



„Využití vyspělých technologií a čichových schopností psů pro zvýšení efektivity vyhledávání pohřešovaných osob v terénu” (PÁTRAC) s identifikačním kódem „VI20172020088”.

Kortizol ve slinách jako možný ukazatel stresu psů

Typ výsledku dle UV č. 837/2017	Evidenční číslo (příjemce)	Rok vzniku
O 3 Metodická příručka	<i>Id</i> 85723	2021
ISBN	Webový odkaz na výsledek	Kde a kdy publikováno
978-80-213-3123-5	patrac.eu	ČZU v Praze Soubor příruček a metodik projektu PÁTRAC 2021

Stručná anotace k výsledku:

V posledních letech vzrostl zájem veřejnosti o životní pohodu zvířat (welfare). Zájem se týká také psů, kteří by v lidské péči měli pocítit co nejmenší míru stresu, což je možné zajistit jen tak, že bude možné míru stresu kvantifikovat. Cílem naší práce bylo shrnout, zda a za jakých podmínek může být hormon kortizol detekovaný ve slinách psů využit jako neinvazivní ukazatel akutního stresu psů. Vzhledem ke komplexnosti stresové odpovědi by mělo být sledování kortizolu ve slinách doplněno o sledování příznaků stresu podle chování, ale je třeba zdůraznit, že behaviorální stresové příznaky nemusí být vždy v přímé korelaci s produkcí stresových hormonů. Kromě sledování příznaků chování je dobré měření koncentrace kortizolu doplnit měřením dalších markerů stresu řídících stresovou reakci.

Řešitelský tým:

manažer, hlavní řešitel

Svobodová Ivona, Chaloupková Helena

autorský kolektiv

Chmelíková Eva, Bolechová Petra, Chaloupková Helena, Svobodová Ivona,
Jovičič Marija, Sedmíková Markéta

věcná, stylistická a jazyková korektura

Končel Roman, Makešová Terezie, Makeš Vladimír, Trankovská Zuzana ml.

grafická úprava

Bezvoda Bohdan

grafický návrh nášivek

Bartoš Luděk

VYHLEDÁVÁNÍ POHŘEŠOVANÝCH OSOB

identifikační kód:
VI20172020088



*Kortizol ve slinách
jako možný ukazatel
stresu psů*

Eva Chmelíková, Petra Bolechová, Helena Chaloupková,
Ivona Svobodová, Maria Jovičič, Markéta Sedmíková



Česká zemědělská
univerzita v Praze

Autoři:

doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.¹

Ing. Petra Bolechová, Ph.D.¹

doc. Ing. Helena Chaloupková, Ph.D.¹

Ing. Ivona Svobodová, Ph.D.¹

Mgr. Marija Jovičić, Ph.D.¹

prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.¹

¹ Česká zemědělská univerzita v Praze,
FAPPZ,
Katedra etologie a zájmových chovů

Příjemce podpory:

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol

Dedikace:

Publikace vznikla za podpory projektu VI20172020088 s názvem Využití vyspělých technologií a čichových schopností psů pro zvýšení efektivity vyhledávání pohřešovaných osob v terénu podpořeného Ministerstvem vnitra České republiky v rámci programu bezpečnostního výzkumu České republiky v letech 2015–2022.

Hlavní řešitel projektu:

Doc. Ing. Helena Chaloupková, Ph.D.¹

e-mail: chaloupkovah@af.czu.cz

Manažer projektu:

Ing. Ivona Svobodová, Ph.D.¹

e-mail: svobodovai@af.czu.cz

Věcná, stylistická a jazyková korektura:

Ing. Roman Končel, Mgr. Terezie Makešová,

Ing. Vladimír Makeš, Zuzana Trankovská ml.

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Tisk: powerprint s.r.o., Brandejsovo nám. 1219,
Praha 6 – Suchdol

Náklad: 300 výtisků

Vydání: první

Rok vydání: 2021

Grafická úprava: Bohdan Bezvoda

Grafický návrh nášivek:

prof. Ing. Luděk Bartoš, DrSc.

© 2021 Česká zemědělská univerzita v Praze

ISBN 978-80-213-3123-5

Abstrakt	4
1. Úvod	5
2. Osy stresu a stresové hormony.....	7
3. Stanovení kortizolu u psů.....	9
3.1 Odběr vzorků pro stanovení salivárního kortizolu.....	10
3.2 Extrakce salivárního kortizolu a vlastní stanovení hormonu	12
4. Faktory ovlivňující produkci kortizolu.....	15
4.1 Čas, věk a pohlaví	15
5. Vliv různých stresorů na produkci slinného kortizolu	17
5.1 Klimatické podmínky jako stresor	17
5.2 Umělý externí faktor jako stresor a povahové testy	18
5.3 Interakce psa s člověkem a jinými psy jako stresor	18
6. Další možné markery stresu psů zjistitelné ve slinách.....	21
7. Závěry.....	23
Použité zdroje	24
Tabulky a obrázky	33

V posledních letech vzrostl zájem veřejnosti o životní pohodu zvířat (welfare). Zájem se týká také psů, kteří by v lidské péči měli pocítit co nejmenší míru stresu, což je možné zajistit jen tak, že bude možné míru stresu kvantifikovat. Neinvasivní metody sledování stresu mohou pomoci odhalit špatný welfare. Cílem naší práce bylo shrnout, zda a za jakých podmínek, může být hormon kortizol nalezený ve slinách psů využit jako neinvasivní ukazatel akutního stresu. Měření kortizolu jako ukazatele stresu psů má určité nevýhody, které mohou vést ke špatné interpretaci výsledků. Klíčová je standardizovaná metoda odběru a následného zpracování vzorků slin před vlastní analýzou. Dále je třeba při přípravě pokusu, statistickém zpracování výsledků, stanoveních a finální interpretaci výsledků vzít v potaz možné střídání hladiny kortizolu během dne (cirkadiální rytmus) a individuální variabilitu v hladině hormonu. Vzhledem ke komplexnosti stresové odpovědi by mělo být měření kortizolu ve slinách doplněno o sledování příznaků stresu podle chování (behaviorální příznaky), ale je třeba zdůraznit, že behaviorální stresové příznaky nemusí být vždy v přímém vztahu s produkcí stresových hormonů. Kromě sledování příznaků chování je dobré měření koncentrace kortizolu doplnit měřením dalších ukazatelů stresu, které jsou zapojeny do dvou drah řídicích stresovou reakci.

V poslední době velmi roste zájem o životní pohodu zvířat, včetně psů. Diskuze spojené s péčí a ustájením psů budou mnohem objektivnější, pokud budeme schopni změřit, jak psi suboptimální podmínky snášejí.

V situacích, která zvířata považují za nevyhovující vykazují známky behaviorálního a fyziologického stresu (1). Stres je biologickou odpovědí organismu na mimořádné okolnosti definované jako stresory, které narušují přirozenou rovnováhu těla (2, 3). Stres bývá vysvětlován jako něco negativního, může mít však také pozitivní význam. Existují dva typy stresu, eustres, jedince neohrožující stres označovaný jako „dobrý stres“ a distres, stres se škodlivými účinky, také popisovaný jako „špatný stres“ (4). V závislosti na povaze a stavu psa může stejný typ stresoru vyvolat eustres, mírný a střední stres ale také těžkou formu stresu. Příznaky distresu mohou být velmi variabilní. V závislosti na délce trvání, je stres definován jako akutní, pokud stresor působí po krátkou dobu a chronický, při dlouhodobém působení stresorů. Jak akutní, tak také chronický stres mohou vyvolat distres (5, 6). V závislosti na svém původu mohou být stresory klasifikovány jako biologické (např. hladovění), fyzikální (např. nízká či vysoká teplota, transport, zranění, nedostatek kyslíku, krvácení a podobně), psychologické a sociální. Mezi posledně dva jmenované stresory jsou řazeny například absence majitele, hlasité zvuky, sociální interakce, cvičení, vystavení novým věcem, či přehnaná očekávání psovoda (7–9). Psi v lidské péči by měli zažívat co nejméně distresu. Aby tento požadavek byl naplněn, je třeba úroveň stresu změřit a následně kvantifikovat. Stále je třeba mít na paměti, že stres je vysoce subjektivním fenoménem.

