the sample was taken [27–29]. In the assessment of repeated or chronic stress, it has been shown that the CORT level in the hair and fur of animals is a reliable indicator [30–34]. The measurement of cumulative CORT in hair is a valuable indicator of chronic stress in wild animals [35–37] due to its incorporation into the hair shaft in the active growth phase [37], which lasts for a longer period [37,38]. Unfortunately, we do not have a full picture of this process [32,39]. Since the discussed cycle concerns free-living animals, there are no accurate and precise data on CORT accumulation or hair growth rate in the context of species differences, and this may result in certain limitations in the interpretation of the data obtained by researchers [40].

Undoubtedly, hunting, as a highly stressful stimulus, may be one of the factors that affects the well-being of cervids [9]. Studies conducted on red deer have shown that hunting results in, in addition to an increase in cortisol levels, changes to the concentration of  $\beta$ -endorphin and the depletion of carbohydrate resources, which is classified as indicating extreme stress [41]. However, stalking hunting is characterized by a stress response of lower intensity than, for example, hunting with hunting dogs or with the participation of many hunters [28]. Therefore, the cyclicity of hunting seasons may cause recurrent chronic stress in cervids [9]. Nevertheless, it is worth noting that, in wild *Cervus canadensis*, no increase in glucocorticoids in feces was confirmed in connection with the number of hunting days [29]. This may be related to adaptation to repeated negative factors and, consequently, to the plasticity of cervid behavior, which is aimed at avoiding strongly negative stimuli [25]. Studies conducted on roe deer obtained via stalking have shown a large range of results, which may indicate that individual variability (resistance to stress, time of exposure to the stimulus) may be decisive in the intensity of the stress reaction [4]. It should be noted, however, that increased physical activity (caused by, for example, tracking and stalking during individual hunting) causes a slight increase in cortisol concentration in a situation where trauma (e.g., collision with a car) results in a disproportionately higher concentration of this glucocorticoid [42]. In Poland, male roe deer are obtained only during the hunting season, which begins on 11 May and lasts several months—until 30 September of the same year. During this period, bucks are obtained only and exclusively through stalking hunts. Stalking hunts are usually performed in the early morning or evening hours, but not during times of darkness, which means from one hour before sunrise to one hour after sunset. These are periods of the day when animals are very active in eating and moving around. Intensive stalking hunts taking place during this time can have a negative impact on the roe deer population [4,5]. Therefore, this study aimed to assess the effects of stalking hunts on the level of long-term stress in male European roe deer (*Capreolus capreolus*) by comparing



the levels of cortisol in the hair of animals obtained at the beginning and at the end of the stalking hunting season, depending on age and carcass mass.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Design

Roe deer were obtained in accordance with Polish Hunting Law and the principles of individual selection during the hunting season [43] for individual hunts in the Lubartów Forest District of the Game Breeding Centre (GBC) in Kozłówka and Rawityn in May and September 2023. Hunting exploitation of European roe deer in Poland is permitted at a density of 1.5 individuals per 100 ha of hunting district area. The number of young individuals is calculated as 70% of the number of females. The planned harvest of roe deer depends on the density, number of young individuals, habitat possibilities, and long-term hunting management plans. The harvest structure is assumed to be as follows: females—up to 50%, males—up to 50%, and fawns—up to 30%. The criteria for the selection of male roe deer are as follows: individuals with first antlers up to 70% of the total number of males planned for shooting (males with first antlers in the shapes of buttons, straight pointed antlers without side branches, antlers with side branches up to 2 cm long); males with 2nd–4th antlers (all antlers with a smaller number of side branches than regular antlers, three side branches on each beam over 3 cm long), min. 30% of the total number of males scheduled for shooting; and males with 5th antlers and older, regardless of the shape of the antlers [43]. The shooting of animals had a selective purpose and was carried out by qualified hunters—employees of the Lubartów Forest District. In order to obtain animals, they conducted single-person hunts on foot without the participation of hunting dogs to minimize the strength of negative stimuli associated with the procedure. The shooting took place in the early morning hours. The animals died immediately after the first precise shot.

The Lubartów Forest District is located in Central and Eastern Poland (51°27' N, 22°29' E). Poland has a temperate, warm, transitional climate. The forests of the Forest District are located mostly in the IV Mazovian-Podlaskie Region, the 5th district of the Podlaskie Lowland, and the Siedlce Upland. The terrain is not very diverse and is characterized by flatness. The annual rainfall is 552 mm, and the average annual temperature is +7.7 °C. The forest district is characterized by a large diversity of habitats and soil fertility. The forest cover of the region is estimated at 24.9%, with 49% of the area covered by coniferous species and 38% covered by mixed forests with deciduous species [44]. In the area of the forest district, the density of red deer (*Cervus elaphus*) is 16.03/1000 ha of forest area, that of roe deer (*Capreolus capreolus*) is 2.08/1000 ha of the total area, and that of moose (*Alces alces*) is 10.15 individuals per 1000 ha of forest and marsh area [44].

