

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Neinvazivní monitorování stresových hormonů ve slinách  
králíků**

**Diplomová práce**

**Bc. Eliška Plzánková**

**Management zdraví a welfare zvířat**

**doc. Ing. Petr Kačer, Ph.D.**

**© 2024 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Neinvazivní monitorování stresových hormonů ve slinách králíků" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Petru Kačerovi PhD. za odborné vedení, cenné rady, ochotný a vstřícný přístup při psaní této diplomové práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině za podporu během mého studia.

# Neinvazivní monitorování stresových hormonů ve slinách králíků

## Souhrn

Tato diplomová práce se zaměřuje na neinvazivní sledování hormonů stresu ve slinách králíků. V teoretické části práce byla pozornost věnována stresu obecně a stresovým hormonům. Dále byl popsán cirkadiánní rytmus a v poslední kapitole teoretické části byla popsána problematika odběru vzorků a jejich analýza obzvláště ze slin.

Praktická část byla věnována měření hodnot jednotlivých parametrů ze slin zvířat. Králíci byli rozděleni podle pohlaví. Následně byly vzorky vyšetřeny a zpracovány. V poslední části se přešlo k ověření hypotéz, kdy se potvrdilo, že steroidní hormony jako kortizol, kortizon, kortikosteron a testosteron korelují s úrovní stresu, kterému je zvíře vystavené.

Cílem bylo vyvinout a ověřit metodu pro monitorování kortizolu, kortizonu, testosteronu a kortikosteronu, což je klíčové pro hodnocení jejich stresové reakce. Studie ukázala úspěšné využití metody HPLC/MS ke kvantifikaci úrovní kortizolu, kortizonu, kortikosteronu a testosteronu ve slinách králíků. Výsledky této studie by mohly ovlivnit péči o zvířata, a neinvazivní monitorování hormonů stresu ve slinách králíků může být užitečným nástrojem v oblasti veterinární péče, etologie a vědeckého výzkumu.

**Klíčová slova:** Stres, sliny, kortizol, kortizon, kortikosteron, HPLC/MS, metabolom.

# Non-invasive Monitoring of Stress Hormones in Rabbit Saliva

## Summary

This thesis focuses on the non-invasive monitoring of stress hormones in rabbit saliva. The theoretical part of the thesis addressed stress in general and stress hormones. Furthermore, the circadian rhythm was described, and the last chapter of the theoretical part addressed the issues of sample collection and their analysis, particularly from saliva.

The practical part was dedicated to measuring the values of individual parameters from animal saliva. Rabbits were divided by gender. Subsequently, the samples were examined and processed. In the final section, hypotheses were tested, confirming that steroid hormones such as cortisol, cortisone, corticosterone, and testosterone correlate with the level of stress to which the animal is exposed.

The aim was to develop and verify a method for monitoring cortisol, cortisone, testosterone, and corticosterone, which is crucial for evaluating their stress response. The study demonstrated the successful application of the HPLC/MS method for quantifying levels of cortisol, cortisone, corticosterone, and testosterone in rabbit saliva. The results of this study could influence animal care, and non-invasive monitoring of stress hormones in rabbit saliva could be a valuable tool in the field of veterinary care, ethology, and scientific research.

**Keywords:** Stress, saliva, cortisol, cortisone, corticosterone, HPLC/MS, metabolome.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Stres a stresové hormony</b> .....	<b>10</b>
2.1.1 Kortizol.....	12
2.1.1.1 Kortizol ve slinách .....	14
2.1.2 Kortizon.....	14
2.1.3 Kortikosteron .....	16
2.1.4 Testosteron.....	17
<b>2.2 Cirkadiánní rytmus</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 Denní režim králíka divokého .....	19
<b>2.3 Vzorke hormonů</b> .....	<b>20</b>
2.3.1 Odběr vzorků krve krevsajícím hmyzem.....	21
2.3.2 Analýza hormonů z výkalů .....	21
2.3.3 Odběr vzorků slin a analýza hormonů ve slinách .....	22
2.3.3.1 Odběr vzorků .....	22
2.3.3.2 Analýza hormonů - metody .....	23
<b>3 Metodika</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Chemikálie</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Použité aparáty k přípravě vzorků</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Příprava vzorků</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4 Stanovení kortikoidů HPLC-MS analýzou</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5 Vzorke</b> .....	<b>32</b>
<b>4 Výsledky</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 Hladiny kortizolu ve slinách samců králíků</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 Hladiny kortikosteronu ve slinách samců králíků</b> .....	<b>37</b>
<b>4.3 Hladiny kortizonu ve slinách samců králíků</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4 Hladiny testosteronu ve slinách samců králíků</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5 Hladiny kortizolu ve slinách samic králíků</b> .....	<b>44</b>
<b>4.6 Hladiny kortikosteronu ve slinách samic králíků</b> .....	<b>45</b>
<b>4.7 Hladiny kortizonu ve slinách samic králíků</b> .....	<b>47</b>
<b>4.8 Hladiny testosteronu ve slinách samic králíků</b> .....	<b>48</b>
<b>4.9 Statistické vyhodnocení experimentální stresové studie</b> .....	<b>50</b>
<b>5 Diskuse</b> .....	<b>54</b>

<b>6 Závěr .....</b>	<b>56</b>
<b>7 Literatura.....</b>	<b>57</b>
<b>8 Obrázky .....</b>	<b>67</b>

# 1 Úvod

Hodnocení stresu u zvířat je aktuálním tématem v oblasti welfare a neinvazivní metody se neustále vyvíjejí a zdokonalují ve snaze vyvinout metody šetrné ke zvířatům.

Při řešení stresových situací je v organismu savců zapojeno mnoho endokrinních mechanismů. Glukokortikoidy vylučované nadledvinami jsou v první linii reakce organismu k překonání stresových situací (Mc Ewen 2010). Při monitorování průběhu glukokortikoidních koncentračních hladin se obvykle využívají vzorky plazmy jako matrice pro stanovení koncentračních úrovní stresových hormonů (kortizon, kortizol, kortikosteron), které slouží jako parametry aktivity nadledvin.

Samotný odběr vzorků krve může bohužel zvíře rušit a přivádět jej sám o sobě do stresové situace a tím ovlivnit vypovídací úroveň experimentu (Touma & Palme 2005). Neinvazivní metody alternativních matric se proto nabízejí jako vhodné řešení. Neinvazivní metody využívají další biologické matrice – sliny, výkaly, pot, mléko, vlasy / peří /srst pro stanovení glukokortikoidů.

Dobře naplánovaný odběr vzorku zařazený do kontextu stresové osy v organismu zvířete je nutný a je nutné jej posuzovat v závislosti na cíli studie (dopad akutního nebo chronického stresu, ad.). Vždy je nutná detailní znalost metabolismu a vylučování stresových hormonů, jejich cirkadiánní rytmy, rychlosti zpoždění, s jakou se objevují v dané biologické matrici, validace pro každý druh a pohlaví a další parametry.

V poslední době se v odborné literatuře řada studií zabývá matricí slin, které představují vhodnou alternativu ke krevní plazmě. Diplomová práce se zabývá vývojem analytické metody a řešením problémů týkajícími se odběru vzorku slin králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*), jeho skladování, zpracování vzorku pro jeho analýzu analytickou metodou (HPLC/MS). Správně aplikované neinvazivní techniky pro sledování metabolitů glukokortikoidů ve vzorcích budou pak užitečným nástrojem pro hodnocení dobrých životních podmínek zvířat při jejich chovu.



## 1 Vědecká hypotéza a cíle práce

Při řešení stresových situací je v organismu savců zapojeno mnoho endokrinních mechanismů. Glukokortikoidy vylučované nadledvinami jsou v první linii reakce organismu k překonání stresových situací. Při monitorování průběhu glukokortikoidních koncentračních hladin se obvykle využívají vzorky plazmy jako matrice pro stanovení koncentračních úrovní stresových hormonů (kortizon, kortizol, kortikosteron), které slouží jako parametry aktivity nadledvin. Samotný odběr vzorků krve může bohužel zvíře rušit a přivádět jej sám o sobě do stresové situace a tím ovlivnit vypovídací úroveň experimentu. Neinvazivní metody alternativních matric se proto nabízejí jako vhodné řešení. Neinvazivní metody využívají další biologické matrice – sliny, výkaly, pot, mléko, vlasy / peří /srst pro stanovení glukokortikoidů. Dobře naplánovaný odběr vzorku zařazený do kontextu stresové osy v organismu zvířete je nutný a je nezbytné jej posuzovat v závislosti na cíli studie (dopad akutního nebo chronického stresu, ad.). Vždy je nutná detailní znalost metabolismu a vylučování stresových hormonů, jejich cirkadiální rytmy, rychlosti zpoždění, s jakou se objevují v dané biologické matrici, validace pro každý druh a pohlaví a další parametry. V poslední době se v odborné literatuře řada studií zabývá matricí slin, které představují vhodnou alternativu ke krevní plazmě.

H1: V organismu existují látky – stresové hormony, jejichž hladiny korelují s úrovní stresu, jimž je organismus vystaven.

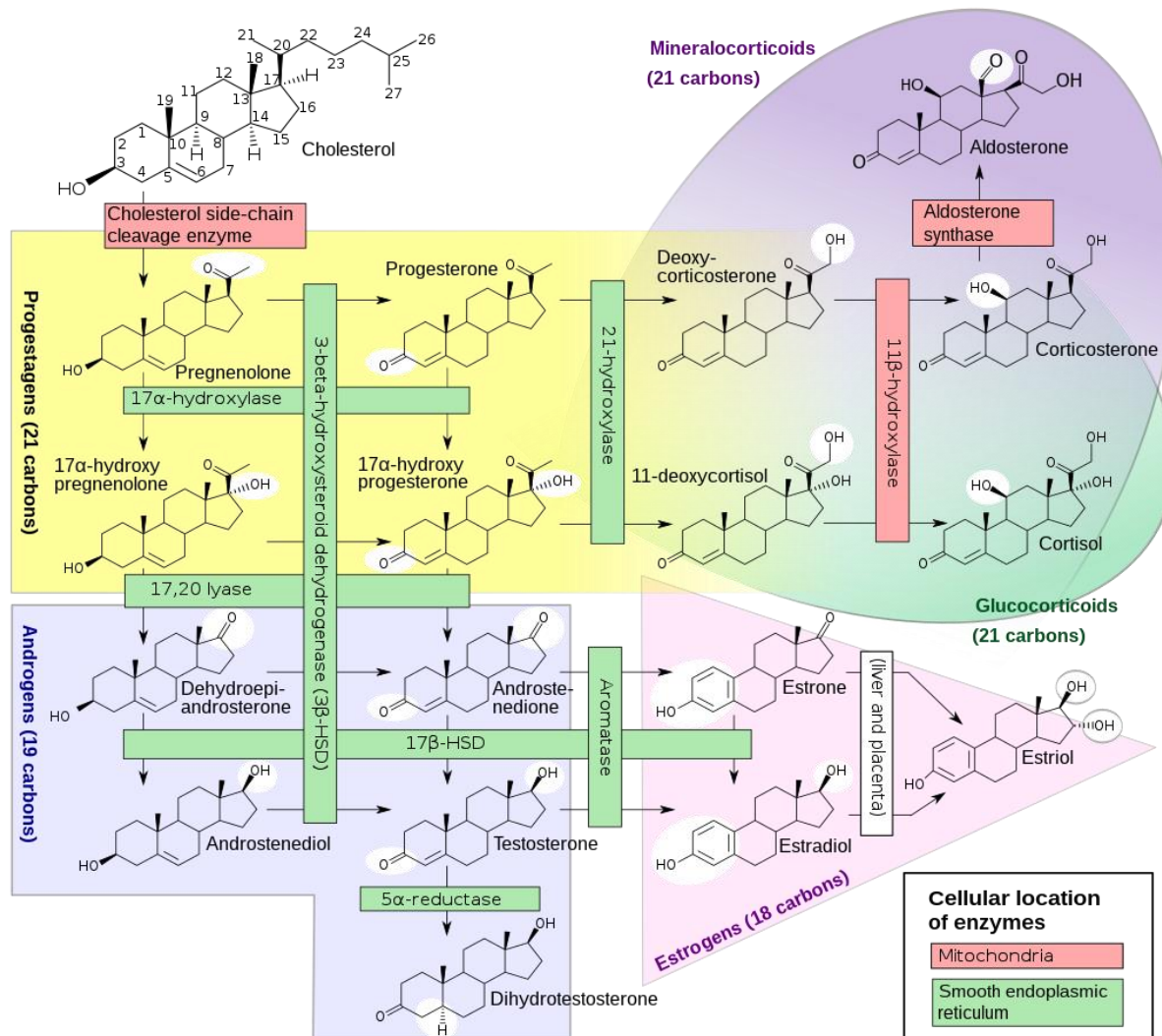
H2: Jako stresové hormony v organismu králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) lze využít některé steroidní hormony v metabolické dráze cholesterolu – kortizon, kortizol, kortikosteron, ad.

H3: Existují koncentrační rozdíly v úrovni stresových hormonů, které korelují s aktuální životní situací, v které se zvíře nachází: stres versus pohoda („fight or flight“ versus „peace“).

## 2 Literární řešerše

### 2.1 Stres a stresové hormony

Krátkodobý stres má ochranný charakter, pomáhá tělu vyrovnat se a přizpůsobit se dané stresové situaci. Naopak dlouhodobý stres může poškodit zdraví jedince (Ivković et al. 2015).



Obrázek 1: Syntéza steroidních hormonů (Häggröm & Richfield 2014)

Stres je v biomedicíně pojmenování pro situace, kdy jsou hladiny glukokortikoidů (hormony vylučované kůrou nadledvin) a katecholaminů (hormony vylučované dřeni nadledvin) zvýšeny jakožto reakce na určitý prožitek (Lepschy et al. 2008; Mc Ewen 2010). Prekursorem těchto steroidních hormonů je cholesterol (Taves et al. 2016), jak je vyznačeno na obrázku 1, kde je vyobrazena steroidogeneze. Tento proces začíná syntézou cholesterolu, který pak pokračuje řadou modifikací v nadledvinách, aby se stal jedním z mnoha steroidních hormonů. Jedním z konečných produktů této dráhy je kortizol. Aby se kortizol uvolnil

z nadledvin, nastává kaskáda signalizace. Hormon uvolňující kortikotropin uvolněný z hypotalamu stimuluje kortikotropy v přední hypofýze k uvolnění ACTH, který přenáší signál do kůry nadledvin. Zde zona fasciculata a zona reticularis v reakci na ACTH vylučují glukokortikoidy, zejména kortizol (Su, Ge & Xie 2024).

Katecholaminy a glukokortikoidy se uvolňují v průběhu několika sekund až minut po působení stresoru. Obě skupiny hormonů jsou rychle metabolizovány a vylučovány močí a výkaly (Lepschy et al. 2008). Glukokortikoidní hormony také zprostředkovávají homeostatické reakce na změny prostředí (Ouyang et al. 2011), podřizují se cyklickým změnám – diurnálním a sezónním. Sezónní kolísání může být způsobeno zvýšenou kompeticí o potravu, sexuálními partnery atd. Diurnální výkyvy jsou dané denní aktivitou jedince (Michael Romero 2002).

Když se zvíře setká se stresem aktivuje se paraventriculární jádro hypotalamu a locus coeruleus (oblast v mozkovém kmeni tvořena šedou hmotou, vytváří se zde noradrenalin (Bouret & Sara 2005)), aby zaktivovali sympaticko-adrenomodulární systém, to vede k uvolnění katecholaminů z dřene nadledvin, jako je např. noradrenalin a adrenalin. Dále se aktivují sympatické nervy (Kooriyama & Ogata 2021).

Centrem fyziologie stresu je osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA = Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis) jejímž výsledným produktem je kortizol a další glukokortikoidy (Gunnar et al. 2009). Osa HPA reguluje cirkulující hladiny glukokortikoidů a je hlavním neuroendokrinním systémem u savců, který umožňuje rychlou reakci a obranu proti stresu (Spiga et al. 2014).

Stres aktivuje sympatiko adrenomedulární systém, tato reakce zmobilizuje síly v organismu (Chida et al. 2006). Hormon uvolňující kortikotropin (CRH) je produkován lokálně v hypotalamu a se stresem se sekrece rychle zvyšuje. CRH vyvolává sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z hypofýzy, který stimuluje uvolňování kortizolu. Kortizol je hlavní glukokortikoidní hormon a je vylučován kůrou nadledvin do krevního řečiště, kde stimuluje zvýšení srdeční frekvence a dechové frekvence, čímž transportuje více kyslíku a energie přenášející krev do koncových orgánů, jako jsou svaly a mozek. Tělo se připravuje na přežití a reakci „boj nebo uteč“. Periferní krevní cévy se stahují, aby zabránily ztrátě krve, zatímco mozek uvolňuje endorfiny pro úlevu od bolesti (Mc Ewen 2010).

Dlouhodobě vysoké hladiny glukokortikoidů mohou snižovat kondici a mohou vést k potlačení reprodukční výkonnosti (Schuster & Schaub 2001). Sekrece těchto hormonů také zhoršuje výkonnost deklarativní paměti (de Quervain et al. 2000). Osa HPA je mimo jiné aktivována, pokud mozek potřebuje přísun energie, kterou mu osa HPA zajistí přísunem glukózy (Peters et al. 2004).

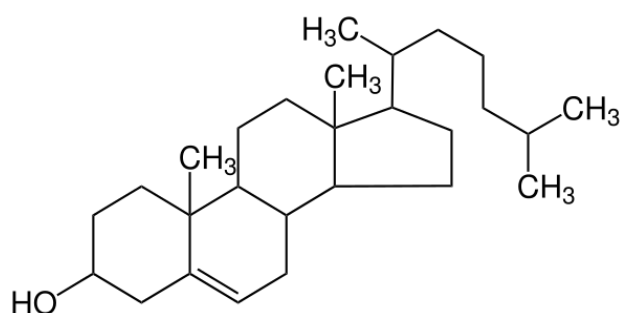
Během infekčních onemocnění se koncentrace kortizolu a kortizonu v těle zvyšují. Glukokortikoidy vyvolávají protizánětlivé a imunosupresivní účinky, které jsou prospěšné pro zvíře tím, že omezí patofyziologické následky infekčního onemocnění (Toth et al. 1992).

Kortikosteron a kortizol ovšem nejsou vylučovány ve stejné výši u všech živočichů. Hlavním glukokortikoidem lidí a většiny savců je kortizol, zatímco u některých živočichů jako např. ryby, obojživelníci a ptáci převažuje kortikosteron (Skarlandtová et al. 2010).

V současné době existují důkazy, které naznačují, že limbické oblasti, jako je hipokampus, prefrontální kůra a amygdala, se zásadním způsobem podílejí na regulaci účinků stresu na paměť prostřednictvím vzájemného působení stresových hormonů a stresem aktivovaných neurotransmiterů (Sandi 2011; Ulrich-Lai & Herman 2009).

Při fyziologické stresové reakci jsou také rozdíly mezi pohlavími, předpokládá se, že jsou částečně způsobeny rozdíly v metabolismu glukokortikoidů samců a samic (Touma et al. 2003). Při posuzování stresu by se ovšem nemělo přihlížet jen na jeden údaj – hodnoty jednoho hormonu, jedné skupiny hormonů, atd... Stres by se pro objektivní zhodnocení měl posuzovat kombinací různých měření např. fyziologických a behaviorálních (Rushen et al. 2011).

Metabolismus cholesterolu u člověka je velmi podobný tomu králičímu, proto se také na králících provádí studie za účelem pochopení účinků hyperlipidémie na aterosklerózu a zvýšený krevní tlak, stejně jako další patologie srdce a cév (Fan et al. 2015). Dospělí králíci syntetizují vysoké množství lipidů, včetně cholesterolu, z rostlinné stravy s vysokým obsahem vlákniny. U novozélandských bílých králíků dochází k syntéze cholesterolu hlavně v játrech, nadledvinách, tenkém střevě a vaječnících (Aguilar-Roblero & González-Mariscal 2020).



Obrázek 2: Cholesterol, strukturní vzorec (Frederick 2014)

### 2.1.1 Kortizol

Kortizol je uváděn jako jeden z hlavních stresových hormonů produkovaný v kůře nadledvin a je nezbytný pro přípravu těla k akci. Tento hormon se zpravidla používá jako hlavní indikátor stresu (Hellhammer et al. 2009). Kortizol pomáhá přizpůsobit se stresorům a koordinuje metabolismus s každodenní aktivitou a řídí spánek. Kromě reakce na stres má tedy kortizol svou životně důležitou úlohu při cirkadiálním rytmu. Přesto se běžně spojuje jen se stresem a zejména s negativními aspekty stresu (McEwen 2019). Kortizol se aktivně účastní na regulaci absorpce vápníku, udržování krevního tlaku, protizánětlivé a imunitní funkce, glukoneogeneze, žaludeční kyseliny a sekrece pepsinu (Heshmati et al. 1998; Wiederanders et al. 1960).

Tento hormon také zvyšuje hladinu cukru v krvi prostřednictvím glukoneogeneze, potlačuje imunitní systém a pomáhá při metabolismu tuků, bílkovin a sacharidů. Čistým účinkem je zvýšení koncentrace glukózy v krvi, dále doplněné snížením citlivosti periferní tkáně na inzulín, čímž se zabrání této tkáni odebírat glukózu z krve (Khani & Tayek 2001). Kortizol má permisivní účinek na působení hormonů, které zvyšují produkci glukózy, jako je glukagon a adrenalin. Kortizol také snižuje tvorbu kostí. Mnohé z těchto funkcí se uskutečňují vazbou kortizolu na glukokortikoidní nebo mineralokortikoidní receptory uvnitř buňky, které se pak vážou na DNA a ovlivňují genovou expresi (Plieger et al. 2018). Kortizol také hraje důležitou, ale nepřímou roli v jaterní a svalové glykogenolýze (štěpení glykogenu na glukóza-1fosfát a glukózu), ke které dochází v důsledku působení glukagonu a adrenalinu. Navíc kortizol usnadňuje aktivaci glykogen fosforylázy, která je nezbytná pro to, aby měl adrenalin účinek na glykogenolýzu (Khani & Tayek 2001).

Kortizol je vylučován v diurnálním rytmu, který má u člověka nejvyšší hodnoty v ranních hodinách (u nočních druhů zvířat naopak) a má za úkol probouzet jedince. Poté klesá a znovu stoupá kolem poledne, večer a v noci jsou jeho hodnoty nejnižší. To vše je podstatné pro řízení denní aktivity a metabolismu (McEwen & Karatsoreos 2015) a pro průběh normální stresové reakce (McEwen 2019). Adaptivní reakce na stres proto mohou být narušeny při nedostatku spánku, směnných režimech v zaměstnání nebo při depresi, kdy hladiny kortizolu v krvi, jsou v přibližně stejné míře po celý den (Young et al. 2004). Měnící se hodnoty kortizolu během dne jsou důvodem proč by se jeho vzorky měly odebírat vždy ve stejný čas, případně i několikrát denně (Blair et al. 2017). Sekrece kortizolu obecně vrcholí 20-30 minut po stresové události, jako je třeba bolest (Buckingham 2006). Ve studii (Beerda et al. 1998) dosáhl kortizol ve slinách vrcholu mezi 16 a 20 minutami po stresovém podnětu a vrátil se na výchozí hodnotu během 60 minut. Liston et al. (2013) uvedli, že denní výkyvy kortizolu podporují tvorbu a eliminaci synapsí v mozku, a to nám pomáhá učit se a přizpůsobovat se.

