

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
katedra etologie a zájmových chovů



Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

Vývoj hladiny salivárních fyziologických markerů
u služebního psa v závislosti na standardizované fyzické
zátěži při simulovaném vyhledávání pohřešovaných osob

Diplomová práce

Bc. Tomáš Blecha

Management zdraví a welfare zvířat

doc. Ing. Helena Chaloupková, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Vývoj hladiny salivárních fyziologických markerů u služebního psa v závislosti na standardizované fyzické zátěži při simulovaném vyhledávání pohřešovaných osob“ jsem vypracoval 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 autor diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

Prohlašuji, že jsem nástroje AI využil v souladu s vnitřními předpisy univerzity a principy akademické integrity a etiky. Na využití tohoto nástroje v práci vhodným způsobem odkazuji.

V Praze dne 20. 4. 2024

Bc. Tomáš Blecha

Poděkování

Jsem vděčný všem zúčastněným kynologickým pátracím týmům, to jest psovodům z řad Horské záchranné služby, Policie ČR, Hasičů, dobrovolnických brigád a jejím psům, stejně tak jako realizačnímu týmu zodpovědnému za projekt Evaluace a zvýšení připravenosti pátracích týmů využívaných při pátrání po pohřešovaných, díky nimž byl umožněn sběr experimentálních dat (salivárních markerů psů) analyzovaných v této práci. Rád bych také vyjádřil své „děkuji“ všem, kteří mě jakkoli podpořili a byli mi nápomoci při zpracování této diplomové práce:

Upřímně děkuji své školitelce, doc. Ing. Heleně Chaloupkové Ph.D. za její vedení a sdílení svých zkušeností během diskuzí a při kritickém zhodnocení mých myšlenek, jejich usměrnění, také za poskytnutí pomoci při statistickém modelování. Jednalo se o skvělou příležitost konzultování, během něhož společně s Ing. Karlem Novákem Ph.D. vytvořili produktivní prostředí při mém studiu a kteří vždy dokázali motivovat. Ing. Karlu Novákovi též vyjadřuji poděkování za pečlivé korektury a katalyzaci mého úsilí.

Jsem hluboce zavázán Ing. Petře Bolechové Ph.D. za odborné a podnětné diskuze, během nichž jsem mohl porozumět nejen aspektům ELISA imunisorbentního testu. Obzvláště děkuji za ochotu a trpělivost při řešení veškerých komplikací nastalých před, během a po rozsáhlých laboratorních analýzách doprovázejících detekci salivárních markerů. Vděčím též za zajištění zázemí samotné laboratoře a připomínky, které mne rozvíjely a umožnily vyhodnocení výsledků.

Děkuji Ing. Ivoně Svobodové, Ph.D. za příležitost zúčastnit se terénních cvičení konaného projektu, za poskytnutí užitečných kontaktů na řešitele doprovázejících zpracování výsledků pro tuto práci a kromě zajištění organizace projektu, též za přátelské rozhovory.

Mé díky věnuji též MVDr. Leoně Raušerové Ph.D. která vždy rozpoutala „brainstorming“ týkající se symptomatologie fyzického přetížení u psů a detekování hypertermických stavů.

Vyjadřuji poděkování kpt. Ing. Vladimíru Makešovi a nrap. Naděždě Kramolišové, kteří mi byli nápomocni s kvalifikovaným kategorizováním náročnosti průchodu vybraných segmentů tras terénních cvičení s ohledem na vegetační pokryv. Dále pak vděčím Ing. Janu Růžičkovi Ph.D., který mne uvedl a sdílel své znalosti ohledně softwarového rozhraní geografického informačního programu QGIS.

Za lásku, trpělivost a pochopení vděčím své rodině, příteli Markovi.

Souhrn

Vývoj hladiny salivárních fyziologických markerů u služebního psa v závislosti na standardizované fyzické zátěži při simulovaném vyhledávání pohřešovaných osob

Fyzická kondice se ukazuje jako klíčový faktor pro efektivní nasazení služebních psů v situacích, kde jsou vystaveni stresujícím podnětům při hledání přeživších v katastrofických událostech či pátrání po pohřešovaných osobách. Tato zvířata čelí náročnému terénu, kde rychlost nalezení pohřešované osoby při aktivním pátrání může zásadně ovlivnit úspěch operace. Pro úspěch takových misí je důležité znát, jak pátrací pes reaguje na fyzické i psychické zatížení, a díky tomu přizpůsobit jeho nasazení podmínkám terénu a nečekaným situacím. Salivární koncentrace kortizolu a oxytocinu, synergicky s variabilitou tělesné teploty by mohly fungovat jako indikátory stresového zatížení. Cílem práce je zjistit i) vliv fyzické zátěže během aktivního pátrání služebních psů na koncentrace jejich hormonů a hodnot tělesné teploty ii) ovlivnění dynamiky těchto fyziologických parametrů v průběhu pátrání volným terénem. Odběr vzorků slin pomocí tamponů Sarstedt® Salivette byl proveden u 18 pátracích psů včetně změření tělesné teploty tympanálními teploměry Sanitas SFT 53 a Genius™ během standardizovaného pátrání po pohřešovaných osobách za účasti kynologických týmů složek integrovaného záchranného systému ČR. Salivární vzorky a tělesná teplota byly odebrány na stanovištích, těsně před aktivním pátráním v rozmezí 7-8 h (PP), po 2 h pátrání (OM1) a následný po 1 h pátrání (OM2). Poté bylo pátrání ukončeno. Během pátrání byl pohyb psa snímán prostřednictvím GPS lokátorů Garmin Astro 230 připnutých k obojkům psů, které zaznamenávaly deskriptory pohybové aktivity jako jsou prodloužení doby strávené aktivním pohybem a uražená vzdálenost (počet překonaných km). Koncentrace hormonů byla stanovena metodou ELISA. Pro statistickou analýzu dat byly vypočteny delty koncentrací salivárního kortizolu, oxytocinu a tělesné teploty mezi jednotlivými segmenty odběrů. Statistické šetření bylo realizováno v programu SAS (verze 9.4), prostřednictvím metody smíšeného lineárního modelu (PROC MIXED) a testovalo vliv faktorů zátěže; prodloužení doby strávené aktivním pohybem, uražené vzdálenosti a prostupu individuálními segmenty zatížení na delty koncentrace salivárního kortizolu, oxytocinu a tělesné teploty mezi počátkem a koncem pátrání, a dále pak změny delt koncentrací hormonů a tělesné teploty prostupem mezi individuálními segmenty zatížení (PP-OM1; OM1-OM2). Bylo prokázáno, že s prodloužením doby strávené aktivním pohybem psů docházelo k vzestupu delty koncentrace salivárního kortizolu ($F_{(1,16)} = 5,45$; $P = 0,033$), avšak nebyl pozorován vliv uražené vzdálenosti ($F_{(1,16)} = 2,02$; $P = 0,17$). Nicméně, ani doba strávená aktivním pohybem psů a ani uražená vzdálenost neovlivnily deltu koncentrace salivárního oxytocinu. Delta tělesné

teploty pozvolna klesala úměrně s uraženou vzdáleností ($F_{(1,16)} = 6,59$; $P = 0,023$), zatímco doba strávená aktivním pohybem nevykazovala na vzestup delty tělesné teploty významný vliv ($F_{(1,13)} = 3,02$; $P = 0,11$). Markantní vzestup byl zjištěn pouze u Δc salivárního kortizolu společně s prostupem psů prvním segmentem zátěže (PP-OM1), po němž Δc salivárního kortizolu naopak poklesla. Delta koncentrace salivárního oxytocinu shodně klesala prostupem obou zátěžových segmentů, mezi nimiž nebyla zaznamenána významná diference, zatímco $\Delta t_{t_{\text{tym}}}$ vykazuje tendenci pro signifikantní vzestup průchodem prvního segmentu (PP-OM1), následovaný její stabilizací a pozvolným poklesem $\Delta t_{t_{\text{tym}}}$ průchodem druhého (OM1-OM2). Závěrem lze konstatovat, že dlouhodobá a intenzivní práce služebních psů má vliv na jejich fyziologický stav, a to zejména co se týče Δc salivárního kortizolu a $\Delta t_{t_{\text{tym}}}$, kdy oxytocin zejména reflektuje vzestupy Δc salivárního kortizolu. Adaptace na tuto fyzickou zátěž je klíčová pro prevenci únavy a zranění, avšak literatura nedostatečně zkoumá dlouhodobé dopady zátěže typu SAR. Tato diplomová práce tak podněcuje další výzkum v této oblasti.

salivární fyziologické markery, ELISA, pes domácí, vyhledávání pohřešovaných osob, standardizovaná fyzická zátěž, modulace stresu

Summary

Changes in concentration of salivary physiological markers in service dog depending on the standardized physical load during search and rescue work

Physical fitness is proving to be a key factor in the effective deployment of service dogs in situations where they are exposed to stressful stimuli when searching for survivors of catastrophic events or searching for missing persons. These animals are faced with challenging terrain where the speed of finding a missing person during an active search can fundamentally affect the success of the operation. For the success of such missions, it is important to know how the search dog reacts to physical and mental stresses, and thus to adapt its deployment to field conditions and unexpected situations. Salivary concentrations of cortisol and oxytocin, synergistically with body temperature variability, could act as indicators of physical load stress. The aim of this study is to investigate i) the influence of physical stress during active search of service dogs on their hormone concentrations and body temperature values ii) the influence of the dynamics of these physiological parameters during open field search. Saliva sampling using Sarstedt® Salivette swabs was performed in 18 search dogs including body temperature measurements with Sanitas SFT 53 and Genius™ tympanic thermometers during standardized search for missing persons with the participation of canine teams of the Integrated Rescue System of the Czech Republic. Salivary samples and body temperature were collected at the sites, just before the active search, between 7-8 h (PP), after 2 h of search (OM1) and after 1 h of search (OM2). Thereafter, the search was terminated. During the search, the dog's movement was sensed using Garmin Astro 230 GPS locators attached to the dogs' collars, which recorded descriptors of movement activity such as the extension of time spent in active movement and distance travelled (number of km covered). Hormone concentrations were determined by ELISA. For statistical data analysis, deltas of salivary cortisol, oxytocin and body temperature concentrations were calculated between sampling segments. The statistical investigation was performed using SAS software (version 9. 4), using the mixed linear model method (PROC MIXED), and tested the effect of the physical load factors; prolongation of time spent in active motion, distance travelled and permeation through individual physical load segments on the deltas of salivary cortisol, oxytocin and body temperature concentrations between the start and end of the search, and the changes in the deltas of hormone concentrations and body temperature through permeation between individual physical load segments (PP-OM1; OM1-OM2). It was shown that there was an increase in the delta concentration of salivary cortisol as the time spent actively moving the

dogs increased ($F_{(1,16)} = 5.45$; $P = 0.033$), but no effect of distance traveled was observed ($F_{(1, 16)} = 2.02$; $P = 0.17$). However, neither the time spent actively moving the dogs nor the distance insulted affected the delta of salivary oxytocin concentration. The body temperature delta decreased gradually in proportion to the distance traveled ($F_{(1,16)} = 6.59$; $P = 0.023$), whereas the time spent in active exercise did not show a significant effect on the rise in the body temperature delta ($F_{(1,13)} = 3.02$; $P = 0.11$). A significant rise was found only in Δc of salivary cortisol together with the dogs' passage through the first segment of the exercise (PP-OM1), after which Δc of salivary cortisol decreased in contrast. Delta salivary oxytocin concentration decreased concordantly through the passage of both stress segments, with no significant difference between them, whereas $\Delta t_{t_{ymp}}$ showed a tendency for a significant rise through the passage of the first segment (PP-OM1), followed by its stabilization and a gradual decrease of $\Delta t_{t_{ymp}}$ through the passage of the second (OM1-OM2). In conclusion, the prolonged and intensive work of service dogs has an effect on their physiological state, especially in terms of Δc salivary cortisol and $\Delta t_{t_{ymp}}$, with oxytocin mainly reflecting the rises in Δc salivary cortisol. Adaptation to this physical load is key to preventing fatigue and injury, but the literature has not sufficiently examined the long-term effects of SAR-type loading. Thus, this thesis encourages further research in this area.

salivary physiological markers, ELISA, canis familiaris, search and rescue work, standardised physical load, stress modulation.

Obsah

1 Úvod: Pátrací a záchranní psi v nouzových intervencích	1
2 Hypotézy a cíle práce	3
3 Literární rešerše	5
3.1 Parametry standardizované zátěže psů během simulovaných pátracích operací	5
3.2 Tělesná teplota jako pomocný fyziologický marker	8
3.3 Modulace a fyziologie stresové odezvy, expozice steroidních hormonů	10
3.3.1 Osa hypotalamo-pituitárně-adrenální (HPA), regulovaná adaptace	12
3.3.2 Osa sympato-adreno-medulární (SAM), stresory indukovaná aktivace	13
3.4 Kortizol, coby predominantní stresový marker u psa ve slinách	14
3.4.1 Cirkadiánní a diurnální rytmus secernace kortizolu	18
3.5 Oxytocin	18
3.6 ELISA: Imunoenzymatická detekce steroidů	23
3.6.1 Enzymově vázaná imunosorbentní analýza (ELISA), uspořádání	23
3.6.2 Kompetitivní uspořádání imunosorbentní ELISAy	24
4 Metodika	27
4.1 Experimentální prostředí standardizovaného zatížení	27
4.1.1 Harmonizované zatížení, kategorizace tras	28
4.1.2 Klasifikace reliéfu, intenzita vegetačního krytu	30
4.1.3 Termometrický profil – diverzita jednotlivých lokalit	32
4.2 Zúčastněné subjekty, predispozice k pátrání	32
4.3 Odběry tělesné teploty a salivárních vzorků	33
4.4 Stanovení koncentrací kortizolu a oxytocinu, princip ELISAy	35
4.4.1 Optimalizované koncentrace protilátek a konjugátů	35
4.4.2 Dispozice standardů hormonů, kalibrační křivka	36
4.4.2.1 Postup laboratorní analýzy oxytocinu	36
4.4.2.2 Postup laboratorní analýzy kortizolu	37
4.5 Statistická analýza dat	38

5 Výsledky:	39
5.1 Deskriptivní parametry pohybu služebních psů v zátěži během pátrání	39
5.2 Vliv fixních faktorů zátěže na Δc kortizolu, Δc oxytocinu	40
5.3 Vliv fixních faktorů zátěže na $\Delta t_{t_{\text{typ}}}$	42
5.4 Vliv prostupu individuálními segmenty na Δc salivárního kortizolu	43
5.5 Vliv prostupu individuálními segmenty na Δc salivárního oxytocinu	44
5.6 Vliv prostupu individuálními segmenty na $\Delta t_{t_{\text{typ}}}$	45
6 Diskuse	49
7 Závěr	55
8 Seznam použité literatury	57

Pátrací a záchranní psi v nouzových intervencích

Pátrací a záchranářští psi mají v současnosti patrný společenský dopad, neboť jsou nepostradatelnou pomocí při nalézání přeživších katastrofických událostí (Diverio et al. 2016; Gordon 2018). Tato fenomenální zvířata integrovaného záchranného systému vykonávají své poslání v otevřeném a těžko přístupném terestrickém terénu, prohledávají sutiny po katastrofách a pátrají po nemohoucích zasypaných lavinami, což je pro ně mentálně, ale především fyzicky náročná disciplína (Jones et al. 2004; Rovira et al. 2008; Schneider & Erhard 2009; Schneider & Slotta-Bachmayr 2009). Ergonomie psů v oblasti působení záchrany pohřešovaných a leckdy zraněných pocestných dosahuje svým uplatněním až do roku 1600, kdy Alpští mniši z kláštera a hospice Velkého průsmyku sv. Bernarda užívali jimi vyšlechtěných svatobernardských psů k efektivnímu lokalizování zbloudilých. Svatobernardští psi představují nenahraditelný zdroj pro případy lavinových a skrze mlhu jen těžko prostupných pohrom, neboť jsou schopni včasného detekování polohy zasypaných, zajištění jejich stabilizace a následné přepravy ke zdravotní bázi (Greatbatch et al. 2015; Diverio et al. 2016).

K detekci nemohoucích vojáků byli pátrací psi též užívaní již před první světovou válkou, nicméně teprve až během jejího trvání, tedy v rozmezí let 1914-18, bylo jejich uplatnění oficiálně zdokumentováno (Jones et al. 2004). Vojenští psi nacházeli své uplatnění vzhledem k vyhledávání zraněných a poskytování první pomoci. V současnosti se i nadále patrná část výcviku civilních a pátracích záchranných psů soustřeďuje na techniky převzaté při výcviku psů z období první a druhé světové války (Helton 2009). K realizaci jejich olfaktorické kapacity však nedochází pouze při fixaci přeživších katastrof, ztracených nebo teroristů, nýbrž také k odhalování kadáverů (Diverio et al. 2016), invazivních či bezprostředně ohrožených CITES druhů, detekování kontrabandu (drogy, tabák) a výbušin (Fjellanger et al. 2002; Gazit & Terkel 2003; Lorenzo et al. 2003) anebo rakovinotvorných buněk.

Efektivita pracovního upotřebení psů nejen při lavinových záchranných operacích je závislá na řadě vjemů, které mají impakt na olfaktorický systém psa; na teplotě vzduchu, směru větru, složení sněhu a hloubce zasypaní nemohoucího. Kromě těchto predispozic terénu společně s podmínkami ovzduší se na detekci lidského pachu a úspěšnosti vyhledávání s ohledem na welfare psů taktéž podílejí faktory, jako je kontext výcviku (Diverio et al. 2016), fyzická zdatnost (Gazit & Terkel 2003), environmentální podmínky (Haverbeke et al. 2008) a kvalita vztahu psa

s jeho psovodem (Lefebvre et al. 2007). Během nouzových intervencí zastávají služební psi, obzvláště pak pátrací a záchraní, nepostradatelnou roli. Prostřednictvím potenciálně stresující a fyzicky náročné činnosti, kterou je lokalizování pohřešovaných osob, se napřímo podílí na záchraně lidských životů. Tito psi vyvíjejí značnou námahu při standardizované fyzické zátěži, podstupují stresory, které představují synchronizované navigování kynologických týmů obtížnými terény, extrémní povětrnostní podmínky a participace na mnohdy vyčerpávajícím, dlouhodobém vyhledávání.

Intraindividuální fyzická zdatnost je nepochybně dalším potenciálním faktorem u lavinových či sutinových pátracích psů, jelikož je od nich mnohdy vyžadováno propátrání rozlehlých oblastí v drsných klimatických podmínkách. Fyzická zdatnost je vnímána jako dovednost organismu udržet a znovu navodit stálost fyziologicky přirozené rovnováhy vnitřního prostředí – homeostázy (Schneider & Erhard 2009). V případě lavinového nasazení je rychlost postupu a tudíž fyzická odolnost psů nesmírně důležitá s ohledem na dramatický pokles šance oběti na přežití úměrně s časem zavalení (Haegeli et al. 2011; Grissom 2011). Některá plemena mají obzvláště vynikající vytrvalost (Poole & Erickson 2011). Vysoce náročná fyzická aktivita spojená s charakterem pátracích operací je pravděpodobným zdrojem stresorů, které mohou být zapříčiněním zpoždění při nálezu rozptýlených obětí a současně mohou představovat riziko pro životní pohodu psů (Spoo et al. 2015).

Za predominantní ukazatel modifikace fyziologického stavu organismu bývá považován kortizol, jenž vykazuje silnou korelaci se stresem. Kortizol tak při adaptaci vůči stresorům plní primární úlohu mobilizace energetických rezerv (Smith & Vale 2006), jejich alokací formou katabolických reakcí. Jako katabolický hormon napomáhá dostupnosti všech substrátů nezbytných pro svalovou tkáň mobilizací glukózy, volných mastných kyselin a aminokyselin z endogenních zásob (Popovic et al. 2019). Vysoké koncentrace demonstrují výrazný stres v rámci tepelného a/nebo chladového zatížení organismu (Angle et al. 2009). K posouzení odezvy organismu na stres lze též využívat variabilitu či zvýšení teploty nad fyziologické rozmezí homeostázy psa. Hodnoty přesahující toto rozmezí u tělesné teploty, a jež zároveň nejsou zapříčiněny stavem nemoci, totiž představují další možný indikátor stresu (Diviero et al. 2016).

Empirické posouzení výkonu psa by mělo být pro psovoda každého kynologického týmu zcela zásadní včetně limitujících faktorů, které by mohly mít dopad na efektivitu průběhem záchranných misí. Ačkoliv jsou pro psy nepostradatelnými vlastnostmi v integrovaném záchranném systému především poslušnost, sounáležitost s psovodem a detekce pachových molekul, bývá po nich též vyžadována adekvátní fyzickou zdatnost, aby byli schopni pokrýt rozsáhlá území, a to především za nepříznivých podmínek. Nejpodstatnějším přínosem při vyhledávání je však psí čich, jenž je nepostradatelný k nalezení pohřešovaných, avšak také výbušin, ilegálních drog a zbraní (Jones et al. 2004; Diverio 2016; Gordon 2018).