GBC Kozłówka has a total area of 10,757 ha, of which 5945 ha (55%) is forests, and GBC Rawityn has an area of 8080 ha, of which 3666 ha (45%) is forests [44]. In the 2022/2023 stalking hunting season, 32 male roe deer were shot in each area (64 individuals in total in both GBCs) from May to September by 11 hunters (data from the Lubartów Forest District).

Ethical review and approval did not apply to this study because biological material was collected after the hunting procedures. Samples from roe deer were harvested during the hunting period (from 11 May to 30 September 2023) in accordance with the Polish Hunting Law, Annex to Resolution No. 57/2005 of 22 February 2005.

### 2.2. Sampling

The individuals harvested in the study were obtained between 11 and 25 May (in the first two weeks after the start of the male hunting season) and between 15 and 30 September (in the last two weeks of the hunting season). On both dates, only summer hair of reddish-brown color was collected from the carcasses of animals. It was cut with laboratory scissors from the skin in the dorsal–caudal region. Full-length hair samples were frozen within the shortest possible time after collection (up to 15 min) and kept at −25 °C until the tests.

### 2.3. Laboratory Analysis

The extraction methodology was modified from that of Burnett et al. [45]. The collected hair was washed with warm water and dried for one day at room temperature (24 °C) in ambient air, and then washed in 5 mL isopropanol for 3 min and dried for 5 days (24 °C in ambient air). The full-length hair was cut to 1–2 mm in length using laboratory scissors, and then 70 mg of trimmed hair was put into a glass vial. Three-and-a-half methanol (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland) was added, and vials were incubated for 18 h at 37 °C with shaking. After incubation, the supernatant was filtrated using 30 mm diameter syringe filters with a porosity of 0.22 mm (Alfachem, Poznań, Poland) to separate the liquid phase, then placed into disposable glass culture tubes. The supernatant was evaporated at 45 °C in ambient air until completely dry. The extracted cortisol samples were assayed using a commercially available EIA kit (Cortisol Enzyme Immunoassay Kit, K003-H5, Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions with the reagents provided. As recommended by the test manufacturer, sensitivity was calculated by comparing the optical density (OD) for the blank and the highest concentration of the standard. The detection limit was determined at two standard deviations from the blank along the standard curve. Sensitivity was set at 27.6 pg/mL. The limit of detection for the assay was determined similarly, comparing the OD values for twenty runs each of the blank standard and the low-concentration sample. The detection limit was determined to be 45.4 pg/mL. The age of the animals was determined post mortem using the Eidmann method, which involves assessment based on the layers of dentine deposited in the canal of the first pair of incisors I1, the characteristic features of the dentition, the stage of development, and the replacement of primary teeth with permanent ones [44].

### 2.4. Statistical Analyses

The statistical analysis used GLM and CORR procedures of SAS software (Statistical Analysis System, 9.4, 2013). The normality of data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test. The significance of differences between CORT content means was verified using multivariate analysis of variance with Tukey's test (proc GLM). In the model, the month of sampling (2 levels—September and May), animal age (2 levels: 3–4 years old and 5–6 years old), and interaction of sampling month and age were used as qualitative factors, while the carcass mass of the animals was used as a quantitative factor. Additionally, the relationship between animal age and CORT concentration was examined using Pearson correlation. Results were presented using basic statistics and the significance of differences between means at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

The CORT concentration was significantly higher in September compared to May ( $\text{Pr. } > |t| = 0.0017$ ) (Table 1). The age of the animals and the interaction of the month of sampling and age did not significantly affect the CORT concentration in the hair of the studied animals.

**Table 1.** Descriptive statistics of the analyzed parameters for animals harvested at the beginning and at the end of the hunting season.

Month of Sampling	N	Age (Years)	Mean Carcass Mass (kg)	Mean Cortisol Concentration (pg/mg)	Standard Deviation	Standard Error	Coefficient of Variation
May	15	3–4	16.866	0.395 <sup>a</sup>	0.016	0.004	3.929
	11	5–6	18.000	0.397 <sup>ab</sup>	0.006	0.002	1.407
September	17	3–4	15.882	0.418 <sup>ab</sup>	0.034	0.008	8.045
	14	5–6	18.571	0.428 <sup>b</sup>	0.041	0.011	9.658

<sup>a, b</sup>—means in the column differ significantly at  $p \leq 0.05$  (Tukey test).



The animal carcass mass did not affect CORT concentration ( $F = 0.41$ ,  $Pr. > F = 0.53$ ;  $t = 0.64$ ,  $Pr. > |t| = 0.53$ ) using the GLM linear model. The Pearson correlation between roe deer carcass mass and CORT concentration was  $-0.019$  and was not significant ( $Pr. > r = 0.88$ ) (Table 1).