Ke sledování welfare psů pomocí fyziologických stresových parametrů byly navrženy různé neinvazivní metody, které zkoumají sympato-adreno-

-medulární a neuroendokrinní systém, imunitní funkce a metabolický stav těla. Řada provedených studií byla zaměřena na sledování účinků stresu pomocí hormonálních markerů, mnoho faktorů je však neznámých. Naše práce se zaměřila na otázku, zda a za jakých podmínek je možné využít hormon kortizol ze slin jako ukazatel akutního stresu psů.

2.

OSY STRESU A STRESOVÉ HORMONY

Bly popsány dvě základní osy stresu: sympato-adreno-medulární (SAM) a hypotalamo-hypofyzárně-adrenální (HPA) (10, 11). Adrenální žlázy, nadledviny, hrají klíčovou roli v obou drahách, produkují dva odlišné typy hormonů, katecholaminy a glukokortikoidy, které dohromady vyrábí fyziologickou odpověď organismu na stres (12) (Obrázek 1).

SAM osa umožňuje nejrychlejší odpověď na stresový stimul díky aktivaci sympatického a parasympatického nervového systému (13). Katecholaminy jako je adrenalin a noradrenalin, také označované jako epinefrin a norepinefrin, ovlivňují glykolýzu, vazokonstrikci cév kosterní svaloviny a jater. Na úrovni srdce zvyšují frekvenci a sílu srdečních kontrakcí, čímž se zvyšuje tok krve a roste krevní tlak. Zmíněné fyziologické změny jsou spojeny s poplachovými reakcemi těla (9, 14).

Aktivace HPA osy následně vede ke zvýšení hladiny glukokortikoidů v krvi (13). Nejdůležitějšími biologicky důležitými glukokortikoidy u savců jsou kortizol a kortikosteron (12). Tyto hormony aktivují katabolické procesy spojené s mobilizací energetických rezerv, stimulují tvorbu glukózy z necukerných zdrojů (glukoneogenezi), ovlivňují metabolismus proteinů a tuků přes jejich rozpad (proteolýzu a lipolýzu) a potlačují dočasnou nežádoucí imunitní reakce (10). Uvolňování glukokortikoidů je regulováno tzv. mechanismem zpětné vazby z jádra, které je umístěno v hypotalamu přes kortikotropin-uvolňující hormon (CRH), hypofyzární adrenokortikotropní hormon (ACTH) a buňky kůry nadledvin (9). Vysoké hladiny glukokortikoidů mají inhibiční účinek na úrovni centrální nervové soustavy i hypofýzy a hypofýza je rezistentní k CRH a ACTH hormonům (15–17). Celková

koncentrace glukokortikoidů v krvi se liší podle živočišného druhu. Mezi druhy existuje rozdíl v citlivosti tkání na hormony stresové osy (18, 19). Kortikosteron je hlavním glukokortikoidem u myší, potkanů a králíků, zatímco kortizol je dominantním glukokortikoidem u primátů, prasat, koček, skotu a psů (12).

3.

STANOVENÍ KORTIZOLU U PSŮ

U psů může být kortizol izolován z krevní plazmy (20, 21), výkalů (22, 23), moči (20, 24), chlupů (25, 26) a slin (20, 27). Glukokortikoidy obsažené ve výkalech a srsti lze použít jako ukazatel dlouhodobého stresu, stejné hormony v krevní plazmě a slinách odráží současný stav organismu a je vhodné je využít jako ukazatel akutního stresu. Metody odběru moči a výkalů (bez chirurgické intervence typu cystocentézy) neovlivňují welfare zvířat, je však obtížné zajistit stejný čas odběru těchto vzorků. Jsou tedy méně vhodné ke zjišťování hladiny kortizolu v určitém čase, protože vzorky obsahují směs analytů naakumulovaných za hodiny (20, 21). Krevní markery mohou být využity jako přímý ukazatel fyziologických změn. Odběr krve je však pro zvíře invazivní procedura, která vyžaduje zaškolenou a k tomuto úkonu způsobilou osobu. Bylo potvrzeno, že invazivní způsob odběru krve ze žíly způsobuje nárůst hladiny kortizolu v intervalu 20 minut po odběru (28). Pokud srovnáme odběr ze žíly se stanovením kortizolu ze slin od psa, který je k odběrům uvyklý a dostává pamlsky, je zákrok minimálně stresující, vzorky lze odebrat v jasně definovaný čas, který je preferován vzhledem k behaviorálním studiím zaměřeným na akutní stres psů (29, 30).

U mnoha druhů, včetně člověka (31) a psů (20, 32), jsou koncentrace kortizolu ve slinách ve vztahu s koncentrací kortizolu v krevní plazmě. U savců je většina kortizolu v krevní plazmě navázána na proteiny. Kortizol vázající globulin je jedním z nejdůležitějších z nich (33). U zdravých psů jsou koncentrace kortizolu ve slinách výsledkem pasivní difúze volného kortizolu přes buňky stěny slinné žlázy (32). Nemoc a podání léků do organismu zvířete mohou ovlivnit vazbu kortizolu na proteiny a může tak být narušen vztah mezi kortizolem v plazmě a slinách. Koncentrace salivárního korti-

zolu se u psů pohybují v rozmezí 7–12 % hodnot v plazmě (20, 32). Jedná se o biologicky aktivní bezproteinovou plazmatickou frakci, která je biologicky aktivní. Proto měření salivárního kortizolu představuje lepší metodu pro sledování adrenokortikální funkce než měření sérového kortizolu (20).

3.1 **ODBĚR VZORKŮ PRO STANOVENÍ SALIVÁRNÍHO KORTIZOLU**

Odběr slin je u psů, kteří jsou na zákrok uvyklí, relativně dobře snášenou procedurou, při které je snadné instruovat majitele, jak sliny odebrat (27). K usnadnění odběru vzorků a dodržení protokolu pro jejich odběr doporučují Sherman a kol. (30) uvykat psy na odběrový materiál nejméně 5 dnů před zahájením experimentu.

Odběr vzorků zahrnuje saturaci absorpčního materiálu slinami z psí tlamy s využitím nebo bez využití stimulantu slinění. Jako stimulant se často využívá kyselina citronová, octová, cukr, chlorid sodný (34–36), nebo pamlsky jako je sýr, párek nebo maso (37), viz Tabulka 1 – Stimulace slinění. Běžnou pasivní alternativou je, aby se pes díval na pamlsky nebo k němu číchal (38, 39). Přítomnost krmiva může psa rozptylovat a může stimulat vysokou produkci slin (40). Pokud je využívána kyselina citronová jako nejběžnější stimulant slinění, vloží se několik pelet nebo krystalů na jazyk anebo se jazyk potře tyčkou s bavlněným tamponem namočeným do kyseliny citronové (27). Citronová kyselina však zvyšuje nejen hladinu salivárního kortizolu, ale také zvyšuje koncentraci testosteronu v lidských slinách, což souvisí s nárůstem kyselosti vzorku (49). Podobný efekt byl pozorován ve slinách psů, kde však kyselina octová neovlivňuje výsledek měření salivárního kortizolu, což může být dáno vysokou pufrací kapacitou psích slin (27). U lidí přijímání potravy s vysokým obsahem proteinů zvyšuje koncentraci salivárního kortizolu až 2 hodiny po jídle (50). Dreschel a Granger (27) zjistili vysokou shodu mezi měřeními před a po využití bavlněné odběrové sady. Potravní zbytky živočišného původu v psí tlamě mohou obsahovat produkty, které interagují s protilátkami používanými v imunoesejích

(51, 52). Z tohoto důvodu Colussi a kol. (41) doporučují vyhnout se u psů pití a krmení 20 minut před odběrem slinných vzorků. Většina studií udává, že vzorky byly odebrány v intervalu 30–120 sekund (Tabulka 1 – Odběrový materiál/trvání odběru). Kobelt a kol. (35) zdůrazňují, že vzorky ke stanovení kortizolu nebudou poškozeny, pokud bude dodržena doba 4 minut pro jejich odběr. Vzorky slin je možné odebírat vytřením z různých částí tlamy, jako je tvář, jazyk, dásně a tvrdé patro (35, 53). Také je možné nechat psa na odběrový materiál pouze slintat (54).