Hypotézy a cíle práce

2

Cílem diplomové práce je zjistit i) vliv fyzicky náročné a potenciálně stresující zátěže během aktivního pátrání služebních psů na jejich koncentrace hormonů a hodnot tělesné teploty ii) ovlivnění dynamiky těchto fyziologických parametrů v průběhu pátrání volným terénem.

Hypotézy budou otestovány prověřením terénních faktorů, jako je prodlužující se doba strávená aktivním pohybem, uražená vzdálenost a prostup individuálními segmenty zatížení, na deltu koncentrace salivárního kortizolu, oxytocinu v kombinaci s monitoringem delty tělesné teploty, coby kontrolního markeru.

Prověřované budou následné hypotézy:

- (1) S prodlužující se dobou strávenou aktivním pohybem nastane vzestup delty koncentrace a delty hodnot i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu iii) tělesné teploty.
- (2) Čím delší vzdálenost pes urazí volným pohybem v terénu (množství překonaných km na trase), tím markantnější je vzestup koncentrace a hodnot: i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu iii) tělesné teploty.
- (3) Vzestup delty koncentrace a hodnot i) salivárního kortizolu ii) salivárního oxytocinu iii) delty tělesné teploty bude přítomen během průchodu obou segmentů zatížení.
- (4) Markantnější vzestup delty koncentrace i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu, iii) delty tělesné teploty nastane průchodem prvního segmentu zatížení v porovnání s druhým segmentem.

3.1 Parametry standardizované zátěže psů během simulovaných pátracích operací

Standardizovaná simulovaná zátěž této diplomové práce si stanovuje reprodukovat analogickou námahu, které jsou pracovní psi podrobováni při skutečném nasazení, například při plošném vyhledávání a pátrání po pohřešovaných osobách v sutinách, povodních či lavinách. Taková fyzická aktivita při pozemní práci zpravidla přesahuje metabolické předpoklady a limity jejich běžné úrovně bazálního metabolismu a zprostředkovává fyziologickou adaptabilitu na rutinní krátkodobou či déletrvající fyzickou zátěž (Rovira et al. 2008). Psi integrovaného záchranného systému bývají pro podobné výkony připravováni s nejvyšší precizností, která by měla být systematicky prověřována při záchranných zkouškách evokujících skutečné mise, díky čemuž je možno prověřit náchylnost zažívaného stresu psa v kontrolovaných podmínkách před samotným nasazením (Lit et al. 2010; Diverio et al. 2016).

Fyzická zdatnost byla definována jako "schopnost organismu udržet vnitřní fyziologickou rovnováhu co nejbližší stavu klidu během fyzické zátěže a pohotově obnovit změněnou rovnováhu po výkonu (Schneider & Bachmayr 2009; Menchetti et al. 2019). Nicméně, faktory ovlivňující takový fyzický výkon psa v simulovaném nasazení stále nejsou dostatečně podrobně prozkoumány (Rovira et al. 2008).

Kondiční adaptace označují fyziologické reakce těla na zvýšenou pohybovou aktivitu u zvířat, bez ohledu na jejich druh. Tyto adaptace jsou klíčové pro zvládnutí náročných fyzických aktivit a eliminaci omezení, která by mohla ovlivnit výkonnost. Pro úspěšný kondiční trénink je zapotřebí jak fyzická, tak mentální připravenost, neboť organismus musí efektivně využívat své energetické rezervy. Nedostatek adekvátního fyzického a metabolického stresu brání tělu v dosažení kondiční adaptace (Schneider & Slotta-Bachmayr 2009).

Kondiční trénink je proces, který vyžaduje kognitivní schopnosti k osvojení specifické zátěže, chování a reakcí, přičemž metabolismus organismu efektivně alokuje energetické rezervy a nutriční zdroje, aby umožnil fyziologické změny nezbytné pro kondiční adaptaci na konkrétní podnět. Tento proces vyžaduje určitý stupeň fyzického nebo metabolického stresu pro stimulaci kondice (Ferasin & Marcora 2009; Schneider & Slotta-Bachmayr 2009).

¹ využity prompty o stylistické reformulaci a gramatické kontrole textu

Zatímco určité stresory jsou nezbytným faktorem, enormní a nadměrný stres může vést k poškození namáhaných tkání, což má za následek zranění a degradaci budované kondice. Habituační má významný impakt na tepovou frekvenci a teplotu psa při fyzické zátěži, neboť snižuje stresovou odezvu organismu a zvyšuje jeho výdrž (Wust 2006, Wilhelm 2007, Ferasin & Marcora 2009, Gillette 2013). Pokud tedy kondicionování přesně neimituje požadovanou pátrací činnost, mohou tkáně nedostatečně vystavené zátěži zůstat neadaptovány pro dosažení vyšší výkonnosti a stávají se tak limitujícím faktorem omezujícím výkonnost.

Pátrání v rozlehlých, otevřených prostorech vyžaduje optimální fyzický stav, jelikož se psi integrovaného záchranného systému podílejí na prozkoumávání různorodého terénu, kde jsou nuceni interagovat se značným množstvím neznámých elementů (např. riziko střetnutí zúčastněných záchranářů, pátracích psů), což vyžaduje kontinuálně udržovaný stav bdělosti. Průzkum trosek vyžaduje též jistou míru zkušeností a opatrnosti podmíněných výcvikem, jelikož obnáší značnou míru ohrožení. Psi totiž musí vykonávat úkony autonomně a současně bez přítomnosti psovoda, jenž z bezpečnostních důvodů nemůže být v bezprostřední blízkosti oblasti katastrofy a je nucen se pohybovat pouze po striktně značených cestách (Wojtas et al. 2020).

Proto je klíčové dodržovat optimální úroveň fyzického a metabolického stresu během tréninku v rámci prevence poškození tkání a vzniku potenciálních zranění (Schneider & Slotta-Bachmayr 2009). Nedostatečnost adaptability na fyziologické nároky v kontextu pátrání zapříčiňuje únavu a selhání, nicméně taktéž specifické onemocnění a zranění, která mají přesah v otázce stavu vitálního organismu psa a jeho životní pohody (Davis 2009, Jones et al. 2004, Slensky et al. 2004). Ty mohou být ovlivněny stresory fyzické i psychické podstaty, které jsou záchranářští psi během prohledávání rozsáhlých oblastí s extrémně drsnými klimatickými podmínkami s úměrnou fyzickou náročností podrobováni (2009). Záchranní psi bývají v praxi během vyhledávání v sutinách mnohdy nasazováni opakovaně. Tito psi vykazovali, jak uvádí Wilhelm (2007), za srovnatelných podmínek tři po sobě jdoucích dní znatelné známky únavy (63 % psů), kdežto první den byla únava detekovatelná pouze v případě 25 % psů. Výzkum tak poukazuje na trend narůstajícího stavu vyčerpání i klesající pravděpodobnosti pro nalezení pohřešovaných osob při opakujícím se vyhledávání podmíněným délkou jeho trvání (Greatbach et al. 2015).

Zdatnost vyžadovaná při stresujících lavinových či sutinových misích je pro pátrací a záchranářské psy nepochybně stresující. Mentální stres přitom negativně narušuje koncentraci psa, což v důsledku snižuje jeho spolehlivost a výkon, které jsou během aplikovaného nasazení nezbytné, neboť je žádoucí aby pes následoval příkazů psovoda, především však aby úspěšně detekoval a analyzoval patřičný pach (Helton 2009). Mentální a psychické zatížení záchranných psů vyvolávají při pátracích misích (Schneider & Slotta-Bachmayr 2009) zejména faktory jako: roční období, obzvláště vnější teplota, klimatické podmínky, typ terénu, vegetační pokryv, nadmořská výška prohledávaného terénu & sdílený prostor s neznámými osobami (Rovira et al. 2008), doba trvání záchranné mise, přeprava vrtulníkem a individuální charakteristiky (věk, váha, struktura srsti).

Nervový systém však umožňuje limitovanou délku plné soustředěnosti po déletrvajícím časovém úseku. Po detekčních psech ať už při vyhledávání pohřešovaných, anebo lokalizování akceleračních

požárů se mnohdy vyžaduje kontinuální bdělostní stav. Takový předpoklad může být ovšem v rozporu s biologicky podmíněnou cirkadiánní aktivitou tohoto taxonu, která dosahuje vrcholových hodnot ve večerních a brzkých ranních hodinách (Accorsi et al. 2008; Clow et al. 2010; Stalder et al. 2016).

Ačkoliv mohou mít na tyto požadavky impakt především individuální trénink s domestikací, dlouhodobý trend evoluce druhu jako soumračného predátora přesto zůstává významný. Je zapotřebí zohlednit tyto biologické predispozice a pokoušet se adaptovat strategie výcviku tak, aby motivoval psy a zároveň odpovídal požadavkům na plnohodnotný výkon a bdělost při kritických situacích, kdy by se za přirozených podmínek uchýlili k odpočinku (Brucks et al. 2019; Jean-Joseph et al. 2020). Pro stanovení míry únavy se u lavinových a záchranářských psů v praxi vyžívá fyzického stresu a jeho deskriptorů v podobě metabolické odezvy organismu na stresory dle intraindividuální zdatnosti.

Lze tak snímat i stres mentální povahy, který u psů v zátěži obvykle nelze jinak kvantifikovat, na rozdíl od laboratorních experimentů spočívajících v kontinuálním pozorování behaviorálních markerů. Monitoring fyzického zatížení zastává účinný prostředek při provádění reálných záchranných operací (Rovira et al. 2008). O fyzickém stresu psů vypovídají především měřitelné parametry termoregulace, srdeční frekvence, metabolismus svalů prezentovaný měřením laktátu v krvi a změny vnitřní teploty organismu indikované hladinou stresového hormonu – kortizolu ve slinách (Gazit & Terkel 2003; Schneider & Slotta-Bachmayr 2009; Meunier 2006; Rovira et al. 2008; Wojtaś et al. 2020).

Sklonitost terénu má vliv na pohyb a fyzickou námahu certifikovaných psů (Novák et al. 2022). Tito psi preferují horizontální pohyb podél terénních kontur, zatímco ve svažitém terénu se sklonem 11° nebo větším regulují pohyb navýšením rychlosti ve vertikálním směru, čímž zkracují dobu hledání. To však současně znamená zintenzivnění fyzické námahy, což může negativně ovlivnit jejich celkovou výdrž. Studie Schneidera, Erharda a Slotta-Bachmayra z roku 2009 potvrzují, že psi s certifikátem SAR projevují optimalizovaný pohyb v obtížném terénu a výrazně akcelerují proces vyhledání, jak uvádí Novák et al. (2022). Certifikovaní psi také upřednostňují při náročných pátracích operacích horizontální pohyb a dosahují vyšší efektivity, i když může docházet k dočasnému zpomalení při stoupaní do svahu. Pak se ovšem degraduje účinnost a je pro psy z biomechanického aspektu zachovat chůzi (Strasser et al. 2014). V náročných pátracích operacích představují certifikovaní psi energeticky šetrnější pohyb se sníženým fyzickým stresem. Reliéf terénu s větším sklonem a hustším vegetačním krytem ztěžuje v synergii s podmínkami klimatu pátrání a prodlužuje dobu potřebnou k prohledání. Certifikovaní psi SAR však pracují rychleji a efektivněji, což zdůrazňuje důležitost pravidelného výcviku.

Tvar terénu a jeho sklon ovlivňují šíření pachu, přičemž prudký sklon vytváří vzdušné turbulence blízko povrchu, což ovlivňuje strategii pátrání psa. Vegetace ovlivňuje mikroklima a vlastnosti vzduchu, což má vliv na šíření pachu (Osterkamp 2020). Mikroklima utvářené přítomným vegetačním pokryvem determinuje vlhkost, proudění vzduchu a jeho teplotu, přičemž rychlost proudění větru a vlhkost vzduchu modifikují šíření odorologických stop, které se snadněji šíří při vlhkém a studeném podnebí. Terény s řidší vegetací a na vyšších nadmořských

výškách usnadňují detekci pachu na větší vzdálenost. Certifikovaní psi jsou také schopni efektivněji prozkoumat specifický v důsledku svým zkušeností a dovedností využívání pachových podmínek při větření, při němž pes systematicky sumuje vzduch. Posléze, při olfaktorické komparaci identifikuje pachové molekuly, což mu umožňuje lokalizovat příslušné pachy či sledovat stopu (Osterkamp 2020). Certifikovaní psi pátrají s ohledem na zkušenost se specifitou jejich práce v kratším intervalu (Jones et al. 2004).

3.2 Tělesná teplota jako pomocný fyziologický marker

Vliv mírných termálních podmínek (přibližně 21 °C) na pátrací a záchranářské psy (SAR) byl studován Rovira et al. 2008. Ti dosahují optimální pracovní úrovně při průměrné rektální teplotě 40,64 °C a neprojevují pokles teploty během zotavení po práci. Provedený výzkum Schneider & Erhard (2009) prokázal vzestup teploty psů v alpském terénu na 39,2 °C až 39,8 °C po práci, a to i po pouhých 20 minutách intenzivního zatížení. Tato teplota je považována hypertermický stav u středního až velkého plemenného rázu, a teplota nad 40 °C může vést k poškození tkání a nad 41 °C k selhání oběhové soustavy psa (Schneider & Erhard 2009; Schneider & Slotta-Bachmayr 2009). K tomu, aby byla tělesná teplota těchto psů stabilizována na hodnotách blízkých bazálním parametrům, byly vyžadovány dvacetiminutové regenerační intervaly, ovšem pouze u psů, kteří byli certifikováni pro vyhledávání v lavinových scénářích. Tato opakovaná procedura regenerace se ukázala jako nezbytná, protože intenzivní svalová aktivita výrazně generuje navýšení tělesné teploty.

Okolní teplota byla identifikována jako kritický determinant ovlivňující pracovní aktivitu a výkon psů. Obecný vědecký konsenzus uvádí, že schopnost psů pracovat se snižuje s rostoucí teplotou okolí (Robbins et al. 2017), kdy psi pracují pomaleji při vysokých teplotách (nad 20 °C) a přítomnosti slunečního záření, což prodlužuje pátrací dobu a navíc představují zvýšené riziko přehřátí, jelikož je odvodňování tepla z povrchu těla organismu méně účinné. Vyšší teploty okolního prostředí měly statisticky signifikantní vliv na zvýšenou aktivitu psů, vyšší hladiny kortizolu v krvi a tachykardii (Willhelm 2007). Tyto jevy mohou přispívat ke snížené vytrvalosti psů, která opadá vzhledem ke komplexním termoregulačním mechanismům aktivovaným při zvyšující se okolní teplotě, jak uvádí studie Robbins et al. z roku 2017. Naopak, v chladných teplotách s větrem a srážkami může zvýšená ztráta tepla zpočátku zvýšit pracovní efektivitu a prodloužit vytrvalost (Willhelm 2007).

Kvalita srsti a klimatický faktor předurčují míru tepelné ztráty. Hustota srsti ovlivňuje izolaci těla. Hustší srst soustřeďuje vzduch mezi chlupy, což kontribuje izolaci těla a snižuje tepelnou ztrátu. Psi s kratší, eventuálně řidší srstí mají vyšší tepelný výdej skrze povrch těla než psi se srstí dlouhou a hrubou. Hustá srst však nechrání klouby před ochlazením během odpočinku. Při teplotách nad nulou je schopnost rychle odvádět teplo povrchem těla u krátce srstnatých psů výhodou při fyzické aktivitě, kdy Wust (2006) dokumentuje při pátracích operacích nižší zvýšení tělesné teploty u krátce srstnatých psů při porovnání s dlouhou nebo hrubou srstí. Nicméně, toto rozporuje studie Schneider a Erhard (2009), které uvádí defekt nízké teploty, která může také negativně ovlivnit výkon psů, protože vyšší tepelné ztráty zvyšují fyzickou námahu (Schneider & Slotta-Bachmayr 2009). Zvýšené termoregulační aspekty jsou schopny manifestovat výrazný

vliv na funkce olfaktorického vnímání skrze potenciální riziko dehydratace a desikace mukonasální membrány (Jones et al. 2004, Jenkins et al. 2018). Takové atmosférickými jevy společně s termoregulační konstelací vykazují modifikaci intenzity šíření olfaktorických stimulů (Cablík et al. 2008; Greatbatch et al. 2015, Gerritsen & Haak 2015; Osterkamp 2020). Proto vyžaduje mukonasální membrána zachování stálé hydratace, neboť její desikace nesmírně komplikuje proces detekce olfaktorických signálů. Toto vysušení může být výsledkem jak výkyvů meteorologických parametrů, tak dehydratace sliznic (Jones et al. 2004). Dehydratace sliznic se též jeví jako jeden z možných faktorů, proč psi, vyhledávající svůj cíl za extrémních klimatických podmínek, mohou prezentovat sníženou výkonnost (Gazit a Terkel 2003).

Teplota vnějšího prostředí významně moduluje termoregulační mechanismy u psů v zátěži, kteří vykonávají termoregulaci skrze potní žlázy lokalizované v digitálních polštářích tlap, avšak významná část této regulace (přibližně 60 %) je asociována s evaporativní ztrátou tepla procesem spojeným s dýcháním (Bernabucci et al. 2010). Tento proces současně manifestuje termickou polyponoi charakterizovanou zvýšenou frekvencí respirace a dýchacích cyklů (Schneider & Slotta-Bachmayr 2009; Davis 2009; Osterkamp 2020). Adaptace v rámci dýchání, relativně neefektivního způsobu odvádění teplota, znatelně interferuje s olfaktorickou funkcí u psů, komplikující činnosti závislé na čichu, například stopování nebo vyhledávání (Gazit & Terkel 2003; Davis 2009; Osterkamp 2020).

Svalová práce investovaná při zatížení navíc zvyšuje množství generovaného tepla, které je třeba taktéž odvést. Zcela zásadní je identifikace intolerance zátěže v extrémních podmínkách, vzniklé tepelným stresem, psododem, který by měl být kompetentní detekovat neschopnost odvodu nahromaděného tepla (termického nátlaku) u svého psa při výkon, kdy může dojít k rozvinutí příznaků úpalu (Bruchim et al. 2017). Mezi nejrizikovější faktory patří obzvláště nadměrná fyzická aktivita, nedostatečná aklimatizace, obezita, příslušnost k určitému plemeni (brachycefalická plemena a labradorští retrívři), velmi vlhká prostředí. Hyperventilace evaporací nadměrného tepla způsobuje odvod tělních tekutin a tedy i tělesné teploty. Nejčastějšími klinickými příznaky vhodnými pro identifikaci úpalu jsou zátěží vyvolaný kolaps, tachypnoe, spontánní krvácivost, příznaky šoku, dezorientace či deliria, případné psychické abnormality včetně deprese, a delirií, dezorientace (Taylor et al. 2009; King et al. 2015; Bruchim et al. 2017).

Postižení psi obvykle vyhledávají stinná místa, jeví diskomfort, odmítají aktivitu, mohou projevovat záškuby a snížené vědomí v důsledku vyčerpání. Monitoring tělesné teploty slouží jako marker mentálního i fyzického zatížení psa. Rektální teploměry, tradičně užívané k tomuto účelu, se ukázaly být pro zvíře stresovým faktorem, navíc jsou nevhodné vzhledem k možné kontaminaci a jelikož mohou narušit peristaltiku gastrointestinálního traktu (Sousa et al. 2011). Z těchto důvodů se inklinuje k užívání infračervených ušních teploměrů, které umožňují rychlou a šetrnou manipulaci, navíc s relativně vysokou přesností a znatelně nižším zatížením v kontextu syntézy stresových hormonů u zkoumaného zvířete. Další oblastí vhodnou pro kvantifikaci tělesné teploty je periorbitální okraj očního víčka a slzného kanálku, přičemž tyto anatomické oblasti disponují vysoce koncentrovaným vaskularizačním zastoupením a mají citlivou odezvu pro hemodynamiku, což umožňuje detekci lokálních fluktuací teploty (Travian et al. 2015) a hypertermie v kontextu fyzického zatížení. Slzná kapilára je inervována infraorbitálním nervem,

jež svou aktivitu odvozuje od lícního nervu, který přímo reaguje na činnost sympatického nervového systému. Slzný aparát je tak studován za účelem posuzování aktivity autonomního nervového systému, který vypovídá o stresujících a bolestivých stimulech (Patterson et al. 2008; Taylor et al. 2009; King et al. 2015 Taylor et al. 2016). Synergie fyzického zatížení a omezeného evaporačního ochlazování dýcháním má za následek některé fyziologické změny, včetně: respirační alkalózy (zvýšení pH krve v důsledku hyperventilace), hypertermie (febrilie; zvýšení tělesné teploty), tachypnoe (zvýšená frekvence dýchání), laktátové acidózy (zvýšení hladiny kyseliny mléčné v krvi), tachykardie a hypokapnie – snížené hladiny oxidu uhličitého v krvi (Rovira et al. 2007; Rovira et al. 2008; Ferasin & Marcora 2009; Piccione et al. 2012).