Při dlouhodobém působení nadměrných hladin kortizolu vzniká Cushingova choroba, která se projevuje například tloušťnutím, atrofií kůže, osteoporózou, depresemi, svalovou atrofií atd. (de Quervain et al. 2000). Naopak snížená tvorba kortizolu, která nastává po nedostatečnosti ledvin, může způsobit např. Addisonovu chorobu, ta má za následky ztrátu tělesné hmotnosti, menší chuť k jídlu, také sníženou toleranci ke stresu, a proto mohou mít lidé s touto chorobou problém přizpůsobit se fyzickému a emocionálnímu stresu (Henry et al. 2021).

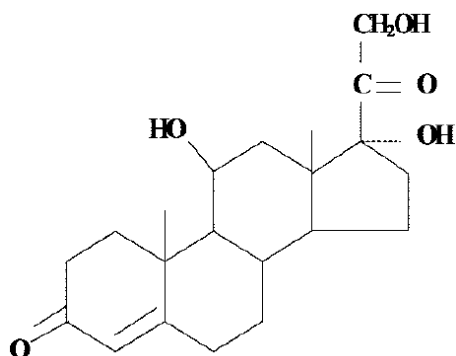
Zvýšené hladiny kortizolu mohou mimo jiné vést k proteolýze = rozpadu bílkovin a k úbytku svalů (Yoshioka et al. 2005). Účinky kortizolu na metabolismus lipidů jsou složitější, protože lipogeneze je pozorována u pacientů s chronicky zvýšenými hladinami cirkulujících glukokortikoidů (tj. kortizolu), ačkoli akutní zvýšení cirkulujícího kortizolu podporuje lipolýzu. Běžným vysvětlením tohoto zjevného rozporu je, že zvýšená koncentrace glukózy v krvi (působením kortizolu) bude stimulovat uvolňování inzulínu. Inzulín stimuluje lipogenezi, takže

je to nepřímý důsledek zvýšené koncentrace kortizolu v krvi, ale k tomu dojde až po delší době (Djurhuus et al. 2002).

Pro výzkumné účely stanovení hladin kortizolu je důležité vědět, že kortizolový cirkadiánní rytmus se u lidí vyvíjí během prvního roku života (de Weerth et al. 2003).

### 2.1.1.1 Kortizol ve slinách

V krvi je jen 1 % až 15 % kortizolu ve své nevázané nebo biologicky aktivní formě. Zbývající kortizol je navázán na sérové proteiny. Nevázaný sérový kortizol vstupuje do slin intracelulárními mechanismy a ve slinách setrvává většina kortizolu nenavázaná na protein. Hladiny kortizolu ve slinách nejsou ovlivněny průtokem slin ani slinnými enzymy (Aardal & Holm 1995). Studie konzistentně uvádějí vysoké korelace mezi sérovým a slinným kortizolem, což naznačuje, že hladiny kortizolu ve slinách spolehlivě hodnotí hladiny hormonu v séru (Dorn et al. 2007; Turpeinen & Hämäläinen 2013).



Obrázek 3 Kortizol, strukturní vzorec (Tomlinson et al. 2002)

### 2.1.2 Kortizon

Kortizon je jedním z glukokortikoidů, který je biologicky inaktivní, jelikož má navázanou keto-skupinu, a ne hydroxylovou jako mají kortizol a kortikosteron (Skarlandtová et al. 2010). V případě, kdy se v organismu zvýší potřeba kortizolu (např. při stresu) je kortizon k dispozici enzymu 11 $\beta$ -HSD1, který ho přemění na kortizol (Seckl 1997).

Kortizon je pregnanový (21uhlíkový) steroidní hormon. Je to přirozeně se vyskytující metabolit kortikosteroidu, který se také používá jako farmaceutické proléčivo a není syntetizován v nadledvinách (Drucker & New 1987). Přirozeně vzniká neaktivní metabolit kortizon v lidském těle hlavně v ledvinách enzymatickou přeměnou kortizolu pomocí 11- $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenázy izozym 2 (Al-Dujaili et al. 2012), naopak v játrech se pomocí působení enzymu 11 $\beta$ -HSD typu 1 může přeměnit zpět na aktivní steroidní kortizol (Walker et al. 1992). Kortizol je silný mineralokortikoid, a proto se inaktivuje na kortizon,

aby nezpůsobil chaos s hladinami elektrolytů – zvyšuje hladinu sodíku v krvi, a naopak zvyšuje hladinu draslíku, což zvedá krevní tlak (Quinkler & Stewart 2003).

Kortizon byl poprvé identifikován americkými chemiky Edwardem Calvinem Kendallem a Haroldem L. Masonem při výzkumu na Mayo Clinic (Carlisle et al. 2016). Během procesu objevování byl kortizon znám jako sloučenina E (zatímco kortizol byl znám jako sloučenina F) (Główka et al. 2010).

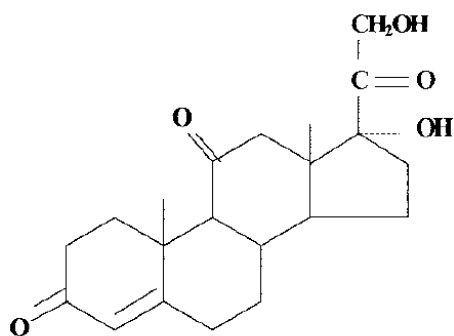
Kortizon spolu s ostatními glukokortikoidy může být podáván jako proléčivo, což znamená, že musí být po podání přeměněn tělem – játry na kortizol, aby byl účinný. Potlačuje reakce imunitního systému a tím snižuje zánět, může být podáván intravenózně, perorálně, intraartikulárně (do kloubu) nebo transkutánně (pod kůží). Rizika existují při dlouhodobém užívání kortizonu, jeho použití však vede k velmi mírné aktivitě a velmi často se místo toho používají silnější steroidy (Barnes 2006).

Kortizonová injekce může poskytnout krátkodobou úlevu od bolesti a může snížit otok způsobený zánětem kloubu, šlachy nebo burzy, například v kloubech kolena, lokte a ramene a do zlomené kostrče (Cushman et al. 2019). Kortizon je používán dermatology k léčbě keloidů (jizev), zmírnění příznaků ekzému a atopické dermatitidy (Kierland 1952).

V krevním séru nad hladinami kortizonu převažuje kortizol, jejich poměr v séru je 4:1 (Blair et al. 2017).

Termín "kortizon" je často nesprávně používán ve významu buď jakýkoli kortikosteroid nebo hydrokortizon, což je ve skutečnosti jiný název pro kortizol (Drucker & New 1987).

Kortizon byl poprvé komerčně vyráběn společností Merck & Co. v roce 1948 nebo 1949. 30. září 1949 oznámil Percy Julian zlepšení procesu produkce kortizonu ze žlučových kyselin. To eliminovalo potřebu používat oxid osmičelý, vzácnou, drahou a nebezpečnou chemikálii. Ve Spojeném království na počátku 50. let John Cornforth a Kenneth Callow z Národního institutu pro lékařský výzkum spolupracovali s Glaxo na výrobě kortizonu z hekogeninu ze sisalových rostlin (Hench 1950; Mukhopadhyay & Kwatra 2018).



Obrázek 4 Kortizon, strukturní vzorec (Tomlinson et al. 2002)

### 2.1.3 Kortikosteron

Kortikosteron, také známý jako 17deoxykortizol a 11 $\beta$ ,21-dihydroxyprogesteron, je 21uhlíkový steroidní hormon kortikosteroidního typu, produkováný v kůře nadledvin (Whitehouse 2011). U lidí má menší význam, kromě velmi vzácného případu vrozené adrenální hyperplazie v důsledku nedostatku 17 $\alpha$ -hydroxylázy (Ulrich-Lai et al. 2006).

Sekrece kortikosteronu se stejně jako kortizolu zvyšuje, když jedinec prožívá stres, kortikosteron podporuje změny chování a metabolismu, které pomáhají přizpůsobit se stresové reakci (Cockrem & Silverin 2002). Hlavním účinkem kortikosteronu v mozku je regulace aktivace osy HPA pomocí negativní zpětné vazby (Ulrich-Lai & Herman 2009).

Cirkulující kortikosteron se nepodílí pouze na krátkodobé regulaci aktivity osy HPA, ale také moduluje učení a paměť, což vede k dlouhodobým adaptivním reakcím (Lyons et al. 2010). S emočními vzpomínkami je kortikosteron do značné míry spojen s rozpoznáváním paměti strachu. Když jsou vzpomínky na strach znovu aktivovány, hladiny kortikosteronu se zvýší. Nárůst hladin kortikosteronu je spojeno s úlevou od úzkosti. Kortikosteron může podmíněný strach buď usnadnit, nebo přerušit (Albrecht et al. 2013; Korte 2001).

U mnoha druhů, včetně obojživelníků, plazů, hlodavců a ptáků, je kortikosteron hlavním glukokortikoidem zapojeným do regulace energie, imunitních reakcí a stresových reakcí (Katsu & Iguchi 2016). Kortikosteron má u lidí pouze slabé glukokortikoidní a mineralokortikoidní potence a je důležitý hlavně jako meziprodukt ve steroidogenní dráze od pregnenolonu k aldosteronu (Katsu & Iguchi 2016). Kortikosteron se přeměňuje na aldosteron aldosteronsyntázou, která se nachází pouze v mitochondriích glomerulóznic buněk. Glomerulosa buňky se nacházejí v zona glomerulosa, což je nej povrchnější oblast endokrinních buněk v kůře nadledvin (Kakiki et al. 2009).

Hladiny kortikosteronu se – jak je tomu i u jiných hormonů – liší mezi samci a samicemi. Podle studie (Figueiredo et al. 2002) samice potkanů vylučují v klidových podmínkách vyšší množství kortikosteronu než samci. V průběhu estrálního cyklu samic se regulace stresu a jeho hormonů mění. V proestu jsou hladiny kortikosteronu vyšší než ve fázích estru a diestru (Atkinson & Waddell 1997).

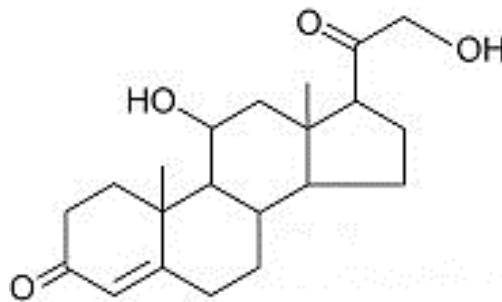
Během stresu, kdy je kortikosteron uvolňován do krevního řečiště, vstupuje do mozku přes hematoencefalickou bariéru a je roznášen do různých oblastí mozku. Bylo prokázáno, že během stresové reakce jsou zvýšené hladiny tohoto hormonu v prefrontální kůře, hipokampu a v amygdale (Garrido et al. 2012). Kortikosteron, společně s ostatními glukokortikoidy přispívá i ke stárnutí organismu (Spiga et al. 2014). U starých potkanů bylo zjištěno, že v prefrontální kůře a hipokampu dochází ke zvýšení bazálních hladin kortikosteronu bez jakéhokoliv dalšího zvýšení hladin při stresu. Tyto zvýšené míry glukokortikoidů mohou přispívat k poškození neuronů, ke kterému dochází v těchto oblastech mozku během stárnutí a stresu (Garrido et al. 2012). Studie, která zkoumala stárnoucí potkany, odhalila výrazné změny v pulzaci kortikosteronu během života daného organismu. Starší jedinci potkanů (12měsíční), měli během cirkadiálního rytmu nižší hladiny



kortikosteronu v nejvyšších fázích v porovnání s mladšími jedinci, což poukazuje na potenciální souvislost mezi narušením plasticity kortikosteronu a poruchami, které souvisejí s věkem (Spiga et al. 2014).

Kortikosteron inhibuje syntézu proteinů a tím proteiny degraduje. Ptáci se zvýšenými hladinami kortikosteronu mají pomalejší růst peří během období přepeřování a delší období špatného létání. Výsledkem tedy je, že mnoho ptáků má snížené hladiny kortikosteronu, když přepeřují, aby se zabránilo degradaci jejich nového peří (Romero et al. 2005). Kortikosteron má i jiné vývojové účinky na ptáky. Zvýšená hladina kortikosteronu u mláďat vede ke zvýšenému žadonění o jídlo a agresivitě. Krátkodobě to vede k vyšší šanci získat potravu, ale z dlouhodobého hlediska zvýšený kortikosteron v raném věku ohrožuje kognitivní funkce ptáků (řešení problémů, asociace vizuálního podnětu s potravou atd.). Reakcí rodičů na zvýšené žebvání mláďat je delší doba shánění potravy. To ponechává hnízdo bez ochrany delší čas. Aby se tomu zabránilo během dlouhých období nedostatku potravy, mohou mláďata některých druhů potlačit činnost kortikosteronu a snížit tak negativní účinky, které zvýšený kortikosteron vyvolává (Loiseau et al. 2001).

Kortikosteron u mláďat králíků vykazuje cirkadiánní odchylky spojené s časem krmení, hodnoty stoupají před dobu sání a nejvyšší míra nastává po krmení. Naopak nejnižší hodnoty se objevují o 12 hodin později. Sekrece kortikosteronu může být ovlivněna mnoha okolnostmi. Například stresové faktory spojené s typem ustájení mohou mít vliv na králíky v intenzivních chovech. Nedostatečná velikost klecí je také spojena se zvýšením hladiny stresových hormonů (Rovirosa et al. 2005).



Obrázek 5 Kortikosteron, strukturní vzorec (Katsu & Iguchi 2016)

#### 2.1.4 Testosteron

Testosteron je primární androgenní hormon a anabolický steroid, který je vylučován varlaty (z Leydigových buněk) a vaječníky (Alzahrani et al. 2019), část se ale také tvoří v kůře nadledvin (Despopoulos & Silbernagl 2003). Produkce testosteronu je stimulována sekrecí luteinizačního hormonu (Keskin et al. 2015). Proces syntézy testosteronu z cholesterolu, objevený v roce 1935, značně urychlil vědecké zkoumání jeho účinků. Tento hormon způsobuje agresivitu a růst a sílu svalů (Gosetti et al. 2013), protože testosteron stimuluje

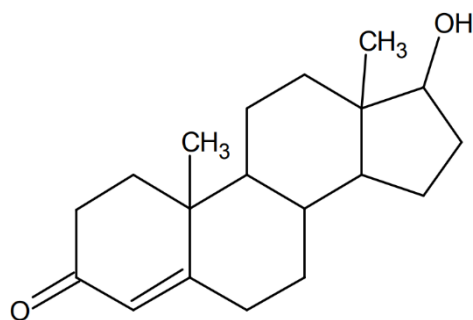
krvotvorbu a působí anabolicky = stavba tkání. Testosteron se odbourává v játrech a odpadní látky se vylučují ledvinami (Despopoulos & Silbernagl 2003).

Průměrné hladiny testosteronu u samců jsou výrazně vyšší než u samic, ale přesto jsou u nich stále prokazatelné (Kooriyama & Ogata 2021). U žen se sekrece hormonu pohybuje okolo 0,3 mg za den, zatímco u mužů je to přibližně 7 mg (Despopoulos & Silbernagl 2003). Cirkadiální rytmy koncentrací testosteronu u mužů jsou obecně nejvyšší ráno a nejnižší večer (Kraemer et al. 2001). Hodnoty testosteronu u samců králíků jsou podle (Aguilar-Roblero & González-Mariscal 2020) nižší v letních měsících.

Chronický stres vyvolává pokles hladiny testosteronu v krvi (Amikishieva et al. 2001), proto jsou také jeho snížené hladiny spojovány s depresivními poruchami (Zitzmann 2009). Během stresových událostí může být hladina testosteronu v krvi snížena v důsledku zhoršení průtoku krve ve varlatech (Kamiya et al. 2003).

Zvýšení hladiny testosteronu závisí mimo jiné na typu stresoru. Studie ukazují, že nejvíce údajů o zvýšení hladiny testosteronu během stresu bylo zjištěno u zvířat při agonistickém chování (Cavigelli & Pereira 2000; Loren Buck & Barnes 2003; Mellonijr et al. 1997; Oyegbile & Marler 2005) a v případě lidí při soutěžení (Zitzmann 2009). Podle Booth et al. (1989) má toto zvýšení hladin testosteronu přípravný účel, charakteristický pro konkurenční prostředí. Navíc je prokázána pozitivní korelace mezi hladinou testosteronu a dominancí jedince (Book et al. 2001). U prasat se ukázalo, že testosteron ve slinách je užitečným biomarkerem, protože se zvyšuje během akutního stresu (Escribano et al. 2014).

U králíků reguluje testosteron velikost brady a análních pachových žláz tím, že podporuje jejich růst. Zvyšuje také značkové chování samců, obzvláště značení bradou (Briganti et al. 2003).



Obrázek 6: Testosteron, strukturní vzorec (Grossman et al. 2011)

## 2.2 Cirkadiánní rytmus

Z latinského *circa diem* znamená cirkadiánní „přibližně den“ a cirkadiánní rytmy označují biologické oscilace s periodou přibližně 24 hodin. Cirkadiánní rytmy jsou zachovávány mezi živými organismy, od sinic až po savce (Spiga et al. 2014).

V přední části hypotalamu se nachází malý párový orgán nazýván suprachiasmatická jádra (SCN), která mají za úkol řídit cirkadiánní rytmy v těle podle okolního prostředí. SCN jsou umístěna za očima, a tak mohou synchronizovat tělo s denní dobou podle světla, které prochází sítnicí (de Lange 2016).

Bylo prokázáno, že při řízení cirkadiánní aktivity HPA, má důležitou roli uvolňování antidiuretického hormonu (ADH) (Kalsbeek et al. 2010), který podle studie (Kalsbeek et al. 1992) u potkanů po uvolnění z SCN silně inhibuje vyplavování nadledvinového kortikosteronu.

Během nástupu světla u nočních i denních druhů se uvolňuje vasopresin z neuronů SCN (Kalsbeek et al. 2012), to způsobuje i potlačení plazmatického kortikosteronu (Buijs et al. 1993). U nočních zvířat, kde světlo proniká do jejich SCN během neaktivní fáze, je uvolňování vazopresinu důležité pro zajištění nízké hladiny cirkulujícího kortikosteronu během denní fáze cirkadiánního rytmu (Kalsbeek et al. 1996).

### 2.2.1 Denní režim králíka divokého (*Oryctolagus cuniculus*)

Králík (*Oryctolagus cuniculus*) má pozoruhodně silný a organizovaný cirkadiánní systém (Jilge & Hudson 2009). Na rozdíl od většiny savců, králíci vylučují dva kortikosteroidy (kortikosteron a kortizol) a oba hormony vykazují cirkadiánní rytmus, kdy nejvyšších hodnot dosahují odpoledne a nejnižších kolem úsvitu (Aguilar-Roblero & González-Mariscal 2020). Rytmicita aktivity mláďat je synchronizována s návštěvami matky a krmením (Rovirosa et al. 2005).

Je to soumravné zvíře, tedy vrchol jeho aktivity nastává při východu a západu slunce (Szendrő et al. 2016), přičemž nejvyšší aktivita nastává při západu (Aguilar-Roblero & González-Mariscal 2020). Odhaduje se, že králíci potřebují 6 – 7krát méně světla pro ostré vidění než člověk. Divocí králíci jsou přes den v norách a vylézají během šera/tmy, kdy přijímají potravu a vylučují tuhé výkaly, zatímco během dne, kdy jsou v norách probíhá cékotrofie (Szendrő et al. 2016) (králíci produkují dva typy trusu – tvrdé výkaly a měkké neboli cékotrofy, které přijímají rovnou z řitního otvoru během první poloviny dne během jejich klidové fáze (Jilge & Hudson 2009)). Měkké výkaly jsou bohaté na živiny a vitamíny a tím, že projdou znovu celým trávicím traktem dojde k maximálnímu využití živin (Guerra Aldrigui et al. 2018).

Jedním z hlavních faktorů koordinace sezónního rozmnožování, obzvláště u volně žijících králíků, je délka dne. Nejvyšší sexuální aktivita samců (ve středomořském prostředí) je od února do srpna s vrcholem v květnu. Podobně je tomu i u samic, kdy nejvyšší počet březích a laktujících je na jaře, kdy se prodlužuje délka denního světla, a snižuje se na podzim (Szendrő et al. 2016). Naopak na ostrově Zembra v severním Tunisku podle Aguilar-Roblero

a González-Mariscal (2020) krátké dny stimulují reprodukci králíků, zatímco dlouhé dny ji potlačují. Tento rozdíl může odrážet genetický posun spojený s geografickou izolací této populace (a souvisejícími ekologickými charakteristikami biotopu), o které je známo, že je na ostrově přítomna více než 2000 let (Ben Saad & Maurel 2002).

## 2.3 Vzorky hormonů

Existují různé metody měření glukokortikoidů. Invazivní metody, jako je odběr krve, vyžadují odchyt, manipulaci a zavedení jehly, které většinou doprovází bolest. Všechny tyto postupy však ovlivňují koncentrace hormonů v krvi během několika minut (Touma & Palme 2005), protože takový odběr zvíře většinou stresuje. Glukokortikoidy se obvykle měří ze vzorků plazmy jako měřítko nadledvinové aktivity a tím i případné poruchy. Bohužel právě sběr takovýchto vzorků může narušit pohodlí zvířete (Palme 2012).

Kromě toho je odběr krve u většiny zvířat v zoologických zahradách možný pouze po anestezii, která může být pro zvířata a odborné pracovníky nebezpečná a nelze ji provádět pro dlouhodobé studie reprodukční aktivity, kdy je nezbytný pravidelný odběr vzorků (Harper & Austad 2000). K inhalační anestezii se přistupuje často i ve veterinární praxi, ve chvíli, kdy lékař nezná, nebo nemá specializaci na dravý druh zvířete. Inhalační anestetika, však můžou nepříznivě ovlivnit výsledky krevních parametrů, obzvláště u fretek (Ott Joslin 2009). V případě drobných zvířat a jejich malé velikosti cév je často nemožné odebrat vzorky krve bez poškození cév a hematomů (Wasser et al. 2000). Například právě krevní cévy králíka jsou křehké a náchylné k tvorbě hematomů, proto je třeba při odběru vzorku postupovat opatrně (Ott Joslin 2009). U takových zvířat také není možné opakovat odběry a hodnotit např. hormonální stav jedince při probíhající nemoci nebo jeho kolísání v průběhu dne. Neinvazivní metody umožňují např. sledovat krátkodobé i dlouhodobé změny koncentrací glukokortikoidů a jejich metabolitů, které jsou zásadní pro dlouhodobější studie sledující např. kolísání hodnot v průběhu jednotlivých ročních období (Touma et al. 2004).