Mezi běžný materiál pro odběr psích slin patří bavlněné nástroje různých tvarů – kuličky, polštářky, provázky (Tabulka 1 – Odběrový materiál/trvání odběru). Jako alternativa mohou být použity hydrocelulózoové oční tampony (55), polypropylenové gázy (46) nebo filtrační papír (56). Odběrový materiál hraje roli v množství odebraných slin. Bavlněné polštářky zadrží 54 % odebraných slin, zatímco polštářky na bázi polyesteru 95 % (57). Relativně novou metodou odběru využitelnou pro psy je odběr na filtrační papír (58). Kortizol se z filtračního papíru extrahuje éterem, který se následně vypaří a ke vzorku je přidán definovaný objem roztoku. Tato metoda zajišťuje, že k analýze bude roztoku dostatek (Tabulka 1 – Odběrový materiál/trvání odběru). Vypařování éteru ze vzorků je časově náročné a vyžaduje přístup k laboratorní troubě a zahřívacímu bloku a nastavení takových podmínek, aby byly minimalizovány vedlejší účinky chemikálií. Je nemožné přesně zjistit objem slin absorbovaný do filtračního papíru (59, 60). Při každém odběru je pro všechny vzorky třeba použít stejný typ odběrového materiálu. Materiál, na který se vzorky odebírají, může ovlivnit složení slin. Některé studie provedené s lidskými vzorky potvrdily, že bavlněný odběrový materiál u některých druhů analytů ovlivňuje výsledky vyšetření, což někteří autoři přisuzují bavlněným vláknům a koncentraci slin z důvodu zadržení vody (52, 59, 61). S menší frekvencí se tyto vedlejší účinky objevují také u syntetických materiálů (60, 61). Objem získaných vzorků se mezi jedinci může významně lišit a může se pohybovat v rozmezí 0–1500 μ l (27). Ačkoliv nové eseje vyžadují ke stanovení pouze velmi malá množství vzorku slin jako je 25 μ l, u malých psů může být obtížné tento objem vzorku získat, což

limituje počet testů, které mohou být provedeny z jednoho vzorku a možnost provádět stanovení ve více opakováních. Často je nízký objem vzorku dán typem absorpčního materiálu a velkým rozptylem hodnot měřených vzorků (62). Ke zvýšení celkového objemu odebraných slin je vhodné odebrat několik vzorků ve stejném čase a mít párové vzorky, pokud by jeden z nich byl kontaminován (34, 40, 63). Pokud je vzorek slin kontaminován 8 % krve, bývají hodnoty naměřeného kortizolu ve srovnání se vzorky bez příměsi krve zhruba dvojnásobné (64). Vzorky, které obsahují viditelnou příměs krve, více než 1 %, by měly být z analýz vyloučeny (27). Na trhu lze koupit kity, které ve vzorcích určených k analýze přítomnost krve prokáží (65, 66).

3.2 EXTRAKCE SALIVÁRNÍHO KORTIZOLU A VLASTNÍ STANOVENÍ HORMONU

Typický odběr vzorku slin se provádí tak, že se bavlněná pomůcka vloží do tlamy psa. Sliny jsou poté extrahovány zmáčknutím nasáklého odběrového tamponu v 5 ml stříkačce, nebo častěji bývá využita speciální zkumavka značky Salivette, ve které je komora s otvorem a do spodní části se centrifugací izolují sliny z odběrového tamponu. Studie uvádějí, že existuje velký rozdíl v parametrech centrifugace, kterou použili jednotliví autoři (Tabulka 1 – Centrifugace), a to jak v čase trvání (10–20 minut), tak také v otáčkách (3000–3500 rpm, 1300–3000 g). Aby výsledky jednotlivých studií byly srovnatelné, je třeba proces centrifugace standardizovat a k vyjadřování výsledků použít vždy stejné jednotky. Pokud nejsou analýzy provedeny těsně po odběru vzorků, je nutné vzorky zamrazit. Mražení zabraňuje změnám ve složení a způsobuje rozpad mukopolysacharidů slin jako je mucin, sliny se tím stávají méně vazké (67). Nella a kol. (68) testovali stabilitu kortizolu ve vzorcích lidských slin, které byly skladovány při různých teplotách a několikrát zmrazeny a rozmrazeny. Vzorky byly uchovány při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pokojové teplotě 72 hodin a nebyl mezi nimi pozorován žádný vý-

znamný rozdíl. Většina studií však doporučuje, aby před analýzou, byly sliny skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabulka 1 – Skladování).

K měření koncentrace kortizolu ve vzorcích slin bývá často využívána imunologická metoda. Princip imunometody zahrnuje soupeření mezi antigenem, který se měří (kortizol) a označenou formou stejného antigenu, který je součástí enzymu (EIA) nebo radioizotopu (RIA) pro vazebná místa protilátky (69). Nejběžněji používanou metodou pro detekci salivárního kortizolu u psů je EIA. V publikovaných studiích bývají často uváděny různé jednotky měření kortizolu, využívány bývají jednotky nmol/l, ng/ml či $\mu\text{g/dl}$ (Tabulka 1 – Koncentrace kortizolu). Pro jednoduché srovnání výsledků je však nezbytné uvádět koncentraci hormonu ve stejných jednotkách.

Odběr vzorků, jejich extrakce a skladování významně ovlivňuje výsledky stanovení. Metodika uváděná v publikovaných článcích je však značně nejednotná. Aby výsledky jednotlivých studií mohly být mezi sebou porovnávány, je nutné metodiku standardizovat.

4.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI KORTIZOLU

4.1 ČAS, VĚK A POHLAVÍ ■

Některé studie uvádějí, že se hladina kortizolu u psů mění v průběhu dne, cirkadiálně, kdy nejvyšší hodnoty hormon dosahuje v ranních hodinách a postupně do večera jeho koncentrace v těle klesá, přičemž nejnižších hodnot hormon dosahuje v nočních hodinách (20, 45, 70). Tento cirkadiální rytmus je synchronizován hodinami světla v mozku a odráží spánkové charakteristiky daného druhu (71). U člověka byl po 45 minutách od probuzení popsán nárůst hladiny koncentrace kortizolu v těle, tzv. awakening effect, někteří autoři tento jev popisují také v případě psů (72, 73). Naproti tomu řada autorů cirkadiální střídání hladin hormonu u psů popírá (55, 74–77). Byla rovněž publikována data, podle kterých hladiny kortizolu u psů, kteří nejsou ve výcviku vykazují cirkadiální rytmus, zatímco pracující psi tento trend nevykazují (78). Navíc existuje značný nesoulad týkající se optimálního času měření vzorků u psů po stimulaci slinění (35, 42, 46). K porovnání výsledků je nezbytné mít data o přesném čase odběru vzorků slin, která v některých publikovaných studiích chybí (Tabulka 1 – Čas odběru vzorků). Některé studie obsahují data z dynamického měření kortizolu v čase (před a po sledování), v některých jsou uvedeny pouze výsledky jednoho měření nebo absolutní hodnoty z denního měření kortizolu, což znemožňuje srovnat individuální hodnoty jednotlivých zvířat v různých studiích.