Hypertermie při intenzivním zatížení není neobvyklým aspektem, neboť je po krátkou dobu tolerovatelná u vitálních jedinců. Horečka je naopak diagnostikována příznakem onemocnění. Obvyklé rozmezí tělesné teploty psa osciluje mezi 37,5 až 39 °C, přičemž není ojedinělou záležitostí, kdy u závodních psů s hypertermií dosahuje až 40 °C. Takový vzestup je však tolerován pouze kondiciovanými psy, kdy úměrná hypertermie v důsledku extrémních podmínek zátěže jinak vede k systémovým onemocněním (Schneider & Slotta-Bachmayr 2009).

Překonáním únosné míry, vzhledem ke kondici nebo fyzické zdatnosti psa, je omezení jeho schopnosti pracovat delší dobu nevyhnutelné, a vyžaduje období odpočinku. Normalizace ukazatele fyzické zátěže, tělesné teploty, byl stanoven na 20 minut odpočinku v případě lavinových psů ponechaných na otevřené ploše po pátrací operaci. Nicméně, teploty během letních vyhledávání v tomto časovém úseku neklesají, teprve až po dalších 40 minutách. V případě lavinových psů pak posléze (po 60 ti minutách) tyto hodnoty i nadále klesají pod výchozí hodnoty, což ilustruje ztráty tepla (Köhler 2004; Wust 2006; Wilhelm 2007).

Při teplotách vnějšího prostředí nad 26,5 °C vykazují psi pachtění, přičemž citlivost na tuto teplotní hranici může variabilně záviset na faktorech jako fyzická kondice, úroveň prováděné fyzické aktivity, věk a genetické determinanty. Pachtění však není pro jedince s kvalifikací na vyhledávání pohřešovaných či lovecky orientované nepřekonatelnou překážkou ve využití čichových vjemů, neboť jsou schopni současně pachtit, vykonávat běh a zároveň soustředěně následovat olfaktorní stopy. Tuto výjimečnou dovednost podporuje anatomie nosní houby, která má „křídlovitý“ tvar nozder, což umožňuje efektivnější a preciznější zachycení pachových stop (Gazit & Terkel 2003; Davis 2009; Osterkamp 2020).

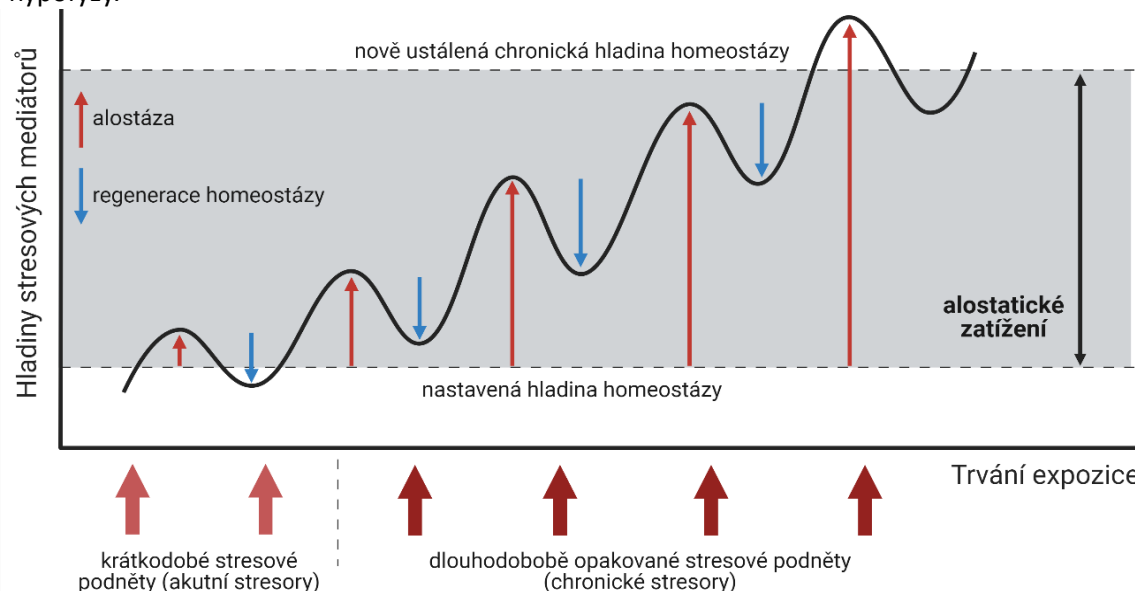
3.3 Modulační a fyziologie stresové odezvy, expozice steroidních hormonů

Stresová odpověď organismu je charakterizována Karatsoreos & McEwen (2011) jako komplexní reakce podnětenou nepříznivými podněty, jež ohrožují přirozenou homeostázi organismu. Takto pozorovaná odchýlení se označují stavem alostázy (viz obrázek 1, str 11), což může zahrnovat tachykardii, systémový metabolismus nebo krevní tlak. I když se stresový termín obvykle kontuje s negativními aspekty, dá se kategorizovat na dva typy v závislosti na stupni, a kontextuální relevanci, přičemž metabolické hormony (mediátoři alostázy) přispívají jak při adaptaci, tak pro rozvoj patofyziologické kondice (Lee et al. 2015). Eustres je typ stresu s pozitivními důsledky, standardně označovaný jako „benefiční stres“, naopak distres je znám pro přínos nepříznivých účinků a přezdívá se mu též „maladaptivní“, jak jej definoval Selye (1998). Dále lze

stres rozlišit v závislosti na trvání; akutní formován stresory krátkodobého charakteru a chronický (déle trvající), pokud je iniciován dlouhodobými stresory. Distres mohou vyvolat oba typy (Moberg & Mench 2000).

Mediátoři alostázy se sestávají z komponent autonomního nervového systému, konkrétně pak katecholaminů, spolu s metabolickými hormony a cytokiny (Karatsoreos & McEwen 2011; Lee et al. 2015). Fyzická aktivita podmiňuje sekreci kortizolu u člověka i psů (Royer et al. 2005; Durocher et al. 2007; Huntingford et al. 2014). Výzvy vyžadující trvalou a celosystémovou mobilizaci metabolických rezerv s nejvyšší pravděpodobností aktivují osu HPA v důsledku stresu (Shirtcliff et al. 2009). K nejvyššímu uvolňování koncentrace kortizolu pak dochází především při vystavení psa hrozbám s podněty, které jsou pro něj v takové situaci nezvládnutelné pro vyhodnocení adekvátní reakce (Cobb et al. 2016). Adaptaci psa na stres lze analyzovat z perspektivy dvou základních fyziologických drah: hypotalamus-hypofýza-nadledvina (HPA) a sympatikus-nadledvina (SAM), jak popisují (Sapolsky 2000; Marques et al. 2010).

Hormonální stresová odezva zprostředkovaná krátkodobými stresory (akutními) obvykle uvolňuje hormony nadledvinové dřeně, kdežto chronická odezva je kontrolována hormonální signalizací kůry (zona fasciculata, glomerulosa) nadledvin (Baritaki et al. 2019). Centrální nervová soustava reaguje dle Herman et al. (2016) na stresory regulací receptorů kortikotropin-uvolňujícího hormonu (kortikoliberinu) a neuropeptidů v rámci hypothalamicko-hypofyzárně-adrenální osy. Kortikoliberin je pak zásadním neuroendokrinním mediátorem této osy při interakci se stresory (Baritaki et al. 2019). Ať už se jedná o stresory endogenního nebo exogenního původu, jejich funkce spočívá ve stimulaci hypotalamu k uvolňování kortikoliberinu, což má za následek sekreci adrenokortikotropního hormonu situované v předním laloku hypofýzy.



Obr. 1: Stresová odezva na akutní a chronické stresory, modifikováno (Lee et al. 2015). Vytvořeno v biorenderu.

Adrenokortikotropin je pak predispozičním hormonem k syntéze glukokortikoidů, hlavních kortikosteroidů z kůry nadledvin. Podněty z behaviorální, nervové a/nebo neuroendokrinní sféry

mohou zapříčinit uvolnění hypotalamického kortikoliberinu (Smith & Vale 2006; Aguilera 2011). Za působení chronického stresu hypofýza a hypotalamus mnohdy reagují výraznější aktivitou HPA osy. Trvalá syntéza glukokortikoidů může vést ke vzniku negativního zpětnovazebného systému, který v důsledku inhibuje odpověď této osy snížením expozice kortikoliberinu společně s adrenokortikotropinem (Smith & Vae 2006; Myers et al. 2012; Herman et al. 2016). Kromě aktivace centrální stresové odpovědi HPA osy mohou stresory vést k uvolňování katecholaminů; adrenalinu, noradrenalinu (neurotransmitter postgangliových vláken sympatiku) a norepinefrinu z dřeně nadledvin prostřednictvím stimulace hormonů nadledvinek endokrinních drah sympatické větve autonomního nervového systému, tedy osy sympato-adreno-medulární. Aktivace probíhá nezávisle na působení HPA osy, kdy během působení stresové odezvy SAM taktéž figuruje kortikoliberin v roli neurotransmiteru (Smith & Vale 2006; Dragoş & Tănăsescu 2010).

Adrenalin urychluje reakci na stresory sekrecí kortikoliberinu a adrenokortikotropinu z hypofýzy a hypotalamu, čímž aktivuje pozitivní dvousměrnou zpětnou vazbu. V negativní zpětné vazbě kortizol inhibuje jejich sekreci, pokud je v dostačujících hladinách. Osy HPA a SAM spolu vzájemně interagují v zájmu pozitivního zpětnovazebného signálního obvodu. Hormony uvolňované dřeně nadledvin zajišťují zejména krátkodobé, neboli také akutní, stresové odpovědi, přičemž hormony původem z kůry nadledvin signálně ovlivňují chronické, dlouhodoběji přetrvávající stresové odpovědi (Baritaki et al. 2019).

3.3.1 Osa hypotalamo-pituitárně-adrenální (HPA), regulovaná adaptace

Osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny se napřímo podílí na stresové odpovědi organismu. Hypotalamus totiž v přítomnosti stresoru vylučuje kortikoliberin, tedy hormon uvolňující sekreci kortikotropínu, čímž stimuluje adrenokortikotropní sekreci v hypofýze. Důsledkem navýšení koncentrace adrenokortikotropínu se pak secernují glukokortikoidy (steroidní hormony) z nadledvin, jež jsou orientačním hlediskem, indikátory, stresové reakce.

Glukokortikoidy, skrze své specifické receptory lokalizované na hypotalamu a hypofýze vykazují negativní zpětnou vazbu, a manifestují se jako efektivní regulátory homeostázy. Mozkové struktury, exprimující receptory pro glukokortikoidy, jsou významnými modulátory hypotalamicko-hypofyzárně-adrenální osy: amygdala aktivuje HPA osu, zatímco hipokampus a cerebrální kortex (frontální kůra) tuto osu kontrolně-inhibují (Marin et al. 2019). Hlavním indikátorem aktivita HPA osy bývá kortizol (Cobb et al. 2016). Jedná se o predominantní glukokortikoid (společně s kortikosteronem) syntetizovaný z cholesterolu (Ulrich-Lai & Hermann 2009; Whirledge & Cidlowski 2013; Lee et al. 2015), a je též vhodným markerem stresu u psů integrovaného záchranného systému, ale i člověka. Tento steroidní hormon secernovaný vrstvou „zona fasciculata“ kůry nadledvin má významný efekt na metabolismus. V reakci na kognitivní a zdraví ohrožující vjemy dochází vlivem sekrece kortizolu k supresi aktivity hypotalamo-hypofyzárně-nadledvinové osy. (Juster et al. 2010). Kortizol zastává svou funkci při zvýšené glykémii v případě sacharidů (syntéza glukózy), reguluje také metabolismus bílkovin (uvolněním aminokyselin svalových bílkovin do krevního oběhu), vápníku a vody, lipolýzu v tukových tkáních. Výsledkem lipolýzy je uvolnění glycerolu a mastných kyselin, které jsou využity při B-oxidaci

(zdroj energie) či syntéze glukózy a nachází své využití ve svalových buňkách. Též se účastní mobilizačních procesů v organismu, během reakce imunitního systému, nebo také při krvetvorbě. Přípravuje tak jedince na stresory, přičemž zajišťuje odpovídající energetické zdroje pro mozek (encephalon). Převažujícím glukokortikosteroidem u primátů, prasat, koček, krav a psů je kortizol, kdežto u myši, potkanů a králíků se jedná o kortikosteron (Palme et al. 2005; Lee et al. 2015).

Glukokortikoidní vzorky z trusu a srsti vypovídají o chronických, dlouhotrvajících stresových podnětech (Hennessy 2013), zatímco stejné hormony v plazmě a slinách odrážejí akutní adaptace organismu. Glukokortikoidy společně s dalšími hormony HPA osy iniciují rychlé behaviorální a fyziologické změny, tzv. „emergency life history stages“, které umožňují dočasné navýšení kondice po dobu trvání nepříznivých vjemů (Wilsterman et al. 2020). Kortizol ve slinách psů koreluje s jeho plazmatickými koncentracemi. Vzhledem k lipofilním vlastnostem může pronikat cytoplazmatickou membránou, jakožto látka nízkomolekulární hmotnosti neproteinové povahy. Buněčné membrány jsou složeny fosfolipidovými dvojvrstvami; ty zabraňují difundaci molekul nerozpustných v tucích. Po vstupu kortizolu do buňky pasivní difúzí, díky jeho lipofilní povaze, dochází k vazbě na specifické cytosolové receptory (Miller 2008; Lee et al. 2015). Nadledviny, jakožto párové endokrinní žlázy se synergeticky podílí na uvolňování katecholaminů a glukokortikoidů v obou osách, umožňujících fyziologickou reakci na stres. Zvýšené uvolňování glukokortikoidů a katecholaminů umožňuje organismu adaptaci (mobilizaci energetických zdrojů, tachykardii) vůči zátěžovým faktorům (Lee et al. 2015).

3.3.2 Osa sympato-adreno-medulární (SAM), stresory indukovaná aktivace

Osa sympatikus-nadledvina (SAM) zprostředkovává co možná nejrychlejší adaptabilitu stresovým podnětům aktivačním mechanismem sympatického a parasympatického systému (Ulrich-Lai & Herman 2009). Glukokortikoidy spojené s mobilizací energetických zásob se podílí na katabolických procesech, stimuluje glukoneogenezi a proteolýzu či lipolýzu, zároveň inhibují dočasně nežádoucí imunitní odpověď organismu (Sapolsky 2000; Palme et al. 2005).

Jejich secernování regulují kortikotropin uvolňující hormon (kortikoliberin nebo také peptidový hormon) a hypofyzárně adrenokortikotropní hormon (kortikotropin) negativní zpětnou vazbou z hypotalamického paraventriculárního jádra (Hennessy 2009). Jejich zvýšené hladiny inhibují centrální a hypofyzární segment HPA osy, přičemž hypofýza může nabývat vůči kortikotropinu a adrenokortikotropinu na rezistenci (Mastokaros et al. 2005). Emise katecholaminů, konkrétně pak adrenalinu s norepinefrinem způsobuje vazokonstrikci drobných cév a také glykolýzu. Stejně tak ovlivňuje vazodilatační proces kosterní a jaterní svaloviny, navíc zvyšuje výkonnost srdečních stahů, a tedy i výdej krve společně s navýšením krevního tlaku. Tyto procesy jsou adaptačním mechanismem obvykle spojovaným s reakcí „boj nebo útěk“ (Hennessy 2013; Whirlledge & Cidlowski 2013), během níž dochází k intenzivnější syntéze glukokortikoidů endokrinním systémem v důsledku déle-přetrvávajícího chronického stresu (Lee et al. 2015). Regulaci působení mechanismu hypotalamo-pituitárně-adrenální a sympato-adreno-medulární osy při stresové odpovědi zachycuje (viz obrázek 2, str 15).

3.4 Kortizol, coby predominantní stresový marker u psa ve slinách

Kortizol, stejně jako adrenalin je klasifikován stresovým hormonem, kterým je možno důvěrně měřit stresové reakce a aktivity osy hypotalamus-hypofýza-nadledvinky. Slinný kortizol se užívá coby biomarker stresu a souvisejících psychomotorických či mentálních onemocnění psů (Wojtas et al. 2020), avšak literatura týkající se diferenciací hladin kortizolu u psů podstupujících fyzickou aktivitu je stále ještě vysoce omezená (Collusi et al. 2016).

Jeho reflektovaná část ve slinách údajně zastává 7-12 % jeho celkového zastoupení plazmy (Chmelíková et al. 2020). Vzhledem k jeho volné, biologicky aktivní frakci v tělních tekutinách se měření ve slinách považuje za vhodnější metodu zhodnocení adrenokortikální funkce než v případě sérového kortizolu (Hellhammer et al. 2009).

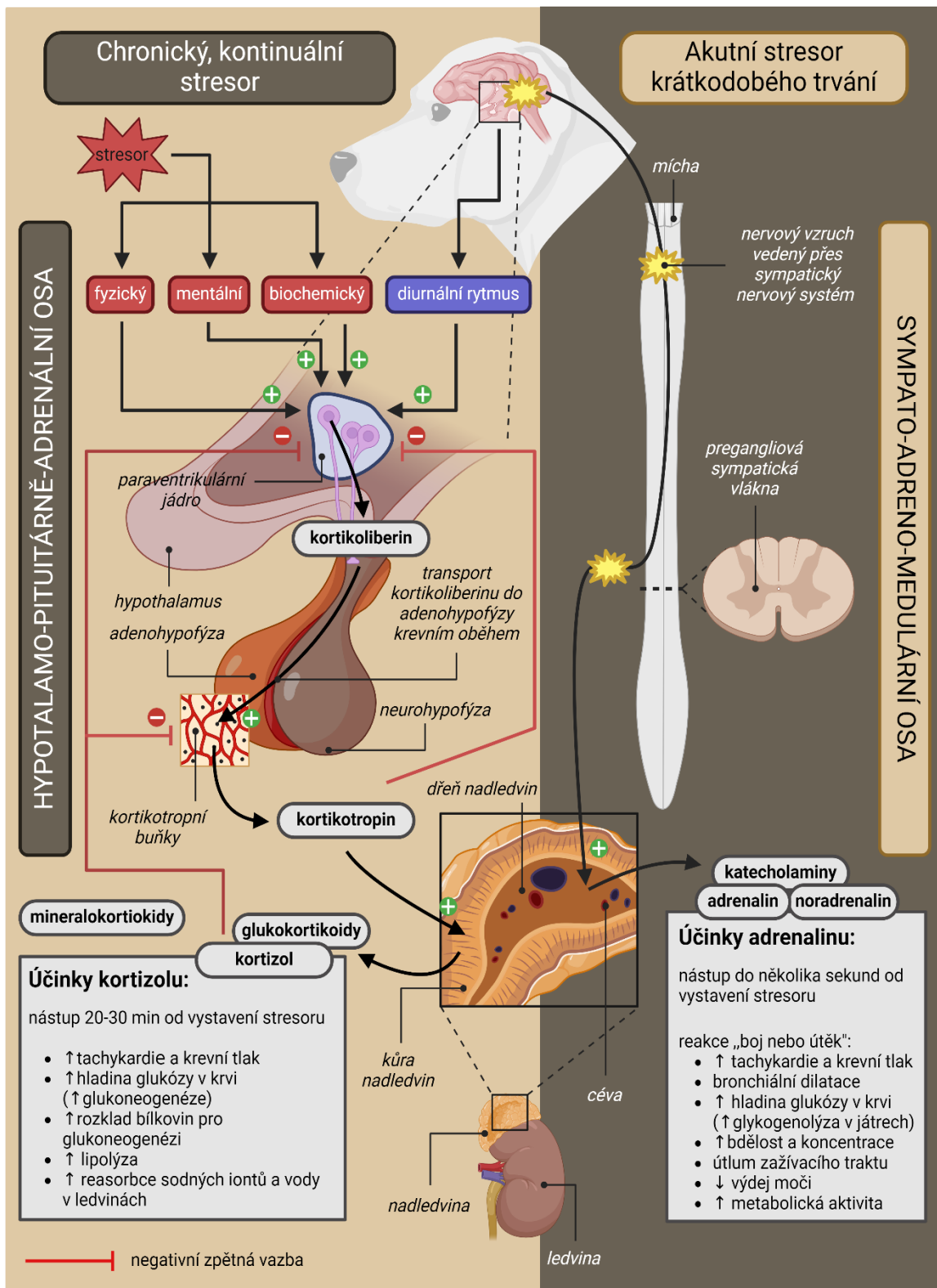
Dočasné navýšení hladin kortizolu bylo zaznamenáno Haverbeke et al. (2008) u vojenských psů absolvujících několik po sobě jdoucích nasazení, které se však po výzvě opět snížilo na výchozí hodnoty. Tito psi tedy zřejmě měli sníženou pohodu z hlediska reakcí na akutně působící stresory, nebyli však stresováni chronicky.