Biologové se většinou snaží minimalizovat újmu studovaného druhu a vzrůstá tak zájem o získávání glukokortikoidních metabolitů co možná nejméně invazivní metodou. Důraz na neinvazivní metody je kladen obzvláště tam, kde se jedná o výzkumy zabývajícími se welfare zvířat. Jedná se např. o měření hormonů ze vzorků trusu (Möstl et al. 2005; Romero & Fairhurst 2016), dále ze srsti (Davenport et al. 2006), kostic (Hunt et al. 2014), peří (Romero & Fairhurst 2016), slin, mléka (Schmidt et al. 2010), nebo i z želvích drápů (Baxter-Gilbert et al. 2014).

Některé druhy matric ale nejsou příliš praktické, např. mléko je omezeno na zvířata v laktaci a odběr vzorků moči je často nesnadný (Sheriff et al. 2011). Kortizol v chlupcích by mohl spíše působit jako měřítko stresu pokožky (např. UV záření) než, že by odrážel systémové hladiny glukokortikoidů (Skobowiat et al. 2011).

Kadlecová et. al (2023) zaznamenali zvýšené hladiny kortikosteronu ve slinách králíků v 15:00h. Podobně Szeto et. al (2004) uvedli ve své studii zvýšení kortikosteronu ve večerních hodinách, konkrétně hladina kortikosteronu v krvi králíků dosáhla maximálních hodnot 30,01 ( $\pm 2,62$ ) ng/ml kolem 18:00. Králík je tedy zvíře vykazující spíše noční aktivitu než denní. Vnější hluk nebo krmení v průběhu dne však mohou změnit jeho vzorce chování na vyšší aktivitu během dne. Z tohoto důvodu by zvířata chovaná v laboratorních podmínkách, kde jsou krmena převážně přes den, kdy je i větší hluk, mohla být nočním odběrem stresována a hodnoty by byly zvýšené. V tomto případě může být relevantní odběr slin pouze ve 12hodinových cyklech (Kadlecova et al. 2023).

### **2.3.1 Odběr vzorků krve krevsajícím hmyzem**

Alternativou k běžnému odběru krve, alespoň pro zvířata chovaná v zajetí, by mohla být aplikace štěnic sajících krev (*Reduviidae, Heteroptera*) (Voigt et al. 2004), nebo zákeřnic, což je biologická technika odběru krve, kterou lze získat krev ze žil, které jsou jinak pro experimentátory nedostupné (Voigt et al. 2003). Kromě toho, že překonávají problém s dostupností žil, jsou zákeřnice pozoruhodné také několika dalšími způsoby: 1. vstříkují do rány látky tišící bolest, 2. nezpůsobují hematomy a 3. zkonsumovaná krev je okamžitě při požití smíchána s antikoagulanty (Voigt et al. 2004).

Bohužel není zcela možné předpovědět účinek trávení brouků na hladinu hormonů. Na jedné straně by střevní tekutiny štěnice mohly například degenerovat molekuly, což by vedlo ke snížení koncentrace hormonu s časem, který uplynul od sání. Na druhou stranu by se koncentrace hormonů mohla také zvýšit, protože hormony by mohly být zadržovány ve střevě kvůli jejich velkým rozměrům. Koncentrace hormonů v požití krvi zůstává konstantní přibližně po dobu 8 hodin, a významně se neliší od koncentrací v krvi získané všedními metodami. (Voigt et al. 2004).

### **2.3.2 Analýza hormonů z výkalů**

Vzorky výkalů mají výhodu snadného sběru, a to bez stresování zvířat (Möstl & Palme 2002).

Glukokortikoidy ve výkalech jsou po defekaci dále metabolizovány bakteriálními enzymy podle podmínek prostředí (Palme et al. 2005). Proto je doporučeno sbírat vzorky ihned po defekaci (Touma & Palme 2005).

Fekální glukokortikoidy mohou být ošetřeny mrazem, přidáním kyseliny nebo alkoholu, steroidy nejsou po takovémto postupu ovlivněny (Millspaugh & Washburn 2004). Skladování vzorků v lednici, před jejich přemístěním do mrazáku, může pomoci snížit možný metabolismus bakteriálních enzymů (Möstl et al. 2005).

### 2.3.3 Odběr vzorků slin a analýza hormonů ve slinách

Primární sliny jsou složením velmi podobné plazmě, jsou produkovány acinárními buňkami slinných žláz, do kterých přestoupí z plazmy voda a elektrolyty. Tyto primární sliny jsou následně upraveny do podoby sekundárních slin ve slinných vývodech, a to sekrecí a resorpcí iontů. Složení slin se liší podle toho, ve které slinné žláze vznikly (Proctor 2016). Např. u alfa amylázy, bylo vyzorováno, že její hladina se liší podle místa v ústech, odkud byl vzorek odebrán. Příušní a podčelistní žlázy produkují vyšší hladinu alfa amylázy oproti podjazykovým žlázám (Robles et al. 2013).

Králíci mají tři hlavní slinné žlázy: příušní, podčelistní a podjazykové. Tyto žlázy mají klíčovou roli při trávení potravy pomocí sekrece slin, které obsahují různé enzymy, vodu, mukopolysacharidy a glykoproteiny (Al-Saffar & Simaway 2014). Studie Kadlecové et. al (2023) prokázala, že koncentrace kortikosteronu v králičích slinách kolísají během dne i bez působení jakéhokoli zjevného stresu a tuto skutečnost je třeba vzít v úvahu při interpretaci výsledků, zejména pokud je tato metoda použita k vyhodnocení stresu.

Cook et al. (1996) zjistili významné korelace mezi hodnotami kortizolu v séru a slinách po stimulaci ACTH u prasat a dokonce navrhli, aby byl kortizol ve slinách lepším indikátorem stresu než kortizol měřený ve vzorcích krve. I u potkanů bylo prokázáno, že slinné žlázy mohou produkovat malý podíl hormonů (Ieko et al. Yokota 2019).

Výsledky studie Romera et. al (2002) ukazují, že hladina glukokortikoidních hormonů, a konkrétně kortizolu, se zvyšuje v krvi zvířete, kterému byl vzorek odebrán, tři minuty nebo méně po zahájení manipulace se zvířetem. Naproti tomu Kobelt et. al (2003) zjistili, že u zvířat během čtyř minut od začátku manipulace nedošlo k žádnému zvýšení hladin kortizolu ve slinách, což může naznačovat, že ke změnám koncentrace ve slinách dochází později než v krvi.

#### 2.3.3.1 Odběr vzorků

Na rozdíl od vzorků moči nebo trusu lze provádět opakované odběry slin v krátkých časových intervalech, což usnadňuje průběžné sledování zvířat (Escribano et al. 2012).

Kortizol a ostatní steroidy ve slinách jsou velmi stabilní, proto mohou být vzorky uchovávány při pokojové teplotě po několik dní, v domácích lednicích nebo mrazácích (Nalla et al. 2014). Clemets a Parker (1998) prokázali, že vzorky slin pro analýzu kortizolu odolávají nejméně pět dní teplotním výkyvům mezi 15 °C a 38 °C. Kromě toho jsou koncentrace kortizolu stabilní při 5 °C po dobu až 3 měsíců nebo při -20 °C a -80 °C po dobu nejméně jednoho roku. Jediná zaznamenaná změna byla po jednom měsíci skladování při pokojové teplotě (Garde et al. 2009). Durdiaková (2013) zkoumala stálost testosteronu při pokojové teplotě, při 4 °C, -20 °C a -80 °C. Po dobu jednoho měsíce, v žádném z těchto případů, nebyly zjištěny jakékoliv významné odchylky.

Sekrece vody a dalších složek slin jsou řízeny parasympatickým a sympatickým nervovým systémem. Sympatické a parasympatické (zvyšují průtok slin) větve autonomního nervového systému totiž inervují slinné žlázy (Lagerlöf et al. 1994). Pokud je jedinec ve stresu, nemusí být v jeho ústní dutině dostatek slin, a proto je i odběr slin ztížen. Aktivace sympatiku podněcuje myoepiteliální buňky a krevní cévy k sekreci slinných proteinů. Naopak aktivace parasympatiku stimuluje muskarinový receptor M3 a poté vtahuje vodu do lumen přes těsná spojení (tight junctions) po gradientu osmotického tlaku pocházejícího z druhého posla (G proteinu) (Proctor & Carpenter 2007).

Správné načasování odběru vzorků je velmi důležité, například určitá stresová událost způsobí zvýšení kortizolu po 15-20 minutách po vystavení stresovému zážitku. Poté hladina začne klesat, takže odběr vzorku po tomto čase již není příliš užitečný (Oster et al. 2017). V případě chronického stresu zůstává hladina kortizolu vysoká po celých 24 hodin, což vede k oslabení cirkadiálního cyklu a potlačené reakci na budoucí stresory (Lam et al. 2019).

Králíkům se většinou sliny odebírají výtěrem z ústní dutiny vatovými tyčinkami. (Baker et al. 2001). Mimo to existuje hlavně u jiných druhů zvířat a lidí mnoho způsobů, jak odebírat sliny. U lidí se může provádět pasivní slinění nebo plivání. Dále je možné použít vybavení jako jsou třeba zkumavky Salivette®, které obsahují tampon k odběru slin pomocí žvýkání (Alzahrani et al. 2019). Ve studii (Baker et al. 2001) byl králíkům proveden odběr slin tak, že se zvířatům nejdříve podal injekčně pod kůži pilokarpin, který mimo jiné zvyšuje sekreci slin, poté byly sliny odebrány vatovými tampony. Ve starších studiích jako je např. (Chauncey et al. 1963) a (Pull & Reynolds 1979) se můžeme setkat spíše s odběrem slin při anestezii králíků.

### **2.3.3.2 Analýza hormonů – metody**

Výhodou stanovení kortizolu ve slinách je odraz biologické aktivity hormonu, protože odráží míru volné frakce hormonu v krvi (Sheriff et al. 2011). Volný kortizol prostupuje do slin, ve kterých se rychle přeměňuje na kortizon, protože slinné žlázy mají vysokou hladinu 11 $\beta$ -HSD2. Poměr kortizolu ku kortizonu v krvi je přibližně 4:1, zatímco ve slinách je tento poměr obrácený právě kvůli již zmíněnému enzymu (Blair et al. 2017). Koncentrace kortizolu je tedy ve slinách oproti séru nižší, proto jsou vyžadovány citlivější metody pro měření hodnot hormonu. Z těchto důvodů se nabízí jako vhodné řešení použití hmotnostní spektrometrie, která má větší citlivost a také specifitu (Proctor 2016). Podle studie (Chen et al. 2020) lze použít hodnoty získané ze slin stejně tak jako markery hormonů v krvi.

Ve slinách se nachází i enzym chromogranin A (CgA), který je uvolňován společně s katecholaminy z dřene nadledvin (Taupenot et al. 2003). CgA se používá jako biomarker v krvi a slinách pro neuroendokrinní nádory a homeostázu kardiovaskulárního systému lidí (Helle & Corti 2015). U lidí hladiny CgA ve slinách vypovídají o cirkadiálním rytmu, kdy hladiny CgA ve slinách dosahují vrcholu po probuzení a klesají během hodiny. Hladiny enzymu pak zůstávají během dne na nízké úrovni (Den et al. 2007). Naopak u psů nebyly objeveny žádné cirkadiální variace po měření CgA každé čtyři hodiny (Kanai et al. 2008). Ve studii

(Escribano et al. 2015), která se zabývala měřením stresových hodnot ze slin prasat, se zjistilo, že 30 minut po vystavení stresové situaci, měla zvířata vyšší koncentrace CgA, a mimo jiné také vyšší hodnoty testosteronu ve slinách.

Ve studii (Baker et al. 2001) byly sliny z výtěru extrahovány pomocí fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po opakované extrakci byly výtažky slin spojeny a filtrovány přes filtrační papír, dialyzovány, lyofilizovány a skladovány při -20 °C, dokud nebyly použity. Jednotlivé složky slin lze stanovit použitím imunologických či biochemických metod, jako je například ELISA (enzymatická imunoanalýza), spektrofotometrie nebo chromatografie (Ivković et al. 2015).

Pro měření hormonů, jako např. kortizol a kortizon, vzhledem k jejich důležitosti v diagnostice, existuje mnoho analytických metod. V posledních několika letech se značně rozvinula metoda pro analýzu hormonů ve slinách a v séru, a to LC-MS (liquid chromatography–mass spectrometry = kapalinová chromatografie-tandemová hmotnostní spektrometrie) (Chen et al. 2020). Další velmi rozšířenou a účinnou metodou pro kvantitativní stanovení metabolitů v tělních tekutinách (Matuszewski et al. 2003) je HPLC-MS/MS (high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry = vysokoúčinná kapalinová chromatografie – tandemová hmotnostní spektrometrie) (Chen et al. 2020). Gossetti et al. (2013) shrnuli stanovení steroidů pomocí UHPLC-MS/MS (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie-tandemová hmotnostní spektrometrie) v různých lidských matricích, včetně slin.

Hormon je ve zmíněných metodách extrahován do organického rozpouštědla, kterým může být dichlormethan (Turpeinen et al. 2009), směs hexanu a methyl-terc-butyletheru (Alvi & Hammami 2019), anebo ethylacetát (Chen et al. 2020). Nemusí se ovšem provádět jen extrakce do rozpouštědla, existuje také extrakce na pevné fázi (SPE) – kolonky. SPE může být buď off-line nebo on-line. Při použití off-line může příprava trvat dlouho a je zvýšená i její složitost. Naopak online SPE je rychlejší a dochází k nižším ztrátám látek (Jones et al. 2012). Další způsob je precipitace proteinů. Tato rychlá metoda, má ale nevýhodu v poklesu citlivosti měření, a to tím, že vzorek musí být naředěn precipitačním činidlem (Jönsson et al. 2003). Pro detekci kortizolu se často užívá hmotnostní spektrometrie s mobilní fází voda + acetonitril nebo voda + methanol, přičemž methanol přispívá k tvorbě iontů (Chen et al. 2020).



### 3 Metodika

Studie byla provedena na platformě metabolomických přístupů, které byly aplikovány na sérii vzorků získaných v experimentálních studiích na vhodně vybraných skupinách králíků při jejich ošetření – různé fáze a porovnány s vzorky získanými v klidovém stavu experimentálních zvířat. Byl vytvořen panel biomarkerů, který byly použity pro monitorování úrovně stresu. Byly vyvinuty metodiky založené na pokročilých analytických metodách (HPLC/MS) a jejich aplikací na skupiny výše definovaných skupin vzorků byly porovnány koncentrační úrovně a vyvozeny příslušné závěry. Kromě zmíněného cíleného přístupu ("targeted analysis") byly na vzorky aplikován i necílený přístup ("untargeted analysis"). Studie byla vyhodnocena pomocí pokročilých statistických metod a byly vyvozeny závěry o vlivu uvedených stresových situací na koncentrační úrovně vybraných stresových biomarkerů.

V předkládané diplomové práci bylo řešeno několik na sebe navazujících úkolů, kterým jsou věnovány následující podkapitoly. A to vývoj metodiky a vlastní stanovení glukokortikoidů ve slinách králíka. Vyvíjená metodika se skládala ze dvou kroků – přípravy vzorku pro analytické stanovení a vlastní HPLC-MS metody.

#### 3.1 Chemikálie

Pro analýzu obsahu kortikoidů ve slinách pomocí metody LC-MS jsem použila tyto chemikálie ve vypsáních koncentracích a čistotě:

Methanol p.a.	CH <sub>3</sub> OH	(Fisher Scientific, ČR)
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	(Fisher Scientific, ČR)
Voda miliQ	H <sub>2</sub> O	ČZU v Praze
Chloroform p.a.	CHCl <sub>3</sub>	(Fisher Scientific, ČR)
Hydroxid amonný	NH <sub>4</sub> OH	(Fisher Scientific, ČR)
Síran horečnatý	MgSO <sub>4</sub>	(Fisher Scientific, ČR)

#### 3.2 Použité aparáty k přípravě vzorků

Ultrazvuková lázeň

SpeedVac™

Dělicí aparát: dělicí nálevka, kruh, stojan, kádinka

Filtrační aparát: fritra, odsávací baňka, pojistná lahev, vodní vývěva, gumové propojení

### 3.3 Příprava vzorků

Příprava vzorků pro vyhodnocení se sestávala z logicky navržených kroků, které respektovaly charakter vzorku a zároveň vlastnosti stanovovaných látek. Cílem bylo stanovit následující kortikoidy – kortizon, kortizol, kortikosteron a testosteron, které jsou přítomné ve slinách králíka.

Vzorky byly získány odběrem slin z dutiny ústní králíka na buničinovou tyčinku, která byla následně extrahována do methanolu.

Akutní stres se u králíků navodil vyšetřením simulujícím veterinární prohlídku – přibližně ve 12 hodin. Králíci byli ustájeni v DEP – stáji (Demonstrační a experimentální pracoviště). Experiment byl proveden na pěti samcích a pěti samicích podobného věku – okolo šesti měsíců. Králíci po vyjmutí z kotce byli zvednuti, byly jim prohlédnuty zuby po otevření tlamy, oči, uši, prohmatána břišní krajina, zvedání končetin jako u prohlídky hybnosti kloubů, ostříhání drápů.

### 3.4 Stanovení kortikoidů HPLC-MS analýzou

Kvalitativní a kvantitativní stanovení kortikoidů – kortizol, kortizon, kortikosteron a testosteron – bylo realizováno metodou kombinující separační metodu – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s vysoce citlivou detekční metodou – hmotnostní spektrometrií.

#### **Analytické podmínky HPLC-MS systému:**

Instrument:	Hmotnostní spektrometr - 3200 Q-Trap (Applied Bio-systems, Kanada).
	Chromatografický systém HPLC – Ultimate 3000 (Di-onex, USA).
	Analytická HPLC kolona – Synergi Fusion-RP 10, 100 x 2,0 mm, 2,5 $\mu$ m (Phenomenex, USA).
Ionizace:	ESI (+) pozitivní ionizační mód
Skenovací režim:	Full scan – 80-1000 Da
Průtok kolonou:	200 $\mu$ l/min
Přímá infúze:	15 $\mu$ l/min roztoku vzorku o koncentraci 250 $\mu$ g/ml (optimalizace MRM přechodů)
Teplota kolony:	40 °C
Objem nástřiku:	5 $\mu$ l
Doba analýzy:	30 min
Ion Spray Voltage:	IS = 5500V

Curtain gas:	CUR = 25 psi
Collision gas:	CAD = medium
Temperature:	TEM = 600 °C
Ion source gas 1:	GS1 = 50 psi
Ion source gas 2:	GS2 = 50 psi

Příprava roztoků referenčních látek: kortizol, kortizon, kortikosteron a testosteron jsou společné složky potenciálně přítomné ve slinách králíka, takže byly komerčně získávány a použity jako referenční látky v této studii. Zásobní roztoky kortizol, kortizon, kortikosteron a testosteron každý (0,20 µg/ml) byly připraveny rozpuštěním jejich standardů v methanolu. Po filtraci přes 0,45 µm Millipore byl roztok referenční látky přímo použit v HPLC/MS analýze.

### Parametry MRM přechodů:

---

#### Kortizol

Molární hmotnost: 362,46 g/mol

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>

Systematický název: 11β,17,21-trihydroxypregn-4-en-3,20-dion

#### Detekční přechod:

C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>                      363,2 → 121, 1

“Declustering potential” DP (V)	50V
“Entrance Potential” EP (V)	10V
Cell Entrance Potential (CEP)	30V
Collision Energy (CE);	6V

#### Konfirmační přechod:

C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>                      363,2 → 97, 1

“Declustering potential” DP (V)	50V
“Entrance Potential” EP (V)	10V
Cell Entrance Potential (CEP)	32V
Collision Energy (CE);	10V

---

#### Kortizon

Molární hmotnost: 360,45 g/mol

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>

Systematický název: 17 $\alpha$ ,21-Dihydroxypregn-4-ene-3,11,20-trione

**Detekční přechod:**

C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> 361,1 → 119, 1

“Declustering potential” DP (V) 55V

“Entrance Potential” EP (V) 10V

Cell Entrance Potential (CEP) 31V

Collision Energy (CE); 14V

**Konfirmační přechod:**

C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> 361,1 → 95, 1

“Declustering potential” DP (V) 50V

“Entrance Potential” EP (V) 10V

Cell Entrance Potential (CEP) 32V

Collision Energy (CE); 12V

---

**Kortikosteron**

Molární hmotnost: 346.467 g/mol

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>

Systematický název: 11 $\beta$ ,21-Dihydroxypregn-4-ene-3,20-dione

**Detekční přechod:**

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub> 347,1 → 121, 1

“Declustering potential” DP (V) 70V

“Entrance Potential” EP (V) 10V

Cell Entrance Potential (CEP) 32V

Collision Energy (CE); 10V

**Konfirmační přechod:**

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub> 361,1 → 95, 1

“Declustering potential” DP (V) 70V

“Entrance Potential” EP (V) 10V

Cell Entrance Potential (CEP) 81V

Collision Energy (CE); 10V

---

## Testosteron

Molární hmotnost: 288,42 g/mol

Systematický název: 17 $\beta$ -hydroxyandrost-4-en-3-on

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>

### Detekční přechod:

C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> 389,1 → 109, 1

“Declustering potential” DP (V) 60V

“Entrance Potential” EP (V) 10V

Cell Entrance Potential (CEP) 32V

Collision Energy (CE); 12V

### Konfirmační přechod:

C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> 389,1 → 97, 1

“Declustering potential” DP (V) 60V

“Entrance Potential” EP (V) 10V

Cell Entrance Potential (CEP) 30V

Collision Energy (CE); 12V

---

### Validační parametry HPLC-MS:

Byla provedena validace metody a nalezeny důležité validační parametry:

Tabulka 1 Validace HPLC/MS metody – validační parametry

	LOD	LOQ ( $\mu$ g/ml)	Linearita	Přesnost	Správnost (%)
<b>Kortizon</b>	0,10	0,33	1–10000	99,15	98,35
<b>Kortizol</b>	0,20	0,66	1–10000	98,75	98,15
<b>Kortikosteron</b>	0,05	0,17	1–10000	99,30	99,05
<b>Testosteron</b>	0,01	0,03	1–10000	99,45	99,10

#### Kortizon

Limit detekce (LOD) 1,2 ng/ml slin

Limit kvantifikace (LOQ) 4,0 ng/ml slin

#### Kortizol

Limit detekce (LOD) 1,2 ng/ml slin

Limit kvantifikace (LOQ) 4,0 ng/ml slin

### **Kortikosteron**

Limit detekce (LOD)	0,03 ng/ml slin
Limit kvantifikace (LOQ)	0,10 ng/ml slin

### **Testosteron**

Limit detekce (LOD)	0,03 ng/ml slin
Limit kvantifikace (LOQ)	0,10 ng/ml slin

**Interference:** Volbou selektivních MRM přechodů a jejich testováním se spikovanými reálnými vzorky a spikovanými „blanky“, bylo ověřeno že k interferencím nedochází.

**Rozsah jednodenní („intra-day“) a mezi-denní („inter-day“) přesnosti** byl 0,20–1,25 %. Přesnost byla stanovena metodou nejmenších čtverců a stanovena 98,25–99,20 % a relativní směrodatná odchylka 0,40 – 1,65 %.

Vzorky byly skladovány při -20 °C v mrazáku chráněné před světlem. LOD a LOQ bylo 0,03 a 0,40 ng/ml.