Naměřené koncentrace salivárního kortizolu jsou shrnuty v Tabulce 1 – Koncentrace kortizolu. Pokud je sledována koncentrace kortizolu, je třeba sledovat individuální rozdíly a zahrnout je do interpretace měření (79). Nekastrované feny mají vyšší koncentrace kortizolu nežli feny kastované,

i než nekastrovaní a kastrování psi. Feny mohou vůči stresorům vykazovat relativní HPA hyperaktivitu (80), takže je nezbytné ve výsledcích studií uvádět pohlaví sledovaných zvířat a také údaje týkající se jejich případné kastrace (Tabulka 1 – Pohlaví). Taylor a kol. (81) se domnívají, že odlišné účinky stresu ve vazbě na pohlaví jsou způsobeny androgen-inhibičním a estrogen-stimulujícím vlivem oxytocinu. Štěňata mladší 6 měsíců mají nižší koncentrace kortizolu nežli psi ve věku 6 měsíců – 1 rok a také než psi mezi 1.–8. rokem života a psi starší (79). Fratkin a kol. (82) také potvrdili, že mladí psi mají během kritické periody růstu do 6 měsíců nižší koncentrace kortizolu. Ideálně by hodnoty stanovení kortizolu psů ve věku do 6 měsíců neměly být porovnávány s hodnotami starších psů (79). I přes to, že je koncentrace salivárního kortizolu štěňat nízká, může být použita jako ukazatel stresu, například pro povahové testy štěňat a jejich vhodnosti pro budoucí pracovní využití (48).

5.

VLIV RŮZNÝCH STRESORŮ NA PRODUKCI SLINNÉHO KORTIZOLU

Při akutním stresu se kromě zvýšení hladiny kortizolu objevují také behaviorální příznaky stresu jako je zvedání přední končetiny, olizování, pohledy stranou, krčení, třes, zrychlené dýchání, zívání a čichání k zemi (7, 24, 83). Jednotlivá zvířata odpovídají na stres odlišně a mají také různé strategie, jak stres překonat. Důvodem je různá povaha, věk, plemeno, a předchozí individuální zkušenost (24, 84).

5.1 KLIMATICKÉ PODMÍNKY JAKO STRESOR ■

Ahrens a kol. (85) sledovali koncentraci kortizolu u záchranných psů v zimě a v létě během tréninku a zjistili, že psi měli zvýšenou koncentraci kortizolu během cvičení v zimním období. Nárůst koncentrace kortizolu přisuzují stresorům jako je jízda v lanovce a podobně, nikoliv klimatickým vlivům. Domnívají se, že práce koncentraci kortizolu v těle psa snižuje. Beerda a kol. (86) studovali vliv počasí na skupinu bíglů během jejich přemísťování v různých ustájovacích zařízeních. Psi byli přemísťováni z prostorných venkovních výběhů do vnitřních málo prostorných kotců. Měření salivárního kortizolu prokázalo, že oproti psům venku, dochází u psů ve vnitřních kotcích ke zvýšení koncentrace kortizolu během teplého počasí, zatímco při špatném počasí se koncentrace kortizolu snižuje. Podle výše zmíněných autorů mají meteorologické vlivy velký dopad na změny v chování psů a fyziologické změny způsobené sociální a prostorovou restrikcí.

5.2 UMĚLÝ EXTERNÍ FAKTOR JAKO STRESOR A POVAHOVÉ TESTY

Beerda a kol. (7) vystavili psy 6 různým typům externích stimulů – zvukům, krátkým elektrickým impulzům, padání zavazadel, otevírání deštníku a dvěma formám omezení v pohybu. Stimuly, které nemohly být psy očekávány, jako jsou zvuky, impulzy proudu a padání předmětů způsobovaly u sledovaných zvířat zvýšení hladiny salivárního kortizolu. Zbytek stimulů, které experimentátor prováděl viditelně, neovlivňovaly hladinu salivárního kortizolu, ale navozovaly u psů neklid, krčení, třes a různé zvukové projevy. Změny v chování při stresu nemusí tudíž být vždy v přímé korelaci s produkcí kortizolu a aktivací HPA stresové osy.

Řada autorů potvrdila vztah mezi hladinou kortizolu a výsledky povahových testů psů. Batt a kol. (37) popsali nárůst salivárního kortizolu po provedení povahového testu u zlatých retrievrů. Sherman a kol. (30) potvrdili nárůst kortizolu ve slinách u pracovních psů armády po provedení emočně-reaktivního testu, který byl prováděn za účelem výběru psů pro odhalování explozivních látek a jehož součástí byly vizuální, poslechové a zkušenostní stimuly. Autoři popsali, že labradoři vykazovali nejvyšší emoční reaktivitu při nejnižším bodovém skóre v povahovém testu a současně měli nejvyšší nárůst jak salivárního, tak také plazmatického kortizolu. Svobodová a kol. (48) dospěli k podobným výsledkům po provedení povahových testů u štěňat a fen německých ovčáků po tréninku obran.

5.3 INTERAKCE PSA S ČLOVĚKEM A JINÝMI PSY JAKO STRESOR

Pes je jedním z mála živočišných druhů, který se zapojuje do mezidruhové hry s člověkem. Hra bývá indikátorem pohody zvířat (87). Horvath a kol. (44) studovali dopad 3minutové hry majitele se psem, přičemž psi byli rozděleni do 2 skupin – policejní psi a psi pohraniční strážce. Hra měla vliv na obě skupiny psů, ovšem opačný, než bylo očekáváno. U policejních psů

se po hře zvýšila koncentrace salivárního kortizolu, u psů pohraničnicků koncentrace kortizolu ve slinách klesla. Autoři tento stav vysvětlují tak, že policejní psi byli povely dovedeni ke hře, zatímco psi pohraničnicků si hráli s majiteli spontánně. Rozdíl v chování, náladě a motivaci psů ovšem nejen ovlivnil motivaci a chování psů během hry, ale měl vliv také na koncentraci kortizolu naměřenou po hře (88).

Při sociálních situacích odlišných od hry bylo prokázáno, že chování člověka ke psu má významný vliv na emoční stav psa. Psi jsou sociální zvířata, která vyžadují kontakt s jedinci svého druhu i člověkem (89, 90). Velmi málo prací se týká účinku současného kontaktu s člověkem a dalšími psy. Většina studií provedených v útulcích se zabývá vztahem mezi lidmi a psy. Například přítomnost člověka v blízkosti psa v útulku snižuje u sledovaných zvířat koncentraci kortizolu a úroveň stresu (28, 83, 91). Willen a kol. (92) také zjistili, že po 30minutové interakci psa s člověkem klesá u psů čerstvě přijatých do útulku koncentrace plazmatického kortizolu. Coppola a kol. (88) popsali, že po 30–90minutové hře, česání, trénování a chození klesá u psů druhý den po umístění do útulku hladina salivárního kortizolu. Monor-Campos a kol. (93) také zjistili, že po 25 minutách interakce s člověkem ve formě výcviku klesá mezi 7. a 9. dnem po převzetí psa do útulku hladina slinného kortizolu. Autoři výše uvedených studií předpokládají, že interakce psa s člověkem neovlivnila hormonální odpověď na nové situace přes HPA stresovou dráhu. Jones a Josephs (46) zjistili, že po závodech agility je vysoká korelace mezi represivním a hrubým chováním psů a zvýšením koncentrace salivárního kortizolu u týmů, které nedoběhly parkur. V tomto případě chování člověka ke psu HPA dráhu stresu aktivuje a navozuje u zvířete stav distresu.

Haubenhöfer a kol. (43) studovali dopad mentálního stresu na psy vykonávající canisterapii. Vyšší koncentrace salivárního kortizolu byly zjištěny u psů, kteří pracovali s klienty v kratších časových intervalech (1–3 hodiny bez přestávky) oproti psům pracujícím po delší čas (maximum 8 hodin s přestávkami). Autoři uvádí, že psi byli pravděpodobně v eustresu a na podmínky se v čase adaptovali. Glenk a kol. (38, 39) také sledovali

hladinu slinného kortizolu psů pracujících při canisterapeutických aktivitách a nepozorovali rozdíl v koncentraci hormonu u vzorků slin odebraných ve volném dni oproti vzorkům odebraným v den terapie. Také Colussi a kol. (41) měřili hladinu salivárního kortizolu psů při canisterapii, ale také u loveckých psů, kteří vystavovali, dohledávali postřelenou zvěř, u barvářů a také u psů v tréninku agility. Koncentrace slinného kortizolu byly statisticky významně sníženy po canisterapii, zatímco ke zvýšení došlo u loveckých psů, kteří vystavovali. Rozdíly nebyly statisticky významné u psů stopujících, na dohledávce, barvářů a ani při agility, ani před ani po ukončení aktivity. Aktivity u testovaných psů pravděpodobně trvaly tak krátký čas, že nemohla být aktivována HPA osa stresu.