Elevované koncentrace kortizolu manifestují návrat k bazálním hodnotám prostřednictvím mechanismu negativní zpětné vazby, které se účastní hypotalamus, prefrontální kortex a zejména hipokampus. Při opakovaném vystavení chronickým stresogenních stimulům se cirkulující hladiny kortizolu udržují dlouhodobě nad fyziologickým rámcem, což vede k narušení činnosti hipokampálních a kortikálních neuronů, kde dochází k iniciaci negativní zpětné vazby (Mizoguchi et al. 2003).

Takové interakce mohou vést k udržování nadprůměrných hladin kortizolu, a to i bez přítomnosti stresogenních podnětů, v důsledku již narušeného mechanismu negativní zpětné vazby. Adaptací persistentním stresorům se může organismus potýkat s nedokonalou obnovou původní homeostázy, což vede k normalizaci nově ustálené, chronicky zvýšené hladiny.

K adaptaci na stres dochází po kumulativním zatížení, též nazývaném alostatickou zátěží. Mezi časté důsledky patří hyperkortizolémie, zvýšení hladin cytokinů účastnících se při zánětlivé reakci, hypertenze, nadváha, inzulinová rezistence, diabetes a neurodegenerativní onemocnění (Lee et al. 2015).

Psi v integrovaném záchranném systému musí být na tento typ práce dokonale připraveni a jejich schopnosti by měly být systematicky prověřovány při záchranných zkouškách (Diverio et al., 2016). Tyto pátrací zkoušky by měly být sestaveny tak, aby psům co nejvíce připomínaly skutečnou záchrannou akci. Proto hodnocení stresu u psa v kontrolovaných podmínkách během zkoušek umožňuje určit náchylnost psa ke stresu, který zažívá při skutečných pátracích operacích (Lit et al., 2010). Kortizol je jedním z měřítek stresové reakce a aktivace hypotalamo-hypofyzárně-nadledvinkové osy v reakci na centrální nebo periferní podněty. Stejně jako adrenalin je klasifikován jako stresový hormon. Slinný kortizol se pak běžně používá jako biomarker stresu a souvisejících duševních nebo tělesných onemocnění (Hellhammer et al. 2009; Wojtas et al. 2021). Koncentrace ve slinách udržují konečnou fázi pasivního difundování skrze acinární buňky slinné žlázy (Granger et al. 2007; Dreschel & Granger 2009). U vitálních jedinců je slinný kortizol extrémně prospektivní, vzhledem k jeho reflektování hladin plazmatické koncentrace, neboť



Obr. 2: Regulační mechanismy hypotalamo-pituitárně-adrenální a sympato-adreno-medulární osy, modifikováno (Yesko 1999; Boron & Boulpaep 2016; Craw 2016; Baritaki et al. 2019). Vytvořeno v BioRenderu.

nevázaný kortizol pasivně difunduje z krve do slin. Majoritní podíl (přes 90 %) plazmatického kortizolu je navázáno na transportní proteiny (kortikosteroidní vazné globuliny). Minoritní část, 3-5 % plazmatického kortizolu je ve volné, nevázané bioaktivní formě (Gratti et al. 2009; Musiala et al. 2018). Po akutním stresoru, obvykle během 10 až 30 minut dosahuje zvýšená koncentrace salivárního kortizolu maximálních hodnot (Schneider & Slotta-Bachmayr 2009)

Se zpožděním 30 minut pak resorbuje adaptivní reakce na předešlý podnět bez disruptivních vlivů spojených s manipulací při samotném odběru. Jedná se tedy o zcela bezbolestní a intermitentní zákrok eliminující stres spojený s odebíráním vzorku ve srovnání s venepunkcí (Granger et al. 2007; Dreschel & Granger 2009; Bennett & Hayssen 2010; Sherman et al. 2015).

Samotný odběr je možno provést z několika částí tlamy psa, např. z jazyka, dásní, tvrdého patra nebo lícního vaku (Kobelt et al. 2003). Potrava živočišného původu v tlamě psa může obsahovat látky, které interferují ve slinných imunoanalýzách (Chmelíková et al. 2020). Proto Colussi et al. (2018) doporučují vyvarování se potravy nejméně 20 minut před každým odběrem. Kolísání sérového kortizolu se v jeho slinném rozhraní projevuje v prodlevě trvající do 5 ti minut (Gatti et al. 2009; Colussi et al. 2016). Bazální hladiny jsou adaptovány vůči vnitřním i vnějším parametrům organismu, konkrétně pak věkem, pohlavím, teplotou a denní dobou (Koyama et al. 2003; Chmelíková et al. 2020). Intaktní fený mají vyšší koncentrace vůči kastrováným a stejně tak vůči kastrováným i intaktním psům (Chmelíková et al. 2020). Naopak nižší hladinu kortizolu mají dle Cobb et al. (2016) psi do věku 6 měsíců vůči psům v rozmezí šest měsíců až rok a 1-8 let starším psům. Fratkin et al. (2013) též uvádějí nízké bazální hladiny během prvních nejkritičtějších period života. Kastráčnický status a pohlaví by tak měly být považovány (Sandri et al. 2015) za relevantní proměnou při analyzování kortizolu u psů.

Tento biologický materiál lze psům odebrat s maximálním prodlením trvajícím do 4 minut, aniž by byl nežádoucím stresorem, znehodnocujícím vypovídající hodnotu takového odběru, a měl tak vliv na koncentrace kortizolu (Kobelt et al. 2003). Koncentrace tohoto glukokortikoidu modulujícího stresové reakce byly zkoumány u armádních psů (Diverio et al. 2016) a psů pátracích a záchranných (např. Ahrens et al. 2004; Slensky 2004). Byl prokázán vliv raného výcviku na koncentraci kortizolu (Ando et al. 2020), přičemž pracovní psi užívaní v armádě či v integrovaném záchranném systému, zaznamenávají jeho zvýšenou hladinu v reakci na fyzické a smyslové zatížení (Haverbeke et al. 2008). Stejně tak byl již analyzován dopad cvičení na plazmatický kortizol, nicméně není příliš známo o jeho parametrech v případě slin. S ohledem na glukoregulační hormony se připouští, že může docházet k jejich významným modifikacím za účelem řízení energetické bilance svalových buněk. Zvýšení koncentrace kortizolu je zřetelně více úměrné délce pracovního vyčerpání než intenzitě samotného úkonu (Rovira et al. 2008).

O této tezi vypovídá též krátké submaximální zatížení u agilít závodů, které ve srovnání se záchrannými disciplínami neměly signifikantní vliv na koncentrace v séru (nejvyšší hodnota Colussi et al. 2018; $3,22 \pm 0,51$ ng/ml). Koncentrace ve slinách u psu se liší v intervalech podmíněných typy vykonávané činnosti. Kolísání je podmíněno rozsahu úkonů a potřebné úrovni bdělosti, jež je pro kognitivní odezvy psa vynakládána (Colussi et al. 2018). Identifikace reakcí psa v důsledku cvičení je zásadní determinantou, v případě kdy zvažujeme odlišení fyziologických

parametrů zapříčiněných vyčerpáním, anebo nemocemi, které mohou vyplývat z dlouhodobé a intenzivní zátěže, která by byla v rozporu s kondicí a úrovní trénovanosti psa.

Vzhledem k pozorovanému vztahu mezi zvýšenými hladinami kortizolu a efektivitou pracovních psů (Foyer et al. 2016), se jeví relevantní zkoumat úroveň stresu u psů vodících a pátracích s možností komparace těchto hladin s těmi, u jedinců žijících v domácím prostředí jako společenští bytí geneticky podobní, bez vlivu pracovního nasazení. Práce vodícího psa je totiž vyčerpávající a mnohdy podněcuje zvýšenou aktivitu osy HPA jako příčinu i důsledek rutinnímu vystavení podnětům neznámé povahy s proměnlivými podmínkami pro odpočinek po zátěžové koncentraci a stavu bdělosti (Bray et al. 2017; De la Fuente-Moreno et al. 2023). Povaha zátěže vodících psů a modulace navýšení sérového kortizolu bývá přisuzována (Chmelíková et al. 2020) pozitivnímu důsledku kognitivních a duševních procesů. Nicméně, zvýšené hladiny nebývají mnohdy přisuzovány pouze excitovaným stavům, naopak je zvýšení pojeno u většiny savců se stresovou reakcí (Koyama et al. 2003; Chmelíková et al. 2020; Wojtas et al. 2020).

Znalost o specifické době potřebné k dosažení klidových hodnot po zátěži je zásadní pro návrh a suplementaci strategií aplikovaných v praxi při liniovém pátrání, které by mohly zamezit nemocem s cvičením spojených jako jsou např. rhabdomyolýza, dehydratace, úpal nebo vyčerpání (Rovira et al. 2008). Fyzické zatížení a život-ohrožující stresory vyvolávají zvýšenou reaktivitu nadledvin, zatímco psychické stresory podmíněné úzkostlivými stavy vedou k podstatně méně výrazné modulaci. Fyzicky náročné, život ohrožující stresory mají za následek zvýšenou reakci nadledvin, zatímco psychické, úzkost vyvolávající stresory mají za následek sníženou reakci. Bornstene et al. (2008) ve svém výzkumu naznačuje mechanismus u zatěžovaných zvířat modulující reakci nadledvin mimo adrenokortikotropního hormonu, který poskytuje zvýšené množství kortikosteroidů, když nastane potřeba čelit fyzickým inzultům, ale snížené množství kortikosteroidů, když k vyrovnání mentálního zatížení dostačuje samotné cvičení (Bornstein et al., 2008). Psi mohou projevovat behaviorální změny v důsledku stresu bez současného zvýšení koncentrací kortizolu ve slinách zřejmě kvůli krátkému trvání cvičení, jež aktivuje pouze sympatický systém. Změny bývají mírné v souvislosti se stopováním krve anebo lovem kopytníků (nejvyšší hodnota $3,04 \pm 0,66$ ng/ml), což potvrzuje dřívější pozorování německých ovčáků, kteří podstoupili stopařské výzvy soutěže IPO, kde aktivace osy HPA byla nižší, pokud úkony vyžadovaly výraznější bdělost a psychickou koncentraci (Colussi et al. 2016).

Naproti pozorování loveckých psů během prodlouženého fyzického vypětí kteří při hledání kořisti svým čenichem soustředěně značí místo jejího skrytu a naznačují zvýšení koncentrací ve srovnání s neutrálními podmínkám (a tedy nižší koncentrace kortizolu v klidovém stavu) mezi odběrovými časy (diference 258 minut), kdy se hladiny navýšily z T1 do T2 ($4,61 \pm 1,38$ ng/ml a $16,33 \pm 4,52$ ng/ml), neboť stejně jako v případě psů v integrovaném záchranném systému vyžadují velké množství energetických zásob. Negativní energetická bilance spojená s fyzickou aktivitou stimuluje sekreci kortizolu (Royer et al. 2005). Zvýšená koncentrace v plazmě (např. během hry s majitelem) úzce souvisí s odezvou organismu na zvýšenou fyzickou aktivitu, zejména při absenci konkrétních stresových stimulů (Handlin et al. 2011). Ta byla pozorována též v séru (Huntingford et al. 2014; Fergestad et al. 2016), po závodě saňových psů ve výzkumu Durocher et al. (2007) v moči. Zátěží indukované zvýšení sérového kortizolu psů zcela absolvujících saňový

závod je v souladu s dřívějšími poznatky o psech využívaných pro dlouhé vzdálenosti a tedy úměrně zvýšenou potřebu energie během fyzické aktivity. Navýšení bylo přisuzováno taktéž inscenaci účasti v závodech (Angle et al. 2009). Koncentrace salivárního kortizolu při stresu byly dle (Cobb et al. 2016) ustáleny v rozmezí 0 až 337,9 ng/ml, přičemž průměrná hodnota je přisuzována 4,5 ng/ml. Podobnou hladinu 3 ng/ml udává Colussi et al. (2018).

3.4.1 Cirkadiánní a diurnální rytmus sekrece kortizolu

Koncentrace kortizolu jsou stimulovány denními, cirkadiánními a sezónními rytmy sekrece. Tento rytmus bývá zpravidla synchronizován světlem prostřednictvím suprachiasmatického jádra, jež odráží spánkové parametry jednotlivého taxonu. Tento fenomén byl zaznamenán u psů (Clow et al. 2010; Stalder et al. 2016), má vrchol v ranních hodinách a posléze klesá v průběhu s deescalací několika hodin před usnutím a při usnutí (Accorsi et al. 2008; Horvath et al. 2007). Cobb et al. (2016) zaznamenali naměřené koncentrace ve shromážděných vzorcích ranních hodinách od 6:00 do 8:00 výrazně nižší ve srovnání s večerními mezi osmou hodinou večerní a půlnocí. Mnoho savců, kterými jsou např. člověk a hlodavci vykazují reakci na probuzení znatelným zvýšením sekrece kortizolu během prvních 30-45 minut (Clow et al. 2010; Stalder et al. 2016). Přítomnost reakce po probuzení však u psů nebyla zjištěna (Cobb et al. 2016). Hodnoty naměřené Colussi et al. (2018) se však významně nelišily: $1,90 \pm 1,59$ ng/ml ranní odběr; $2,20 \pm 1,84$ ng/ml poledne a $1,72 \pm 1,88$ ng/ml večerní. Dle uváděných údajů (Gianneto et al. 2014; Glenk et al. 2014; Sandri et al. 2015) by tak měl být považován za nejvhodnější údaj večerní vzorek (Colussi et al. 2018). Gieanetta et al. (2014) nicméně udává nejvyšší vrchol cirkadiánního rytmu kolem poledne a některé studie dokonce udávají úplnou absenci diurnální a cirkadiánní variace kortizolu (Bergeron et al. 2002; Koyama et al. 2003; Wenger-Riggenbach et al. 2010). Nejednota napříč studiemi znemožňuje zcela přesné posouzení slinného kortizolu pro 24 hodinový cyklus u psů (Cobb et al. 2016).

3.5 Oxytocin

Oxytocin reprezentuje slibný biomarker fyzické zátěže u pracovních psů, zejména ve vztahu ke stresové odpovědi organismu a dráhám aktivity kortizolu (Osorio et al. 2016). Hormon z podstaty neuropeptidové povahy, syntetizovaný v buňkách magnocelulárních neuronů v supraoptických a paraventriculárních jádrech hypothalamu a uvolňovaný hypofýzou, zastává klíčovou roli v neurofyzilogických procesech. Multifunkční účinky závisí na individuálních faktorech, včetně genetiky, pohlaví, věku, sociálního prostředí a zkušeností z raného života (Knobloch et al. 2012; Quintana et al. 2021).

Podstupuje rychlý axonální transport do zadní části hypofýzy, kde je ukládán společně s neurofyziny do doby, kdy jej patřičné podněty uvolní do systémového krevního oběhu a centrálního nervového systému (Barret 2016). Oxytocinergní systém, aktivní u různých taxonů savců, hraje významnou roli v interspecifických vztazích, což je patrné při vzájemné aktivaci evolučně zakotvené vazby mezi lidmi a psy. Fyziologicky má inhibiční účinky na hypothalamo-pituitárně-adrenální osu, modulující stresové reakce. V případě stresových stimulů uvolňuje paraventriculární jádro oxytocin, což koreluje s adaptabilním chováním při habituaci vůči

stresorům (Miklósi 2009; Onaka & Takayanagi 2021). Inhibice kurzoru-kortizolu může nastoupit pozvolna (Cardoso et al. 2013), proto se mohou vysoké koncentrace slinného oxytocinu i glukokortikoidů vyskytovat současně. Pozitivní korelaci pozorovala Ogi et al. (2020) u psů, při mírně stresujícím stimulu tj. při izolaci v neznámé místnosti.

Adaptivní změny jsou podmíněny interním a externím podmínkám s pozorovanou plasticitou v oxytocinových neuronech a receptorech (Grinevich & Stoop 2018). Receptory oxytocinu v centrální amygdale projevují anxiolytickéⁱ účinky modulací její aktivity, která je zodpovědná za tlumení strachu a úzkosti. Modulace má vliv taktéž na stres vnímatvé oblasti mozku, jakými jsou hipokampus a amygdala. Exogenním podáním oxytocinu zde lze tlumit stresem podmíněnou aktivitu a modifikovat neuroendokrinní odpověď, plasticitu synapsí a hipokampem podmíněnou paměť (Grinevich & Ludwig 2021). Aktivace oxytocinových neuronů v kontextu stresové odpovědi se též účastní sympatický nervový systém, konkrétně pak katecholaminergní aferenty, přičemž projekce z katecholaminergních neuronů v prodloužené míše hraje významnou roli (Onaka & Takayaagi 2021). Tyto neurony reagují na různé stresory a jejich reakce odpovídá aktivaci oxytocinových neuronů, což naznačuje souvislost mezi nimi. Oxytocinové neurony reagují na stresory biologicky suboptimálního-stresogenního prostředí, (nebo naopak vímaného jakožto bezpečné, kdy dochází ke zklidnění), příjem potravy i sociální angažovanost a následně uvolňují oxytocin do plazmy, jenž lokálně difunduje ke vzdáleným receptorům v mozku, vyvolávající anxiolytické a pro-sociální účinky nezbytné také při adaptaci chronickému stresu (Neumann & Landgraf 2012).

Chronická expozice oxytocinu způsobuje indukovanou dysmotilitu gastrointestinálního traktu, jež se za běžných podmínek pojí s jeho aktivním působením. Rozšiřujíc svůj záběr, přebírá oxytocin, coby neurotransmitter a parakrinní hormon klíčovou roli v energetickém metabolismu, tlumení úzkosti a jakožto regulační činitel stresové odpovědi savců. Vykazuje vnímatelné účinky na amygdalu, sociální chování; při kognici druhových příslušníků, mateřsko-vazebního vztahu, sexuálními interakcemi či formování párových pout anebo při agonistickém chování mezi samci (inhibice agresivity). Je přítomen též během březosti, porodu, kojení či během reakce „boj nebo útěk“ (Zheng et al. 2010; Yoshimoto et al. 2012; Grinevich & Ludwig 2021).

Jeho širokosáhlý regulační vliv zahrnuje neuroendokrinní, autonomní nervový a imunitní systém úzce související s modulací stresové odpovědi, vyvrcholující v tlumení aktivity hypotalamicko-hypofyzární-adrenální osy, utlumení zánětlivých kaskád a tlumení chování spojeného s úzkostí (Barret 2016). Vycházející z magnocelulárních a parvocelulárních neuronů se oxytocin rozptyluje do mesencephalonu (středního mozku), medully oblongaty (prodloužené míchy) a medully spinalis (páteřní míchy), ovlivňuje škálu funkcí zahrnující regulační procesy příjmu potravy, autonomní reakce, kardiovaskulární reaktivitu, nocicepciⁱⁱ a regulaci homeostázy při adaptaci náročným behaviorálním výzvám souvisejících s úzkostí. Děje se tak v důsledku uvolňování kortikoliberinu, kdy se v případě intranazální aplikace realizuje inhibice sekrece kortikotropínu a v důsledku pak narušení sekrece kortikosteronu (Blevins et al. 2004; Onaka

ⁱ Anxiolytický hormon supresuje úzkostné a stresové stavy, podporuje relaxaci. Při symptomatické léčbě anxiolytika ovlivňují neurotransmitery, regulují nervovou aktivitu a snižují úzkostné projevy

& Takayanagi 2021). Oxytocinový systém působí jakožto adaptabilní substrát, podněcující adaptabilitu externímu prostředí, usnadňující procesy učení a významně přispívající k odolnostním kapacitám organismu. Vzájemná aktivace mezi oxytocinovým systémem a osou HPA (Feldman 2012), naznačující obousměrnou regulaci, která je ovlivněna částečně psychosociálními faktory (Dabrowska et al. 2011; Feldman & Bakermans-Kranenburg 2017).

Při výskytu stresu může oxytocin snížit hladiny kortizolu, přispívající návratu k bazálním hodnotám. Aktivní podání oxytocinu snižuje úzkostně orientované chování a podmíněný strach. Účinky oxytocinu na osu HPA zahrnují dle Romanov et al. (2017) inhibici sekrece kortikotropinu mozku, vedoucí k poklesu produkce a uvolňování kortizolu. Hormonální dráhy pro aktivaci neuronů oxytocinem zahrnují interakce s norepinefrinem, peptidem uvolňující prolaktin (PrRP) a dalšími neurotransmitery. Interakce PrRP-oxytocin je považována za potenciální místo křížového působení mezi stresem a příjmem potravy. Podání oxytocinu může inhibovat adrenokortikotropní hormon a následnou sekreci glukokortikoidů (Onaka & Takayanagi 2021; Duque-Wilckens 2020). Centrální stresová odpověď zahrnuje modulaci sekreci kortikoliberinu oxytocinem způsobem závislým na dávce, ovlivňující kortikotropiny v hypofýze prostřednictvím receptorů oxytocinu. Široká distribuce receptorů manifestují účinek v různých oblastech zapojených do reprodukčního a mateřského chování, dále pak při procesu učení, ukládání paměti či jeho posílení (Onaka & Takayanagi 2021).