### **Optimalizované analytické podmínky:**

Byla vyvinuta HPLC-MS metoda, která splňovala první uvedený požadavek na ideální separaci, nicméně doba analýzy se pohybovala kolem 25 minut. Úpravou podmínek lze zkrátit celkový čas analýzy při zachování úplné separace všech komponent. Podmínky analýzy byly následující a separace je zachycena na následujícím chromatogramu – obrázek 7.

Chromatografický systém: HPLC Ultimate 300 RS, Dionex, USA

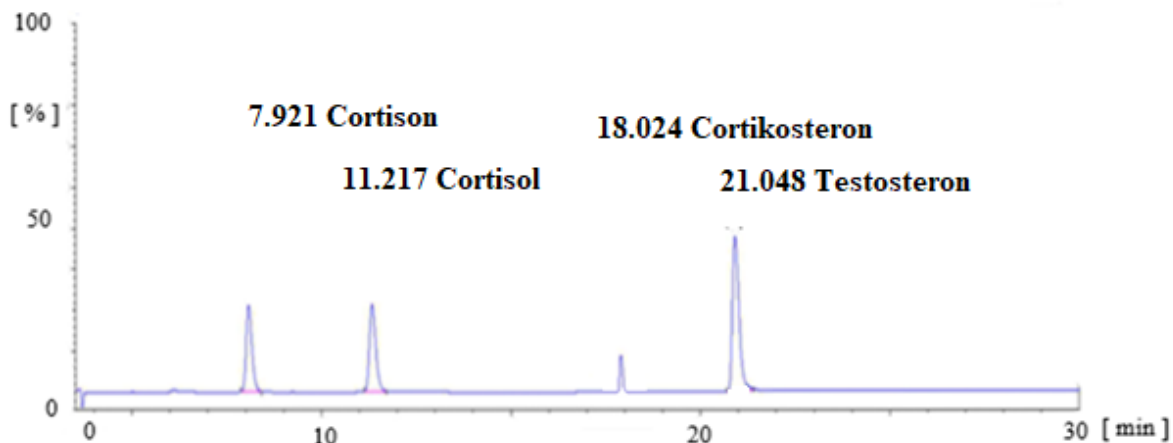
Hmotnostní spektrometr: 3200 QTRAP, AB-Sciex, Kanada

Chromatografická kolona:

Kolona: ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 μm)

Předkolona: ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm x 2,1 mm x 1,7 μm)

Na obrázku 7 je uveden chromatogram, který byl získán optimalizací analytické metody s cílem zajistit separaci jednotlivých komponent, které byly monitorovány:



Obrázek 7 Chromatogram separovaných komponent

<b>Analyt</b>	<b>Retenční čas</b>
<i>Cortison</i>	7.92 min.
<i>Cortisol</i>	11.22 min
<i>Cortikosteron</i>	18.03 min
<i>Testosteron</i>	21.05 min

**Chromatografická kolona a podmínky:**

Kolona:	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm)
Předkolona:	ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm x 2,1 mm x 1,7 µm)
Objem nástřiku:	2 µl
Slabý promývací roztok:	Deionizovaná voda/ methanol (90/10)
Silný promývací roztok:	Methanol
Mobilní fáze A:	0,1% kyselina octová v deionizované vodě
Mobilní fáze B:	0,1% kyselina octová v methanolu
Průtok mobilní fáze:	0,6 ml/min
Gradient mobilní fáze:	0 min (10 % B) – 4 min (100 % B) – 7 min (100 % B) – 7,1 min (10 % B) – 10 min (10 % B)

### 3.5 Vzorky

#### **Příprava vzorků pro HPLC/MS analýzu:**

##### Extrakční příprava vzorku

Vzorky byly jímány na buničinu – vytření tlamy – vážení před a po odběru. Pro extrakci se použije na buničinu nasáklý vzorek a je vložen do 10 ml falcon zkumavky a je přidáno 10 ml směsi methanol:voda (1:1). Vzorky byly ponechány ve tmě 30 min v ultrazvuku. Poté byl vzorek znovu sonikován po dobu 10 minut a centrifugován při 6000 g (centrifuga 5810R, Eppendorf AG, Německo). Supernatant byl odpařen do sucha a rozpuštěn ve 4 ml 100% methanolu, filtrován přes 0,22 mikronový PVDF injekční filtr. Takto připravený roztok je předložen k H/LC/MS analýze.

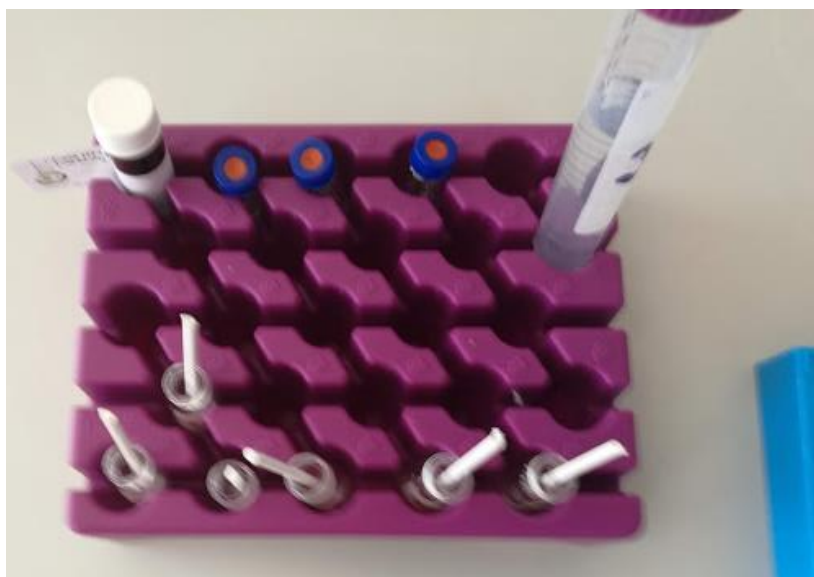




Obrázek 8 Extrakční příprava vzorků z odběrových tyčinek na sliny. 1 (vlastní fotografie)



Obrázek 9 Extrakční příprava vzorků z odběrových tyčinek na sliny. 2 (vlastní fotografie)



Obrázek 10 Extrakční příprava vzorků z odběrových tyčinek na sliny. 3 (vlastní fotografie)

## 4 Výsledky

Monitorování stresových hormonů ve slinách pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) je perspektivní technika používaná ve vědeckém výzkumu a klinické praxi. V rámci experimentální či primárně vyvinuta a validována metodika HPLC/MS, která poskytuje s vysokou přesností a správností hodnoty stresových hormonů ve slinách – viz. experimentální část. Proces se skládá z několika na sebe navazujících se kroků:

Prvním krokem je odběr vzorků, kdy jsou odebrány sliny z ústní dutina pomocí speciálních odběrových sond a vzorek je označen směsí deuterovaných standardů jednotlivých látek vždy na čtyřech místech standardů, kdy je vodík nahrazen deuteriem. Odběr slin je odběrem neinvazivním, který je pro zvíře méně stresující ve srovnání s odběrem krve, jako odběrem invazivním, který může ovlivnit hladinu hormonů a tím zkreslit „stresový monitoring“.

Druhým krokem je pak vlastní příprava analytických vzorků, kdy odebrané vzorky slin se zpracují extrakcí stresových hormonů macerací odběrových tyčinek, označením deuterovanými standardy všech monitorovaných látek, kdy jsou připraveny pro následnou analýzu metodou HPLC/MS. Pro tento účel lze alternativně použít různé metody, včetně extrakce pevnou fází nebo extrakce kapalina-kapalina.

Následným krokem je pak separace pomocí vyvinuté a validované metodiky HPLC/MS – viz experimentální část. Extrahované hormony ze supernatantu se separují pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). HPLC separuje molekuly na základě jejich afinity ke stacionární fázi (obvykle kolona naplněná specifickým materiálem) a jejich interakcí s mobilní fází (rozpuštědlo nebo směs rozpouštědel). Detekce je bezprostředně provedena hmotnostní spektrometrií: Když se separované hormony oddělují z HPLC kolony, jsou směřovány do hmotnostního spektrometru. Hmotnostní spektrometrie ionizuje molekuly a odděluje je na základě jejich poměru hmotnosti k náboji. To vytváří hmotnostní spektrum, které je v podstatě otiskem molekul přítomných ve vzorku. Dalším krokem je pak kvantifikace a kvalitativní analýza – konfirmace. Data generovaná hmotnostním spektrometrem jsou zpracována pro kvantifikaci hladin stresových hormonů přítomných ve vzorcích slin. To zahrnuje porovnání signálů získaných ze vzorku se signály získanými ze známých standardů.

Interpretace dat je pak následujícím krokem, kdy jsou hladiny stresových hormonů kvantifikovány, čímž lze data interpretovat a vyvodit závěry o stresové reakci subjektu. Faktory, jako je denní doba, podmínky prostředí a individuální rozdíly, mohou ovlivnit hladiny hormonů a je třeba je vzít v úvahu během analýzy. Celkově lze říci, že HPLC/MS monitorování stresových hormonů ve slinách poskytuje cenné poznatky o fyziologických reakcích na stres a může být použito v různých oblastech včetně psychologie, neurovědy, endokrinologie a experimentální veterinární medicíny.

Následující grafy jsou barevně odlišeny:

Modré vybarvení – grafy pro jednotlivé hormony samců.

Zelené vybarvení – grafy pro jednotlivé hormony samic.

Grafy bez vybarvení – porovnání stresových a klidových hodnot.

#### **4.1 Hladiny kortizolu ve slinách samců králíků**

Kortizol je steroidní hormon produkovaný nadledvinami v reakci na stres. Hraje klíčovou roli v reakci těla na stres, reguluje metabolismus, imunitní funkce a další fyziologické procesy. Hladiny kortizolu během dne kolísají ve vzoru známém jako cirkadiánní rytmus. Interpretace hladin kortizolu ve slinách závisí na kontextu studie. Zvýšené hladiny kortizolu mohou naznačovat akutní stres nebo chronický stres, pokud se udrží v průběhu času. Naopak nízké hladiny kortizolu mohou naznačovat nedostatečnost nadledvin nebo chronické vyčerpání ze stresu.

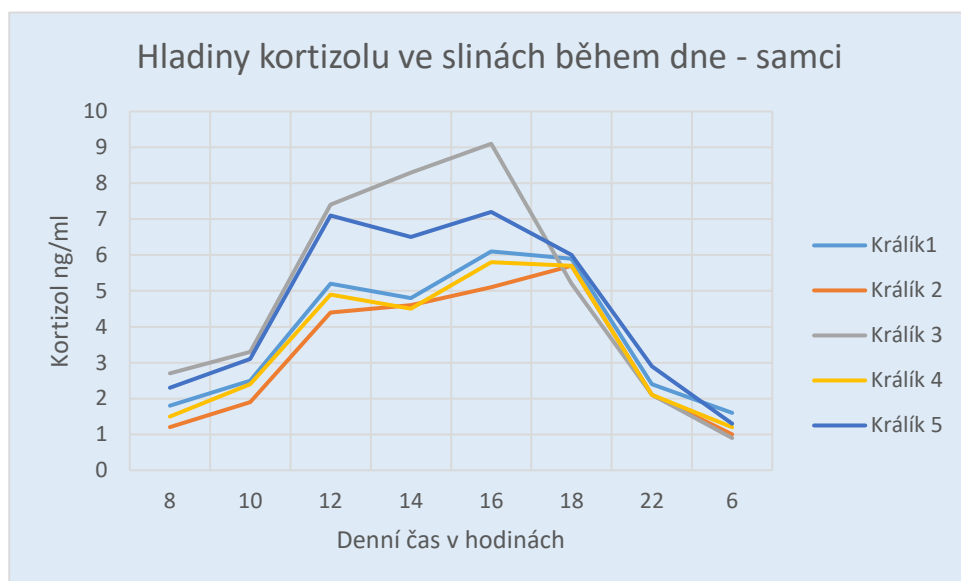
Měření kortizolu ve slinách má aplikace v různých oblastech, včetně endokrinologie a výzkumu stresu. Používá se k hodnocení úrovně stresu, hodnocení intervencí pro zvládnání stresu a zkoumání role dysregulace kortizolu v různých zdravotních stavech. Celkově lze říci, že odběr vzorků slin pro měření kortizolu poskytuje neinvazivní a pohodlnou metodu pro posouzení úrovně stresu a pochopení fyziologické reakce těla na stres.

Stanovení hladin koncentrace kortizolu ve slinách králičích samců může být zásadní pro pochopení jejich stresové reakce a celkového zdraví. V průběhu studie je nutné při provádění experimentů se zvířaty dodržovat etické pokyny, včetně minimalizace stresu a nepohodlí během odběru vzorků a zajištění dobrých životních podmínek zvířat v průběhu studie. Celkově může měření hladin kortizolu ve slinách králičích samců poskytnout cenné informace o jejich stresové reakci a pohodě, což přispívá jak k vědeckému porozumění, tak k veterinární péči.

Jakmile jsou změřeny hladiny kortizolu, měla by být provedena statistická analýza k určení jakýchkoli významných rozdílů mezi vzorky odebranými za různých podmínek nebo v různých časových bodech. Při analýze je třeba vzít v úvahu faktory, jako je věk, strava, podmínky ustájení a stresory. Interpretace výsledků by měla brát v úvahu konkrétní kontext studie. Například zvýšené hladiny kortizolu mohou naznačovat akutní stres, zatímco chronicky zvýšené hladiny mohou naznačovat chronický stres nebo základní zdravotní problémy. Je důležité vzít v úvahu přirozené změny hladin kortizolu v průběhu dne a v reakci na různé podněty. Porovnání hladin kortizolu u samců králíků s hladinami u samic nebo jiných druhů může poskytnout pohled na rozdíly mezi pohlavími nebo druhově specifické stresové reakce.

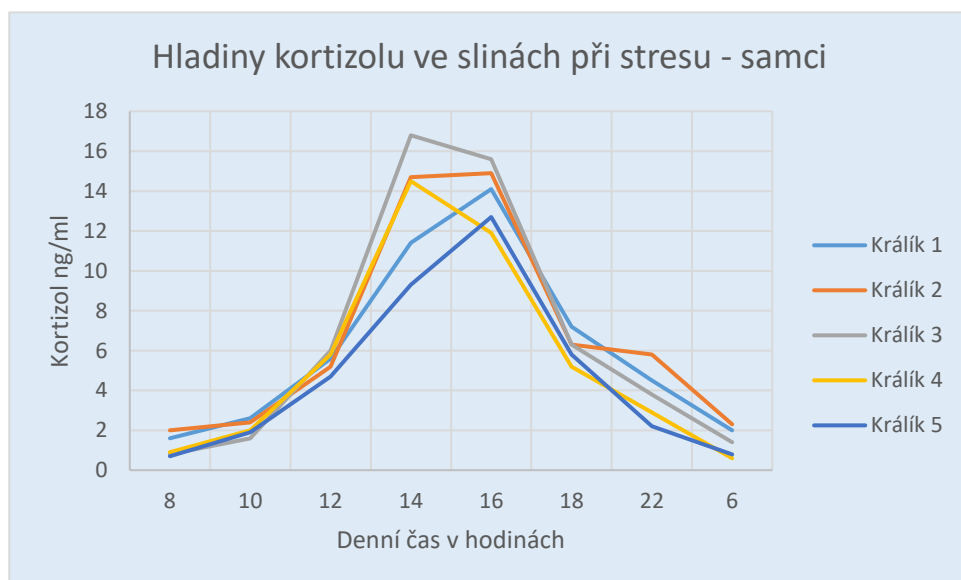
Primárně byla pozornost věnována vyhodnocení cirkadiálních biorytmů v úrovních hladin kortizolu ve slinách samců králíka. Byla vybrána skupina králičích samců shodného věku cca 6 měsíců a jim byly odebírány vzorky slin v časových intervalech dvou hodin, a to v denních časech 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 a 22 h. Vzorky byly zpracovány, vyhodnoceny metodou HPLC/MS a jejich hladiny vyneseny do grafu – Graf 1. Z časových závislostí je zřejmé, že ranní hodnoty

jsou nízké a následně stoupají až ke svému 3-5násobku, kdy maxima dosahují mezi 16.-18. hodinou odpolední.

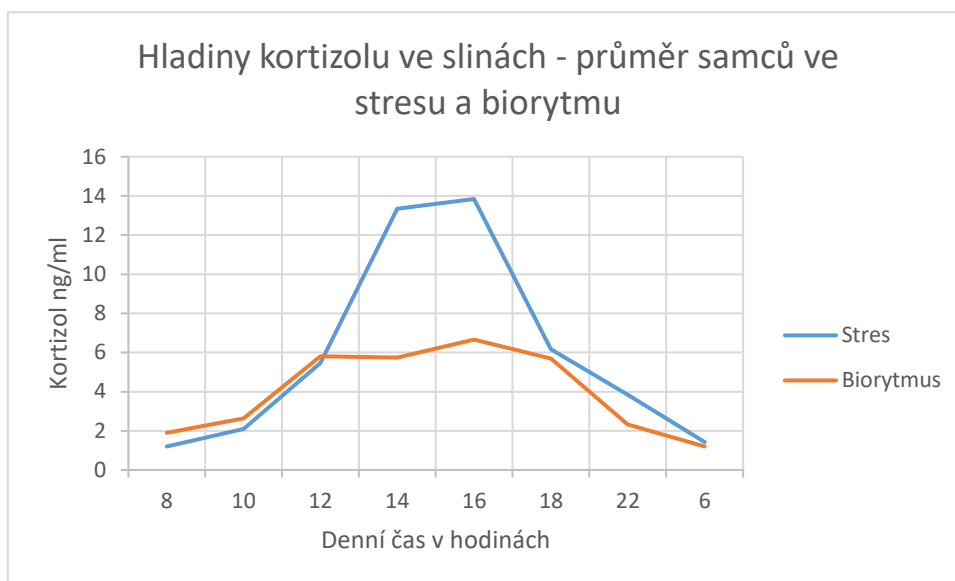


**Graf 1** Hladina naměřeného hormonu kortizolu ve slinách u samců králíků během dne (biorytmus)

Následně byly shodní experimentální jedinci podrobeni stresové situaci cca ve 12 h, kdy jim bylo provedeno modelové vyšetření zdravotního stavu – prohlídka – jako stresující impuls. Z grafu 2 je zřejmé, že hladiny kortizolu ve slinách dosahují v horizontu minut zvýšených hladin v porovnání s normálním cirkadiálním biorytmem.



**Graf 2** Hladina naměřeného hormonu kortizolu ve slinách u samců králíků při stresu



**Graf 3** Průměr hladin naměřeného hormonu kortizolu ve slinách u samců králíků pro stresové hodnoty a biorytmus

Porovnání obou situací je zachyceno na grafu 3, kde jsou zachyceny průměrné hodnoty stresovaných a nestresovaných králíků při respektování cirkadiálních biorytmů. Z nich je zřejmé, že zvýšení koncentračních hladin kortizolu nastává v horizontu jednotek minut a následuje pokles, přičemž zvýšené hladiny ve slinách zůstávají zvýšené po dobu několika hodin a následuje jejich návrat na fyziologické koncentrace.

Nejvyšší hodnoty po stresové situaci vrostly o 106 % oproti klidovým hodnotám v cirkadiálním rytmu, tento rozdíl nastal okolo 16. hodiny, kdy nastává též vrchol hladin kortizolu podle cirkadiálního rytmu, takže stresové hodnoty mohli být mírně ovlivněny biorytmem.

#### 4.2 Hladiny kortikosteronu ve slinách samců králíků

Kortikosteron hraje klíčovou roli v systému reakce těla na stres, pomáhá regulovat různé fyziologické procesy, aby se vyrovnalo se stresory. Kortikosteron se uvolňuje v reakci na stresory, ať už fyzické, psychické nebo environmentální. Pomáhá tělu adaptovat se na stres mobilizací energetických rezerv, potlačením nepodstatných funkcí (jako je trávení a reprodukční funkce) a posílením kognitivních funkcí a bdělosti. Zatímco kortikosteron je nezbytný pro zvládnutí akutního stresu, chronické vystavení zvýšeným hladinám kortikosteronu (nebo chronickému stresu) může mít škodlivé účinky na zdraví.

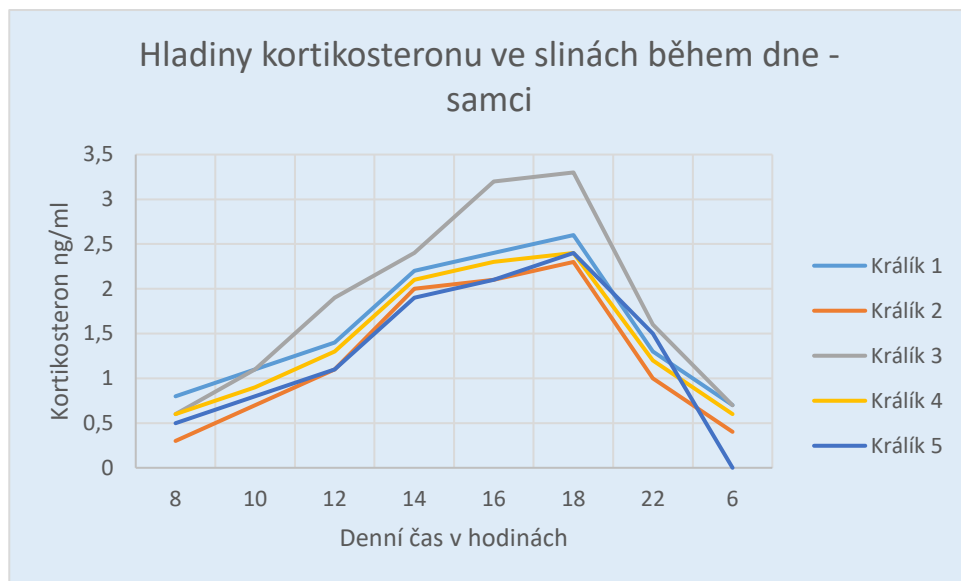
Odběr vzorků slin je neinvazivní a relativně bez stresová metoda ve srovnání s odběrem krve, takže je vhodná pro studium stresových reakcí u lidí i zvířat. Tato metoda je zvláště výhodná ve výzkumu zahrnujícím kojence, děti a zvířata, kde odběr krve může být nepraktický nebo eticky náročný.