#### 4. Discussion

The average CORT concentration in hair collected in May in both age groups of male roe deer was almost identical, and it was similar in September. The results of our analysis of hair collected in May are consistent with the average results obtained by Ventrella et al. [3] in June. However, the CORT concentration in hair collected in September was different [3]. Our study has indicated a much higher CORT concentration in roe deer hair at the end of the hunting season and after the mating season, which falls at the turn of July and August. The same results have already been reported in other species [46–48]. In turn, studies conducted in Italy on roe deer that died as a result of collisions with cars did not show any correlation between the month of sampling and the CORT concentration in the fur of these animals, and the levels were slightly higher than those obtained in our own research [37].

It should be emphasized that, at present, there are no reference values to which the results obtained by the authors of this study could be related. However, other researchers have shown much higher CORT concentrations in the hair of red deer [49] or elk [39]. The differences are most likely due to species differences, as well as environmental factors such as climate, increased predation pressure, or population density in the area where the population lives [49]. Franchini et al. [37] indicated that higher CORT concentrations in late summer and autumn may be characteristic of areas with a cold climate, and Huber et al. [50] confirmed in their studies higher CORT concentrations in months characterized by lower temperatures. Rakic et al. [51] emphasized that the CORT concentration in the fur fluctuates throughout the year and is dependent on the timing of hair coat changes; it increases when the hair is not growing (resting phase), which has been confirmed by studies conducted on grey wolves [52] and American hares (*Lepus americanus*) [53].

Our own studies, however, indicate that the CORT concentration was significantly higher in September compared to May. The basic factor that may influence the increase in stress levels in male roe deer, apart from the ongoing hunting season, is the mating season. Territorial behavior in European roe deer emerges with the arrival of spring, reaching its peak during the rut. At that time, males display intensified territorial behavior, characterized by increased aggression [54], which may have an impact on our results. Studies conducted so far on cervids confirm that rut is a particularly stressful period for cervids [28,50,55]. The increase in cortisol concentration in the fur may also be influenced by negative environmental factors, including climate, ambient temperature, or the high density of the species in a given area [12,49,56–58]. In the study region, the average temperatures for the months covered by the study were: May: 9–16 °C, June: 16–26 °C, July: 15–23 °C, August: 10–32 °C, and September: 9–19 °C [59]. It can therefore be concluded that the temperature value for the above-mentioned months could have been an additional negative factor causing heat stress [60], because in the case of moose (*Alces alces*), the upper-temperature limit that does not cause the above stress is 14 °C in the summer months [61], moose being an excellent example of a species sensitive to maximum temperatures in each season [60].

An important factor influencing the welfare of roe deer is the density of the red deer (*Cervus elaphus*) population in its habitat. Many authors indicate that a high density of this species may negatively affect the population of roe deer, primarily due to food competition [62–64]. It should therefore be considered that potential interactions of these two species may lead to increased CORT secretion in roe deer, especially when both species share the same habitats [37]. However, in the study area, the density of red deer probably does not have a negative impact on the population of European roe deer, as it was at the level of 16.03 individuals per 1000 ha of forest area [44]. According to the recommendations

of the Polish Hunting Association, it should oscillate between 15 and 35 individuals per 1000 ha of forest area—such values allow for rational hunting management [43].

It is worth emphasizing that lower CORT concentrations in various species, including roe deer, are typical for warmer months—CORT concentration increases from early spring to late summer [3,64,65], which contrasts our results. It is also important to note that a high concentration of androgens during the rut in roe deer may affect the CORT concentration caused by stress [66,67], although the relationship between CORT and testosterone may be apparent due to seasonal fluctuations in both of these hormones [3].

The results obtained herein confirm the lack of a relationship between the carcass mass of animals, age, and CORT concentration in the hair, which has already been noted [40,49]. This allows us to conclude that the factors that have the strongest impact on the welfare of roe deer are primarily environmental factors, including animal disturbance during hunting seasons. Considering the cyclical repetition of this negative stimulus, it may cause chronic stress in free-living animals [9]. Gentsch et al. [28] indicated that individual hunting is less stressful than, for example, the death of an animal due to a road accident, but little is known about long-term stress in wild animals. The mere presence of hunters in the hunting ground is a negative stimulus for cervids and affects their welfare [5,9]. Studies conducted by Bateson and Bradshaw [41] indicate that the increasing concentration of cortisol in the feces of red deer is positively correlated with the intensity of hunting pressure. A lack of such a correlation was demonstrated by Ensminger et al. [28] in studies conducted on wild *Cervus canadensis*. Therefore, determining the concentration of CORT in the fur of game animals offers a reliable indicator for tracking its trends and monitoring the welfare of these animals [39,51].