Byla prokázána přítomnost receptorů pro glukokortikoidy nacházejících se v amygdale, hipokampu a hypotalamu, které zde poukazují na možnou regulaci oxytocinu kortizolem. Synergické působení kortikosteroidy vázajícího globulinu a oxytocinu v hypothalamu vypovídá o vzájemné stimulaci mezi oxytocinem a kortizolem při regulování stresových odpovědí. Oxytocin zastává v případě psů zkoumaný biomarker v oblasti neuroendokrinního a behaviorálního výzkumu, a který vzhledem ke své neinvazivní povaze přispívá k udržení žádoucího stavu welfare. (Herman et al. 2012; Dief et al. 2018; Li et al. 2019). K signifikantnímu zvýšení hladin oxytocinu dochází v důsledku aerobního zatížení, kdy je oxytocin uvolněn jádra solitárního traktu – ze shluků sensorických jader neuronů utvářejících vertikální sloupec šedé hmoty v prodloužené míše, což podněcuje aktivita parasympatického nervového systému (Lindsay 2000).

Parasympatikus reguluje srdeční tonus prostřednictvím bloudivého nervu (nervus vagus) a tlumí tak tachykardii zapříčiněnou intenzivním cvičením, což vede k autonomním modifikacím vzhledem k ovlivnění sensorickou zpětnou vazbou z baroreceptorového reflexu (příjem viscerosenzitivních podnětů) a variabilitě srdeční frekvence. Oxytocin inhibuje tachykardii způsobenou cvičením a přispívá k adaptacím pro optimální fyzickou aktivitu (Hew-Butler et al. 2008; de Jong et al. 2015; Ludyga et al. 2022). Elevované koncentrace oxytocinu byly zaznamenány (studie Rassovsky et al. 2019) vyjma vytrvalostního cvičení též v průběhu martiálních umění s vysokou intenzitou fyzické aktivity. Krátkodobé středně-náročné tréninky měly za následek významné navýšení hladin oxytocinu u dospělých mužů i žen, který přetrvával nejméně 30 minut po skončení tréninku. Prokrvení svalů při vynakládaném fyzickém výkonu doprovází exkreci adrenalinu, který kontribuje k zvýšení tachykardie a tachypnoe, kdy je do svalů

ⁱⁱ Neurohumorální odpověď při podráždění nociceptorů, vznik signalizace o bolestivém stimulu a jeho vedení nervovými vlákny do centrálního nervového systému.

větší množství kyslíku, což má pozitivní dopad na adaptabilitu spojenou s aerobní aktivitou (Lindsay 2000; Hew-Butler et al. 2008).

Salivární koncentrace oxytocinu jsou obvykle měřeny prostřednictvím enzymových imunoanalýz a dosahují pozoruhodně vyšších hodnot, než je tomu v případě člověka, což zdůrazňuje druhově podmíněných specifik pro analýzu tohoto biomarkeru (MacLean et al. 2018; Ogi et al. 2020). Validační studie White-Traut et al. (2009) vyžadovaly až čtyřnásobné koncentrace slin pro spolehlivě vypovídající hodnoty vzorků. Naměřené koncentrace v slinném médiu psů se pohybovaly v rozmezí 0,281 ng/ml a 0,694 ng/ml v případě souprav Arbor Assays a Cay-man Chemical. Analýza identických vzorků s extrakcí a bez, poskytla korelované hodnoty v případě obou užitých souprav (nicméně extrahované vzorky měly pochopitelně výrazně nižší koncentrace). Koncentrace oxytocinu jsou podmíněny cirkadiálním rytmem, přičemž vrcholu dosahují v případě krevní plazmy v průběhu světelné fáze dne a naopak k poklesu dochází během soumraku, jak je tomu prokázáno např. v případě myší. Přesná determinace vrcholové aktivity koncentrací oxytocinu však v případě psů doposud nebyla exaktně stanovena (Yamashita et al. 2013; Maclean et al. 2018).

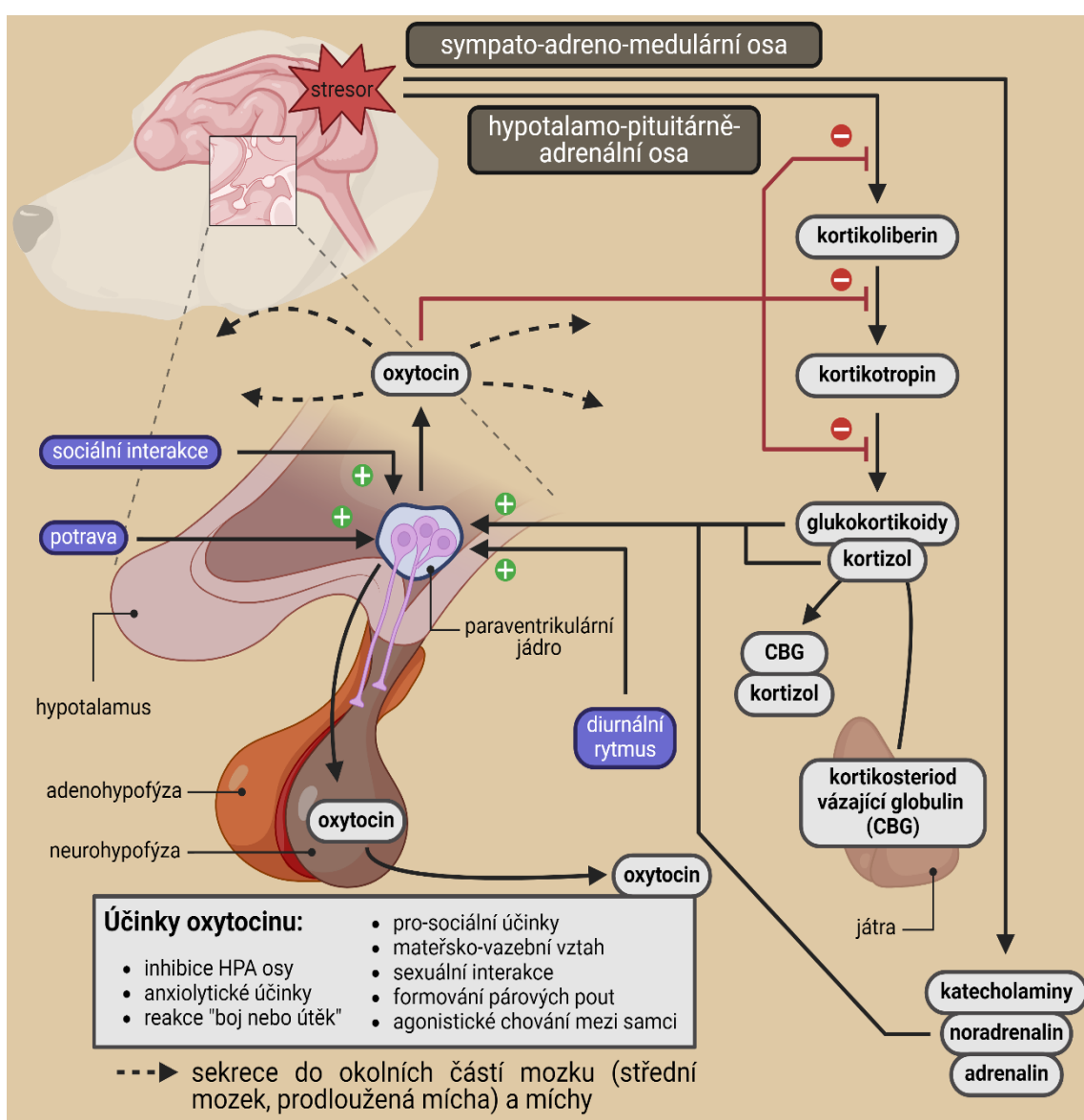
Navzdory obtížím přesného stanovení doby trvání hormonální aktivity oxytocinu při jeho maximálním vzestupu, tzv. oxytocinového peaku, detekce oxytocinu ve slinách poskytuje řadu výhod pro výzkum kognitivních a behaviorálních aspektů interspecifické komunikace ve vztahu mezi psem a člověkem (Ogi et al. 2020). Steroidní hormony v hypotalamických jádrech, glukokortikoidy, se podílejí na sekreci oxytocinu. Ty jsou sekretovány z dřeně nadledvin pod vlivem adrenokortikotropínu z předního laloku hypofýzy, jehož regulace je mediována oxytocinem a jeho receptory, především pak hypotalamickým kortikoliberinem (ilustruje diagram 2, str. 17). Na distribuci glukokortikoidů v systémovém oběhu má též impakt kortikosteroid vázající globulin, k jehož syntéze dochází v játrech, a který se podílí na stresové odpovědi v kontextu srdeční činnosti (Dief et al. 2018).

Slinné vzorkování je neinvazivní, lze ho provádět ve specifický čas a snadno jej lze provádět přímo majiteli psů v jejich přirozeném prostředí, poskytuje flexibilitu pro krátkodobé i dlouhodobé hodnocení peptidické aktivity u psů. Nutnost uchovávat vzorky při nízkých teplotách (jejich zmrazování) je zásadní pro stabilitu molekul a prevenci degradace s ohledem na zachování integrity v zájmu zajištění přesných výsledků analýz (MacLean et al. 2018). Interpretování výsledků může být obtížné, neboť centrální a periferní sekrece oxytocinu nemusí být synchronní, oxytocin je totiž uvolňován nezávisle na lokálním působení neuronů, přičemž uvolnění z dendritů vykazuje zpožděné působení oproti sekreci terminálního synaptického uzlíku (Ludwig & Leng 2008).

Fyzická aktivita, zejména vytrvalostní či dlouhodobé povahy, nikoliv krátkodobé a intenzivní povahy indukuje vzestup koncentrací oxytocinu v krevní plazmě u člověka, což zdůrazňuje jeho roli při fyzické aktivitě (Hew-Butler et al. 2008). O potenciálu oxytocinu jakožto stresového biomarkeru vypovídají též fixně ustálené vztahy (srovnatelné s navozeným poutem mezi matkou a mládětem), zahrnující blízké interakce mezi majiteli a pracovními psy, které přispívají ke snížení koncentrací kortizolu společně s krevním tlakem. Koncentrace oxytocinu v případě majitelů i psů jsou ovlivněny frekvencí a typem dotyku během interakcí a podmíněny behaviorálním kontextem

(Kotrschal et al. 2009). Psi s nižšími hladinami oxytocinu jsou častějšími recipienti při příjmu hlazení a účastní se interakcí četněji, zatímco majitelé projevují potřebu donace – navození sociální interakce. Oxytocin inhibuje uvolňování kortizolu u psů, což vede k pozitivnímu vzrušení namísto projevů stresového chování.

Majitelé s vyššími hladinami oxytocinu vykazují uklidňující účinky na své psy, což zdůrazňuje vzájemnou stimulaci hladin oxytocinu (Kotrschal et al. 2009). Hladiny oxytocinu a kortizolu jsou u obou nepříbuzných druhů modifikovány navozováním oxytocinem podmíněných interakcí s ohledem na koevoluční, symbiotickou hypotézu – což odráží komplexní vztah mezi oxytocinerní aktivitou a regulací stresu v partnerských vztazích mezi psem a člověkem (Miklósi 2009; Beetz et al. 2012). Kauzalitou ovšem může být též evoluce konvergentní, při níž by synergie hladin hormonů byla zapříčiněna analogickými selekčními tlaky.



Obr. 3: Sekrece oxytocinu při stresové odpovědi, diagram vlastní, převzato (Dief et. al. 2018).

3.6 ELISA: Imunoenzymatická detekce steroidů

Enzymová imunoanalýza EIA a imunosorbentní test enzymově vázaný s pevnou fází ELISA jsou neinvazní analytické metody s vysokou senzitivitou, kterými lze detekovat a kvantifikovat přítomnost antigenů či protilátek (analytů) obsažených v biologickém vzorku. Kolormetrický systém těchto metod detekuje analyty komplexu enzymatického substrátu a monoklonálních či polyklonálních protilátek, jejichž kombinace umožňuje vznik tzv. enzymového konjugátu (Wild 2013). Imunosorbentní test s pevnou fází, ELISA, váže protilátku s enzymem, kdežto u EIA enzymových imunoanalýz bývá protilátka navázána na tzv. label-značku, nejedná se tedy o metody se shodným principem fungování, jak bývají nežádáky mylně interpretovány (Möstl et al. 2005). Metodu ELISA lze použít jednak pro kvalitativní, jednak pro kvantitativní stanovení (Hayrapetyan et al. 2023). Metoda je založena na specifické interakci antigen-protilátka a následné detekci této interakce pomocí enzymové reakce, která produkuje měřitelný signál (Wild 2013). Na procesu interakce antigen-protilátka či protilátka-protilátka se podílí van der Waalsovy síly, Coulombovy interakce a vodíkové můstky. Vlastní afinita k vazbě antigen-protilátka bývá taktéž podmíněna mnoha dalšími faktory včetně pH, teploty, iontové síly roztoku, koncentrací a typem detergentu a koncentrací dalších přítomných makromolekul (Wild 2013).

Za nezbytné složky imunosorbentních metod bývají (Matson 2023) považovány: pevná fáze plnící imunosorbentní funkci, analyt ve vzorku, detekční protilátka identifikující takový komplex antigen-protilátka, k němuž má detekční protilátka taktéž vazebnou afinitu. Determinujícím principem pro vývoj imunosorbentních testů spočívá právě ve vzájemné afinitě interagujících činidel (Brown et al. 2004). Detekční protilátky jsou značeny vybraným enzymem, konjugovaným, jenž při detekční fázi mění přidaný substrát na barevný produkt. Výsledné zbarvení lze detekovat spektrofotricky či luminometrem (Möstl et al. 2005; Crowther 2009; Ayidin 2015; Shah & Manghsoudlou 2016). Pro spolehlivé prokázání analytu ve studovaném vzorku se hojně využívá konjugovaných enzymů coby markerů – alkalická fosfatáza a křenová peroxidáza. Principem vizualizace s použitím alkalické fosfatázy je odstranění fosfátové skupiny ze substrátu (4-nitrofenylfosfát), čímž vzniká žlutě zbarvený produkt (p-nitrofenol), kdežto u křenové peroxidázy je substrát (nejčastěji tetramethylbenzidin) oxidován v přítomnosti H_2O_2 na barevný produkt. Oxidace substrátu musí být však zastavena přidávkem kyseliny. Kyselé prostředí rovněž stabilizuje výsledný barevný produkt (Crowther 2009; Wild 2013).

3.6.1 Enzymově vázaná imunosorbentní analýza (ELISA), uspořádání

ELISA může být členěna a klasifikována do několika typů konfigurací: přímé, nepřímé a sendvičové uspořádání (viz obrázek 4A). U každého typu konfigurace se mohou vyskytovat jemné nuance v užití komponent, modifikace determinující specifické využití v praxi (Matson 2023). Během přímé ELISA (viz obrázek 4B) je antigen přímo adsorbován na povrch mikrotitrační destičky. Protilátka proti cílovému antigenu s konjugovaným enzymem je poté přidána. Následně je přidán substrát, jenž je pomocí konjugovaného enzymu přeměněn na barevný produkt. Intenzita tohoto signálu je měřena nejčastěji spektrofotricky. Mezi výhody této metody patří především jednoduchost a rychlost, protože se vyžaduje méně inkubačních a promývacích kroků. Zároveň je menší riziko křížové reaktivity, protože je použita

pouze jedna protilátka. Velkou nevýhodou této metody je však nižší citlivost v porovnání s nepřímou a sendvičovou ELISA konfigurací, protože nedochází k amplifikaci signálu.

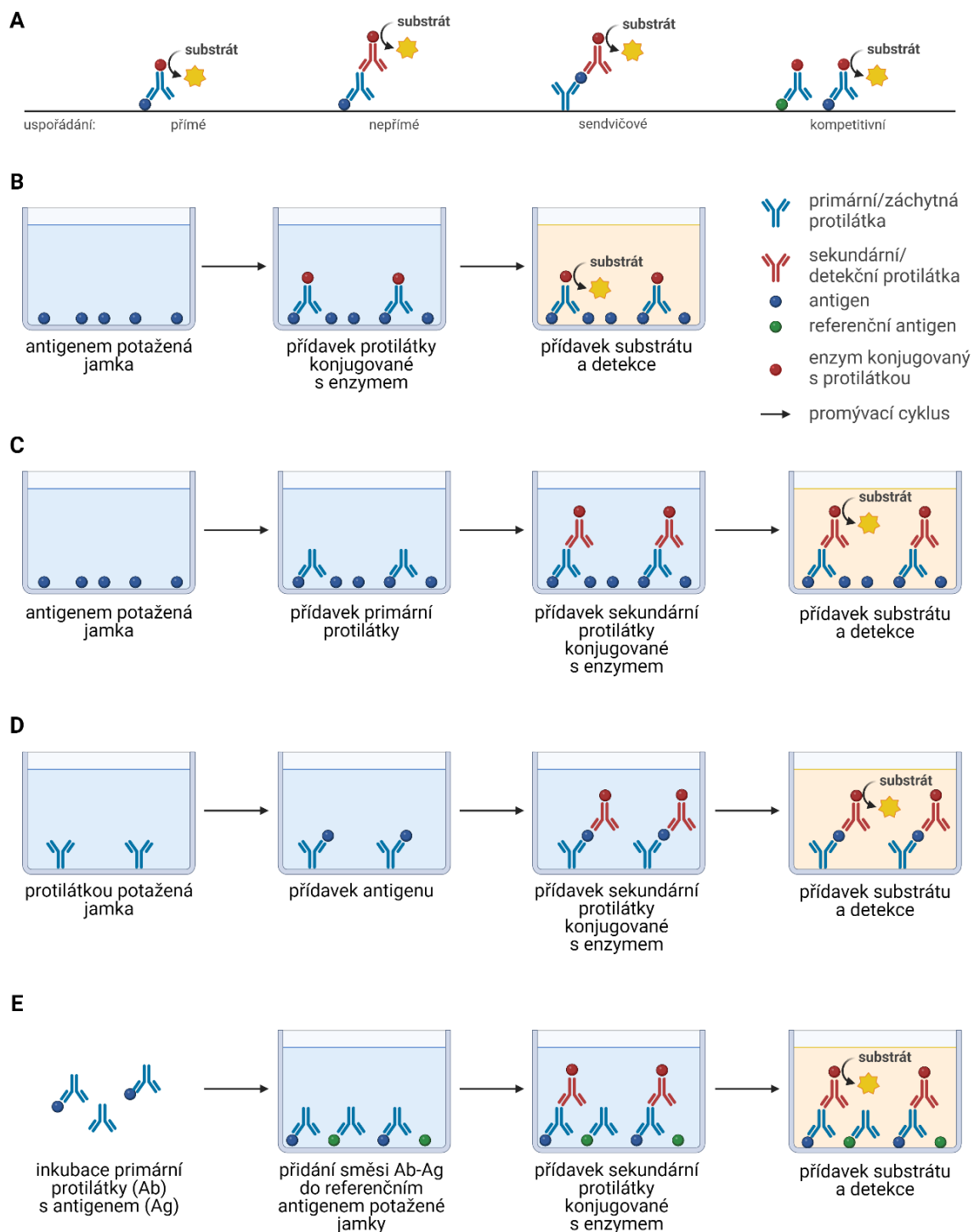
Nepřímé uspořádání (viz obrázek 4C) využívá dvě různé protilátky (primární a sekundární). Primární protilátka je specifická pro antigen, jímž je potažena mikrotitrační deska, sekundární protilátka je specifická vůči primární protilátce a obsahuje konjugovaný enzym. Díky sekundární protilátce dochází k amplifikaci signálu, čímž má tato metoda vyšší citlivost než přímé uspořádání. Na druhou stranu je zde vyšší riziko nespecifické vazby díky použití dvou různých protilátek časová náročnost díky vícekrokovým inkubacím a promýváním.

Sendvičové uspořádání (viz obrázek 4D) je založeno na použití dvou různých protilátek specifických pro různé epitopy stejného antigenu. První protilátka (záchytná) je imobilizovaná na povrch mikrotitrační destičky na níž se váže antigen ze vzorku. Poté se váže druhá protilátka (detekční), která je konjugována s enzymem. Tato konfigurace umožňuje velmi specifickou a citlivou detekci antigenu. Lze tedy daný antigen stanovit kvalitativně i kvantitativně. Metoda je vhodná pro vzorky se složitou maticí makromolekul. Metoda je však technicky náročná a časově nákladná. (Jianwen 2013; Hayrapetyan et al. 2023). Nepřímé a sendvičové konfigurace lze určitým způsobem modifikovat. Nejčastější modifikací těchto metod je využití tzv. kompetitivní uspořádání (Hayrapetyan et al. 2023).