Odras aktivity osy HPA: Hladiny kortikosteronu ve slinách jsou považovány za spolehlivý indikátor aktivity osy HPA. Když tělo zažívá stres, kortikosteron se uvolňuje do krevního řečiště

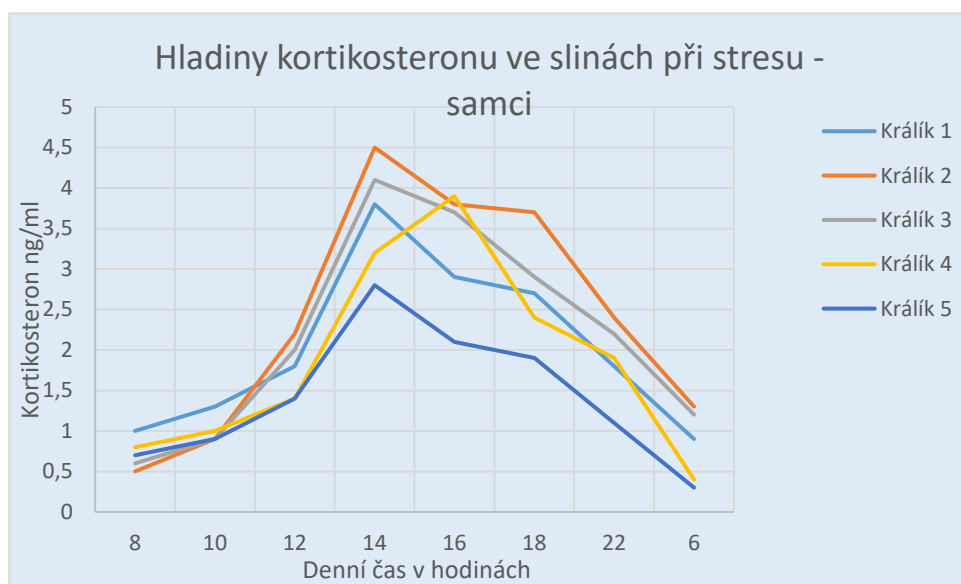
a jeho část difunduje do slin. Změny hladin kortikosteronu ve slinách proto mohou odrážet změny ve stresové reakci těla.

Hladiny kortikosteronu ve slinách byly použity v různých výzkumných kontextech ke zkoumání fyziologických a behaviorálních reakcí na akutní a chronické stresory.

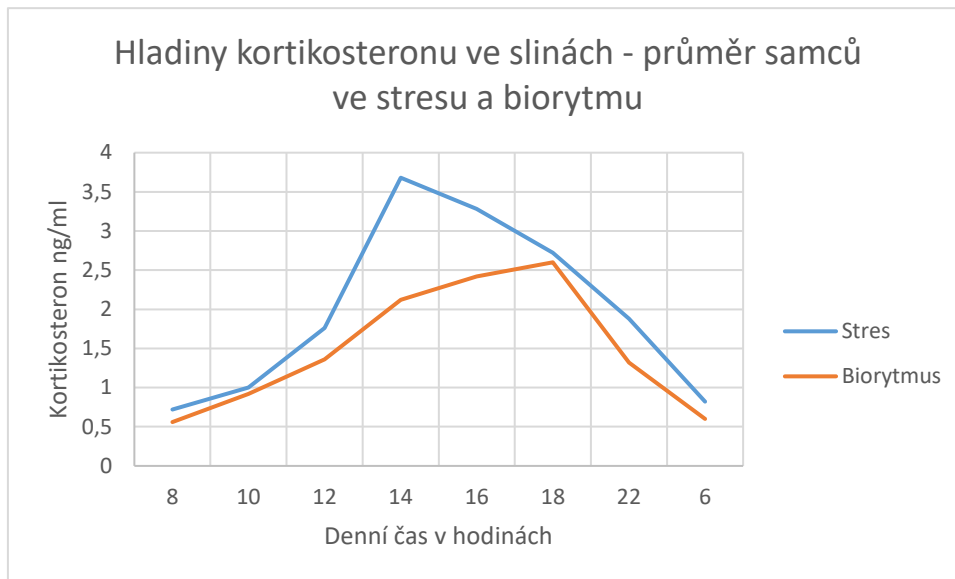
Shodně jako v případě kortizolu bylo provedeno stanovení kortikosteronu, tj. jeho cirkadiální rytmus, reakce na stres a porovnání mezi oběma hladinami. Z výsledků prezentovaných v grafech 4-6 je zřejmé, že kortikosteron funguje shodně jako kortizol tedy jako stresový biomarker. Existuje jeho cirkadiální biorytmus, který je při monitorování stresu nutno respektovat. Změny v koncentračních hladinách u kortikosteronu nejsou tak významné jako u kortizolu.



Graf 4 Hladina naměřeného hormonu kortikosteronu ve slinách u samců králíků během dne (biorytmus)



Graf 5 Hladina naměřeného hormonu kortikosteronu ve slinách u samců králíků při stresu



**Graf 6** Průměr hladin naměřeného hormonu kortikosteronu ve slinách u samců králíků pro stresové hodnoty a biorytmus

Graf 5 ukazuje zvýšení hodnot hladiny kortikosteronu po působení stresoru – manipulace, která proběhla ve 12 hodin. V grafu 4 jsou zaznamenány hodnoty kortikosteronu způsobené biorytmem. Z grafu 6 je zřejmé, že hladiny hormonu po stresovém zážitku se vrátí na úroveň, kdy je králík v klidu po šesti hodinách, na rozdíl od údajů při měření kortizolu, začne kortikosteron klesat přibližně po dvou hodinách.

Nejvyšší hodnoty po stresové situaci vrostly o 74 % oproti klidovým hodnotám v cirkadiálním rytmu, tento rozdíl nastal okolo 14. hodiny. V tuto hodinu, jíž začínají běžně stoupat hladiny kortikosteronu ovlivněné cirkadiálními rytmy, ale vrchol nastává až o několik hodin později.

### 4.3 Hladiny kortizonu ve slinách samců králíků

Kortizon, glukokortikoidní hormon, se úzce podílí na reakci těla na stres. Zatímco velká část výzkumu stresu a glukokortikoidů se zaměřuje na kortizol (aktivní formu kortizonu u lidí), kortizon samotný hraje roli ve fyziologii stresu, zejména v pochopení dynamiky osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA), která reguluje stresové reakce těla.

Kortizon, stejně jako kortizol, se uvolňuje v reakci na stresory jako součást adaptivní reakce těla na vyrovnání se se stresem. Pomáhá mobilizovat energetické rezervy, potlačovat záněty a modulovat imunitní funkce, aby podpořila reakci těla na stres.

Kortizon, přeměněný z kortizolu v periferních tkáních, může působit jako zpětnovazební signál pro regulaci aktivity osy HPA. Zvýšené hladiny kortizonu mohou inhibovat uvolňování hormonu uvolňujícího kortikotropin (CRH) a adrenokortikotropního hormonu (ACTH), což nakonec vede ke snížení sekrece kortizolu.

Glukokortikoidy jako kortizon hrají klíčovou roli v metabolické regulaci během stresu. Podporují glukoneogenezi (produkci glukózy z nesacharidových zdrojů), zvyšují hladinu

krvního cukru a modulují metabolismus lipidů, aby poskytovaly tělu dodatečné energetické zdroje během stresových situací.

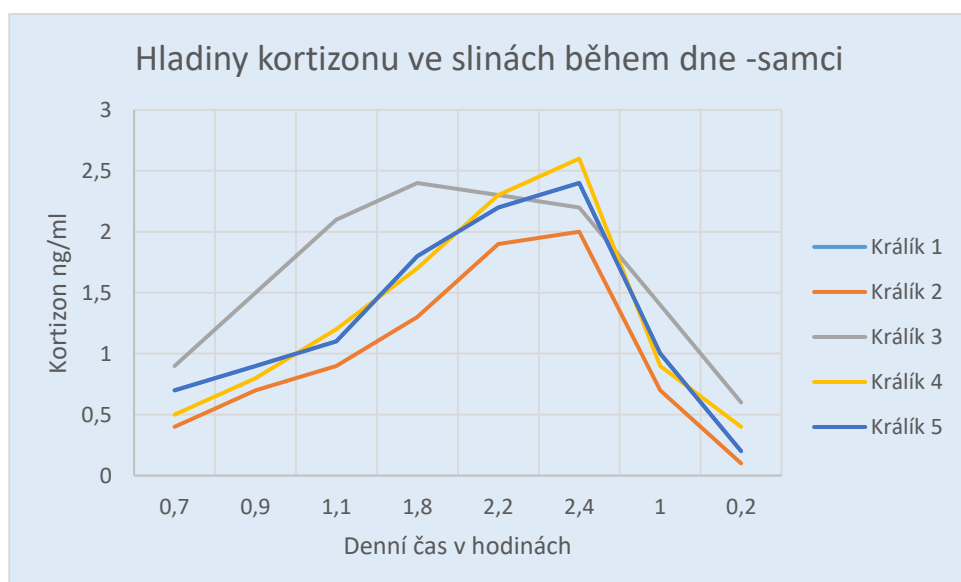
Kortizon spolu s kortizolem vykazuje silné imunomodulační účinky, včetně potlačení zánětlivých reakcí a modulace aktivity imunitních buněk. Tyto účinky pomáhají tlumit imunitní reakci během stresu, aby se zabránilo nadměrnému zánětu a poškození tkání.

Chronický stres může vést k dysregulaci osy HPA a změně signalizace glukokortikoidů, která se podílí na různých poruchách souvisejících se stresem, včetně deprese, úzkosti a posttraumatické stresové poruchy (PTSD). Dysregulované hladiny kortizonu mohou přispívat k patofyziologii těchto stavů.

Měření kortizonu spolu s kortizolem ve slinách, krvi nebo moči slouží jako důležité biomarkery ve výzkumu stresu. Umožňují posoudit individuální rozdíly v reaktivitě stresu, zkoumat dopad chronického stresu na zdravotní výsledky a hodnotit účinnost intervencí při zvládnání stresu.

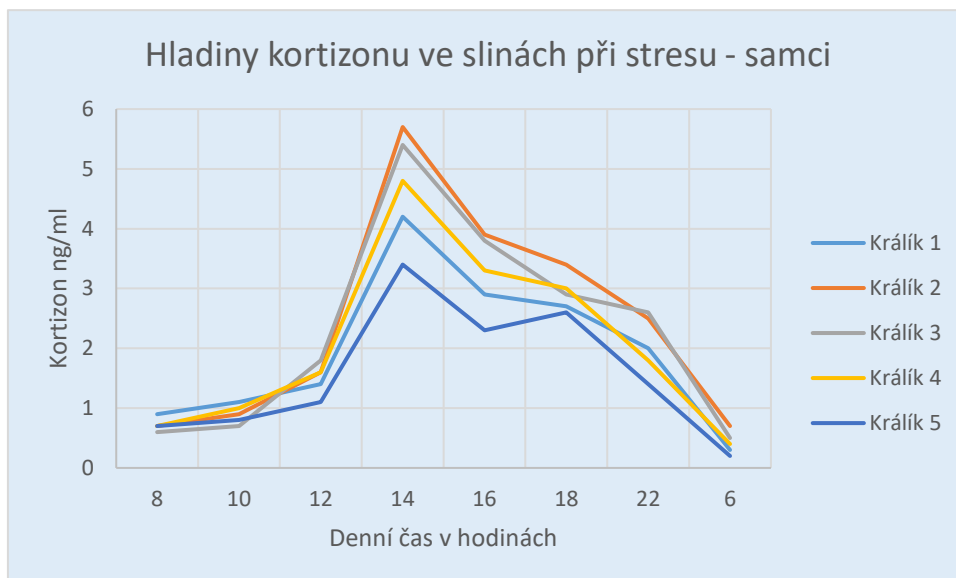
Celkově lze říci, že zatímco kortizol je často středem pozornosti ve výzkumu stresu, kortizon také hraje významnou roli v systému reakce těla na stres. Pochopení dynamiky kortizonu spolu s kortizolem poskytuje cenné poznatky o fyziologických mechanismech, které jsou základem stresu a jeho dopadu na zdraví a pohodu.

Shodně jako v případě kortizolu a kortikosteronu bylo provedeno stanovení kortizonu, tj. jeho cirkadiální rytmus, reakce na stres a porovnání mezi oběma hladinami. Z výsledků prezentovaných v grafech 7-9 je zřejmé, že kortizon funguje shodně jako kortizol jako stresový biomarker. Existuje jeho cirkadiální biorytmus, který je nutno při monitorování stresu respektovat. Změny v koncentračních hladinách u kortizonu nejsou tak významné jako u kortizolu.

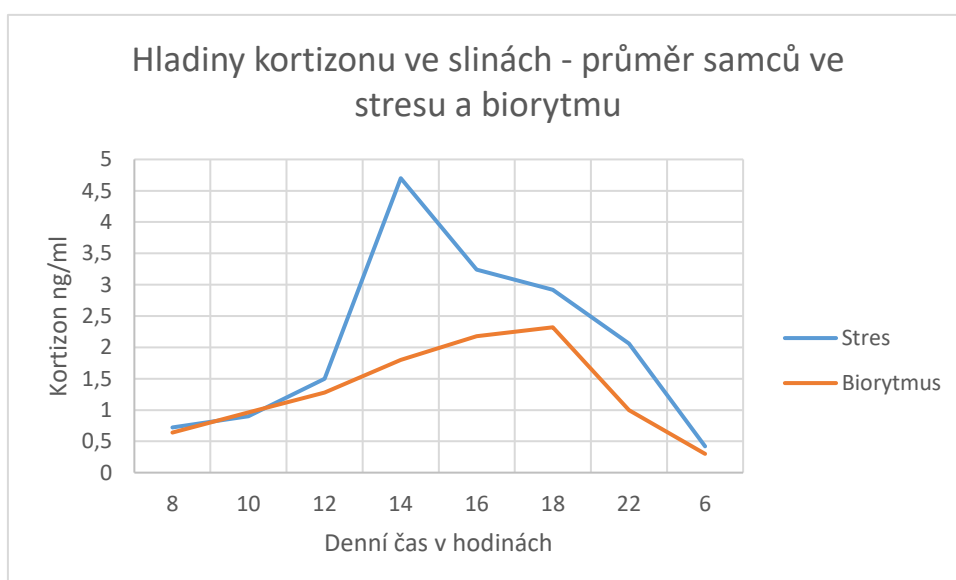


**Graf 7** Hladina naměřeného hormonu kortizonu ve slinách u samců králíků během dne (biorytmus)





**Graf 8** Hladina naměřeného hormonu kortizonu ve slinách u samců králíků při stresu



**Graf 9** Průměr hladin naměřeného hormonu kortizonu ve slinách u samců králíků pro stresové hodnoty a biorytmus

Graf 8 ukazuje hodnoty kortizonu v králíčích slinách před a po působení stresoru – manipulace s králíkem, která byla provedena ve 12 hodiny, což je vidět i v grafu, kde hodnoty značně stoupají s maximální hodnotou ve 14 hodin. Na grafu 7 je možné vidět naměřené hodnoty kortizonu během dne bez působení stresoru. Jak ukazuje graf 9, největší rozdíl mezi stresovými hodnotami hormonu a biorytmem nastal ve 14 hodin, hodnoty se začaly vyrovnávat po 18. hodině, avšak hladiny kortizonu po vystavení stresu byly stále vyšší než průměrná hodnota denního cyklu.

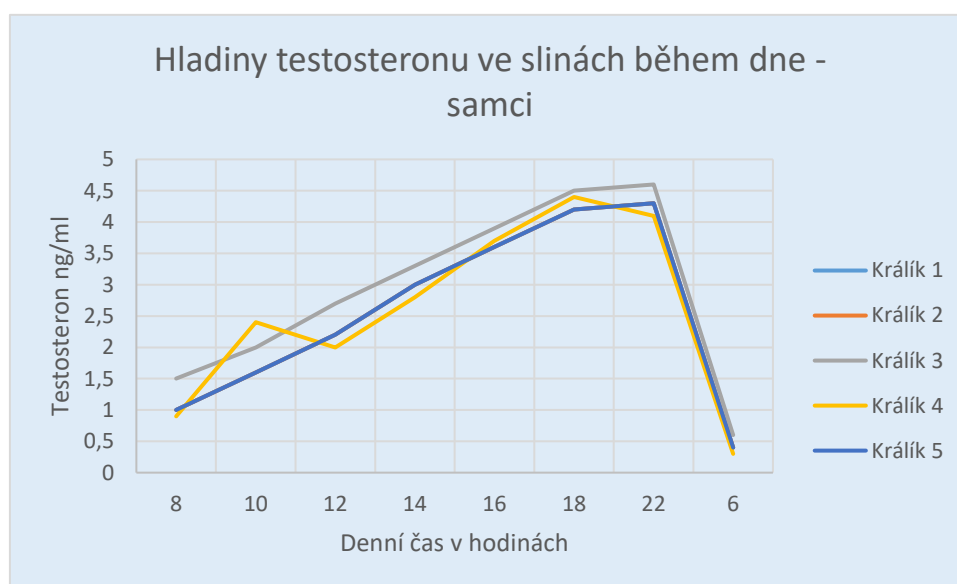
Nejvyšší hodnoty po stresové situaci vrostly o 161 % oproti klidovým hodnotám v cirkadiánním rytmu, tento rozdíl nastal okolo 14. hodiny.

#### 4.4 Hladiny testosteronu ve slinách samců králíků

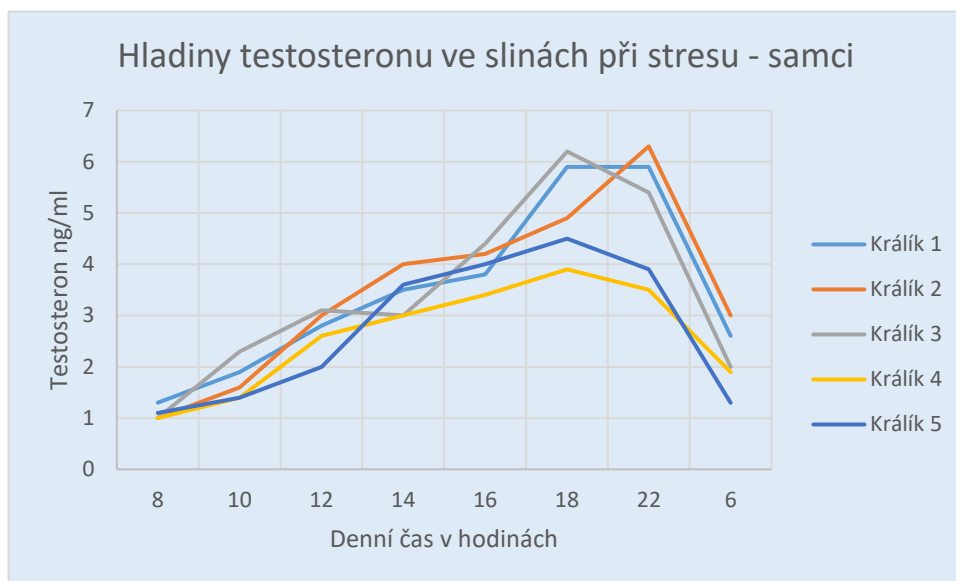
Měření hladiny testosteronu ve slinách je předmětem vědeckého výzkumu již několik desetiletí. Zatímco krevní testy zůstávají zlatým standardem pro hodnocení hormonálních hladin, měření testosteronu ve slinách si získalo pozornost díky jeho neinvazivní povaze a potenciálnímu využití v různých výzkumných a klinických aplikacích. Přestože je koncentrace testosteronu ve slinách nižší než v krvi, odráží volnou, biologicky dostupnou frakci hormonu, která je fyziologicky relevantní.

Měření testosteronu ve slinách je cenný nástroj pro zkoumání vztahů mezi hormony a chováním, sledování hormonálních změn.

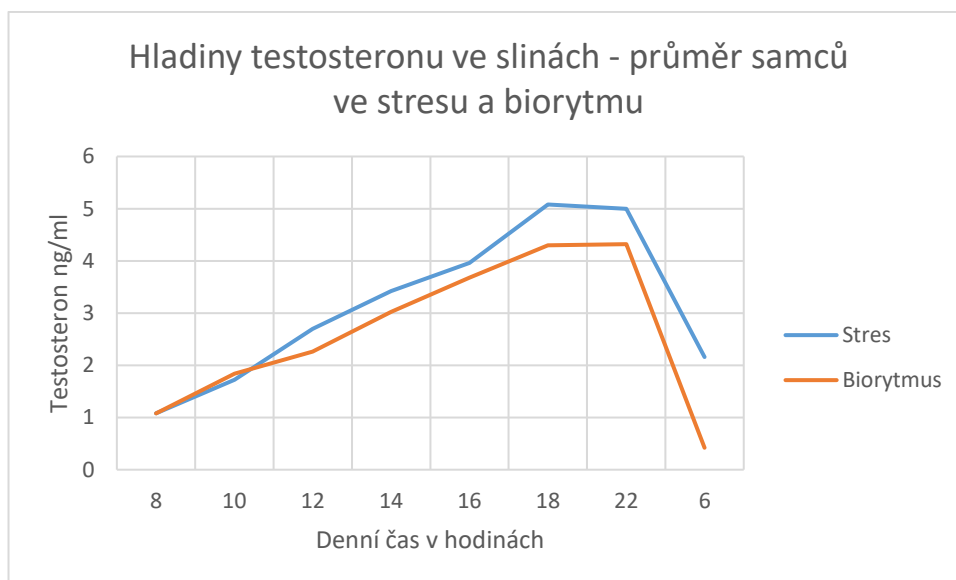
Shodně jako v případě kortizolu, kortizonu a kortikosteronu bylo provedeno stanovení testosteronu, tj. jeho cirkadiální rytmus, reakce na stres a porovnání mezi oběma hladinami. Z výsledků prezentovaných v grafech 10-12 je zřejmé, že testosteron není stresový biomarker. Existuje jeho cirkadiální biorytmus, který je nutno při monitorování jeho hladin respektovat. Změny v koncentračních hladinách u testosteronu jsou významné z hlediska cirkadiálních biorytmů, nicméně byl prokázán nulový efekt při monitorování stresu.



**Graf 10** Hladina naměřeného hormonu testosteronu ve slinách u samců králíků během dne (biorytmus)



**Graf 11** Hladina naměřeného hormonu testosteronu ve slinách u samců králíků při stresu



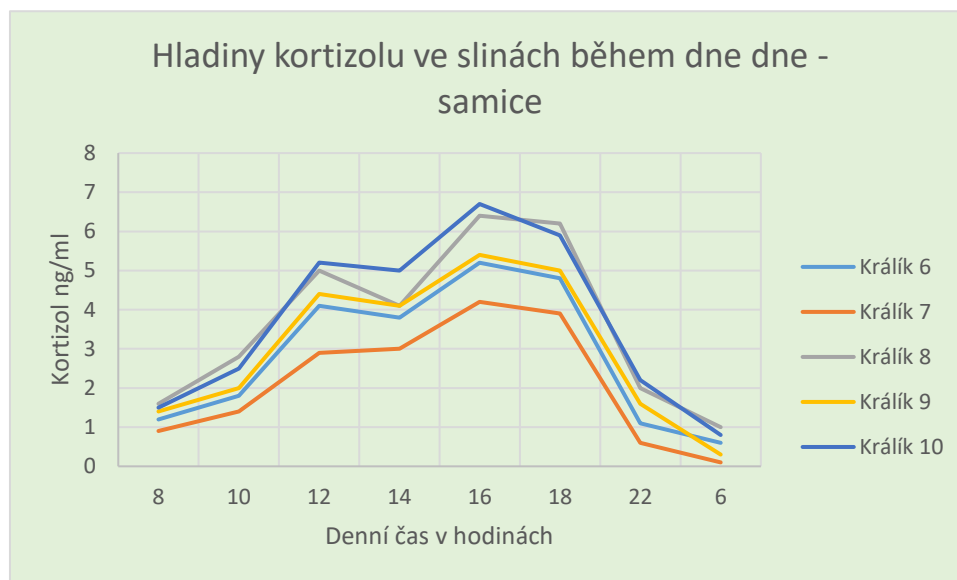
**Graf 12** Průměr hladin naměřeného hormonu testosteronu ve slinách u samců králíků pro stresové hodnoty a biorytmus

Hladiny testosteronu ve slinách samců králíků je možné vidět v grafu 10. Na rozdíl od třech výše zmíněných hormonů u testosteronu nebyl tak náhlý vzestup hladiny hormonu po působení stresoru. Graf 11 ukazuje hladinu hormonu u králíků během dne bez stresu. V grafu 12 je znázorněn rozdíl mezi průměrem grafu 10 a 11. Je zde překvapivě vidět, jak již bylo zmíněno, že hodnoty po stresové situaci nevzrostly tak moc jako u předešlých hormonů. Křivky se téměř kopírují a stresové hodnoty jsou jen lehce zvýšené.