## 5. Conclusions

In summary, the cortisol concentration in the hair of male European roe deer was significantly higher in animals obtained at the end of the stalking hunting season. Disturbing animals during the hunting season may be one of the factors that generates chronic stress in them, especially if the negative stimulus is repeated over a longer period of time. However, it may also be an effect of the season, but it did not correlate with the carcass mass or the age of the animals. The results obtained and analyzed herein can be a valuable source of information in the context of deer welfare. Still, this is preliminary research and should be expanded upon in subsequent years, along with other methods of assessing welfare.

**Author Contributions:** Conceptualization: K.D.-M. and K.T.; methodology: K.D.-M. and K.T.; laboratory analysis: P.S. and A.S.; formal analysis: K.D.-M. and K.T.; collection of biological material: K.D.-M.; writing—original draft preparation: K.D.-M. and K.T., writing—review and editing: K.D.-M. and K.T.; supervision: K.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

**Institutional Review Board Statement:** Ethical review and approval do not apply to this study due to the fact that biological material from red deer was harvested during the hunting period (from 1 September to 31 December 2022) in accordance with the principles of population and individual selection of game animals in Poland (Polish Hunting Law, Annex to Resolution No. 57/2005 of 22 February 2005).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all individual participants involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available upon request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** This article will be part of K. Dżiki-Michalska's PhD thesis. The authors thank the employees of the Lubartów Forest District for their help in collecting biological material.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Abbreviations

CORT: cortisol; A: age; CM: carcass mass.