3.6.2 Kompetitivní uspořádání imunosorbentní ELISAy

Principem ELISA v kompetitivním (též inhibičním) uspořádání je kompetice antigenu s předem definovaným množstvím stejného, ale značeného, antigenu (tzv. stopovacího) o vazbu na specifické protilátce, která je v omezeném množství (Jianwen 2013; Shah & Manghsoudlou 2016; Hayrapetyan et al. 2023). Tato metoda umožňuje detekci malých molekul, jako jsou hormony, steroidy, toxiny, kde není možné použít klasické nepřímé či sendvičové uspořádání (Lequin 2005; Engvall 2010). Díky kompetici o vazebná místa vykazuje kompetitivní uspořádání vysokou specifičnost, avšak nižší citlivost ve srovnání s nepřímým a sendvičovým uspořádáním. Pro účel této diplomové práce byla nepřímou ELISA v kompetitivním uspořádáním (princip viz obrázek 4E) detekce a kvantifikace kortizolu a oxytocinu ze psích (*Canis lupus familiaris*) slin (tzv. salivární kortizol/oxytocin).

Nespornou výhodou odebrání salivárního kortizolu či oxytocinu oproti plazmatickému je neinvazivní způsob odběru vzorku, který se aplikuje především v oblastech výzkumu behaviorální ekologie, biomedicínských oborech ale i v rámci managementu chovu domácích i divokých zvířat a je v souladu s dodržením nezbytných principů pro zachování psychického a fyzického stavu odebíraného zvířete, jeho welfare (Kobelt et al. 2003; Bennet & Hayssen 2010; Palme 2012). Zkoumán bývá především fyziologický stres, který mnohdy bývá zodpovědný za vychýlení z rovnovážného stavu homeostázy studovaného organismu (Palme 2012).



Obr. 4: Konfigurace enzymově vázaného imunosorbentního testu (ELISA). A) Přehled ELISA typů konfigurací, B) princip přímého uspořádání, C) princip nepřímého uspořádání, D) princip sendvičového uspořádání a E) princip kompetitivního nepřímého uspořádání. Modifikováno (Alahi & Mukhopadhyay 2017, Boster Biological Technology 2023). Vytvořeno v biorenderu.

Sběr salivárních vzorků a termometrie psů této diplomové práce byly realizovány při příležitosti účasti v projektu „Evaluace a zvýšení připravenosti pátracích týmů využívaných při pátrání po pohřešovaných osobách v terénu“ s označením „Pátrač II“, uskutečněným katedrou etologie a zájmových chovů ČZU v Praze a dotovaným grantem ministerstva vnitra ČR vedeným jako VK01020018.

Byla stanovena standardizovaná zátěžová procedura pro dosažení fyzické připravenosti psů při absolvování terénních cvičení zvolených lokalit. Tato cvičení byla zřízena v souladu s dosavadními poznatky o pracovního režimu a fyziologických limitech psů (především jejich čichového potenciálu), coby vysoce efektivního pátracího prostředku, a jejich psovodů z řad Horské záchranné služby ČR, Policie ČR, Hasičů a dobrovolnických kynologických brigád, díky jejichž spoluúčasti byl odběr vzorků umožněn.

4.1 Experimentální prostředí standardizovaného zatížení

Samotné tratě terénních cvičení byly designovány tak, aby imitovaly reálné nasazení a rozličné terestrické podmínky operací plošného vyhledávání pohřešovaných osob, které jakožto figuranti personifikovali studenti České zemědělské univerzity. Tyto tratě byly navrženy v souladu s posouzením vedoucího terénních cvičení a lektora analogických zátěžových podmínek, kpt. Ing. Vladimírem Makešem, Krajského ředitelství policie Královohradeckého kraje.

Slinné vzorky společně s tělesnými teplotami byly psům odebrány v etapách testační zátěžové trasy podle synchronního harmonogramu, jež byla psy absolvována během června 2023, a která též posloužila jakožto stabilizační prostředek stanovené metodiky pro odběr těchto vzorků. Po validaci odběrové metodologie byla následně uskutečněna dvě řádná cvičení konaná v červenci a říjnu téhož roku, jejichž charakteristiky shrnuje tabulka 1, str 28. Během terénních cvičení byl každý ze psů snímán GPS lokátorem Garming Astro 230 v rámci opakovaných segmentů navržené trasy, kdy tento geolokační přístroj zaznamenával polohu v podobě pozičních bodů pro každého sledovaného psa.

Tabulka 1: Lokality tratí a jejich příslušné charakteristiky

TERMÍN	LOKALITA	KRAJ	PRŮM. ROZLOHA TRASY
7. – 9. 6. 2023	Česká Kubice	Plzeňský	75 ha
11. – 13. 7. 2023	Dobrotice	Zlínský	88,75 ha
3. – 5. 10. 2023	Hamry u Plumlova	Olomoucký	186 ha

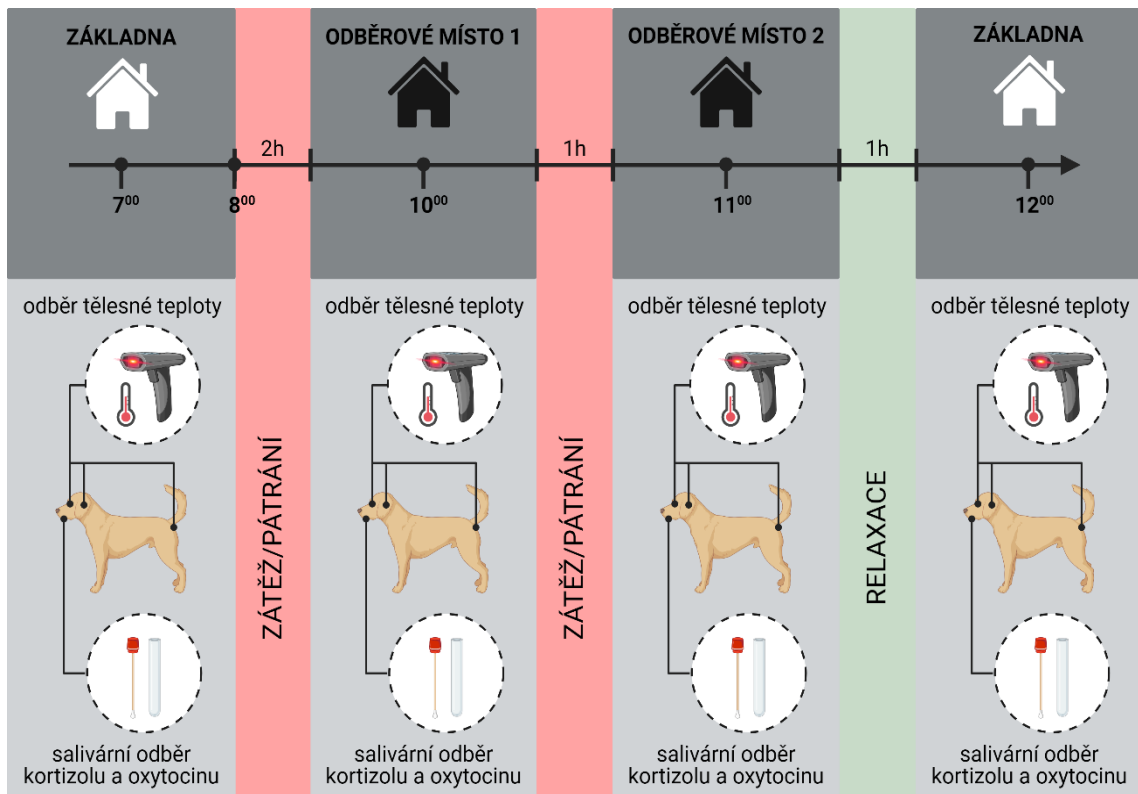
Kompletní dataset umožnil analýzu fyzického a mentálního zatížení psů s ohledem na informace zakomponované v těchto bodech, který obsahoval: vzdálenostní úsek každých dvou za sebou jdoucích bodů, zaznamenaný čas pro každý z pozičních bodů (hh:mm:ss), průměrnou či maximální rychlost vyvinutou během uražené mezibodové vzdálenosti (m/s), geografické souřadnice vycházející ze systému WGS-84 (zeměpisná délka, šířka, výška) a též teplotu vzduchu (°C) skrze čidla připevněná k obojkům propojená Bluetooth rozhraním s GPS přijímači. Stažením dat do softwarového rozhraní volně dostupných programů Garmin BaseCamp (GARMIN®, Schaffhausen, Švýcarsko) společně s multiplatformním geografickým informačním systémem ArcGIS 10.4. (Esri, Redlands, U.S.A) byla poté přidružena data:

i) uražená vzdálenost (množství překonaných kilometrů) ii) rozloha trasy (ha), iii) počáteční a konečný čas (hh:mm:ss), iv) souhrnný čas překonání trasy, v) dílčí doba strávená pohybovou aktivitou, vi) doba bez vykonávání pohybu (např. čichání, rozhlížení se, setrvání v nehybnosti, sumování), vii) průměrná a maximální rychlosti (km/h) dosažené na trati, viii) nejnížší a nejvyšší nadmořská výška geografického umístění (m. n. m.), ix) počet vzestoupaných a sestoupaných metrů. Získaná data byla po exportaci do tabulkového procesoru Microsoft Excel dodatečně upravena pro potřeby statistického vyhodnocení.

4.1.1 Harmonizované zatížení, kategorizace tras

Kolekce veškerých fyziologických dat byla provedena na homogenně navržených trasách terénních cvičení, pokaždé v příslušné lokalitě. Trasy byly rozčleněny dle polohových pozičních bodů reprezentujících synchronicitu z hlediska časové a tudíž i pohybové náročnosti pro jejich překonání.

Trasy byly vždy systematicky absolvovány před samotnou operací, čímž došlo k jejich integraci do GPS lokátorů později přidělených kynologickým pátracím týmům s cílem udržet standardizovanou zátěž pro každý případ cvičení a současně podrobit každou z nich dřívějšímu otestování. Během těchto průchodů byly pečlivě zaznamenány orientační geografické body a následně integrovány do GPS lokátorů, které byly k dispozici každému pátracímu týmu, sestávajícímu z psovoda a psa. Tyto informace sloužily pátracím týmům k orientaci při simulaci pátrání a plnění zátěžové operace. Každý z pátracích týmů překonal simulované pátrání po pohřešovaných osobách, což zahrnovalo harmonizované pracovní zatížení během tříhodinového průchodu trasou. Tato simulace zahrnovala několik odpočinkových intervalů, včetně navštívení dvou stanovišť pro odběr salivárních vzorků a měření tělesných teplot v terénu. Další odběry byly provedeny v ranních hodinách, před zahájením zátěžové operace a také



Obr. 5: Harmonizovaný sběr salivárních vzorků. Schéma postupu a rozvržení odběrů při provádění experimentální procedury – standardizované zátěže. Vytvořeno v biorenderu.

bezprostředně po jejím ukončení v návaznosti na relaxační periodou psa. Harmonizace pro sběr fyziologických dat umožňuje komparování parametrů zátěže na psa vzhledem ke stavu předcházejícímu a stavu bezprostředně následujícím stavu psa vzhledem k pohybové aktivitě během propátrávání zátěžových segmentů po náročném výkonu (po náležitém odpočinku) s ohledem na faktory fyzické únavy a motivaci k výkonu.

Během této činnosti byl každý tým pověřen provedením několika kontrolních značení v třech samostatných segmentech, které byly analogicky náročné pro překonání z hlediska časového distribuce. Úspěšné nalezení pohřešované osoby bylo potvrzeno intenzivním štěkotem. Každému týmu byla svěřena úloha propátrat trasu v přiděleném terénu s různorodými podmínkami vegetačního krytu a rozlišnou průchodností.

Distribuce povinných přestávek byla provedena v souladu s nezbytným odpočinkem mezi zátěžovými segmenty, zahrnující kontrolní značení a salivární odběry na dvou předem určených odběrových stanovištích (viz obr. 5, harmonogram zátěže). Před samotným pátráním obdržely týmy pořadím podmíněný index, který determinoval startovní pozici. Konečný čas se odvíjel v závislosti na rychlosti, přesnosti průchodu a úspěšnosti označení individuálních figurantů. Trať byla dokončena na druhém odběrovém stanovišti s fyziologickým realizačním týmem. Po návštěvě tohoto stanoviště psovod oznámil svou konečnou pozici na základně a následně se uchýlil se psem k odpočinku, čímž byla zátěžová trať ukončena. Kynologické pátrací

týmy byly předem informovány pouze o přítomnosti figurujících pohřešovaných osob, avšak nebyly jim poskytnuty informace o jejich konečném počtu. Tím bylo zajištěno, že týmy budou udržovány v terénní simulaci co nejvěrněji odpovídající podmínkám reálného nasazení.

4.1.2 Klasifikace reliéfu, intenzita vegetačního krytu

Během terénního průzkumu byly pozorovány významné variace reliéfu, překonaného převýšení a vegetačního pokryvu v závislosti na konkrétní lokalitě, a tudíž i náročnosti na fyzický výkon psa pro překonání vzestupu či sestupu té které nadmořské výšky. K posouzení obtížnosti průchodu byl stanoven vegetační index, který umožňuje komparovat vybrané segmenty terénních cvičení a také mezi nimi, v rámci jedné trasy.

K designování trasy vyžival vůdčí cvičení současný stav vegetace příslušné lokality k identifikaci vhodné plochy pro zvolení každého segmentu. Segmenty v obtížně prostupných terénech byly přiřazeny menší plochou ve srovnání se segmenty umístěnými v lokalitách snadněji prostupných. Pro účely této diplomové práce byla stanovena míra prostupnosti vegetačního pokryvu vycházející ze subjektivního posouzení vůdčího cvičení s klasifikací do třístupňového modelu, přičemž číselný kodex znázorňuje náročnost prostupu terénem, kdy;

1OT – otevřená krajina, relativně snadná prostupnost, přes 2MP – mírný porost, s adekvátním manévrovacím prostorem, až po 3HP – hustý porost, kompaktní reliéf vyžadující zvýšenou námahu a pozornost. Přidružená písmena pak determinují náležitost segmentů konané trasy k příslušné lokalitě. Kategorizaci integruje tabulka třístupňového modelu intenzity vegetace.

Tabulka 2: Kategorizace třístupňového modelu intenzity vegetace

1 Otevřená krajina (OT)

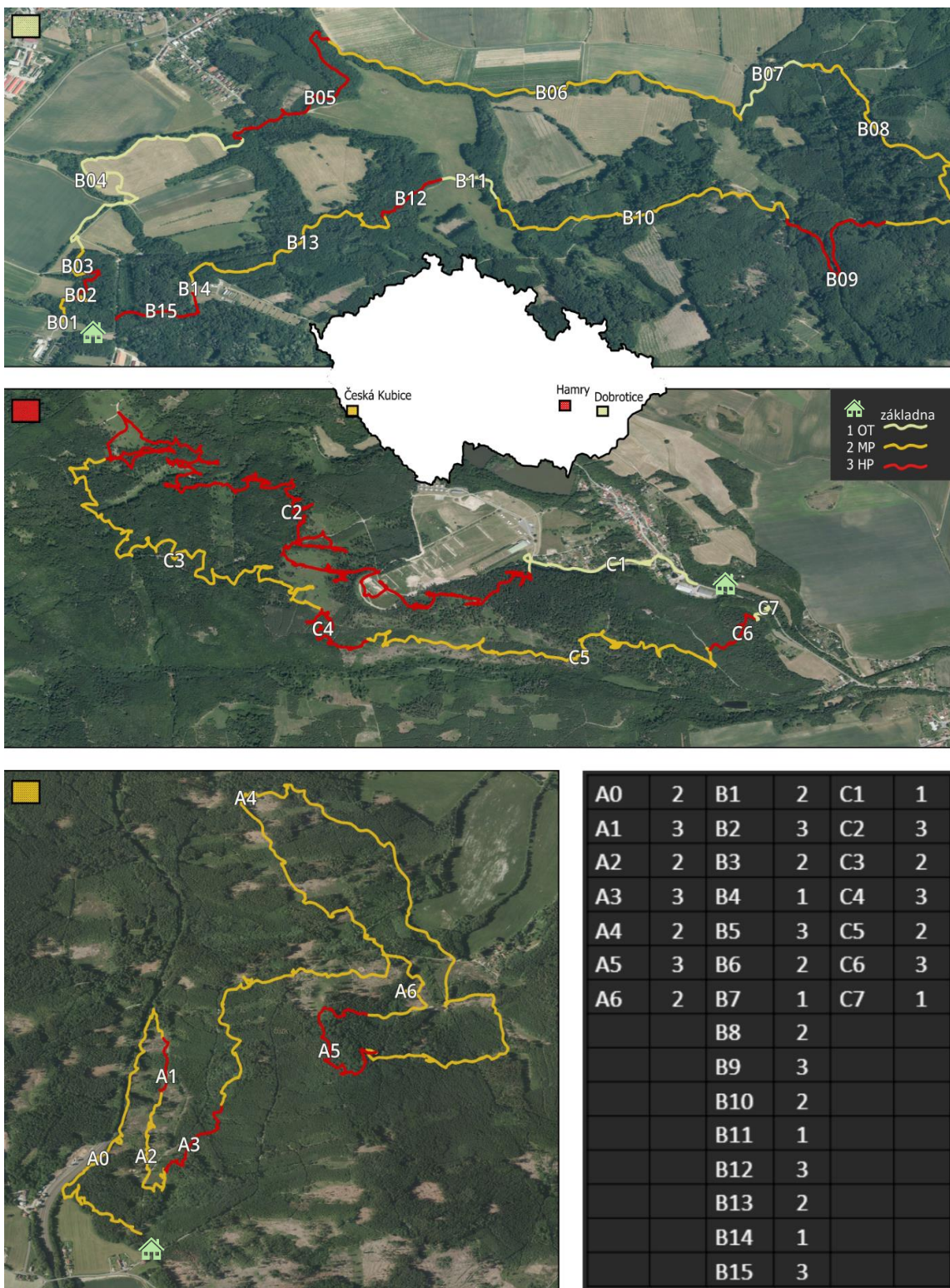
Reprezentuje úseky tras, charakterizované dominancí převážně otevřeného reliéfu bez výrazné vegetace či porostu. Tato topografie zahrnuje např. travnaté pláně, cesty, louky, vysoký les a pastviny s absencí husté vegetace, což utváří optimální podmínky pro snadný průchod a maximální vizuální přehlednost.

2 Mírný porost (MP)

Trasy s mírným porostem keřů a stromů, jejichž hustota není nadměrná. Tento typ terénu umožňuje relativně snadnou průchodnost a poskytuje adekvátní manévrovací prostor. Jedná se zejména o lesní cesty s omezeným porostem, občasným výskytem skupin stromů a keřů, bez výrazné vegetace.

3 Hustý porost (HP)

Identifikuje úseky tras, které vedou kompaktním lesem a pravidelným stromovým porostem, čímž vytváří náročné podmínky pro průchod. Tyto úseky charakterizuje vysoká koncentrace stromů a keřů, což může negativně ovlivnit vizuální percepci a pohyblivost. Jedná se o úseky tras vedoucí hustým lesem, mlázím, porosty s nízkými větvemi a koncentrovaným podrostem, kde průchod vyžaduje zvýšenou pozornost a fyzickou námahu členitým reliéfem.



Obr. 6: Kategorizace segmentů tras pohybové aktivity psa vybraných lokalit na zákl. třístuňový modelu náročnosti prostupu. Segmenty A1-7 (Česká Kubice), B1-15 (Dobrotice), C1-7 (Hamry u Plumlova). Žlutá linie – otevřená krajina (1OT), oranžová linie – mírný porost (2MP), červená linie – hustý porost (3HP).

4.1.3 Termometrický profil – diverzita jednotlivých lokalit

S účelem analýzy pohybové aktivity psa a tudíž i vynaložené fyzické zdatnosti byla zvolena jakožto potenciálně klíčový faktor, jenž by mohl mít významný dopad na fyzickou aktivitu a výkonnost psů ambientní teplota vzduchu. Tato selekce vychází z dřívějších výzkumných studií, např. práce Robbins et al. (2017), anebo Spoo et al. (2015), které explicitně zdůrazňují potenciální vliv této proměnné na pohybovou aktivitu a fyzickou zátěž psů.