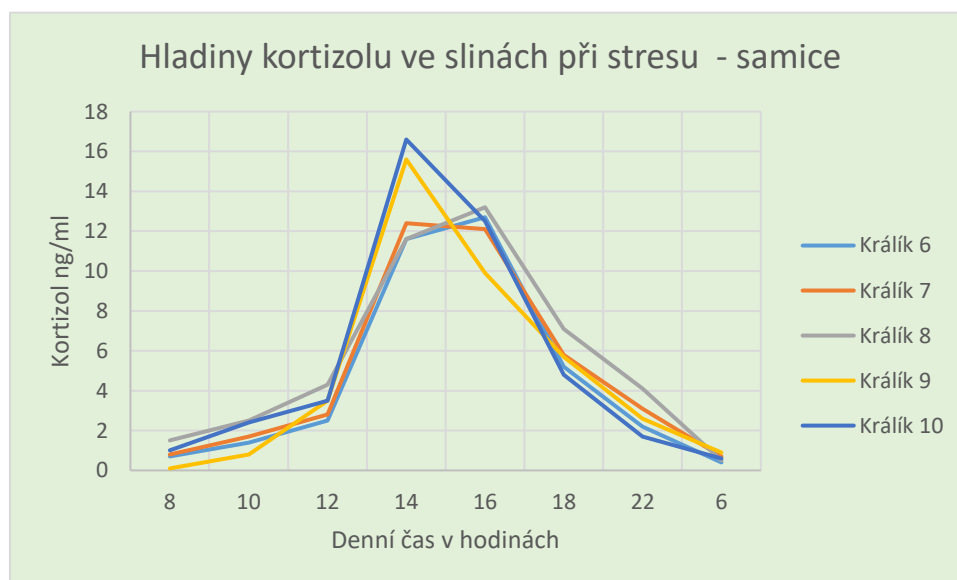
Nejvyšší hodnoty po stresové situaci vrostly pouze o 18 % oproti klidovým hodnotám v cirkadiánním rytmu, tento rozdíl nastal okolo 18. hodiny. V tuto hodinu, již začínají běžně stoupat hladiny tohoto hormonu ovlivněné cirkadiánními rytmy, úroveň stresových hodnot tak velmi koreluje s hladinou testosteronu v cirkadiánním rytmu bez stresu.

## 4.5 Hladiny kortizolu ve slinách samic králíků

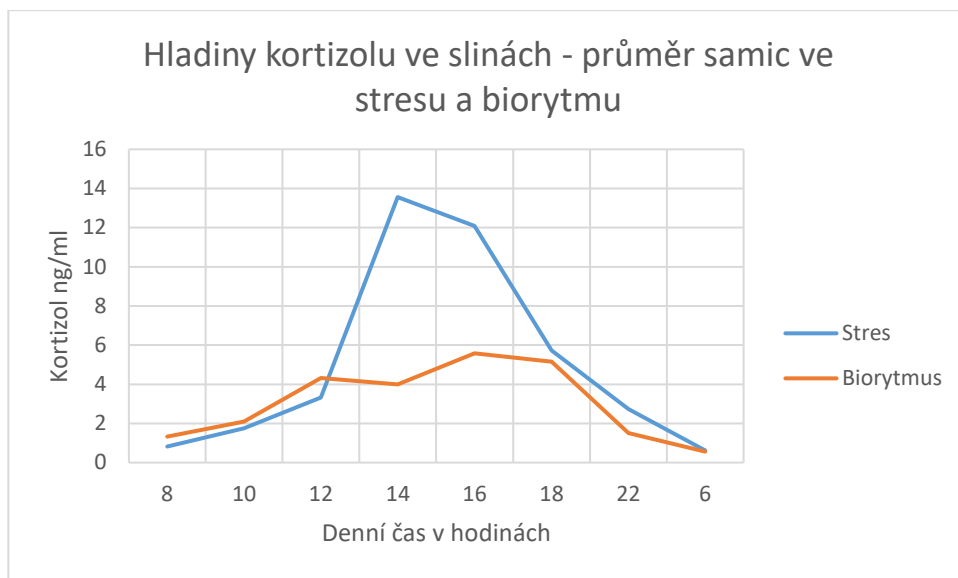
Identické experimenty byl realizovány u stejného počtu samic králíka, jejichž věk byl téměř shodný se samci, ve snaze posoudit vliv pohlaví na úroveň stresového hormonu kortizolu ve slinách, a to jak v experimentu pro posouzení cirkadiálního biorytmu, tak stresového experimentu simulujícího vyšetření veterinářem.



**Graf 13** Hladina naměřeného hormonu kortizolu ve slinách u samic králíků během dne (biorytmus)



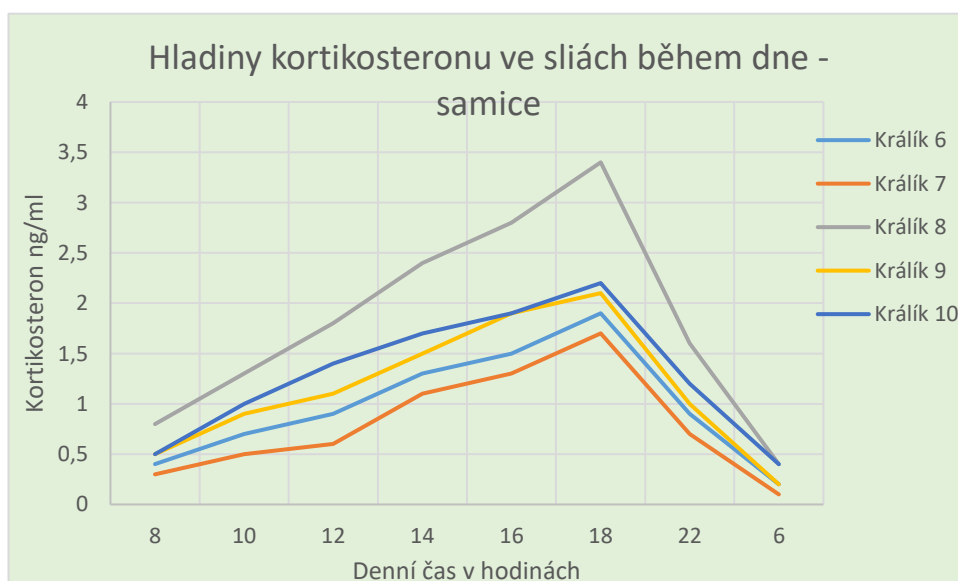
**Graf 14** Hladina naměřeného hormonu kortizolu ve slinách u samic králíků při stresu



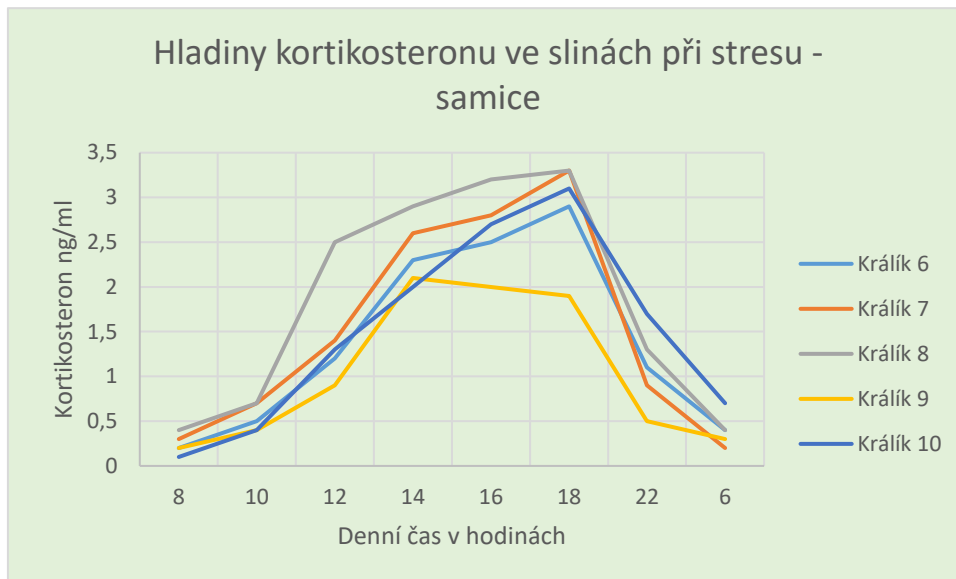
**Graf 15** Průměr hladin naměřeného hormonu kortizolu ve slinách u samic králíků pro stresové hodnoty a biorytmus

Graf 13 zachycuje hodnoty kortizolu ve slinách samic králíků, kde byl způsoben stres manipulací ve 12 hodin. Na grafu 14 jsou vidět hladiny hormonu kortizolu během cirkadiánního rytmu, kde neprobíhal žádný zásadní stres. Na grafu 15 je nepochybné, v kolik hodin stresor zapůsobil. Nejvyšší rozdílná hodnota je 10 ng/ml – tedy 239 % ve 14 hodin, což může být způsobené i tím, že kortizol v tuto denní dobu běžně lehce klesá a stres začal působit ve 12 hodiny, tedy ve 14 hodin dosáhly hladiny kortizolu maxima. Stresové hodnoty se vyrovnávají po 6 hodinách od působení stresoru.

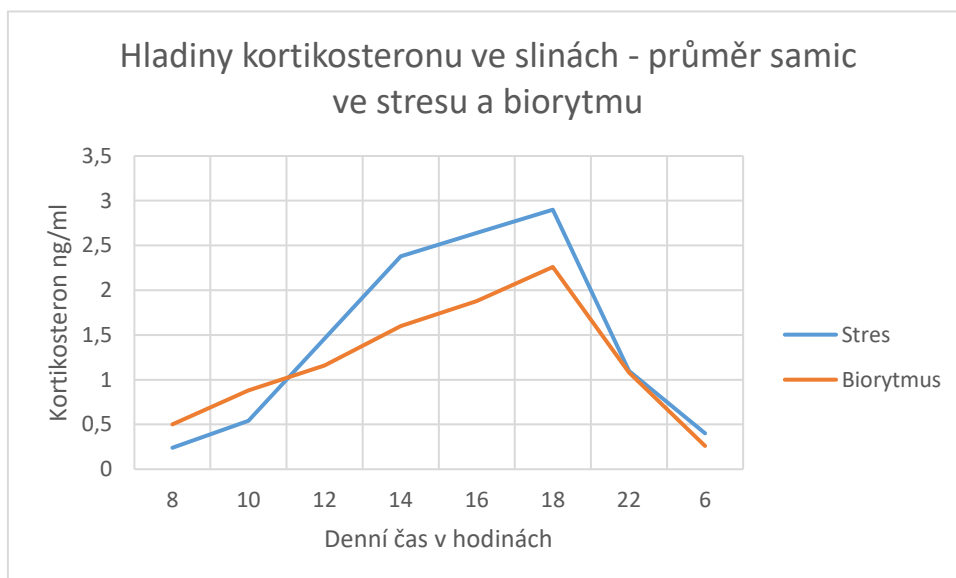
#### 4.6 Hladiny kortikosteronu ve slinách samic králíků



**Graf 16** Hladina naměřeného hormonu kortikosteronu ve slinách u samic králíků během dne (biorytmus)



**Graf 17** Hladina naměřeného hormonu kortikosteronu ve slinách u samic králíků při stresu

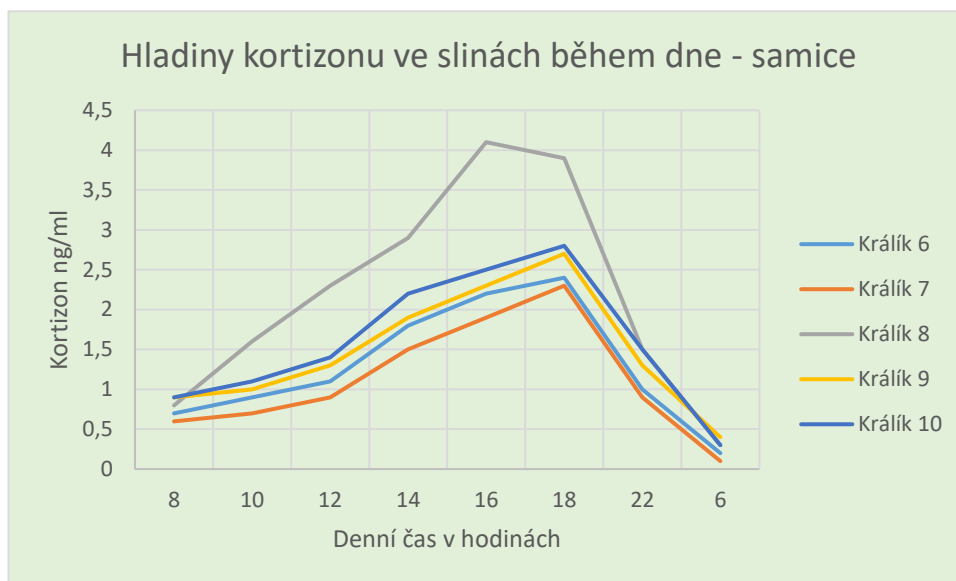


**Graf 18** Průměr hladin naměřeného hormonu kortikosteronu ve slinách u samic králíků pro stresové hodnoty a biorytmus

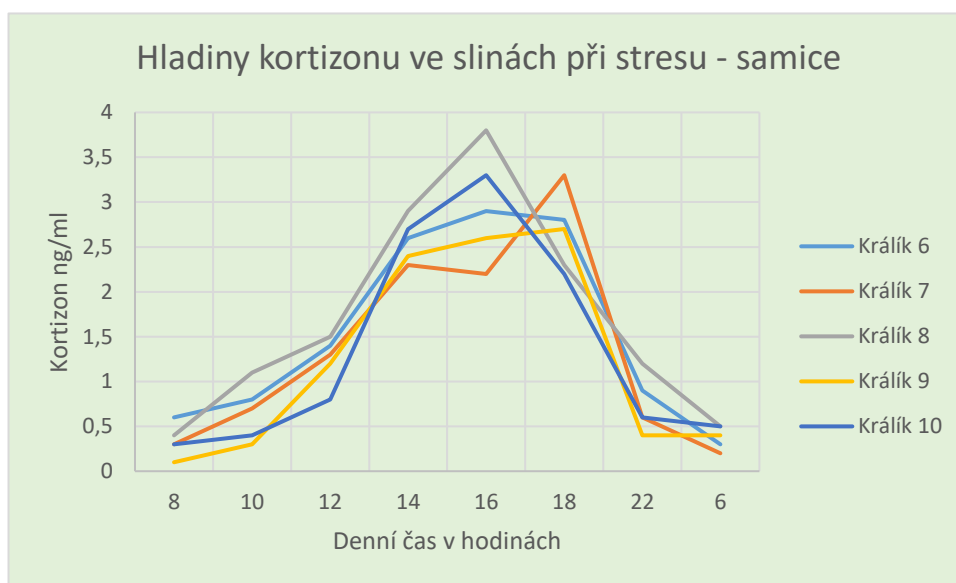
Graf 16 ukazuje hladiny hormonu kortikosteronu během dne, ve 12 hodin bylo s králíky manipulováno, což pro ně byl značný stresor. Graf 17 zobrazuje data biorytmu samic. Na grafu 18 je možné vidět srovnání zprůměrovaných hodnot mezi stresovými hodnotami a běžným dnem. U kortikosteronu, i přes to, že je značný rozdíl v hladinách, není zde takový rozdíl jako u hormonu kortizolu

Nejvyšší hodnoty kortikosteronu po stresové situaci vrostly o 28 % oproti klidovým hodnotám v cirkadiánním rytmu, tento rozdíl nastal okolo 18. hodiny, kdy nastává i vrchol v hodnotách cirkadiánního rytmu. Úroveň stresových hodnot tak byla pravděpodobně ovlivněna biorytmem, ale jasné zvýšení po působení stresoru je zde vidět. Stresové hodnoty se vyrovnaly přibližně po 7 hodinách od působení stresoru.

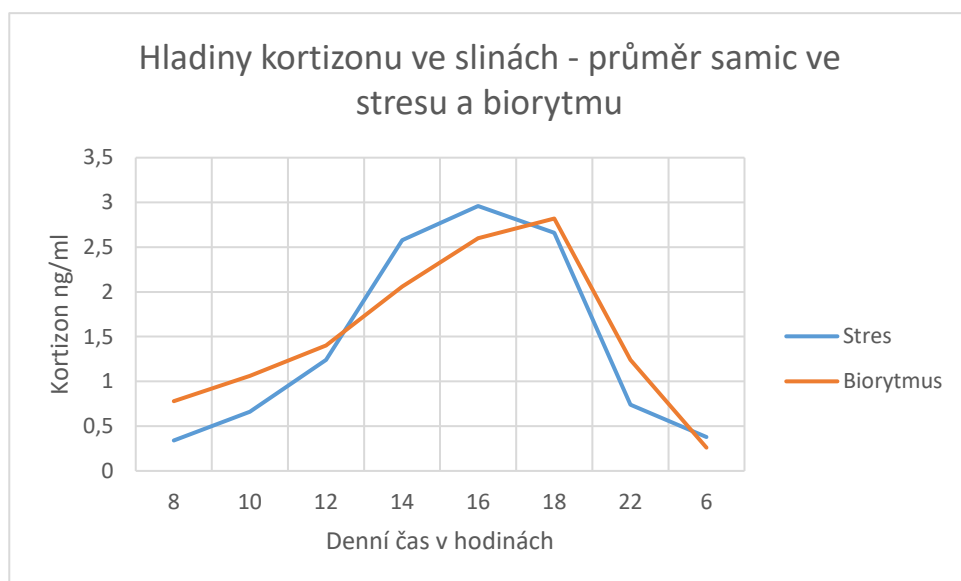
## 4.7 Hladiny kortizonu ve slinách samic králíků



Graf 19 Hladina naměřeného hormonu kortizonu ve slinách u samic králíků během dne (biorytmus)



Graf 20 Hladina naměřeného hormonu kortizonu ve slinách u samic králíků při stresu

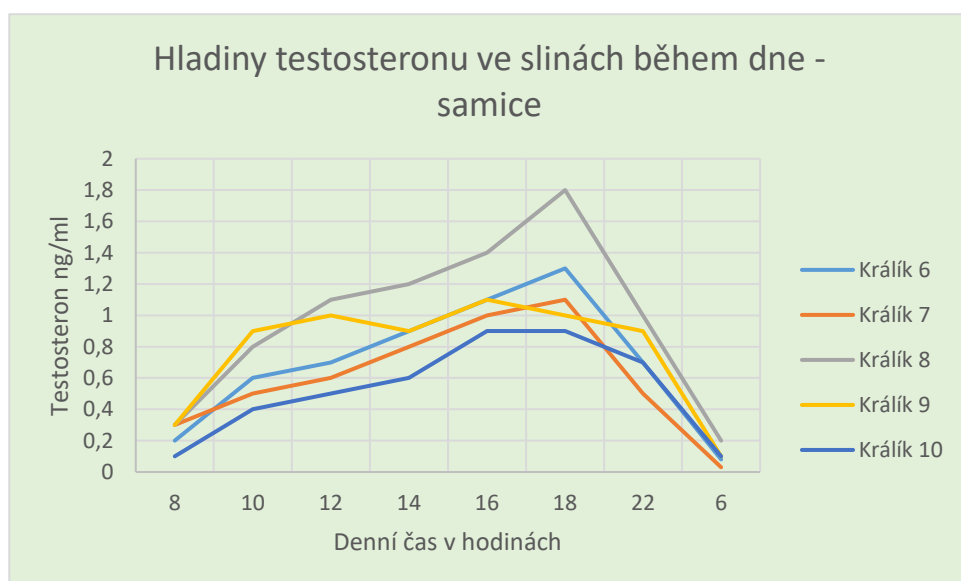


**Graf 21** Průměr hladin naměřeného hormonu kortizonu ve slinách u samic králíků pro stresové hodnoty a biorytmus

Na grafu 19 je možné vidět, jak stresor způsobený ve 12 hodin zapůsobil na hladiny kortizonu, nejvyšších hodnot dosahoval kortizon 4 hodiny po manipulaci s králíkem. Graf 20 znázorňuje hladiny kortizonu v průběhu dne. V grafu 21 je vidět porovnání stresových hodnot a hodnot způsobených cirkadiálním rytmem. Překvapivě po zprůměrování hodnot se křivky příliš neliší, po 12. hodině, kdy proběhl stres se hodnoty zvedly dramatičtěji, než tomu je běžně, ale rozdíl nebyl ani 1 ng/ml, šlo pouze o 13% nárůst.

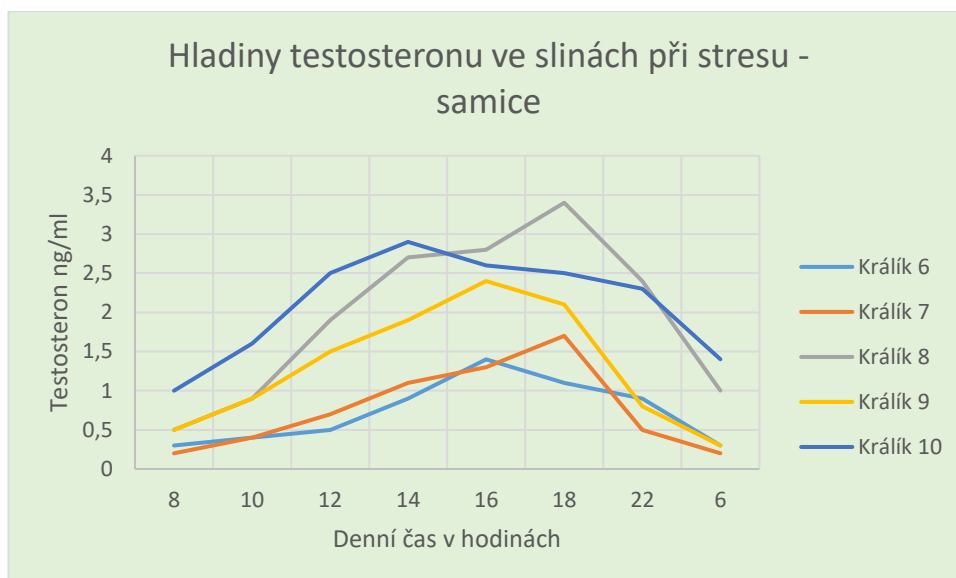
Nejvyšší hodnoty kortizonu po působení stresoru vrostly jen o 14 % oproti klidovým hodnotám v cirkadiálním rytmu, tento rozdíl nastal okolo 16. hodiny, v tu dobu již zřetelně vzrůstají hodnoty hormonu ovlivněné cirkadiálním rytmem, které dosahují maxima okolo 18. hodiny. Stresové hodnoty se vyrovnávají přibližně po šesti hodinách.