6.

DALŠÍ MOŽNÉ MARKERY STRESU PSŮ ZJISTITELNÉ VE SLINÁCH

Ke stanovení akutního stresu psů mohou být kromě kortizolu použity další slinné ukazatele stresu. Charakterizují fyziologickou odpověď organismu na stresory přes HPA a SAM osy a jsou podobně jako kortizol vylučovány do slin.

Chromatogranin A (CgA) je vylučován společně s katecholaminy během akutní stresové reakce. Je však více stabilní, a tudíž vhodnější pro použití jako ukazatel stresu. Koncentrace CgA jako markeru aktivace SAM stresové osy se po prudkém nárůstu rychle snižuje. Z tohoto důvodu může být využit jako ukazatel distresu nebo vzrušení (47, 94). Také hormony kates-tatin (CST) a vasostatin (VS) mohou sloužit jako markery stresu. Na rozdíl od kortizolu nejsou ovlivněné věkem, pohlavím, plemenem ani denní dobou (95).

Dalšími potencionálními neinvazivními stresovými markery odrážejícími aktivaci SAM stresové osy mohou být slinná alfa-amyláza (sAA). Contreras-Aquilar a kol. (96) popsali nárůst aktivity tohoto enzymu, i když je známo, že sliny psů obsahují fyziologicky jen velmi malá množství tohoto enzymu. Koncentrace sekrečního imunoglobulinu A (sIgA) se také mění při akutním stresu a může být využit jako parametr zapojený do aktivace HPA osy. Zatímco při stresu roste hladina slinného kortizolu, sIgA klesá v důsledku potlačení jeho vylučování kortizolem (48, 94).

U lavinových psů byly využity další markery stresu (97), jako je mRNA exprese genu pro transportér glukózy 4, cyklooxygenáza 2, superoxid dismutáza 1 a heat shock protein 70, které byly po stresu zvýšeny. Tyto mar-

kery mohou být využity jako ukazatele metabolického a oxidačního stresu (Tabulka 2).

Kortizol ve slinách je možným ukazatelem akutního stresu psů, nicméně jeho využití má některé nevýhody, které mohou vést ke špatné interpretaci naměřených dat. Klíčovým aspektem je standardizovaná metoda odběru vzorků a jejich zpracování. Při přípravě schématu pokusu je třeba brát v potaz individuální rozdíly mezi zvířaty a vliv denní doby na koncentraci salivárního kortizolu, je třeba správně statisticky vyhodnotit výsledky a také je vhodně interpretovat. Použití kortizolu jako stresového ukazatele by mělo být doplněno sledováním chování, ale je třeba brát v potaz, že behaviorální stresové symptomy nejsou vždy v pozitivním vztahu s produkcí stresových hormonů typu glukokortikoidů, mezi které patří také kortizol. Komplexní povaha stresové odpovědi vyžaduje doplnění měření kortizolu o další stresové markery SAM osy jako je CgA, CST a VS nebo HPA osy včetně sIgA. Obsáhlé sledování dopadu stresu na jedince umožní charakterizovat úroveň stresu a zjistit, zda stresová odpověď vede u sledovaného zvířete až ke škodlivému stresu, distresu.

POUŽITÉ ZDROJE

- Stafleu FR, Rivas E, Rivas T, Vorstenbosch J, Heeger FR, Beynen AC. The use of analogous reasoning for assessing discomfort in laboratory animals. *Anim Welf* 1992;1:77-84.
- Laugero KD, Moberg GP. Energetic response to repeated restraint stress in rapidly growing mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E33-E43.
- Karatsoreos IN, McEwen BS. Psychobiological allostasis: Resistance, resilience and vulnerability. *Trends Cogn Sci* 2011;15:576-584.
- Selye HA. Syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998;10:230-231.
- McVicar A. Workplace stress in nursing: A literature review. *J Adv Nurs* 2003;44:633-642.
- Moberg GP, Mench JA. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare* 2000; CAB International, Wallingford, UK 377pp.
- Beerda B, Schilder MBH, van Hooff J, de Vries HW, Mol JA. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Appl Anim Behav Sci* 1998;58:365-381.
- Pastore C, Pirrone F, Balzarotti F, Faustini M, Pierantoni L, Albertini M. Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. *J Vet Behav-Clin Appl Res* 2011;6:188-194.
- Hennessy MB. Using hypothalamic-pituitary-adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: A review. *Appl Anim Behav Sci* 2013;149:1-12.
- Sapolsky RM. Stress hormones: Good and bad. *Neurobiol Dis* 2000;7:540-542.
- Marques AH, Silverman MN, Sternberg EM. Evaluation of stress systems by applying noninvasive methodologies: Measurements of neuroimmune biomarkers in the sweat, heart rate variability and salivary cortisol. *Neuroimmunomodulation* 2010;17:205-208.
- Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Mostl E. Stress hormones in mammals and birds – comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. In: *Trends in comparative endocrinology and neurobiology*, Vaudry H, Roubos E, Schoofs L, Fiik G,

Larhammar D (Eds.), *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005, pp162-171.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:397-409.

Whirledge S, Cidlowski JA. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: Beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 2013;154:4450-4468.

Tizabi Y, Aguilera G. Desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following prolonged administration of corticotropin-releasing hormone or vasopressin. *Neuroendocrinology* 1992;56:611-618.

Feldman S, Conforti N, Weidenfeld J. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 1995;19:235-240.

Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos GP. Exercise and the stress system. *Hormones (Athens)* 2005;4:73-89.

Reynolds PD, Ruan Y, Smith DF, Scammell JG. Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin fkbp51. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:663-669.

Romero LM, Meister CJ, Cyr NE, Kenagy GJ, Wingfield JC. Seasonal glucocorticoid responses to capture in wild free-living mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:R614-R622.

Beerda B, Schilder MBH, Janssen N, Mol JA. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs. *Horm Behav* 1996;30:272-279.

Steiss JE, Schaffer C, Ahmad HA, Voith VL. Evaluation of plasma cortisol levels and behavior in dogs wearing bark control collars. *Appl Anim Behav Sci* 2007;106:96-106.

Accorsi PA, Carloni E, Valsecchi P, Viggiani R, Garnberoni M, Tarnanini C, Seren E. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen Comp Endocrinol* 2008;155:398-402.

Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol Behav* 2019;199:229-243.

Rooney NJ, Gaines SA, Bradshaw JWS. Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiol Behav* 2007;92:847-854.

Bennett A, Hayssen V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: Coat color and pigment differences. *Domest Anim Endocrinol* 2010;39:171-180.

Bryan HM, Adams AG, Invik RM, Wynne-Edwards KE, Smits JEG. Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2013;52:189-196.

Dreschel NA, Granger DA. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Horm Behav* 2009;55:163-168.

Hennessy MB, Williams MT, Miller DD, Douglas CW, Voith VL. Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: Can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? *Appl Anim Behav Sci* 1998;61:63-77.

Haverbeke A, Diederich C, Depiereux E, Giffroy JM. Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiol Behav* 2008;93:59-67.

Sherman BL, Gruen ME, Case BC, Foster ML, Fish RE, Lazarowski L, DePuy V, Dorman DC. A test for the evaluation of emotional reactivity in labrador retrievers used for explosives detection. *J Vet Behav* 2015;10:94-102.

Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychobiological research – an overview. *Neuropsychobiology* 1989;22:150-169.