Pro detailní analýzu byly v překonaných segmentech tras měřeny teploty vzduchu (°C), přičemž k tomu sloužil GPS lokátor připevněný na obojek zvířete. Z naměřených hodnot byl následně vypočten průměr teploty překonané trasy pro každou lokalitu, s dodatečným zaznamenáním minimálních (15,6°C) a maximálních (22,59 °C) teplotních hodnot (viz Tabulka 3, níže):

Tabulka 3: Teplotní profil a diverzita terénního cvičení příslušné lokality

LOKALITA	PRŮM. TEPLOTA	MINIMÁLNÍ T	MAXIMÁLNÍ T	SMĚR. ODCHYLKA
Česká Kubice	19,47 °C	16,1 °C	21,4 °C	± 2,65
Dobrotice	22,59 °C	19,9 °C	26,8 °C	± 2,10
Hamry u Plumlova	17,61 °C	15,6 °C	21,18 °C	± 1,51

Tabulka 4: Parametry zúčastněných subjektů

	ZÚČASTNĚNÉ SUBJEKTY (pes/fena)	PRŮMĚRNÝ VĚK	PLEMENO NEJČETNĚJI	ATESTACE ano/ne
Česká Kubice	3 (1/2)	6,3 let	BO (67%)	2/1
Dobrotice	7 (6/1)	6,6 let	BO (57 %)	6/1
Hamry u Plumlova	8 (5/3)	5,1 let	NKO (38%)	5/3

4.2 Zúčastněné subjekty, predispozice k pátrání

Terénní cvičení byla konána v červnu až říjnu 2023—Pro tuto diplomovou práci bylo vybráno 18 pátracích psů, z toho 6 fen. Zúčastněné feny se při účasti na terénních cvičení nenechávaly v průběhu estru. Analyzovaní psi náleželi do věkové škály 2 až 9 let, z čehož průměrný věk byl $5,8 \pm 1,7$ let. Terénních cvičení se zúčastnili příslušníci převážně ovčáckých plemen (Belgický ovčák Malinois (BO), Německý ovčák, Australský ovčák, Australská Kelpie), lovečtí a pracovní psi (Knírač velký, Německý krátkosrstý ohař (NKO), Louisianský leopardí pes). Nejčteněji bylo zastoupeno plemeno Belgický ovčák. Výzkumný soubor zahrnoval psy s praktickou zkušeností v plošném pátrání po pohřešovaných osobách, z nichž někteří měli atestaci MVČR.

4.3 Odběry tělesné teploty a salivárních vzorků

Fyziologická data byla nasbírána v souladu s realizací pevně synchronního harmonogramu. Nejprve probíhal sběr před zahájením pátrání v přidělených segmentech dané lokality na základně. Poté následovaly odběry dat na dvou určených místech za účasti dříve instruovaného fyziologického týmu. Poslední fáze probíhala opět na základně, po skončení pátracího procesu a po uplynutí nezbytné doby pro obnovu relaxovaného stavu psa a návratu hormonálních hodnot k jejich bazálním hodnotám homeostázy v klidovém režimu.

Kvantifikace tělesné teploty psů byla provedena prostřednictvím dvou tympanálních-ušních teploměrů; digitálního s infračerveným paprskem (Sanitas SFT 53, Sanitas Fühlhómerő, Německo) a klinickým (Genius™ 3, COVIDIEN, Dublin, Irsko) určeným do zevního zvukovodu a měřným rozsahem 33,0 °C - 42,0 °C. Tyto obecně vzato spolehlivé přístroje (Hall et al. 2018) sloužily k identifikaci potenciální hypertermie či teplotního stresu psů během fyzického zatížení či dokonce přetížení (snímání tělesné teploty, viz obr. 8, níže). Bylo dbáno na sterilizaci senzorů nasazením nového jednorázového krytu vždy mezi jednotlivými odebíranými zvířaty.

Tyto teploměry, v souladu s poznatky literatury (např. Yanmaz et al. 2015) byly využity jako nejspolehlivější, avšak i ty mohou vykazovat nízkou shodu s rektálním měřením s ohledem na nekonzistenci u přehnaně osrstěné partie psa, při špatném kalibrování či nevhodném přiložení snímačů k ušnímu kanálu. (Evans & Lahunta 2012; Cannas et al. 2018; Hall & Carter 2017; Carter & Hall 2018). Nekonzistenci měření může navíc ovlivnit faktor neznámého prostředí, jakožto poplachová reakce, a odlišné plemenné parametry uší (Cugmas et al. 2020). Pro ověření validity



(autor: Ing. Josef Růžička)

Obr. 8: Snímání termálního okna; zevního sluchovodu psa, měřeno tympanálním teploměrem.

našich výsledků jsme rovněž zařadili bezkontaktní infračervený teploměr A200 od výrobce Rohson, jehož měřící rozsah byl od 32,0 °C do 42,9 °C s přesností mezi 0,3 °C a 0,6 °C. Tento interval zahrnuje fyziologické teplotní rozmezí psů: 37,5 °C a 39,0 °C. Salivární vzorky byly u psů extrahovány v souladu s konvenční procedurou, která respektovala standard Cobbs et al. (2016), pomocí tamponů Sarstedt® Salivette Cortisol (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Německo). Odběr byl pečlivě harmonizován, vždy koncipován po sejmutí tělesných teplot psa. Sliny byly odebrány do zkumavek Salivette® (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Německo), na které byly pro tyto účely předem zaznamenány časové údaje o odběru a identifikační index lihovým nesmývatelným fixem, pro pozdější identifikaci jednotlivých psů. Veškeré odběry byly provedeny bez dřívější konzumace potravy.

Samotný proces extrakce slin prováděl psovod za asistence fyziologického týmu, přičemž postup odběru byl předem demonstrován prostřednictvím instruktážního videa. Specifický tampon byl vyjmut ze zkumavky a postupně v třífázovém třicetivteřinovém intervalu (s postupným prostřídáním 3x 30 s) veden bokem tlamy psa vně dentice (extrakce slin, viz obr. 7, níže). Následně byl tampon navrácen do zkumavky a bezprostředně umístěn do uzavíratelného ZIP sáčku, který byl pak umístěn do dvoustěnné vakuované izolační termoláhve (Thermos Mountain FFX 0,9l, Thermos LLC, Schaumburg, Illinois, USA). Tato termoláhev byla vždy okamžitě umístěna do polystyrenového termoboxu obsahujícího gelové chladicí sáčky. Extrahované sliny byly bezodkladně uschovány do kompresorové automrazničky (Engel Coolers® MT35F-U1-P, Engel Coolers, Jupiter, Florida, USA) s chladícími kondenzátory. Tyto vzorky byly udržovány v kontinutálně chlazeném stavu při výchozí teplotě - 18 °C a transportovány pro extrakci pod laboratorními podmínkami metodou ELISA. Konečný vzorek laboratorně analyzovaných psů byl determinován takovými subjekty, které si bez zjevného



(autor: Ing. Josef Růžička)

Obr. 7: Extrakce slin tamponem Sarstedt za účelem analýzy koncentrace kortizolu a oxytocinu

odporu nechaly při aplikaci tamponu do tlamy pomocí procedury (3x30s), a jež uvolnili dostatečné hladiny slin k pozdější analýze bez příměsi krve.

4.4 Stanovení koncentrací kortizolu a oxytocinu, princip ELISAY

Diagnostická, in vitro kvantitativní detekce aktivní frakce volného kortizolu (hydrokortizonu a hydroxykortikosteronu), stejně jako detekce oxytocinu ve slinách psů byla realizována byla společně s detekcí salivárních vzorků společně s detekcí jejich koncentrací byla realizována užitím komerčních souprav-kitů DRG Salivary Cortisol ELISA kit SLV-2930 (DRG Instruments GmbH, Frauenbergstraße, Německo) a Oxytocin ELISA kit, FineTest®(Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Čína) enzymově imunisorbentních testů na pevné fázi, založených na principu kompetitivní vazby. Oba testy disponují vysokou citlivostí a specifitou pro detekci, nebyly pozorovány významné zkřížené reaktivity či interference mezi detekovanými hormony a analogy.

Enzymově imunisorbentní testy byly provedeny na předem potažených mikrotitračních destičkách typu F96 MaxiSorp (Nunc, Dánsko) s monoklonální protilátkou, jež se přímo váže k adsorbovanému antigenu – molekule kortizolu či oxytocinu. Endogenní kortizol či oxytocin se účastní, společně s konjugáty kortizolu a křenové peroxidázy kompetice na pevné fázi o vazbu na biotinylovanou detekční protilátku, kdy první tzv. záchytná protilátka váže label (označený hormon), peroxidázový konjugát. Přebytečný konjugát křenové peroxidázy-enzymu a streptavidinu (komplex streptavidin-biotin) a nenavázané vzorky byly po inkubaci vymyty, přičemž do každé z jamek byl přidán substrátový roztok (200 μ l) protein HRP-Streptavidin (SABC) při stanovení kortizolu. K naředění promývacího roztoku (30 ml) byla použita deionizovaná voda (1170 ml).

K zástavě enzymatických reakcí každé jamky bylo užito 100 μ l stopovacího roztoku v závislosti na vývoji zbarvení. Navázaný konjugát peroxidázy je inverzně zbarven vůči koncentraci kortizolu ve slinném vzorku psa, neboť množství navázaného konjugátu peroxidázy je nepřímě úměrné koncentraci kortizolu ve vzorku (IISBR 2023). Pro oxytocin byl do každé jamky přidán substrátový roztok tetrametylbenzidinu. Po proběhnutí reakce substrátu s enzymem byl přidán stop-roztok kyseliny sírové a následně spektrofotometricky (čtečka mikrodestiček Biotec©) determinována optická hustota při zvolené intenzitě 1,0 na základě zbarvení. Konečná koncentrace oxytocinu se ve vzorku stanoví komparováním se standardní křivkou. Veškeré roztoky i pufrы byly připraveny v souladu s protokolem výrobce protilátek a konjugátů dr. Coralie Mundro (Clinical Endocrinology Laboratory, University of Californie, Davis, USA). Nakonec byla stanovena absorbance každé jamky při vlnové délce 450 nm využitím čtečky mikrotitračních destiček (Biotec©).

4.4.1. Optimalizované koncentrace protilátek a konjugátů

Stanovením vhodných faktorů ředění vzorku a detekčních protilátek s konjugáty lze získat optimální poměr koncentrací absorbancemi v kontrolních jamkách, při zachování žádoucí úrovně senzitivity imunisorbentního testu. V souladu s metodikou Hodges a Heistermann (2011) byla vytvořena sériovým ředěním vhodná koncentrace konjugátů a záchytných protilátek pro změření hladin obou hormonů. Současné posouzení těchto dvou proměnných sériovým ředěním jamek pufrem s různým poměrem vzorku a pufrem pro ředění protilátky bylo zjištěno optimální nejen

optimální koncentrace každého z reagentů, ale také ideální poměr koncentrací. Na základě této procedury, tzv. "checkerboard titration" lze docílit jejím aplikováním náležitě senzitivity prováděné analýzy. Kvantifikovatelné koncentrace detekčních protilátek tak bylo dosaženo touto kontrolní titrací, přičemž sloupce obsahovaly faktory ředění protilátek a řádky faktory ředění vzorků.

4.4.2. Dispozice standardů hormonů, kalibrační křivka

4.4.2.1 Postup laboratorní analýzy oxytocinu

Salivární vzorky oxytocinu byly ve zkumavkách Salivette® Cortisol (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Německo) centrifugovány prostřednictvím Hettich Zentrifugen D-78532 (Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo) a Labnet Hermler Z 233 MK-2 (Hermler Labor Technik GmbH, Wehingen, Německo) při teplotě 15 °C, rychlosti 3000 RPM po dobu 15 min za účelem urychlení sedimentace. Po centrifugaci byl přepipetován odstředěný supernatant do Eppendorf PhysioCare Concept® (Eppendorf AG, Hamburg, Německo) mikrozkušavky, jež byl zmrazen při teplotě -16 °C. Ke standardnímu roztoku bylo přidáno 1 ml pufru pro zředění vzorku, posléze byl roztok inkubován 10 minut při pokojové teplotě a vzápětí vortexován. Z tohoto roztoku byly následně naředěny kalibrační roztoky pipetou Eppendorf SE, Research®Plus (Eppendorf AG, Hamburg, Německo) dvojkovou řadou. Do první zkumavky bylo integrováno 0,3 ml standardního roztoku (z nulové zkumavky) společně s 0,3 ml pufru ředícího oxytocin, následně byl roztok precizně smísen a naředěn za účelem sestavení standardní křivky. Na základě experimentu ředícího faktoru byla získána oxytocinová standardní křivka s rozsahem od 1 ng/ml až po 0,015625 ng/ml, která korespondovala s optimálním rozsahem detekční soupravy, přičemž testovaný vzorek byl vždy důkladně pomíchán s ředícím pufrem. Výsledná křivka standardních roztoků se tak pohybovala ve škále: 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,125 ng/ml, 0,0625 ng/ml, 0,03125 ng/ml, 0,015625 ng/ml a blank jamka bez barvy 0 ng/ml. Na jejím základě byla měřena koncentrace extrahovaných vzorků. Vzorky s obsahem krve byly během procesu selektovány a následně vyřazeny z analýzy.

Na mikrodestičky byly pipetovány po 50 µl/jamku standardní roztoky, extrahované vzorky oxytocinu, ředící pufr HRP-Streptavidin (SABC) a blank ke kalibraci, přičemž u každého extrahovaného vzorku salivárního oxytocinu byl provedeno ředění 1:5. Do každé jamky bylo bezprostředně přidáno 50 µl dříve připraveného konjugátu zředěného (HRP-Streptavidin) protilátky značené biotinem s pufrem ředícím protilátky v poměru 1:100, poté byly jamky inkubovány při 37 °C po dobu 45 minut. Standardní vzorky posloužili k indukci zástavy barevné reakce. Po aspiraci byly vzorky celkem třikrát promyty promývacím pufrem. Následně bylo pipetováno 100 µl konjugátu křenové peroxidázy-streptavidin v poměru 1:100. Mikrotitrační deska byla inkubována 30 minut při 37 °C. Po pěti promývacích cyklech bylo přidáno 90 µl roztoku substrátu TMB, (tetramethylbenzidinu), jež byl inkubován 20 minut při 37 °C až do zjevné vizualizace gradientu. Po integraci 50 µl stop roztoku byla měřena spektrofotometricky (čtečka mikrodestiček Biotec©) absorbance při intenzitě čtečky 1,0 a determinována optická hustota s nastavením 450 nm vlnové délky. Po autoregulovaném promísení mikrotitrační destičky čtečkou a spektrofotometrickém změření byla data importována z programu GEN5. Analyzované

(extrahované) vzorky byly kvantifikovány prostřednictvím interpolace (nalezením přibližných hodnot v rozmezí intervalu) z kalibrační křivky. Absorbance párovaných jamek byla transformací logaritmické křivky vycházející ze standardních hodnot přepočtena na konečnou koncentraci (pg/ml). Tato koncentrace extrahovaného oxytocinu byla převedena na potřebné jednotky (ng/ml).

4.4.2.2 Postup laboratorní analýzy kortizolu

Zkumavky Salivette® Cortisol (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Německo) obsahující endogenní kortizol se rovněž centrifugovaly Hettich Zentrifugen D-78532 (Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo) a Labnet Hermle Z 233 MK-2 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Německo) se záměrem separování mucinů při teplotě 15 °C, rychlosti 3000 RPM po dobu 15 min. Supernatant se po procesu sedimentace pipetoval do Eppendorf PhysioCare Concept® (Eppendorf AG, Hamburg, Německo) mikrozkušavek – eppendorfek, které byly posléze zchlazeny na konstantní teplotu – 20 °C. V souladu s pokyny deklarovanými v komerčním kitu DRG Salivary Cortisol SLV-2930 (DRG Instruments GmbH, Frauenbergstraße, Německo) byl přichystán promývací, 40x koncentrovaný roztok (30 ml) smísením s deionizovanou vodou (1170 ml) o konečném objemu 1200 ml. Do příslušných mikrotitračních jamek byly dávkovány standardy (nulový blank - 6), reagenty připravené k aplikaci z dodaných činidel detekční soupravy s koncentracemi standardní křivky: 0 - 0,1 - 0,5 - 1,5 - 4 - 10 - 30 ng/ml, konverzním faktorem 1ng/ml a konzervantem bez obsahu rtuti. Vzorky s obsahem krve byly během procesu selektovány a následně vyřazeny z analýzy. Kalibrační roztoky, standardy byly do příslušných jamek dávkovány pipetou Eppendorf SE, Research®Plus (Eppendorf AG, Hamburg, Německo). Pro každý standart bylo užito jednorázových špiček pro zabránění křížové kontaminace. Na základě získané standardní řady se škálou od 30 ng/ml až 0,1 ng/ml a bezbarvého blank roztoku (obsah 0 ng/ml) byla měřena koncentrace kortizolu obsaženého ve slinách psů. Sestavená řada tak byla analogická s optimálním rozsahem detekční soupravy. Na mikrotitrační jamky v držáku rámečku byly dávkovány po 100 µl roztoky standardu, extrahované vzorky kortizolu a blank ke kalibraci se zvoleným ředícím faktorem 1:10; 10 µl slin + 90 µl standardu 0, které byly rovněž důkladně promíchány.

Poté bylo vpipetováno do každé z jamek 200 µl enzymového konjugátu (kortizol konjugovaný s křenovou peroxidázou). Po aspiraci byly roztoky promíchány a inkubovány po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Mikrotitrační jamky byly promyty dříve zkompletovaným roztokem (400 µl/jamka). Integrovaním substrátového roztoku TMB (tetramethylbenzidinu) při množství 200 µl se jamky na mikrotitrační destičce inkubovaly za pokojové teploty, dokud se nevizualizoval gradient. K zástavě enzymatické reakce došlo aplikací 100 µl stop roztoku H₂SO₄. do každé jamky. Absorbance byla spektrofotometricky měřena čtečkou mikrotitračních destiček (Biotec©) při vlnové délce 450 ± 10 nm a nastavené intenzitě čtečky 1,0 současně se stanovením optické hustoty. Zjištěná data byla posléze analyzována programem GEN5. Vynesením průměrných absorbancí každého ze standardů vůči hodnotě absorbance na vertikální ose (Y) a hodnotě koncentrace horizontální osy (X) byla sestrojena kalibrační křivka z níž byly interpolací kvantifikovány detekované koncentrace kortizolu z párových jamek. Komparováním průměrných

hodnot absorbcí extrahovaného kortizolu s odpovídajícími koncentracemi této křivky. Koncentrace extrahovaného kortizolu byly převedeny do podoby ng/l).

4.5 Statistická analýza dat

Pro popisnou statistiku měřených proměnných byl použit průměr prodloužení doby strávené aktivním pohybem a uražené vzdálenosti. Statistická analýza dat byla provedena v programu SAS, verze 9.4. Pro analýzu vlivu zátěže na koncentrace kortizolu, oxytocinu a hodnoty tělesné teploty byly vypočteny rozdíly (delty) mezi koncentrací a teplotou těchto parametrů mezi jednotlivými úseky měření, a to: mezi počátkem a koncem pátrání (PP-OM2), a dále pak změny delt prostupem mezi individuálními segmenty zatížení (PP-OM1; OM1-OM2). V prvním kroku korelační analýzou bylo zjištěno, jak mezi sebou korelují dvě proměnné charakterizující zátěž psa během pátrání, a to: uražená vzdálenost (počet překonaných km) a prodloužení doby strávené aktivním pohybem v terénu. Spearmanova korelace prokázala slabý korelační koeficient ($r = 0,14$, $P = 0,6$), proto oba fixní faktory byly použity v analýzách vlivu zátěže na delty koncentrací obou hormonů a tělesné teploty. Pro analýzu vlivu spojitých fixních faktorů (uražená vzdálenost, prodloužení doby strávené aktivním pohybem) a kategoriálního fixního faktoru (prostup individuálními segmenty zatížení s odběrovým místem) na rozdíly (delty – mezi segmentem zatížení PP-OM1 a OM1-OM2) koncentrací salivárního kortizolu, oxytocinu a tělesné teploty byly využity smíšené lineární modely (PROC MIXED), kde jako náhodný faktor bylo použito ID psa v interakci s lokalitou sběru dat. Rozdíly v rámci signifikantního vlivu kategoriální proměnné byly stanoveny metodou nejmenších čtverců (LS means).