#### 4.8 Hladiny testosteronu ve slinách samic králíků

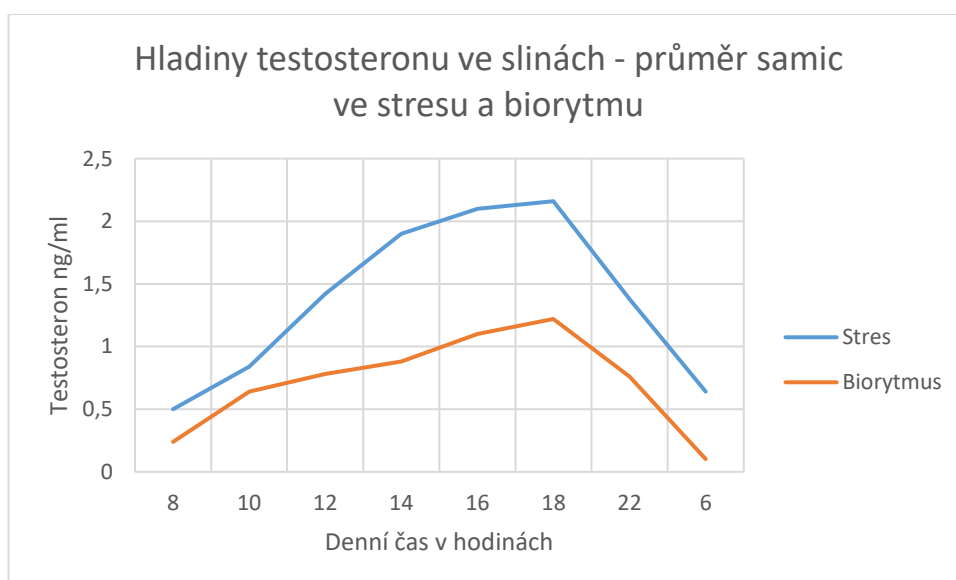


**Graf 22** Hladina naměřeného hormonu testosteronu ve slinách u samic králíků během dne (biorytmus)





**Graf 23** Hladina naměřeného hormonu testosteronu ve slinách u samic králíků při stresu

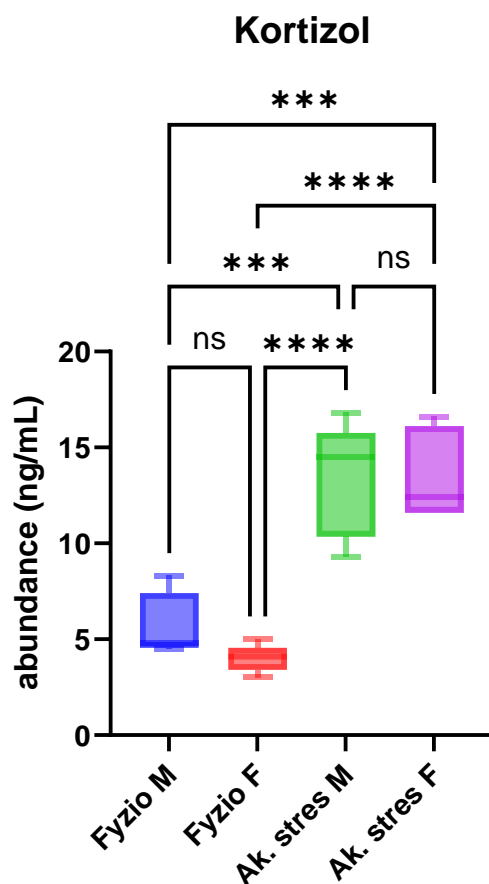


**Graf 24** Průměr hladin naměřeného hormonu testosteronu ve slinách u samic králíků pro stresové hodnoty a biorytmus

Graf 22 ukazuje hodnoty ovlivněné stresem způsobeným ve 12 hodin. Je možné vidět, že hodnoty testosteronu jsou u samic velmi variabilní. Během cirkadiánního rytmu se nejvyšší hodnoty testosteronu objevují okolo 18. hodiny viz graf 23. Na grafu 24 jsou zaznamenány zprůměrované hodnoty grafu 22 a 23, grafy se liší spíše jen zvýšenými hodnotami, ale jinak se tvarem v podstatě kopírují.

Nejvyšší hodnoty testosteronu po stresoru vzrostly o 77 % oproti klidovým hodnotám v cirkadiánním rytmu, tento rozdíl nastal okolo 18. hodiny, v tento čas vzrůstají i hodnoty hormonu ovlivněné cirkadiánním rytmem, které dosahují maxima okolo 18. hodiny. Stresové hodnoty se vyrovnávají přibližně po sedmi hodinách.

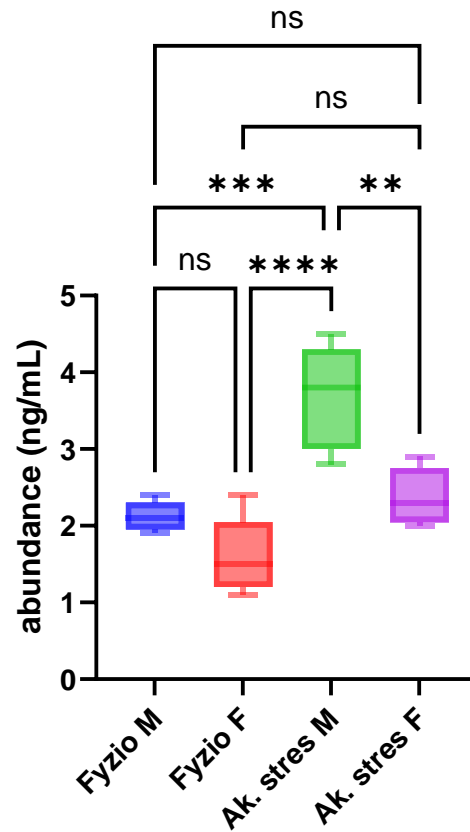
## 4.9 Statistické vyhodnocení experimentální stresové studie



Tukey's multiple comparisons test

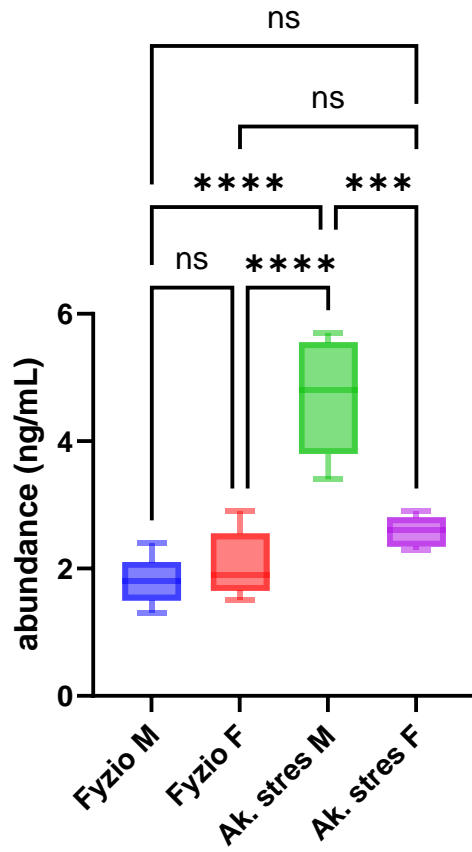
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Adjusted P Value	
Fyzio M vs. Fyzio F	1.740	-2.061 to 5.541	0.5702	A-B
Fyzio M vs. Ak. stres M	-7.600	-11.40 to -3.799	0.0002	A-C
Fyzio M vs. Ak. stres F	-7.820	-11.62 to -4.019	0.0001	A-D
Fyzio F vs. Ak. stres M	-9.340	-13.14 to -5.539	<0.0001	B-C
Fyzio F vs. Ak. stres F	-9.560	-13.36 to -5.759	<0.0001	B-D
Ak. stres M vs. Ak. stres F	-0.2200	-4.021 to 3.581	0.9983	C-D

## Kortikosterone

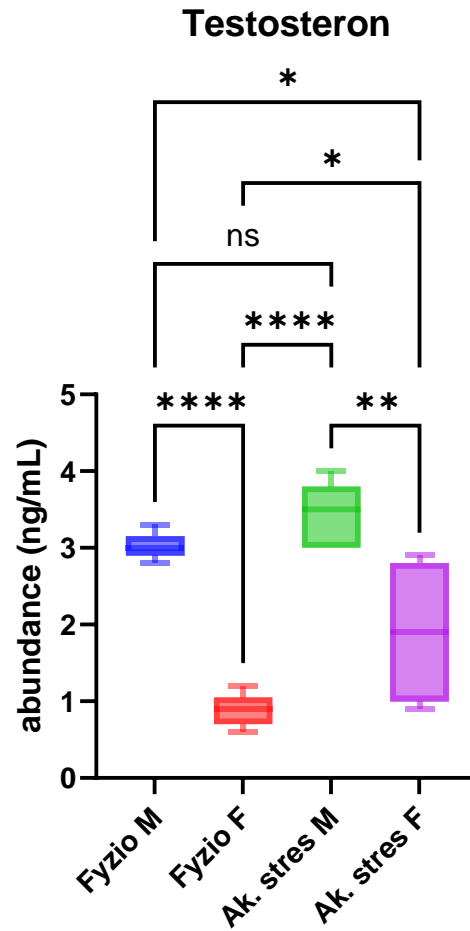


Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Adjusted P Value	
Fyzio M vs. Fyzio F	0.5200	-0.3340 to 1.374	0.3356	A-B
Fyzio M vs. Ak. stres M	-1.560	-2.414 to -0.7060	0.0004	A-C
Fyzio M vs. Ak. stres F	-0.2600	-1.114 to 0.5940	0.8196	A-D
Fyzio F vs. Ak. stres M	-2.080	-2.934 to -1.226	<0.0001	B-C
Fyzio F vs. Ak. stres F	-0.7800	-1.634 to 0.07400	0.0798	B-D
Ak. stres M vs. Ak. stres F	1.300	0.4460 to 2.154	0.0025	C-D

## Kortizon



Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Adjusted P Value	
Fyzio M vs. Fyzio F	-0.2600	-1.313 to 0.7932	0.8931	A-B
Fyzio M vs. Ak. stres M	-2.900	-3.953 to -1.847	<0.0001	A-C
Fyzio M vs. Ak. stres F	-0.7800	-1.833 to 0.2732	0.1892	A-D
Fyzio F vs. Ak. stres M	-2.640	-3.693 to -1.587	<0.0001	B-C
Fyzio F vs. Ak. stres F	-0.5200	-1.573 to 0.5332	0.5099	B-D
Ak. stres M vs. Ak. stres F	2.120	1.067 to 3.173	0.0002	C-D



Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Adjusted P Value	
Fyzio M vs. Fyzio F	2.140	1.199 to 3.081	<0.0001	A-B
Fyzio M vs. Ak. stres M	-0.4000	-1.341 to 0.5407	0.6257	A-C
Fyzio M vs. Ak. stres F	1.120	0.1793 to 2.061	0.0171	A-D
Fyzio F vs. Ak. stres M	-2.540	-3.481 to -1.599	<0.0001	B-C
Fyzio F vs. Ak. stres F	-1.020	-1.961 to -0.07934	0.0313	B-D
Ak. stres M vs. Ak. stres F	1.520	0.5793 to 2.461	0.0014	C-D

## 5 Diskuse

Stres je komplexní fyziologická a psychologická reakce, ke které dochází, když jedinec vnímá hrozbu, výzvu nebo požadavek, který přesahuje jeho schopnost se s tím vyrovnat. Reakce těla na stres zahrnuje koordinovanou souhru mezi nervovým systémem, endokrinním systémem a imunitním systémem. Vnímání a aktivace: Stres začíná vnímáním stresoru, který může být fyzický, psychologický nebo environmentální. Limbický systém mozku, zejména amygdala a hypotalamus, hraje klíčovou roli při detekci a zpracování stresorů. Když je stresor vnímán, hypotalamus aktivuje stresovou reakci těla.

Aktivace sympatického nervového systému (SNS): Hypotalamus spouští uvolňování signálních molekul, včetně hormonu uvolňujícího kortikotropin (CRH) a adrenokortikotropního hormonu (ACTH), které stimulují nadledvinky k uvolňování stresových hormonů, jako je kortizol a adrenalin. Tyto hormony aktivují sympatický nervový systém, což vede k reakci „bojů nebo úteč“. SNS zvyšuje srdeční frekvenci, krevní tlak a dýchání a zároveň přesměrovává průtok krve do základních orgánů a svalů, aby připravilo tělo na reakci na vnímanou hrozbu.

Aktivace osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA): Kromě SNS aktivuje hypotalamus osu HPA. CRH uvolňovaný hypotalamem stimuluje hypofýzu k uvolňování ACTH, což zase stimuluje nadledvinky k produkci kortizolu. Kortizol, často označovaný jako „stresový hormon“, pomáhá regulovat metabolismus, potlačovat záněty a mobilizovat zásoby energie pro podporu reakce těla na stres. Chronická aktivace osy HPA a prodloužené zvýšení hladin kortizolu mohou mít negativní účinky na zdraví, včetně imunitní suprese, metabolické dysregulace a kardiovaskulárního rizika.

Stresová reakce je přísně regulována mechanismy negativní zpětné vazby, aby se zabránilo nadměrné aktivaci. Kortizol působí negativní zpětnou vazbou na hypotalamus a hypofýzu, čímž inhibuje další uvolňování CRH a ACTH, jakmile se hladina stresu sníží. To pomáhá obnovit homeostázu a vrátit tělo do stavu rovnováhy.

Vliv na imunitní funkce: Stres může modulovat imunitní funkce, přičemž akutní stres často posiluje imunitní reakce, zatímco chronický stres může imunitní funkci potlačit. Prodloužená aktivace stresové reakce, zejména uvolňování kortizolu, může potlačit produkci imunitních buněk a zánětlivých mediátorů, díky čemuž jsou jedinci náchylnější k infekcím a zánětlivým stavům.

Chronické nebo opakované vystavení stresu může mít významné dlouhodobé účinky na fyzické a duševní zdraví. Je spojován s celou řadou stavů, včetně kardiovaskulárních onemocnění, gastrointestinálních poruch, deprese, úzkosti a nespavosti. Pochopení fyziologie stresu je zásadní pro vývoj účinných strategií pro zvládání stresu a podporu celkové pohody.

Podle grafů v kapitole 4 můžeme vidět jednotlivé hodnoty hormonů pro samce a samice králíka domácího. Dle grafů biorytmu můžeme říct, že hladiny hormonů se řídí

cirkadiánním rytmem. Podle našeho měření, hladiny naměřených hormonů dosahují maxima přibližně mezi 16. a 19. hodinou. Další, ale menší vrchol nastává okolo poledních hodin. Králík domácí je někdy uváděn jako krepuskulární zvíře, a jinde jako nokturální. Vzhledem k našim datům, je aktivita králíka spíše krepuskulární, tedy soumravná.

Po porovnání nárůstu výše hormonů mezi pohlavími jsme zjistili, že kortikosteron a kortizon se procentuálně zvýšil více u samců. Přestože klidové hodnoty kortikosteronu mají vyšší samice, tak nárůst byl menší než u samců. Samcům se hodnoty zvýšily 2,6× ve srovnání se samicemi. Kortizon se samcům zvýšil oproti samicím až 11,5×. Největší změna u samic je vidět v hodnotách kortizolu, které měly rozdíl mezi stresovými a klidovými hodnotami 239 %, což je více jak dvakrát větší nárůst než u samců, kde stresové hodnoty narostly o 106 %. Podle hladin kortizolu můžeme říct, že samice byly více citlivé na stres, ale podle ostatních hodnot, jsou pohlaví králíků v tomto případě spíše vyrovnané. Důvodem proč se samicím tak zvýšil kortizol po stresové reakci by mohlo být zapříčiněno tím, že samice mají v klidovém stavu vyšší hodnotu kortizonu než samci, a kortizon se přeměňuje na kortizol, pokud to organismus potřebuje. Výše testosteronu je u samic nižší než u samců, ale při reakci na stres u nich tento hormon reagoval až čtyřikrát více než samcům, kde se stresové hladiny pohybovaly blíže klidovým hodnotám. Tento jev by mohl být způsoben tím, že při stresu se samcům zhorší průtok krve ve varlatech, ve kterých je testosteron nejvíce produkován. Na rozdíl od samic, kde jsou hlavním zdrojem tohoto hormonu nadledviny, které u samců produkují méně testosteronu než právě varlata.

Hormonální odpověď na stresor je možné zaznamenat ze slin ve velmi krátkém čase, řádově minut, oproti tomu například ve vzorkách moči by mohly být hladiny stresových hormonů opožděnější, protože cesta hormonu do slin je poměrně rychlá. Jedním z důvodů může být i to, že jazyk je silně prokrven.

Naměřené údaje mohou být ovlivněny ročním obdobím, odběry vzorků probíhaly v březnu, kdy se dny prodlužují. Návrh pro další studie by mohl být měření během jednoho roku, aby se porovnal jednotlivá roční období a hormonální aktivita s tím související. Cirkadiánní rytmus se může odlišovat podle toho, zda jsou dlouhé slunné dny nebo je období na konci podzimu, kdy se čas denního světla zkracuje a teploty klesají.

## 6 Závěr

Cílem této práce bylo prokázat, zda existují látky – stresové hormony, jejichž hladiny souvisí s úrovní stresu, kterému je organismus vystaven a zda se tím následně dají hodnotit podmínky králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) v chovu. Dalším cílem bylo vyvinout metodu HPLC-MS ke stanovení stresových hormonů v králíčích slinách.

V této práci jsme ověřili, že pomocí metody HPLC-MS můžeme stanovit hodnoty stresových hormonů ve slinách králíka domácího. Dále se v našem výzkumu přišlo na to, že v organismu existují látky – stresové hormony, kterými v této práci byly kortizol, kortizon, kortikosteron a testosteron, jejichž hladiny souvisí s úrovní stresu, kterému je zvíře vystavené. A tyto hormony mohou být využity jako ukazatelé aktuální životní situace. Potvrdila se tedy hypotéza, že jako stresové hormony v organismu králíka domácího můžeme využít již zmíněné čtyři steroidní hormony.

Zjistili jsme, že hladiny hormonů podléhají cirkadiánnímu rytmu, ale mohou být narušeny náhlým stresem. Podle hodnot cirkadiánního rytmu vykazuje králík domácí největší aktivitu ve večerních hodinách. Nejvyšší hodnoty v odpovědi na akutní stres byly zaznamenány v hladinách kortizolu u samic králíků. Výhodou odběru slin je opakované odebírání vzorků během dne, které by bylo například při odebírání krve u králíků velmi náročné, v některých případech i nemožné.



## 7 Literatura

- Aardal E, Holm A. 1995. Cortisol in Saliva - Reference Ranges and Relation to Cortisol in Serum. *cclm* **vol. 33**:927-932.
- Aguilar-Roblero R, González-Mariscal G. 2020. Behavioral, neuroendocrine and physiological indicators of the circadian biology of male and female rabbits. *European Journal of Neuroscience* **vol. 51**:429-453.
- Albrecht A, Çalışkan G, Oitzl M, Heinemann U, Stork O. 2013. Long-Lasting Increase of Corticosterone After Fear Memory Reactivation: Anxiolytic Effects and Network Activity Modulation in the Ventral Hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **vol. 38**:386-394.
- Al-Dujaili E, Baghdadi H, Howie F, Mason J. 2012. Validation and application of a highly specific and sensitive ELISA for the estimation of cortisone in saliva, urine and in vitro cell-culture media by using a novel antibody. *Steroids* **vol. 77**:703-709.
- Al-Saffar F, Simaway M. 2014. Histomorphological and histochemical study of the major salivary glands of adult local rabbits. *Int. J. Adv. Res.* **11**:378-402.
- Alvi S, Hammami M. 2019. A Simple Ultrapformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Measurement of Cortisol Level in Human Saliva. *International Journal of Analytical Chemistry* **vol. 2019**:1-8.
- Alzahrani, Alshuwaier, Aljaloud, Gibson, Khalaf, Alhawiti, Watson. 2019. Development of a Derivatization Method for Investigating Testosterone and Dehydroepiandrosterone Using Tandem Mass Spectrometry in Saliva Samples from Young Professional Soccer Players Pre- and Post-Training. *Scientia Pharmaceutica* **vol. 87**.
- Amikishieva A, Avgustinovich D, Koryakina L. 2001. Buspirone prevents sexual motivation in depressed male mice from reduction. *European Neuropsychopharmacology* **vol. 11**:S314-S315.
- Atkinson H, Waddell B. 1997. Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle\*. *Endocrinology* **vol. 138**:3842-3848.
- Baker J, Berry A, Boscato L, Gordon S, Walsh B, Stuart M. 2001. Identification of some rabbit allergens as lipocalins **vol. 31**:303-312.
- Barnes P. 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology* **vol. 148**:245-254.
- Baxter-Gilbert J, Riley J, Mastromonaco G, Litzgus J, Lesbarreres D. 2014. A novel technique to measure chronic levels of corticosterone in turtles living around a major roadway. *Conservation Physiology* **vol. 2**:cou036-cou036.
- Beerda B, Schilder M, van Hooff J, de Vries H, Mol J. 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science* **vol. 58**:365-381.
- Ben Saad M, Maurel D. 2002. Long-Day Inhibition of Reproduction and Circadian Photogonadosensitivity in Zembra Island Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biology of Reproduction* **vol. 66**:415-420.
- Blair J, Adaway J, Keevil B, Ross R. 2017. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting **vol. 24**:161-168.

Book A, Starzyk K, Quinsey V. 2001. The relationship between testosterone and aggression: a meta-analysis. *Aggression and Violent Behavior* **vol. 6**:579-599.

Booth A, Shelley G, Mazur A, Tharp G, Kittok R. 1989. Testosterone, and winning and losing in human competition. *Hormones and Behavior* **vol. 23**:556-571.

Bouret S, Sara S. 2005. Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function. *Trends in Neurosciences* **vol. 28**:574-582.

Briganti F, Della Seta D, Fontani G, Lodi L, Lupo C. 2003. Behavioral effects of testosterone in relation to social rank in the male rabbit. *Aggressive Behavior* **vol. 29**:269-278.

Buckingham J. 2006. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology* **vol. 147**:S258-S268.

Buijs R, Kalsbeek A, van der Woude T, van Heerikhuize J, Shinn S. 1993. Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **vol. 264**:1186-1192.

Carlisle J, Gibson A, Schmatolla E. 2016. Cortisone. *Postgraduate Medicine* **vol. 8**:113-124.

Cavigelli S, Pereira M. 2000. Mating Season Aggression and Fecal Testosterone Levels in Male Ring-Tailed Lemurs (*Lemur catta*). *Hormones and Behavior* **vol. 37**:246-255.

Cockrem J, Silverin B. 2002. Sight of a Predator Can Stimulate a Corticosterone Response in the Great Tit (*Parus major*). *General and Comparative Endocrinology* **vol. 125**:248-255.

Cook N, Schaefer A, Lepage P, Jones S. 1996. Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science* **vol. 76**:329-335.