## References

- Central Statistical Office 2023. Available online: <https://stat.gov.pl/> (accessed on 30 November 2023).
- Barić Rafaj, R.; Tončić, J.; Vicković, I.; Šošćarić, B. Haematological and biochemical values of farmed red deer aematological and biochemical values of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Arhiv.* **2011**, *81*, 513–523. Available online: <https://hrcak.srce.hr/70942> (accessed on 22 September 2024).
- Ventrella, D.; Elmi, A.; Bertocchi, M.; Anibaldi, C.; Parmeggiani, A.; Govoni, N.; Bacci, M.L. Progesterone and Cortisol Levels in Blood and Hair of Wild Pregnant Red Deer (*Cervus Elaphus*) Hinds. *Animals* **2020**, *10*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dziki-Michalska, K.; Tajchman, K.; Kowalik, S. Physiological response of roe deer (*Capreolus capreolus*) during stalking hunts depending on age. *BMC Vet. Res.* **2023**, *19*, 266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dziki-Michalska, K.; Tajchman, K.; Kowalik, S.; Wójcik, M. The Levels of Cortisol and Selected Biochemical Parameters in Red Deer Harvested During Stalking Hunts. *Animals* **2024**, *14*, 1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carbillet, J.; Rey, B.; Palme, R.; Morellet, N.; Bonnot, N.; Chaval, Y.; Cargnelutti, B.; Hewison, A.J.M.; Gilot-Fromont, E.; Verheyden, H. Under cover of the night: Context-dependency of anthropogenic disturbance on stress levels of wild roe deer *Capreolus capreolus*. *Conserv. Physiol.* **2020**, *8*, coaa086. [[CrossRef](#)]
- Haase, C.G.; Long, A.K.; Gillooly, J.F. Energetics of stress: Linking plasma cortisol levels to metabolic rate in mammals. *Biol. Lett.* **2016**, *12*, 20150867. [[CrossRef](#)]
- Jankord, R.; Herman, J.P. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1148*, 64–73. [[CrossRef](#)]
- Vilela, S.; da Silva, A.A.; Palme, R.; Ruckstuhl, K.E.; Sousa, J.P.; Alves, J. Physiological stress reactions in red deer Induced by Hunting activities. *Animals* **2020**, *10*, 1003. [[CrossRef](#)]
- Martin, L.B. Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2009**, *163*, 70–76. [[CrossRef](#)]
- Griffin, J.F.T.; Thomson, A.J. Farmed deer: A large animal model for stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* **1998**, *15*, 445–456. [[CrossRef](#)]
- Malherbe, J.C. Influence of Environmental and Individual Characteristics on Baseline Stress Levels, and Consequences in a Large Mammal, the Roe Deer *Capreolus capreolus*. Ph.D. Thesis, Université Paul Sabatier—Toulouse III, Toulouse, France, 2019.
- Dhabhar, F.S. Effects of stress on immune function: The good, the bad, and the beautiful. *Immunol. Res.* **2014**, *58*, 193–210. [[CrossRef](#)]
- Hing, S.; Narayan, E.J.; Thompson, R.C.A.; Godfrey, S.S. The relationship between physiological stress and wildlife disease: Consequences for health and conservation. *Wildl. Res.* **2016**, *43*, 51. [[CrossRef](#)]
- Wyse, A.T.S.; dos Santos, T.M.; Seminotti, B.; Leipnitz, G. Insights from Animal Models on the Pathophysiology of Hyperphenylalaninemia: Role of Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Inflammation. *Mol. Neurobiol.* **2021**, *58*, 2897–2909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Güldenpfennig, J.; Schmicke, M.; Hoedemaker, M.; Siebert, U.; Keuling, O. An approach to assess stress in response to drive hunts using cortisol levels of wild boar (*Sus scrofa*). *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 16381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dallman, M.F.; Akana, S.F.; Cascio, C.S.; Darlington, D.N.; Jacobson, L.; Levin, N. Regulation of ACTH secretion: Variations on a theme of B. *Recent Prog. Horm. Res.* **1987**, *43*, 113–173. [[CrossRef](#)]
- Korzekwa, A.J.; Kotlarczyk, A.M. Artificial Reproductive Technology (ART) Applied to Female Cervids Adapted from Domestic Ruminants. *Animals* **2021**, *11*, 2933. [[CrossRef](#)]
- Mc Ewen, B.S. Allostasis and allostatic load: Implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* **2000**, *22*, 108–124. [[CrossRef](#)]
- Chrousos, G.P. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2009**, *5*, 374–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Verbeek, E.; Colditz, I.; Blache, D.; Lee, C. Chronic stress influences attentional and judgement bias and the activity of the HPA axis in sheep. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211363. [[CrossRef](#)]
- Tsigos, C.; Chrousos, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* **2002**, *53*, 865–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Otten, W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2019**, *1*, 10–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sapolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 55–89. [[CrossRef](#)]
- Dickens, M.J.; Romero, L.M. A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2013**, *191*, 177–189. [[CrossRef](#)]
- Christ-Crain, M. Vasopressin and Copeptin in health and disease. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2019**, *20*, 283–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Novak, M.A.; Hamel, A.F.; Kelly, B.J.; Dettmer, A.M.; Meyer, J.S. Stress, the HPA axis, and nonhuman primate well-being: A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2013**, *143*, 135–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Gentsch, R.P.; Kjellander, P.; Röken, B.O. Cortisol response of wild ungulates to trauma situations: Hunting is not necessarily the worst stressor. *Eur. J. Wildl. Res.* **2018**, *64*, 11. [[CrossRef](#)]
29. Ensminger, D.C.; Pritchard, C.; Langkilde, T.; Gingery, T.; Banfield, J.E.; Walter, W.D. The influence of hunting pressure and ecological factors on fecal glucocorticoid metabolites in wild elk. *Wildl. Biol.* **2020**, *2*, 00683. [[CrossRef](#)]
30. Cirimele, V.; Kintz, P.; Dumestre, V.; Gouille, J.P.; Ludes, B. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **2000**, *107*, 381–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Koren, L.; Mokady, O.; Karaskov, T.; Klein, J.; Koren, G.; Geffen, E. A Novel Method Using Hair for Determining Hormonal Levels in Wildlife. *Anim. Behav.* **2002**, *63*, 403–406. [[CrossRef](#)]
32. Russell, E.; Koren, G.; Rieder, M.; Van Uum, S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 589–601. [[CrossRef](#)]
33. Gormally, B.M.G.; Romero, L.M.; Angelier, F. What are you actually measuring? A review of techniques that integrate the stress response on distinct timescales. *Funct. Ecol.* **2020**, *34*, 2030–2044. [[CrossRef](#)]
34. Tallo-Parra, O.; Lopez-Bejar, M.; Carbajal, A.; Monclús, L.; Manteca, X.; Devant, M. Acute ACTH-induced elevations of circulating cortisol do not affect hair cortisol concentrations in calves. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2017**, *240*, 138–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Prandi, A.; Peric, T.; Corazzin, M.; Comin, A.; Colitti, M. A first survey on hair cortisol of an alpine ibex (*Capra ibex ibex*) population. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2018**, *36*, 57–74.
36. Filacorda, S.; Comin, A.; Franchini, M.; Frangini, L.; Pesaro, S.; Pezzin, E.N.; Prandi, A. Cortisol in hair: Do habitat fragmentation and competition with golden jackal (*Canis aureus*) measurably affect the long-term physiological response in European wildcat (*Felis silvestris*)? *Ann. Zool. Fennici.* **2021**, *59*, 1–16. [[CrossRef](#)]
37. Franchini, M.; Peric, T.; Frangini, L.; Prandi, A.; Comin, A.; Rota, M.; Filacorda, S. You're stressing me out! Effect of interspecific competition from red deer on roe deer physiological stress response. *J. Zool.* **2023**, *320*, 63–74. [[CrossRef](#)]
38. Meyer, J.S.; Novak, M.A. Minireview: Hair Cortisol: A Novel Biomarker of Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Activity. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4120–4127. [[CrossRef](#)]
39. Keogh, M.J.; Thompson, D.P.; Crouse, J.A. Tracking reproductive events: Hoof growth and steroid hormone concentrations in hair and hoof tissues in moose (*Alces alces*). *Conserv. Physiol.* **2023**, *11*, coad097. [[CrossRef](#)]
40. Ventrella, D.; Elmi, A.; Barone, F.; Carnevali, G.; Govoni, N.; Bacci, M.L. Hair Testosterone and Cortisol Concentrations in Pre- and Post-Rut Roe Deer Bucks: Correlations with Blood Levels and Testicular Morphometric Parameters. *Animals* **2018**, *8*, 113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bateson, P.; Bradshaw, E.L. Physiological effects of hunting red deer (*Cervus elaphus*). *Proc. Biol. Sci.* **1997**, *264*, 1707–1714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sheriff, M.J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* **2011**, *166*, 869–887. [[CrossRef](#)]
43. Polish Hunting Law, Annex to Resolution No. 57/2005 of 22 February 2005. Available online: <https://lubartow.lublin.lasy.gov.pl/> (accessed on 22 September 2024).
44. Forest District Lubartów. Available online: <https://lubartow.lublin.lasy.gov.pl/> (accessed on 28 February 2024).
45. Burnett, T.A.; Madureira, A.M.L.; Silper, B.F.; Nadalin, A.; Tahmasbi, A.; Veira, D.M.; Cerri, R.L.A. Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 7685–7690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Brown, W.A.B.; Chapman, N.G. The dentition of fallow deer (*Dama dama*): A scoring scheme to assess age from wear of the permanent molariform teeth. *J. Zool.* **1990**, *221*, 659–682. [[CrossRef](#)]
47. Martin, J.G.A.; Réale, D. Animal temperament and human disturbance: Implications for the response of wildlife to tourism. *Behav. Process.* **2008**, *77*, 66–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Cattet, M.; Macbeth, B.J.; Janz, D.M.; Zedrosser, A.; Swenson, J.E.; Dumond, M.; Stenhouse, G.B. Quantifying long-term stress in brown bears with the hair cortisol concentration: A biomarker that may be confounded by rapid changes in response to capture and handling. *Conserv. Physiol.* **2014**, *2*, cou026. [[CrossRef](#)]
49. Caslini, C.; Comin, A.; Peric, T.; Prandi, A.; Pedrotti, L.; Mattiello, S. Use of hair cortisol analysis for comparing population status in wild red deer (*Cervus elaphus*) living in areas with different characteristics. *Eur. J. Wildl. Res.* **2016**, *62*, 713–723. [[CrossRef](#)]
50. Huber, S.; Palme, R.; Arnold, W. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2003**, *130*, 48–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Rakic, F.; Fernandez-Aguilar, X.; Pruvot, M.; Whiteside, D.; Mastro Monaco, G.; Leclerc, L.; Jutha, N.; Kutz, S. Variation of hair cortisol in two herds of migratory caribou (*Rangifer tarandus*): Implications for health monitoring. *Conserv. Physiol.* **2023**, *11*, coad030. [[CrossRef](#)]
52. Pereira, P.; Esteruelas, N.F.; Nakamura, M.; Rio-Maior, H.; Krofel, M.; Di Blasio, A.; Zoppi, S.; Robetto, S.; Llana, L.; García, E. Hair cortisol concentration reflects the life cycle and management of grey wolves across four European populations. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 5697. [[CrossRef](#)]
53. Lavergne, S.G.; Peers, M.J.L.; Mastro Monaco, G.; Majchrzak, Y.N.; Nair, A.; Boutin, S.; Boonstra, R. Hair cortisol as a reliable indicator of stress physiology in the snowshoe hare: Influence of body region, sex, season, and predator-prey population dynamics. *Gen. Comp. Endo.* **2020**, *294*, 113471. [[CrossRef](#)]
54. Hoem, S.A.; Melis, C.; Linnell, J.D.C.; Reidar, A. Fighting behaviour in territorial male roe deer *Capreolus capreolus*: The effects of antler size and residence. *Eur. J. Wildl. Res.* **2007**, *53*, 1–8. [[CrossRef](#)]