Vincent IC, Michell AR. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res Vet Sci* 1992;53:342-345.

Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Lewis JG, Weller A. Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol Behav* 2007;90:43-53.

King T, Hemsworth PH, Coleman GJ. Fear of novel and startling stimuli in domestic dogs. *Appl Anim Behav Sci* 2003;82:45-64.

Kobelt AJ, Hemsworth PH, Barnett JL, Butler KL. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Res Vet Sci* 2003;75:157-161.

Damian JP, Bengoa L, Pessina P, Martinez S, Fumagalli F. Serial collection method of dog saliva: Effects of different chemical stimulants on behaviour, volume and saliva composition. *Open Veterinary Journal* 2018;8:229-235.

Batt LS, Batt MS, Baguley JA, McGreevy PD. Factors associated with success in guide dog training. *J Vet Behav* 2008;3:143-151.

Glenk LM, Kothgassner OD, Stetina BU, Palme R, Kepplinger B, Baran H. Therapy dogs' salivary cortisol levels vary during animal-assisted interventions. *Anim Welf* 2013;22:369-378.

Glenk LM, Kothgassner OD, Stetina BU, Palme R, Kepplinger B, Baran H. Salivary cortisol and behaviour in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study. *J Vet Behav* 2014;9:98-106.

Lensen cmM, Moons CPH, Diederich C. Saliva sampling in dogs: How to select the most appropriate procedure for your study. *J Vet Behav* 2015;10:504-512.

Schwartz EB, Granger DA, Susman EJ, Gunnar MR, Laird B. Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Dev* 1998;69:1503-1513.

Gibson EL, Checkley S, Papadopoulos A, Poon L, Daley S, Wardle J. Increased salivary cortisol reliably induced by a protein-rich midday meal. *Psychosom Med* 1999;61:214-224.

Magnano CL, Diamond EJ, Gardner JM. Use of salivary cortisol measurements in young infants: a note of caution. *Child Dev* 1989;60:1099-1101.

Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran M. Use of salivary biomarkers in biobehavioural research: cotton based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:165-173.

Colussi A, Stefanon B, Adorini C, Sandri M. Variations of salivary cortisol in dogs exposed to different cognitive and physical activities. *Ital J Anim Sci* 2018;17:1030-1037.

Ley J, Coleman GJ, Holmes R, Hemsworth PH. Assessing fear of novel and startling stimuli in domestic dogs. *Appl Anim Behav Sci* 2007;104:71-84.

Conley MJ, Fisher AD, Hemsworth PH. Effects of human contact and toys on the fear responses to humans of shelter-housed dogs. *Appl Anim Behav Sci* 2014;156:62-69.

Bergeron R, Scott SL, Emond JP, Mercier F, Cook NJ, Schaefer AL. Physiology and behavior of dogs during air transport. *Can J Vet Res* 2002;66:211-216.

Jones AC, Josephs RA. Interspecies hormonal interactions between man and the domestic dog (*Canis familiaris*). *Horm Behav* 2006;50:393-400.

Parra MD, Vaisanen V, Ceron JJ. Development of a time-resolved fluorometry based immunoassay for the determination of canine haptoglobin in various body fluids. *Vet Res* 2005;36:117-129.

Hansen AM, Garde AH, Persson R. Measurement of salivary cortisol – effects of replacing polyester with cotton and switching antibody. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:826-829.

Oyama D, Hyodo M, Doi H, Kurachi T, Takata M, Koyama S, Satoh T, Watanabe G. Saliva collection by using filter paper for measuring cortisol levels in dogs. *Domest Anim Endocrinol* 2014;46:20-25.

Granger DA, Cicchetti D, Rogosch FA, Hibel LC, Teisl M, Flores E. Blood contamination in children's saliva: Prevalence, stability, and impact on the measurement of salivary cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:724-733.

Takagi K, Ishikura Y, Hiramatsu M, Nakamura K, Degawa M. Development of a saliva collection device for use in the field. *Clin Chim Acta* 2013;425:181-185.

Gröschl M. Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry* 2008;54:1759-1769.

Harmon AG, Hibel LC, Romyantseva O, Granger DA. Measuring salivary cortisol in studies of child development: Watch out – what goes in may not come out of saliva collection devices. *Dev Psychobiol* 2007;49:495-500.

van der Borg JAM, Beerda B, Ooms M, de Souza AS, van Hagen M, Kemp B. Evaluation of behaviour testing for human directed aggression in dogs. *Appl Anim Behav Sci* 2010;128:78-90.

Wenger-Riggenbach B, Boretti FS, Quante S, Schellenberg S, Reusch CE, Sieber-Ruckstuhl NS. Salivary cortisol concentrations in healthy dogs and dogs with hypercortisolism. *J Vet Intern Med* 2010;24:551-556.

Kivlighan KT, Granger DA, Schwartz EB, Nelson V, Curran M, Shirtcliff EA. Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Horm Behav* 2004;46:39-46.

Kamodyova N, Banasova L, Jansakova K, Koborova I, Tothova L, Stanko P, Celec P. Blood contamination in saliva: Impact on the measurement of salivary oxidative stress markers. *Dis Markers* 2015; 479251.

Poll EM, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, Stanzel S, Gilsbach JM, Gressner A, Yagmur E. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clin Chim Acta* 2007;382:15-19.

Nalla AA, Thomsen G, Knudsen GM, Frokjaer VG. The effect of storage conditions on salivary cortisol concentrations using an enzyme immunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75:92-95.

Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *Int J Biomed Sci* 2006; 2:217-235.

Rijnberk A, Derkinderen PJ, Thijssen JH. Investigations on adrenocortical function of normal dogs. *J Endocrinol* 1968;41:387-395.

Horvath Z, Igyarto BZ, Magyar A, Miklosi A. Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. *Horm Behav* 2007;52:621-630.

Czeisler CA, Chiasera AJ, Duffy JF. Research on sleep, circadian-rhythms and aging – applications to manned spaceflight. *Exp Gerontol* 1991;26:217-232.

Clow A, Hucklebridge F, Stalder T, Evans P, Thorn L. The cortisol awakening response: More than a measure of HPA axis function. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;35:97-103.

Stalder T, Kirschbaum C, Kudielka B, Adam E, Pruessner J, Wust S, Dockray S, Smyth N, Evans P, Hellhammer D, Miller R, Wetherell M, Lupien S, Clow A. Assessment of the cortisol awakening response: Summary of the expert consensus guidelines. *Psychoneuroendocrinology* 2016;71:44-44.

Johnston SD, Mather EC. Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay – clinical absence of diurnal-variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests. *Am J Vet Res* 1978;39:1766-1770.

Takahashi Y, Ebihara S, Nakamura Y, Takahashi K. A model of human sleep-related growth-hormone secretion in dogs – effects of 3-hours, 6-hours and 12-hours of forced wakefulness on plasma growth-hormone, cortisol, and sleep stages. *Endocrinology* 1981;109:262-272.

Kemppainen RJ, Sartin JL. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma-concentrations of adrenocorticotropin, cortisol and thyroxine in dogs. *J Endocrinol* 1984;103:219-226.