Cushman D, Ofek E, Syed R, Clements N, Gardner J, Sams J, Mulvey J, McCormick Z. 2019. Comparison of Varying Corticosteroid Type, Dose, and Volume for the Treatment of Pain in Small- and Intermediate-Size Joint Injections: A Narrative Review **vol. 11**:758-770.

D. Clements A, Richard Parker C. 1998. The Relationship Between Salivary Cortisol Concentrations in Frozen Versus Mailed Samples. *Psychoneuroendocrinology* **vol. 23**:613-616.

Davenport M, Tiefenbacher S, Lutz C, Novak M, Meyer J. 2006. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and Comparative Endocrinology* **vol. 147**:255-261.

de Lange C. 2016. Get in sync. *New Scientist* **vol. 230**:30-33.

de Quervain D, Roozendaal B, Nitsch R, McGaugh J, Hock C. 2000. Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nature Neuroscience* **vol. 3**:313-314.

de Weerth C, Zijl R, Buitelaar J. 2003. Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early Human Development* **vol. 73**:39-52.

Den R, Toda M, Nagasawa S, Kitamura K, Morimoto K. 2007. Circadian rhythm of human salivary chromogranin A. *Biomedical Research* **vol. 28**:57-60.

Despopoulos A, Silbernagl S. 2003. *Taschenatlas der Physiologie* edition.. Thieme, Stuttgart.

Djurhuus C, Gravholt C, Nielsen S, Mengel A, Christiansen J, Schmitz O, Møller N. 2002. Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **vol. 283**:E172-E177.

- Dorn L, Lucke J, Loucks T, Berga S. 2007. Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* **vol. 44**:281-284.
- Drucker S, New M. 1987. Disorders of Adrenal Steroidogenesis. *Pediatric Clinics of North America* **vol. 34**:1055-1066.
- Durdiaková J, Fábryová H, Koborová I, Ostatníková D, Celec P. 2013. The effects of saliva collection, handling and storage on salivary testosterone measurement. *Steroids* **vol. 78**:1325-1331.
- Escribano D, Gutiérrez A, Tecles F, Cerón J. 2015. Changes in saliva biomarkers of stress and immunity in domestic pigs exposed to a psychosocial stressor. *Research in Veterinary Science* **vol. 102**:38-44.
- Escribano D, Fuentes-Rubio M, Cerón J. 2012. Validation of an automated chemiluminescent immunoassay for salivary cortisol measurements in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **vol. 24**:918-923.
- Escribano D, Gutiérrez A, Fuentes-Rubio M, Cerón J. 2014. Saliva chromogranin A in growing pigs: A study of circadian patterns during daytime and stability under different storage conditions. *The Veterinary Journal* **vol. 199**:355-359.
- Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, Chen Y. 2015. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: From pathophysiological mechanisms to translational medicine **vol. 146**:104-119.
- Figueiredo H, Dolgas C, Herman J. 2002. Stress Activation of Cortex and Hippocampus Is Modulated by Sex and Stage of Estrus. *Endocrinology* **vol. 143**:2534-2540.
- Frederick R. 2014. Effects of static vs. non-static in vitro techniques on lipid penetration into silicone hydrogel contact lenses. Doctoral dissertation. New Orleans.
- Garde A, Persson R, Hansen Å, Österberg K, Ørbæk P, Eek F, Karlson B. 2009. Effects of lifestyle factors on concentrations of salivary cortisol in healthy individuals. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **vol. 69**:242-250.
- Garrido P, de Blas M, Del Arco A, Segovia G, Mora F. 2012. Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat. *Neurobiology of Aging* **vol. 33**:375-382.
- Główka F, Kosicka K, Karaźniewicz-Łada M. 2010. HPLC method for determination of fluorescence derivatives of cortisol, cortisone and their tetrahydro- and allo-tetrahydro-metabolites in biological fluids. *Journal of Chromatography B* **vol. 878**:283-289.
- Gosetti F, Mazzucco E, Gennaro M, Marengo E. 2013. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. *Journal of Chromatography B* **vol. 927**:22-36.
- Grossman R, Kasturi P, Hamelberg D, Liu B. 2011. An Empirical Study Of The Universal Chemical Key Algorithm for Assigning Unique Keys to Chemical Compounds. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* **vol. 02**:155-171.
- Guerra Aldrigui L, Nogueira-Filho S, Altino V, Mendes A, Clauss M, Nogueira S. 2018. Direct and indirect caecotrophy behaviour in paca ( *Cuniculus paca* ). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **vol. 102**:1774-1782.

- Gunnar M, Talge N, Herrera A. 2009. Stressor paradigms in developmental studies: What does and does not work to produce mean increases in salivary cortisol. *Psychoneuroendocrinology* **vol. 34**:953-967.
- Häggström M, Richfield D. 2014. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *WikiJournal of Medicine* **vol. 1**.
- Harper J, Austad S. 2000. Fecal Glucocorticoids: A Noninvasive Method of Measuring Adrenal Activity in Wild and Captive Rodents. *Physiological and Biochemical Zoology* **vol. 73**:12-22.
- Helle K, Corti A. 2015. Chromogranin A: a paradoxical player in angiogenesis and vascular biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **vol. 72**:339-348.
- Hellhammer D, Wüst S, Kudielka B. 2009. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* **vol. 34**:163-171.
- Hench P. 1950. Effects Of Cortisone Acetate And Pituitary Acth On Rheumatoid Arthritis, Rheumatic Fever And Certain Other Conditions. *Archives of Internal Medicine* **vol. 85**.
- Henry M, Thomas K, Ross I. 2021. Sleep, Cognition and Cortisol in Addison's Disease: A Mechanistic Relationship. *Frontiers in Endocrinology* **vol. 12**.
- Heshmati H, Riggs B, Burritt M, McAlister C, Wollan P, Khosla S. 1998. Effects of the Circadian Variation in Serum Cortisol on Markers of Bone Turnover and Calcium Homeostasis in Normal Postmenopausal Women1 **vol. 83**:751-756.
- Hunt K, Stimmelmayer R, George C, Hanns C, Suydam R, Brower H, Rolland R. 2014. Baleen hormones: a novel tool for retrospective assessment of stress and reproduction in bowhead whales (*Balaena mysticetus*). *Conservation Physiology* **vol. 2**:cou030-cou030.
- Chauncey H, Henriques B, Tanzer J. 1963. Comparative enzyme activity of saliva from the sheep, hog, dog, rabbit, rat, and human. *Archives of oral biology* **8**:615-627.
- Chen B, Lyu H, Xu X, Wang C. 2020. Simultaneous quantification of cortisol and cortisone in serums and saliva from depressive patients by supported liquid extraction coupled to HPLC–MS/MSs. *Acta Chromatographica* **vol. 32**:269-275.
- Chida Y, Sudo N, Kubo C. 2006. Does stress exacerbate liver diseases?. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **vol. 21**:202-208.
- Ieko T, Sasaki H, Maeda N, Fujiki J, Iwano H, Yokota H. 2019. Analysis of Corticosterone and Testosterone Synthesis in Rat Salivary Gland Homogenates. *Frontiers in Endocrinology* **vol. 10**.
- Ivković N, Božović Đ, Račić M, Popović-Grubač D, Davidović B. 2015. Biomarkers of Stress in Saliva / Biomarkeri stresa u pljuvački. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* **vol. 32**:91-99.
- Jilge B, Hudson R. 2009. Diversity And Development Of Circadian Rhythms In The European Rabbit. *Chronobiology International* **vol. 18**:1-26.
- Jones R, Owen L, Adaway J, Keevil B. 2012. Simultaneous analysis of cortisol and cortisone in saliva using XLC–MS/MS for fully automated online solid phase extraction. *Journal of Chromatography B* **881-882**:42-48.
- Jönsson B, Malmberg B, Amilon Å, Helene Garde A, Ørbæk P. 2003. Determination of cortisol in human saliva using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **vol. 784**:63-68.

- Kadlecova G, Volfova M, Chloupek J, Sebankova M, Hostovska L, Voslarova E, Vecerek V. 2023. Determination of diurnal rhythm of salivary corticosterone concentration in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*) using a non-invasive method. *Scientific Reports* **vol. 13**.
- Kakiki M, Morohashi K, Nomura M, Omura T, Horie T. 2009. Expression of aldosterone synthase cytochrome P450 (P450aldo) mRNA in rat adrenal glomerulosa cells by angiotensin ii type1 receptor. *Endocrine Research* **vol. 23**:277-295.
- Kalsbeek A, Fliers E, Hofman M, Swaab D, Buijs R. 2010. Vasopressin and the Output of the Hypothalamic Biological Clock. *Journal of Neuroendocrinology* **vol. 22**:362-372.
- Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs R, Fliers E. 2012. Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **vol. 349**:20-29.
- Kalsbeek A, Buijs R, van Heerikhuizen J, Arts M, van der Woude T. 1992. Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Research* **vol. 580**:62-67.
- Kalsbeek A, van der Vliet J, Buijs R. 1996. Decrease of Endogenous Vasopressin Release Necessary for Expression of the Circadian Rise in Plasma Corticosterone: a Reverse Microdialysis Study. *Journal of Neuroendocrinology* **vol. 8**:299-307.
- Kamiya H, Sasaki S, Ikeuchi T, Umemoto Y, Tatsura H, Hayashi Y, Kaneko S, Kohri K. 2003. Effect of Simulated Microgravity on Testosterone and Sperm Motility in Mice. *Journal of Andrology* **vol. 24**:885-890.
- Kanai K, Hino M, Hori Y, Nakao R, Hoshi F, Itoh N, Higuchi S. 2008. Circadian variations in salivary chromogranin a concentrations during a 24-hour period in dogs. *Journal of Veterinary Science* **vol. 9**.
- Katsu Y, Iguchi T. 2016. 18-Hydroxycorticosterone. *Handbook of Hormones*:529-e95B-3. Elsevier.
- Katsu Y, Iguchi T. 2016. Corticosterone. *Handbook of Hormones*:527-e95A-3. Elsevier.
- Keskin M, Budak S, Zeyrek T, Çelik O, Mertoglu O, Yoldas M, Ilbey Y. 2015. The relationship between serum hormone levels (follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, total testosterone) and semen parameters. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia* **vol. 87**:194-197.
- Khani S, Tayek J. 2001. Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome. *Clinical Science* **vol. 101**:739-747.
- Kierland R. 1952. Cortisone And Corticotropin (Acth) In Dermatology. *Jama: The Journal of the American Medical Association* **vol. 148**.
- Kitaysky A. 2001. Corticosterone facilitates begging and affects resource allocation in the black-legged kittiwake. *Behavioral Ecology* **vol. 12**:619-625.
- Kobelt A, Hemsworth P, Barnett J, Butler K. 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science* **vol. 75**:157-161.
- Kooriyama T, Ogata N. 2021. Salivary stress markers in dogs: Potential markers of acute stress. *Research in Veterinary Science* **vol. 141**:48-55.

- Korte S. 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology **vol. 25**:117-142.
- Kraemer W, Loebel C, Volek J, Ratamess N, Newton R, Wickham R, Gotshalk L, Duncan N, Mazzetti S, Gómez A, Rubin M, Nindl B, Häkkinen K. 2001. The effect of heavy resistance exercise on the circadian rhythm of salivary testosterone in men. *European Journal of Applied Physiology* **vol. 84**:13-18.
- Lagerlöf F, Oliveby A, Weetman D, Geddes D. 1994. Intra- and Inter-Individual Differences in Salivary Sucrose Clearance over Time. *Caries Research* **vol. 28**:348-352.
- Lam J, Shields G, Trainor B, Slavich G, Yonelinas A. 2019. Greater lifetime stress exposure predicts blunted cortisol but heightened DHEA responses to acute stress. *Stress and Health* **vol. 35**:15-26.
- Lepschy M, Rettenbacher S, Touma C, Palme R. 2008. Excretion of catecholamines in rats, mice and chicken. *Journal of Comparative Physiology B* **vol. 178**:629-636.
- Liston C, Cichon J, Jeanneteau F, Jia Z, Chao M, Gan W. 2013. Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nature Neuroscience* **vol. 16**:698-705.
- Loiseau C, Sorci G, Dano S, Chastel O. 2008. Effects of experimental increase of corticosterone levels on begging behavior, immunity and parental provisioning rate in house sparrows. *General and Comparative Endocrinology* **vol. 155**:101-108.
- Loren Buck C, Barnes B. 2003. Androgen in free-living arctic ground squirrels: seasonal changes and influence of staged male-male aggressive encounters. *Hormones and Behavior* **vol. 43**:318-326.
- Lyons D, Parker K, Schatzberg A. 2010. Animal models of early life stress: Implications for understanding resilience. *Developmental Psychobiology* **vol. 52**:402-410.
- Matuszewski B, Constanzer M, Chavez-Eng C. 2003. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* **vol. 75**:3019-3030.
- Mc Ewen B. 2010. Neurobiology of Interpreting and Responding to Stressful Events: Paradigmatic Role of the Hippocampus. *Comprehensive Physiology*:155-178.
- McEwen B. 2019. What Is the Confusion With Cortisol?. *Chronic Stress* **vol. 3**.
- McEwen B, Karatsoreos I. 2015. Sleep Deprivation and Circadian Disruption. *Sleep Medicine Clinics* **vol. 10**:1-10.
- Mellonijr R, Connor D, Xuanhang P, Harrison R, Ferris C. 1997. Anabolic-Androgenic Steroid Exposure During Adolescence and Aggressive Behavior in Golden Hamsters **vol. 61**:359-364.
- Michael Romero L. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* **vol. 128**:1-24.
- Millspaugh J, Washburn B. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology* **vol. 138**:189-199.
- Möstl E, Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* **vol. 23**:67-74.

- Möstl E, Rettenbacher S, Palme R. 2005. Measurement of Corticosterone Metabolites in Birds' Droppings: An Analytical Approach. *Annals of the New York Academy of Sciences* **vol. 1046**:17-34.
- Mukhopadhyay S, Kwatra G. 2018. Evolution and Development of Topical Corticosteroids. A Treatise on Topical Corticosteroids in Dermatology:1-9. Springer Singapore, Singapore.
- Nalla A, Thomsen G, Knudsen G, Frokjaer V. 2014. The effect of storage conditions on salivary cortisol concentrations using an Enzyme Immunoassay. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **vol. 75**:92-95.
- Oster H, Challet E, Ott V, Arvat E, de Kloet E, Dijk D, Lightman S, Vgontzas A, Van Cauter E. 2017. The Functional and Clinical Significance of the 24-Hour Rhythm of Circulating Glucocorticoids. *Endocrine Reviews* **vol. 38**:3-45.
- Ott Joslin J. 2009. Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. *Journal of Exotic Pet Medicine* **vol. 18**:117-139.
- Ouyang J, Hau M, Bonier F. 2011. Within seasons and among years: When are corticosterone levels repeatable?. *Hormones and Behavior* **vol. 60**:559-564.
- Oyegbile T, Marler C. 2005. Winning fights elevates testosterone levels in California mice and enhances future ability to win fights. *Hormones and Behavior* **vol. 48**:259-267.
- Palme R. 2012. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare* **vol. 21**:331-337.
- PALME R, RETTENBACHER S, TOUMA C, EL-BAHR S, MÖSTL E. 2005. Stress Hormones in Mammals and Birds: Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. *Annals of the New York Academy of Sciences* **vol. 1040**:162-171.
- Peters A, Schweiger U, Pellerin L, Hubold C, Oltmanns K, Conrad M, Schultes B, Born J, Fehm H. 2004. The selfish brain: competition for energy resources **vol. 28**:143-180.
- Plieger T, Felten A, Splittgerber H, Duke É, Reuter M. 2018. The role of genetic variation in the glucocorticoid receptor (NR3C1) and mineralocorticoid receptor (NR3C2) in the association between cortisol response and cognition under acute stress. *Psychoneuroendocrinology* **vol. 87**:173-180.
- Proctor G. 2016. The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000* **vol. 70**:11-25.
- Proctor G, Carpenter G. 2007. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience* **vol. 133**:3-18.
- Pull S, Reynolds J. 1979. The collection of saliva in the new-born rabbit, guinea-pig and rat. *The Journal of physiology* **289**:1P-2P.
- Quinkler M, Stewart P. 2003. Hypertension and the Cortisol-Cortisone Shuttle **vol. 88**:2384-2392.
- Robles T, Sharma R, Harrell L, Elashoff D, Yamaguchi M, Shetty V. 2013. Saliva sampling method affects performance of a salivary  $\alpha$ -amylase biosensor. *American Journal of Human Biology* **vol. 25**:719-724.
- Romero L, Storchlic D, Wingfield J. 2005. Corticosterone inhibits feather growth: Potential mechanism explaining seasonal down regulation of corticosterone during molt **vol. 142**:65-73.

- Romero L, Fairhurst G. 2016. Measuring corticosterone in feathers: Strengths, limitations, and suggestions for the future **vol. 202**:112-122.
- Rovirosa M, Levine S, Gordon M, Caba M. 2005. Circadian rhythm of corticosterone secretion in the neonatal rabbit. *Developmental Brain Research* **vol. 158**:92-96.
- Rushen J, Butterworth A, Swanson J. 2011. ANIMAL BEHAVIOR AND WELL-BEING SYMPOSIUM: Farm animal welfare assurance. *Journal of Animal Science* **vol. 89**:1219-1228.
- Sandi C. 2011. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends in Neurosciences* **vol. 34**:165-176.
- Seckl J. 1997. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Brain: A Novel Regulator of Glucocorticoid Action?. *Frontiers in Neuroendocrinology* **vol. 18**:49-99.
- Sheriff M, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* **vol. 166**:869-887.
- Schmidt A, Biau S, Möstl E, Becker-Birck M, Morillon B, Aurich J, Faure J, Aurich C. 2010. Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domestic Animal Endocrinology* **vol. 38**:179-189.
- Schuster J, Schaub G. 2001. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitology Research* **vol. 87**:994-1000.
- Skarlandtová H, Fraňková M, Frynta D, Kittnar O. 2010. Stress and stress hormones in mammals. *Cesk Fyziol* **59**:32-6.
- Skobowiat C, Dowdy J, Sayre R, Tuckey R, Slominski A. 2011. Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: regulation by ultraviolet radiation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **vol. 301**:E484-E493.
- Spiga F, Walker J, Terry J, Lightman S. 2014. HPA Axis-Rhythms. *Comprehensive Physiology* **4**:1273-1298.
- Su Y, Ge R, Xie H. 2024. Steroidogenesis of Corticosteroids, Genetic Mutation, and Endocrine Disruption Leading to Adrenal Insufficiency. *Cortisol - Between Physiology and Pathology [Working Title]*. IntechOpen..
- Szendrő Z, Gerencsér Z, McNitt J, Matics Z. 2016. Effect of lighting on rabbits and its role in rabbit production: A review. *Livestock Science* **vol. 183**:12-18.
- Szeto A, Gonzales J, Spitzer S, Levine J, Zaias J, Saab P, Schneiderman N, McCabe P. 2004. Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology* **vol. 29**:861-866.
- Taupenot L, Harper K, O'Connor D. 2003. The Chromogranin–Secretogranin Family. *New England Journal of Medicine* **vol. 348**:1134-1149.
- Taves M, Plumb A, Korol A, Van Der Gugten J, Holmes D, Abraham N, Soma K. 2016. Lymphoid organs of neonatal and adult mice preferentially produce active glucocorticoids from metabolites, not precursors. *Brain, Behavior, and Immunity* **vol. 57**:271-281.
- Tomlinson J, Draper N, Mackie J, Johnson A, Holder G, Wood P, Stewart P. 2002. Absence of Cushingoid Phenotype in a Patient with Cushing's Disease due to Defective Cortisone to Cortisol Conversion **vol. 87**:57-62.



- Toth L, Gardiner T, Krueger J. 1992. Modulation of sleep by cortisone in normal and bacterially infected rabbits. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **vol. 263**:R1339-R1346.
- Touma C, Palme R. 2005. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **vol. 1046**:54-74.
- Touma C, Palme R, Sachser N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior* **vol. 45**:10-22.
- Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology* **vol. 130**:267-278.
- Turpeinen U, Hämäläinen E. 2013. Determination of cortisol in serum, saliva and urine **vol. 27**:795-801.
- Turpeinen U, Välimäki M, Hämäläinen E. 2009. Determination of salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **vol. 69**:592-597.
- Ulrich-Lai Y, Figueiredo H, Ostrander M, Choi D, Engeland W, Herman J. 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **vol. 291**:E965-E973.
- Ulrich-Lai Y, Herman J. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience* **vol. 10**:397-409.
- Voigt C, Helversen O, Michener R, Kunz T. 2003. Validation of a non-invasive blood-sampling technique for doubly-labelled water experiments. *Journal of Experimental Zoology* **296A**:87-97.
- Voigt C, Faßbender M, Dehnhard M, Wibbelt G, Jewgenow K, Hofer H, Schaub G. 2004. Validation of a minimally invasive blood-sampling technique for the analysis of hormones in domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha). *General and Comparative Endocrinology* **vol. 135**:100-107.
- Walker B, Campbell J, Fraser R, Stewart P, Edwards C. 1992. Mineralocorticoid excess and inhibition of 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in patients with ectopic ACTH syndrome. *Clinical Endocrinology* **vol. 37**:483-492.
- Wasser S, Hunt K, Brown J, Cooper K, Crockett C, Bechert U, Millspaugh J, Larson S, Monfort S. 2000. A Generalized Fecal Glucocorticoid Assay for Use in a Diverse Array of Nondomestic Mammalian and Avian Species. *General and Comparative Endocrinology* **vol. 120**:260-275.
- Whitehouse M. 2011. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: reflections after 60 years. *Inflammopharmacology* **vol. 19**:1-19.
- Wiederanders R, Classen K, Gobbel. W, Doyle M. 1960. The Effect of Cortisone Acetate on Gastric Secretion \*. *Annals of Surgery* **vol. 152**:119-128.
- Yoshioka G, Imaeda N, Ohtani T, Hayashi K. 2005. Effects of cortisol on muscle proteolysis and meat quality in piglets. *Meat Science* **vol. 71**:590-593.
- Young E, ABELSON J, LIGHTMAN S. 2004. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Frontiers in Neuroendocrinology* **vol. 25**:69-76.

Zitzmann M. 2009. Testosterone and the brain. *The Aging Male* **vol. 9**:195-199.

## 8 Obrázky

1. Obrázek č. 1: Syntéza steroidních hormonů (Häggström & Richfield 2014)
2. Obrázek č. 2: Cholesterol, strukturní vzorec (Frederick 2014)
3. Obrázek č. 3: Kortizol, strukturní vzorec (Tomlinson at al 2002)
4. Obrázek č. 4: Kortizon, strukturní vzorec (Tomlinson at al 2002)
5. Obrázek č. 5: Kortikosteron, strukturní vzorec (Katsu & Iguchi 2016)
6. Obrázek č. 6: Testosteron, strukturní vzorec (Grossman et al. 2011)
7. Obrázek č. 7: Chromatogram separovaných komponent
8. Obrázek č. 8: Extrakční příprava vzorků z odběrových tyčinek na sliny. 1 (vlastní fotografie)
9. Obrázek č. 9: Extrakční příprava vzorků z odběrových tyčinek na sliny. 2 (vlastní fotografie)
10. Obrázek č. 10: Extrakční příprava vzorků z odběrových tyčinek na sliny. 3 (vlastní fotografie)