55. Rehbinder, C.; Edqvist, L.E.; Lundström, K.; Villafañe, F. Field study of management stress in reindeer (*Rangifer tarandus* L.). *Rangifer* **1982**, *2*, 2–21. [[CrossRef](#)]
56. Spong, G.; Gould, N.P.; Sahlén, E.; Cromsigt, J.P.; Kindberg, J.; DePerno, C.S. Large-scale spatial variation of chronic stress signals in moose. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0225990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tajchman, K.; Bogdaszewski, M.; Kowalczyk-Vasilev, E. Effects of supplementation with different levels of calcium and phosphorus on mineral content of first antler, bone, muscle, and liver of farmed fallow deer (*Dama dama*). *Can. J. Anim. Sci.* **2020**, *100*, 17–26. [[CrossRef](#)]
58. Tajchman, K.; Ukalska-Jaruga, A.; Bogdaszewski, M.; Pecio, M.; Janiszewski, P. Comparison of the accumulation of macro- and microelements in the bone marrow and bone of wild and farmed red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 324. [[CrossRef](#)]
59. Available online: <https://www.meteoatlas.pl/polska/kozlowska> (accessed on 30 November 2023).
60. Boone, R.B. Weather and Climate Impacts on Browsing and Grazing Ungulates. In *The Ecology of Browsing and Grazing II*; Gordon, I.J., Prins, H.H.T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019. [[CrossRef](#)]
61. Renecker, L.A.; Hudson, R.J. Seasonal energy expenditures and thermoregulatory responses of moose. *Can. J. Zool.* **1986**, *64*, 322–327. [[CrossRef](#)]
62. Storms, D.; Aubry, P.; Haman, J.C.; Saïd, S.; Fritz, H.; Saint-Andrieux, C.; Klein, F. Seasonal variation in diet composition and similarity of sympatric red deer *Cervus elaphus* and roe deer *Capreolus capreolus*. *Wildl. Biol.* **2008**, *14*, 237–250. [[CrossRef](#)]
63. Richard, E.; Gaillard, J.M.; Saïd, S.; Hamann, J.L.; Klein, F. High red deer density depresses body mass of roe deer fawns. *Oecologia* **2010**, *163*, 91–97. [[CrossRef](#)]
64. Borkowski, J.; Banul, R.; Jurkiewicz-Azab, J.; Hołdyński, C.; Święczkowska, J.; Nasiadko, M.; Załuski, D. There is only one winner: The negative impact of red deer density on roe deer numbers and distribution in the Słowiński National Park and its vicinity. *Ecol. Evol.* **2021**, *11*, 6889–6899. [[CrossRef](#)]
65. Bacci, M.L.; Nannoni, E.; Govoni, N.; Scorrano, F.; Zannoni, A.; Forni, M.; Martelli, G.; Sardi, L. Hair cortisol determination in sows in two consecutive reproductive cycles. *Reprod. Biol.* **2014**, *14*, 218–223. [[CrossRef](#)]
66. Boswell, T.; Woods, S.C.; Kenagy, G.J. Seasonal Changes in Body Mass, Insulin, and Glucocorticoids of Free-Living Golden-Mantled Ground Squirrels. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1994**, *96*, 339–346. [[CrossRef](#)]
67. Handa, R.J.; Weiser, M.J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Front. Neuroendocrinol.* **2014**, *35*, 197–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## **Załącznik 2**