- Koyama T, Omata Y, Saito A. Changes in salivary cortisol concentrations during a 24-hour period in dogs. *Horm Metab Res* 2003;35:355-357.
- Kolevska J, Brunclik V, Svoboda M. Circadian rhythm of cortisol secretion in dogs of different daily activities. *Acta Vet Brno* 2003;72:599-605.
- Dreschel NA, Granger DA. Physiological and behavioural reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. *Appl Anim Behav Sci* 2005;95:153-168.
- Cobb ML, Iskandarani K, Chinchilli VM, Dreschel NA. A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domest Anim Endocrinol* 2016;57:31-42.
- Garnier F, Benoit E, Virat M, Ochoa R, Delatour P. Adrenal-cortical response in clinically normal dogs before and after adaptation to a housing environment. *Lab Anim* 1990;24:40-43.
- Taylor SE, Klein LC, Lewis BP, Gruenewald TL, Gurung RAR, Updegraff JA. Biobehavioural responses to stress in females: Tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev* 2000;107:411-429.
- Fratkin JL, Sinn DL, Patall EA, Gosling SD. Personality consistency in dogs: A meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e54907.
- Svobodova I, Chaloupkova H, Koncel R, Bartos L, Hradecka L, Jebavy L. Cortisol and secretory immunoglobulin a response to stress in German shepherd dogs. *PLoS One* 2014;9.
- Beerda B, Schilder MBH, vanHooff J, deVries HW. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Appl Anim Behav Sci* 1997;52:307-319.
- Hiby EF, Rooney NJ, Bradshaw JWS. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. *Physiol Behav* 2006;89:385-391.
- Ahrens F, Knies K, Schneider M, Kohler F, Erhard MH. Influence of different training and outdoor conditions on plasma histamine and cortisol concentrations in search-and-rescue dogs. *Inflam Res* 2005;54:S34-S35.
- Beerda B, Schilder MBH, Van Hooff J, De Vries HW, Mol JA. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioural responses. *Physiol Behav* 1999;66:233-242.
- Boissy A, Manteuffel G, Jensen MB, Moe RO, Spruijt B, Keeling LJ, Winckler C, Forkman B, Dimitrov I, Langbein J, Bakken M, Veissier I, Aubert A. Assessment

of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiol Behav* 2007;92:375-397.

Horvath Z, Doka A, Miklosi A. Affiliative and disciplinary behavior of human handlers during play with their dog affects cortisol concentrations in opposite directions. *Horm Behav* 2008;54:107-114.

Coppola CL, Grandin T, Enns RM. Human interaction and cortisol: Can human contact reduce stress for shelter dogs? *Physiol Behav* 2006;87:537-541.

Fox MW. Psychosocial and clinical applications of critical period hypothesis in dog. *J Am Vet Med Assoc* 1965;146:1117-1119.

Wolfe A. Social-theory and the 2nd biological revolution. *Social Research* 1990;57:615-648.

Tuber DS, Sanders S, Hennessy MB, Miller JA. Behavioral and glucocorticoid responses of adult domestic dogs (*canis familiaris*) to companionship and social separation. *J Comp Psychol* 1996;110:103-108.

Willen RM, Mutwill A, MacDonald LJ, Schiml PA, Hennessy MB. Factors determining the effects of human interaction on the cortisol levels of shelter dogs. *Appl Anim Behav Sci* 2017;186:41-48.

Menor-Campos DJ, Molleda-Carbonell JM, Lopez-Rodriguez R. Effects of exercise and human contact on animal welfare in a dog shelter. *Vet Rec* 2011;169:388.

Haubenhofer D, Mostl E, Kirchengast S. Cortisol concentrations in saliva of humans and their dogs during intensive training courses in animal-assisted therapy. *Wien Tierarztl Monatsschr* 2005;92:66-73.

Lensen RCMM, Moons CPH, Diederich C. (2019). Physiological stress reactivity and recovery related to behavioral traits in dogs (*Canis familiaris*). *PLoS One* 2019;14:1-15.

Ryan MG, Storey AE, Anderson RE, Walsh CJ, Walsh CJ. (2019). Physiological indicators of attachment in domestic dogs (*Canis familiaris*) and their owners in the strange situation test. *Front Behav Neurosci* 2019;13:162.

Srithunyarat T, Hagman R, Höglund OV, Olsson U, Stridsberg M, Jitpean S, Lagerstedt AS, Pettersson A. Catestatin and vasostatin concentrations in healthy dogs. *Acta Vet Scand* 2017;59:74-80.

Contreras-Aguilar MD, Tecles F, Martínez-Subiela S, Escribano D, Bernal LJ, Cerón JJ. Detection and measurement of alpha-amylase in canine saliva and changes after an experimentally induced sympathetic activation. *BMC Vet Res* 2017;13:266.

Diverio S, Guelfi G, Barbato O, Di Mari W, Egidi M, Santoro M. Non-invasive assessment of animal exercise stress: Real-time PCR of GLUT4, COX2, SOD1 and HSP70 in avalanche military dog saliva. *Animal* 2015;9:104-109.

Tabulka 1: Studie, ve kterých byl jako ukazatel akutního stresu sledován hormon kortizol ve slinách psů

STUDIE	PLEMENO	POHLAVÍ	VĚK	POČET PSŮ	KATEGORIE PSŮ	TESTOVACÍ PROSTŘEDÍ	PŘÍTOMNOST MAJITELE
Batt a kol. (37)	zlátý retrívr labradorský retrívr	27 kastrováných psů 16 kastrováných fen	6–20 měsíců	43	vodčí	výběh	ne
Beerd a kol. (20)	kříženci	neuveдено	neuveдено	16	mazlíček	výběh	ne
Beerd a kol. (7)	nespecifikováno	6 psů 4 feny	5,2–13,8 roku	10	mazlíček	místnost	ne
Bryan a kol. (26)	kříženci	5 psů 2 feny	dospělí	7	výuka studentů	místnost	ne
Colussi a kol. (45)	nespecifikováno	11 nekastrováných psů 12 nekastrováných fen 4 kastrováné feny	> 12 měsíců	27	mazlíček	lovečtí dohledávači, barváři, trénink agility, canisterapie	ano
Dreschel a Granger (27)	čistokrevní psi	18 fen 6 psů	1,5–12 let	24	lov	výběh	ano
Dreschel a Granger (74)	zlátí retrívrí kříženci	10 kastrováných fen 9 kastrováných psů	1–13 let	19	mazlíček	místnost	ano
Glenk a kol. (38)	čistokrevní kříženci	9 kastrováných fen 5 nekastrováných fen 7 nekastrováných psů	1,5–14 let	21	mazlíček	dům	ano
Glenk a kol. (39)	kříženeц labradorský retrívr	1 nekastrováný pes 3 kastrováné feny 1 nekastrováná žena	3–10 let	5	terapeutický pes	místnost	ano
Haubenhofe r a kol. (92)	nespecifikováno	6 nekastrováných fen 12 kastrováných fen 12 nekastrováných psů 3 kastrováni psi	1,5–10,5 roku	33	terapeutický pes	místnost	ano

STUDIE	PLEMENO	POHLAVÍ	VĚK	POČET PSŮ	KATEGORIE PSŮ	TESTOVACÍ PROSTŘEDÍ	PŘÍTOMNOST MAJITELE
Horvath a kol. (85)	německý ovčák	84 psů 43 psů 41 psů	2–11 let 2–7 let 8–11 let	84	police	místnost	ano
Horvath a kol. (65)	německý ovčák	60 psů 26 psů 34 psů	2–11 let 2–7 let 8–11 let	60	police	výběh	ne
Jones a Josephs (49)	nespecifikováno	56 psů 27 fen	2–7 let	83	agility	venku	ano
Lensen a kol. (93)	nespecifikováno	6 štěňat samců 10 štěňat fen 6 nekastrovaných psů 2 kastrování psi 3 nekastované feny 5 kastrování fen	17,57 ± 2,94 týdnů 60,85 ± 2,64 týdnů	32	mazlíček	místnost	ano
Pastore a kol. (8)	nespecifikováno	12 fen 5 psů	> 18 měsíců	17	agility	venku	ano
Sherman a kol. (30)	labradorský retrivér	8 nekastrovaných psů 3 kastované feny 5 nekastované feny	2 roky	16	detekce výbušnin	výběh	ne
Svobodová a kol. (79)	německý ovčák	17 štěňat 9 štěňat samců 8 štěňat fen 10 nekastrování fen	7 týdnů 3,3 ± 1,7 roku	27	police	výběh	ne