**Oświadczenia autorów publikacji dotyczące ich wkładu w przygotowanie  
opublikowanych prac naukowych**



Mgr inż. Katarzyna Dziki-Michalska  
Ul. Lwowska 26/23  
20-128 Lublin  
tel.: 502 433 462  
e-mail: katarzyna.michalska@up.lublin.pl

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S. 2024. Physiological response of roe deer (*Capreolus capreolus*) during stalking hunts depending on age. BMC Vet. Res. 19:266* mój udział polegał na przeglądzie literatury, prowadzeniu badań klinicznych, laboratoryjnych, eksperymentalnych oraz pozyskiwaniu próbek i danych, a także wykonaniu doświadczenia. Dodatkowo opracowałam koncepcję i zaprojektowałam badania, zinterpretowałam wyniki, przygotowałam manuskrypt i zrewidowałam jego ostateczną formę. Mój wkład pracy w publikację wynosił 70%.

  
.....  
Podpis

Dr hab. Katarzyna Tajchman, prof. UPL  
Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

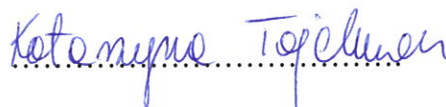
Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S. 2024. Physiological response of roe deer (Capreolus capreolus) during stalking hunts depending on age. BMC Vet. Res. 19:266* mój udział polegał na konceptualizacji pracy, zaprojektowaniu badania, przygotowaniu manuskryptu oraz jego korekcie po recenzjach, nadzorze nad badaniami oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 15%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pn. „Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Dziki-Michalskiej.



Podpis



Dr hab. Sylwester Kowalik, prof. UPL  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

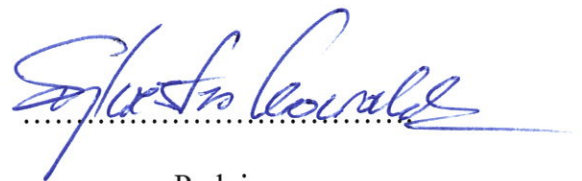
**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S. 2024. Physiological response of roe deer (Capreolus capreolus) during stalking hunts depending on age. BMC Vet. Res. 19:266* mój udział polegał na konceptualizacji pracy, zaprojektowaniu badania, pobraniu próbek, wykonaniu eksperymentu, interpretacji wyników oraz przygotowaniu i zredagowaniu manuskryptu.

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 15%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pn. „Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Dziki-Michalskiej.



Podpis

Mgr inż. Katarzyna Dziki-Michalska  
Ul. Lwowska 26/23  
20-128 Lublin  
tel.: 502 433 462  
e-mail: katarzyna.michalska@up.lublin.pl

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S., Wójcik M. 2024. The levels of cortisol and selected biochemical parameters in red deer harvested during stalking hunts. Animals. 14(7):1108* mój udział polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, analizie formalnej, zebraniu materiału biologicznego, przygotowaniu manuskryptu oraz przeredagowaniu manuskryptu po recenzjach. Mój wkład pracy w publikację wynosił 70%.

  
.....  
Podpis

Dr hab. Katarzyna Tajchman, prof. UPL  
Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S., Wójcik M. 2024. The levels of cortisol and selected biochemical parameters in red deer harvested during stalking hunts. Animals. 14(7):1108* mój udział polegał na konceptualizacji pracy, zaprojektowaniu metodologii, analizie formalnej, przygotowaniu manuskryptu oraz jego korekcie po recenzjach, nadzorze nad badaniami oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pn. „Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Dziki-Michalskiej.



Podpis

Dr hab. Sylwester Kowalik, prof. UPL  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S., Wójcik M. 2024. The levels of cortisol and selected biochemical parameters in red deer harvested during stalking hunts. Animals. 14(7):1108* mój udział polegał na wykonaniu analiz laboratoryjnych oraz rewizji manuskryptu po recenzjach. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pn. „Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Dziki-Michalskiej.



Podpis

Mgr Maciej Wójcik  
Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych w Lublinie  
ul. Czechowska 4  
20-950 Lublin

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Kowalik S., Wójcik M. 2024. The levels of cortisol and selected biochemical parameters in red deer harvested during stalking hunts. Animals. 14(7):1108* mój udział polegał na zebraniu materiału biologicznego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pn. „Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Dziki-Michalskiej.

  
Kierownik  
Zespołu ds. Gospodarki Łowieckiej  
Podpis  
mgr inż. Maciej Wójcik

Mgr inż. Katarzyna Dziki-Michalska  
Ul. Lwowska 26/23  
20-128 Lublin  
tel.: 502 433 462  
e-mail: katarzyna.michalska@up.lublin.pl

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Staniszewska P., Strachecka A. 2024. Comparison of cortisol levels in the hair of male european roe deer at the beginning and end of the stalking hunting season. Animals. 14(22):3184* mój udział polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, analizie formalnej, zebraniu materiału biologicznego, przygotowaniu manuskryptu oraz przerecikowaniu manuskryptu po recenzjach. Mój wkład pracy w publikację wynosił 70%.

  
.....  
Podpis



Dr hab. Katarzyna Tajchman, prof. UPL  
Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Staniszewska P., Strachecka A. 2024. Comparison of cortisol levels in the hair of male european roe deer at the beginning and end of the stalking hunting season. Animals. 14(22):3184* mój udział polegał na konceptualizacji pracy, zaprojektowaniu metodologii, analizie formalnej, przygotowaniu manuskryptu oraz jego korekcie po recenzjach, nadzorze nad badaniami oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pn. „Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Dziki-Michalskiej.

  
.....  
Podpis

Dr Patrycja Staniszevska  
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców  
i Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Doświadczalna 50A, 20-980 Lublin

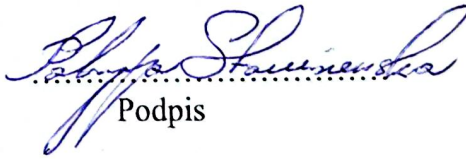
Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Staniszevska P., Strachecka A. 2024. Comparison of cortisol levels in the hair of male european roe deer at the beginning and end of the stalking hunting season. Animals. 14(22):3184* mój udział polegał na wykonaniu analiz laboratoryjnych. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pn. „Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Dziki-Michalskiej.

  
Podpis



Prof. dr hab. Aneta Strachecka  
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców  
i Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Doświadczalna 50A, 20-980 Lublin

Lublin, dn. 04 marzec 2025 r.

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

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Dziki-Michalska K., Tajchman K., Staniszevska P., Strachecka A. 2024. Comparison of cortisol levels in the hair of male european roe deer at the beginning and end of the stalking hunting season. Animals. 14(22):3184* mój udział polegał na wykonaniu analiz laboratoryjnych. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Dobrostan wybranych jeleniowatych pozyskanych podczas polowań z podchodu” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr inż. Katarzyny Dziki-Michalskiej.

*Aneta Strachecka*

.....

Podpis