STUDIE	ODBĚROVÝ MATERIÁL / TRVÁNÍ ODBĚRU	ČAS ODBĚRU VZORKŮ	POČET MĚŘENÍ / DEN	STIMULACE SLININĚ	SKLADOVÁNÍ	CENTRIFUGACE	TYP ESEJE	KONCENTRACE KORTIZOLU	DALŠÍ STRESOVÉ MARKERY
Batt a kol. (37)	bavlněné polštářky kosmetické tampony ? sekund	chybí data	2	zraková stimulace potravou	-80 °C	3000 rpm 15 minut	EIA	chybí data, pouze hodnota statistické významnosti	chování
Beerda a kol. (20)	bavlněné polštářky ? sekund	11:00–16:00	12	pelety octové kyseliny	-20 °C	chybí data	RIA	4,7 nmol/l	katecholamin v moči
Beerda a kol. (7)	bavlněné polštářky, zkumavky salivette ? sekund	11:00–15:00	7	citronová kyselina	chybí data	chybí data	RIA	6,0–13,0 nmol/l	srdeční frekvence chování
Bryan a kol. (26)	bavlněné kulíčky 60 sekund	8:00 11:30 13:30	3	citronová kyselina 5% roztok	-80 °C	chybí data	EIA	0,98–2,31 ng/ml	ne
Colussi a kol. (45)	bavlněné polštářky; zkumavky salivette 90–120 sekund	6:30–9:30 9:30–15:00 20:00–23:00	3	zraková stimulace potravou	-20 °C	1500xg 15 minut	EIA	1,27–16,33 ng/ml	chybí data
Dreschel a Granger (27)	bavlněný provázek 60 sekund	14:00–18:00	3	citronová kyselina hovězí odměna	-40 °C	3000 rpm 15 minut	EIA	0,07–0,22 µg/dl	chování

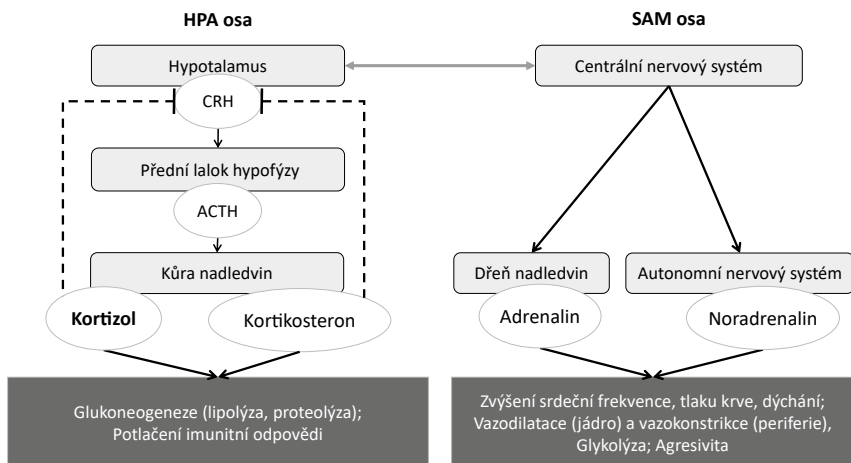
STUDIE	ODBĚROVÝ MATERIÁL / TRVÁNÍ ODBĚRU	ČAS ODBĚRU / VZORKŮ	POČET MĚŘENÍ / DEN	STIMULACE SLINĚNÍ	SKLADOVÁNÍ	CENTRIFUGACE	TYP ESEJE	KONCENTRACE KORTIZOLU	DALŠÍ STRESOVÉ MARKERY
Dreschel a Granger (74)	bavlněný provázek, zkumavka salivette 60–120 sekund	chybí data	6	citronová kyselina hovězí odměna	-40 °C	3000 rpm 15 minut	EIA	0,17 µg/dl	ne
Glenk a kol. (38)	bavlněná kulička – velcí psi, zkumavka salivette; hydrocelulóznová houba – malí psi 40–70 sekund	9:00–10:00 13:00–14:00 18:00–19:00	3	zraková stimulace potravou	-20 °C	3000xg 15 minut	EIA	1,5–5,5 ng/ml	chování
Glenk a kol. (39)	bavlněná kulička, zkumavka salivette 40–70 sekund	9:30–11:00 2 vzorky kontrola doma	3	zraková stimulace potravou	-20 °C	3000 xg 15 minut	EIA	1–6 ng/ml	chování
Haubenhofer a kol. (92)	bavlněné polštářky, zkumavka salivette 30 sekund	ráno oběd po tréninku	3	ne	chybí data	1500xg 10 minut	EIA	1,9–2,8 nmol/l	chování
Horvath a kol. (85)	bavlněné polštářky 30–60 sekund	9:00–15:00	2	ne	-80 °C	3000 rpm 15 minut	EIA	0,05–0,25 µg/dl	chování
Horvath a kol. (65)	bavlněné polštářky 30–60 sekund	9:00–15:00	2	ne	-80 °C	3000 rpm 15 minut	EIA	0,10–0,14 µg/dl	chování

STUDIE	ODBĚROVÝ MATERIÁL / TRVÁNÍ ODBĚRU	ČAS ODBĚRU VZORKŮ	POČET MĚŘENÍ / DEN	STIMULACE SLINIVÉ	SKLADOVÁNÍ	CENTRIFUGACE	TYP ESEJE	KONCENTRACE KORTIZOLU	DALŠÍ STRESOVÉ MARKERY
Jones a Josephs (49)	polypropylenová gáza	12:00–15:00	2	ne	–20 °C	3000 rpm 15 minut	EIA	změny kortizolu v porovnání s testosteronem ng/ml	testosteron
Lensen a kol. (93)	polštářky maximálně 240 sekund	10:00 nebo 14:00	3	ne	–20 °C	3000 rpm 1851,41xg 15 minut	EIA	pouze poměr mezi pokusnými skupinami	chování chromogranin A (CgA) sekreční imunoglobulin A (sIgA)
Pastore a kol. (8)	bavlněná kulička 30 sekund	pozdní odpoledne	2	citronová kyselina 5% roztok	–20 °C	3500 rpm 15 minut	EIA	2,1–2,8 ng/ml	chování
Sherman a kol. (30)	bavlněný provázek 120–180 sekund	13:00–16:00	2	zraková stimulace potravou	–20 °C	1300 xg 20 minut	EIA	0,049–0,373 µg/dl	chování
Svobodová a kol. (79)	bavlněný polštářek 60–120 sekund	7:00–11:00	2	ne	chybí data	chybí data	EIA	štěňata 1,2–1,8 nm feny 0,7–1,2 nm	chování IgA

Tabulka 2: Možné ukazatele akutního stresu ve slinách psů

STUDIE	SALIVÁRNÍ MARKER
Svobodová a kol., (79)	sekreční IgA (sIgA)
Lensen a kol. (93)	chromogranin A (CgA)
Srithunyarat a kol. (95)	katestatin (CST) vasostatin (VS)
Conteras–Aguilar a kol. (96)	alfa–amyláza (sAA)
Diverio a kol. (97)	transportér glukózy 4 (GLUT–4) cyklooxygenáza 2 (COX2) superoxid dismutáza 1 (SOD1) heat shock protein 70 (HSP70)

Obrázek 1: Hypotalamo-hypofyzárně-adrenální a sympato-adreno-medulární osy stresu a jejich účinky



HPA osa – hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osa;

SAM osa – sympato-adreno-medulární osa;

CRH – kortikotropin uvolňující hormon;

ACTH – adrenokortikotropní hormon;

HPA osa je regulována kortikotropin uvolňujícím hormonem (CRH), který řídí sekreci hormonu z adenohipofýzy, který se označuje jako adrenokortikotropní hormon (ACTH). ACTH stimuluje buňky kůry nadledvin k vyloučení hormonů glukokortikoidů mechanismem zpětné vazby. Sympato-adreno-medulární osa (SAM) reaguje na různé stresory přes adrenalin ze dřeně nadledvin a noradrenalin z autonomní nervové soustavy. Nepřerušovaná černá čára znázorňuje stimulační účinek hormonů HPA a SAM dráhy stresu. Přerušovaná černá čára znázorňuje jejich inhibiční účinek.