Legenda uváděných faktorů a užívaných zkratk

<i>doba strávená v terénu</i>	celková doba strávená na trase včetně čichání, rozhlížení se, setrvání v nehybnosti, sumování atp.
<i>průměrná doba strávená v terénu</i>	průměrná doba strávená na trase včetně čichání, rozhlížení se, setrvání v nehybnosti, sumování atp.
<i>doba strávená aktivním pohybem</i>	doba strávená na trati namáhavým pohybem, aktivním pátráním
<i>rychlost pohybu</i>	průměrná rychlost v km za hodinu
<i>rychlostní maximum</i>	maximální rychlost v km za hodinu
<i>uražená vzdálenost</i>	uražená vzdálenost psem, množství překonaných km
<i>FC, fold change</i>	míra popisující, jak moc se změnil poměr mezi definovanou veličinou s ohledem na původní a následné měření.
<i>faktor prostupu individuálními segmenty zatížení</i>	prostup vybraným individuálním segmentem zatížení na determinované trase v konextu, prověřuje vzájemný vztah delty koncentrace a tělesné teploty prostupem mezi individuálními segmenty zatížení s odběrovými místy (PP-OM1; OM1-OM2).
<i>PP</i>	ranní odběr realizovaný před aktivním pátráním
<i>OM1</i>	první odběrové stanoviště zátěžového segmentu
<i>OM2</i>	druhé odběrové stanoviště zátěžového segmentu
<i>R</i>	odběr po hodinové relaxaci od ukončení aktivního pátrání
<i>tt_{tymp}</i>	tělesná teplota měřená tympanálními teploměry
<i>c kortizol</i>	koncentrace salivárního kortizolu
<i>c oxytocin</i>	koncentrace salivárního oxytocinu
<i>SAR psi</i>	search and rescue; pátrací a záchranářští psi

5.1 Deskriptivní parametry pohybu služebních psů v zátěži během pátrání

Naměřené relevantní hodnoty zúčastněných psů vybraných tras prezentuje tabulka 5; reflektuje prodlužující se dobu strávenou pohybem a fyziologické výkonnostní parametry psů. Dále tabulka uvádí deskriptory pohybové aktivity (viz tab. 6, str 40) a uraženou vzdálenost, která je závislá na individuální trajektorii každého psa. Podrobný přehled koncentrací salivárního kortizolu a oxytocinu (viz graf. 7^{1/2} a 7^{2/2}, str. 46-47)

Tabulka 5: Parametry pohybové aktivity a fyziologický stav reflektující pátrání

DESKRIPTORY POHYBOVÉ AKTIVITY		NAMĚŘENÉ PARAMETRY			
doba strávená v terénu		2,35 - 3,32 hod			
průměrná doba strávená v terénu		3,02 hod (SD ± 14,4 min)			
doba strávená aktivním pohybem		2,26 hod (SD ± 10,14 h, min = 2,10 h; max = 2,40 h)			
rychlost pohybu		4,1 - 7,9 km/h			
rychlostní maximum		12 - 54 km/h			
uražená vzdálenost		10 - 19,5 km			
FYZIOLOGICKÉ PARAMETRY		1 TĚLESNÁ TEPLOTA (° C)		1 SALIVÁRNÍ KONCENTRACE (ng/ml)	
		<i>vnější zvukovod</i>	<i>tympanální</i>	<i>kortizol</i>	<i>oxytocin</i>
<i>ranní odběr (PP)</i>	\bar{x}	35,73 ± 1,11	36,6 ± 0,64	25,2 ± 0,16	32,8 ± 16,63
	max	38,6	37,7	80,4	78,0
	min	33,4	35,5	0,6	1,0
<i>1. segment (OM1)</i>	\bar{x}	37,0 ± 1,25	38,4 ± 1,79	54,1 ± 31,13	34,4 ± 30,19
	max	39,1	41,8	125,5	134,9
	min	34,2	35,8	4,5	1,4
<i>2. segment (OM2)</i>	\bar{x}	37,9 ± 0,92	38,5 ± 0,74	47,0 ± 27,25	28,9 ± 22,81
	max	39,8	39,7	124,3	175,6
	min	34,7	36,7	2,2	3,5
<i>postrelaxační odběr (R)</i>	\bar{x}	37,6 ± 0,50	37,7 ± 0,65	34,6 ± 23,60	32,1 ± 21,83
	max	38,8	39,1	143,6	177,8
	min	36,2	36,6	1,4	4,1

¹ LSmeans ± S.E.: průměry nejmenších čtverců ± standardní chyba

Tabulka 6: Popisná statistika proměnných deskriptorů pohybové aktivity

POPISNÁ CHARAKTERISTIKA PROMĚNNÉ	ČASOVÝ HORIZONT PÁTRÁNÍ	MNOŽSTVÍ PŘEKONANÝCH KM
Průměr	02:25:57	14,31
Medián	02:25:28	13,90
směr. odchylka	00:08:39	2,54
první kvartil	02:20:20	13,00
třetí kvartil	02:30:12	16,10
maximum	02:40:36	19,50
minimum	02:10:15	10,00

Tabulka 7: Nacionale analyzovaných subjektů

VZOREK	JMÉNO PSA	TERÉNNÍ CVIČENÍ	PLEMENO	POHLAVÍ	VĚK	ATESTACE
1	Athos	Dobrotice	NKO	pes	7	ano
2	Cedr	Dobrotice	BO	pes	5	ano
3	Ford	Dobrotice	BO	pes	8	ano
4	Moody	Dobrotice	BO	pes	7	ne
5	Wictory	Dobrotice	NO	fena	7	ano
6	Cairo	Dobrotice	BO	pes	7	ano
7	Charon	Dobrotice	NO	pes	5	ano
8	Dexi	Česká Kubice	BO	fena	7	ano
9	Agavero	Česká Kubice	AUO	pes	9	ano
10	Brigitte	Česká Kubice	BO	fena	3	ne
11	Yetti	Hamry u Plumlova	NKO	fena	6	ano
12	Brody	Hamry u Plumlova	NKO	pes	5	ano
13	Max	Hamry u Plumlova	NO	pes	3	ano
14	Diego	Hamry u Plumlova	AKE	pes	9	ne
15	Attitus	Hamry u Plumlova	NKO	pes	7	ano
16	Hattrick	Hamry u Plumlova	LC	fena	4	ano
17	Qira	Hamry u Plumlova	BO	fena	2	ne
18	Gandal	Hamry u Plumlova	KV	pes	5	ano

legenda: NKO německý krátkosrstý ohař, BO belgický ovčák malinois, NO německý ovčák, AUO australská kelpie, LC louisianský leopardí pes, KV knírač velký

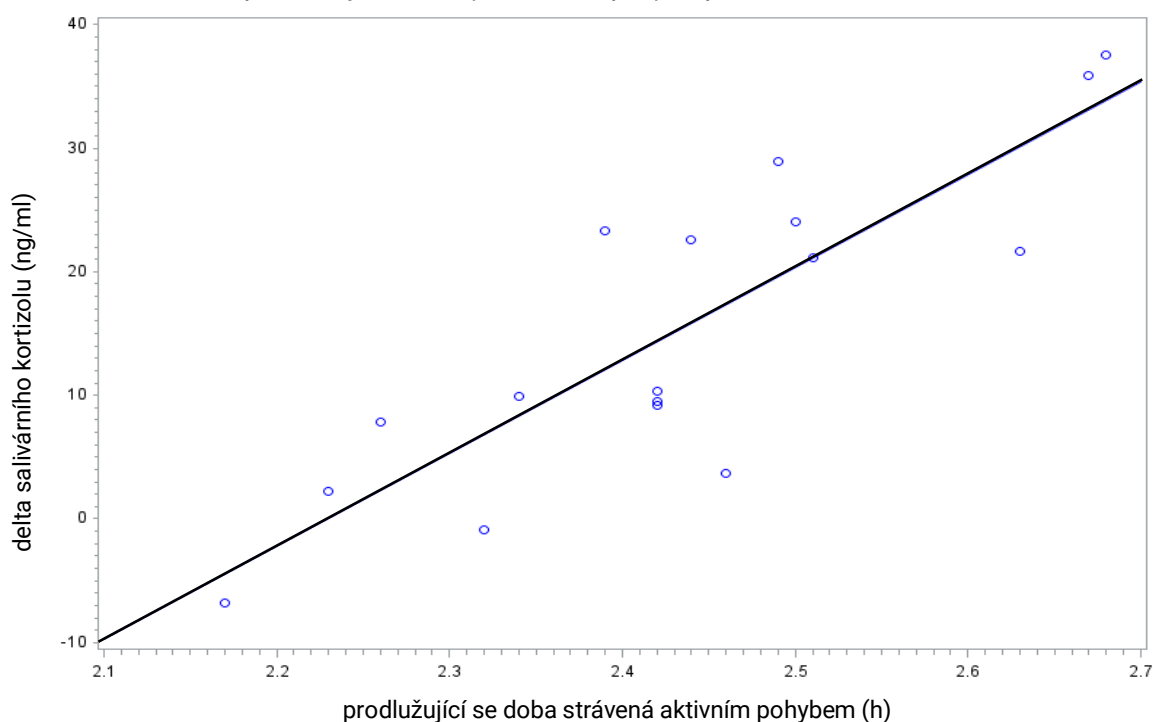
5.2 Vliv fixních faktorů zátěže na Δc kortizolu, Δc oxytocinu

Faktor prodlužující se doby strávené aktivním pohybem psa signifikantně ovlivňuje Δc salivárního kortizolu, přičemž tato prodlužující se doba strávená aktivním pohybem během pátrání na určených segmentech trasy korespondovala s Δc ($F_{(1,16)} = 5,45$; $P = 0,033$). Vzestup Δc salivárního kortizolu ilustruje graf 1, na straně 41.

Významný dopad na vzestup Δc salivárního kortizolu však nebyl prokázán u uražené vzdálenosti absolvované trasy, tedy u množství překonaných kilometrů ($F_{(1,16)} = 2,02$; $P = 0,17$). Podrobný přehled „fold change“ koncentrací hormonů a tělesné teploty (viz tabulka 8, str 41). Souhrnné údaje fixních faktorů; prodlužující se doby strávené aktivním pohybem a uražené vzdálenosti demonstruje tabulka 7, viz výše.

¹ Analýzy salivárních vzorků realizovány (SAS, verze 9.4) v rámci konzultací se školitelkou DP

Graf 1: Vliv faktoru prodlužující se doby aktivního pohybu psů na Δc salivárního kortizolu



Tabulka 8: Koncentrace salivárních hormonů (ng/ml), analyzování SAR psi

SUBJEKT PES	NEJVYŠŠÍ HLADINA KORTIZOL	ODBĚROVÉ STANOVIŠTĚ	FC (PP)			NEJVYŠŠÍ HLADINA OXYTOCIN	FC (PP)			
			OM1	OM2	R		OM	OM1	OM2	R
Athos	15,5	2	↗ 1.59x	↗ 2.07x	↘ X	51.5	PP	↘ 07.06x	↘ 3.34x	↘ X
Cedr	57,4	1	↗ 3.96x	↗ 2.46x	↗ 2.89x	19.6	2	↘ 2.51x	↘ 4.08x	↘ X
Ford	107,2	2	↗ 2.72x	↗ 3.05x	↗ 3.05x	61.2	PP	↘ 8.16x	↘ 7.29x	↘ 1.96x
Moody	24,2	1	↗ 1.07x	↘ 1.04x	↘ X	38.8	PP	↘ 4.31x	↘ 4.85x	↘ X
Wictory	71,5	2	↗ 2.22x	↗ 3.63x	↘ 1.41x	33.6	R	↘ 1.55x	↘ 1.01x	↗ 1.27x
Cairo	5,3	R	↗ 2.81x	↗ 1.38x	↗ 3.31x	10	PP	↘ 7.14x	↘ 1.12x	↘ 1.52x
Charon	21,2	1	↗ 2.83x	↗ 1.71x	↘ 5.36x	15.7	2	↗ 12.40x	↘ 15.70x	↗ 10.90x
Dexi	32,7	2	↘ 1.50x	↗ 1.16x	↘ 2.16x	15.3	1	↗ 2.35x	↗ 1.14x	↘ 0.65x
Agavero	61,9	1	↗ 103.17x	↗ 33.17x	↗ 19.50x	12.5	1	↗ 1.18x	↘ 3.03x	↘ X
Brigitte	124,3	1=2	↗ 11.00x	↗ 11.00x	↗ 2.07x	16.5	PP	↘ 4.58x	↘ 4.58x	↘ 4.02x
Yetti	125,5	1	↗ 3.78x	↗ 1.47x	↘ X	34	PP	↘ 1.06x	↘ 2.04x	↘ 1.65x
Brody	46,0	R	↗ 1.56x	↗ 1.17x	↗ 1.94x	40.5	1	↘ X	↘ X	↘ X
Max	49,6	X	↗ 1.63x	↗ 2.46x	↗ 1.76x	50.8	1	↘ 1.25x	↘ 1.48x	↘ 1.70x
Diego	64,0	2	↘ X	↘ X	↘ X	120.4	PP	↘ X	↘ X	↘ X
Attitus	78,5	PP	↘ 1.17x	↗ 1.06x	↘ 2.08x	175.6	2	↗ 1.73x	↗ 2.25x	↘ 2.06x
Hattrick	121,1	1	↗ 3.75x	↗ 2.25x	↗ 2.17x	32.2	PP	↘ 1.46x	↘ 1.36x	↘ 1.15x
Qira	24,4	R	↗ 1.46x	↗ 1.46x	↗ 1.53x	46.7	PP	↘ 1.72x	↘ 1.26x	↘ X
Gandal	143,6	R	↘ 1.86x	↘ 1.45x	↗ 1.79x	177.8	R	↗ 2.51	↗ 1.04	↗ 4.15x

PP před pátráním OM1 první odběrové místo OM2 druhé odběrové místo R po relaxační periodě, FC (PP) = Fold Change PP, OM odběrové místo

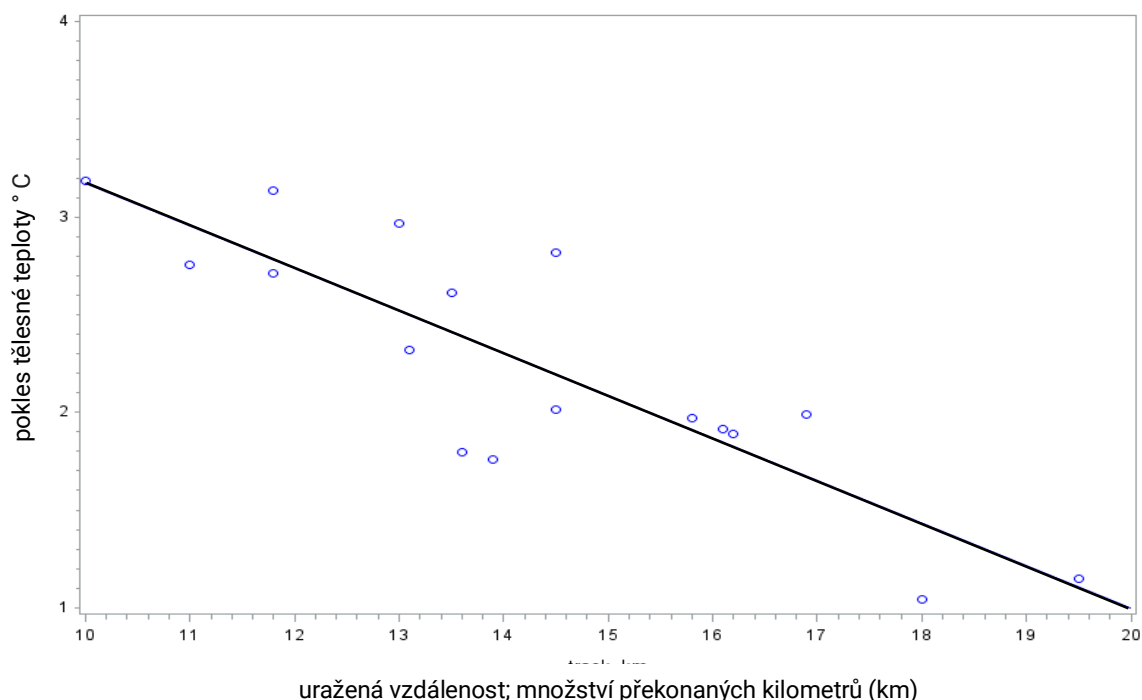
Analýza dat neprokázala signifikantní dopad žádného z prokazovaných fixních faktorů; ani prodlužující se doby strávené aktivním pohybem ($F_{(1,16)} = 1,42$; $P=0,25$), a ani uražené vzdálenosti, tedy množství překonaných kilometrů ($F_{(1,16)} = 0,48$; $P= 0,5$) pozorovaných subjektů v pohybu volným terénem na Δc salivárního oxytocinu.

5.3 Vliv fixních faktorů zátěže na $\Delta t_{t_{ymp}}$

Výsledky zaznamenávají rozdíly v $\Delta t_{t_{ymp}}$ u pozorovaných psů v oblasti zevního zvukovodu, jež byla signifikantně ovlivněna faktorem uražené vzdálenosti ($F_{(1,16)} = 6,59$; $P = 0,023$), přičemž $\Delta t_{t_{ymp}}$ pozvolna klesala úměrně s množstvím překonaných kilometrů, tzn. delší uraženou vzdáleností psem (viz graf 2).

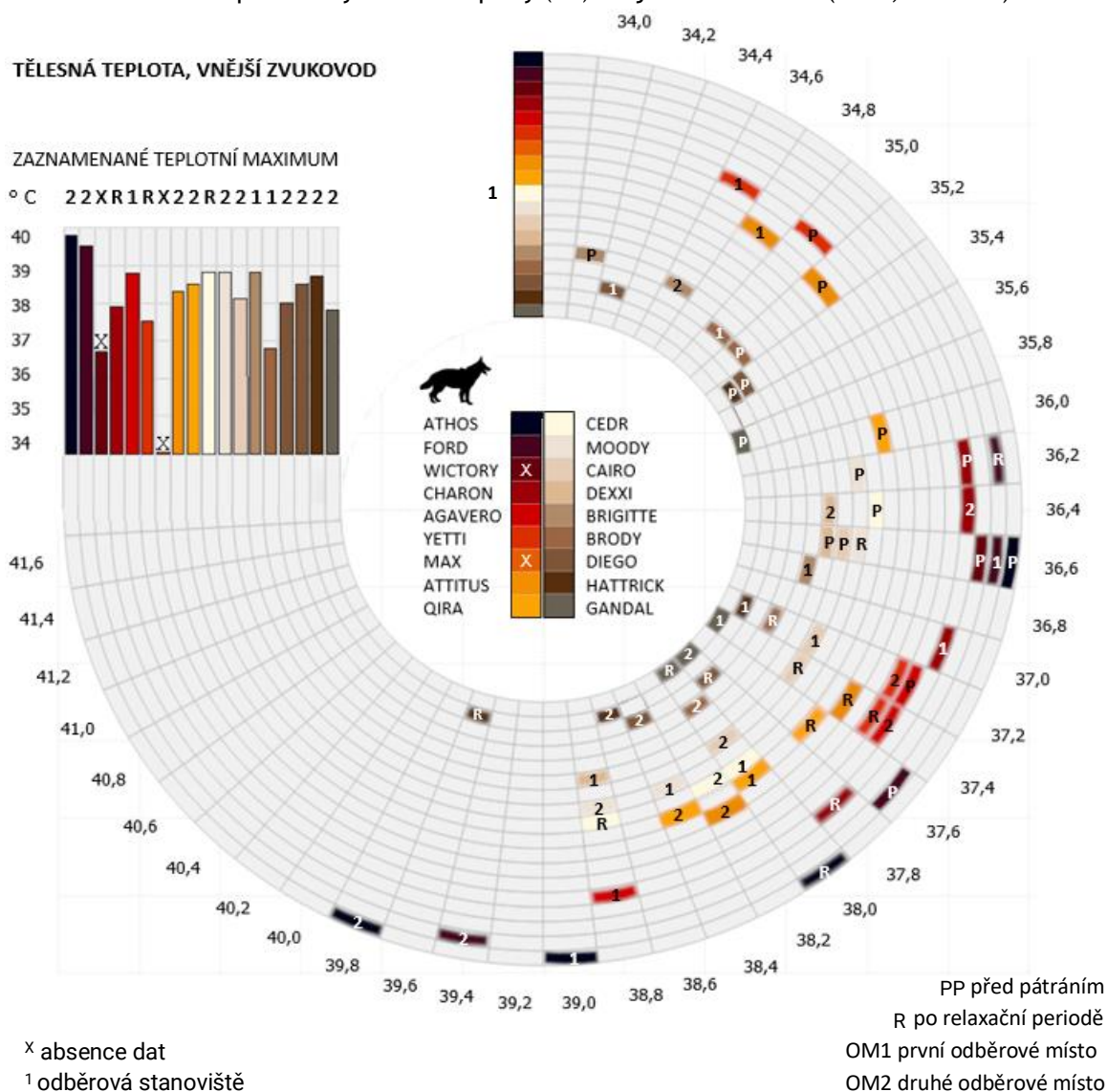
Vliv prodlužující se doby strávené pohybem při pátrání psů ($F_{(1,13)} = 3,02$; $P = 0,11$) nevykazuje významný vliv na $\Delta t_{t_{ymp}}$ psa. Popisnou charakteristiku proměnné prodlužující se doby strávené pohybem a uražené vzdálenosti reflektuje pro Δc oxytocinu i $\Delta t_{t_{ymp}}$ tabulka 7 (viz str 46).

Graf 2: $\Delta t_{t_{ymp}}$ psa v závislosti na faktoru uražená vzdálenost



K detekci potenciálního kauzálního vztahu mezi prodlužující se dobou strávenou aktivním pohybem a uraženou vzdáleností byla užita implementace korelační analýzy s využitím Spearmanova koeficientu pořadové korelace. Korelační procedura odhalila pouze slabou korelaci ($r = 0,14$), což naznačuje, že mezi prověřovanými proměnnými neexistuje signifikantní vztah. Čas strávený psy při pátrání byl sice konzistentní, avšak rozdělení fyzické zátěže odpovídalo individuální aktivitě psů, kteří se pohybovali ovšem volně.

Graf 3²: Naměřené parametry tělesné teploty (°C) vnějšího zvukovodu (A200, Rohson)

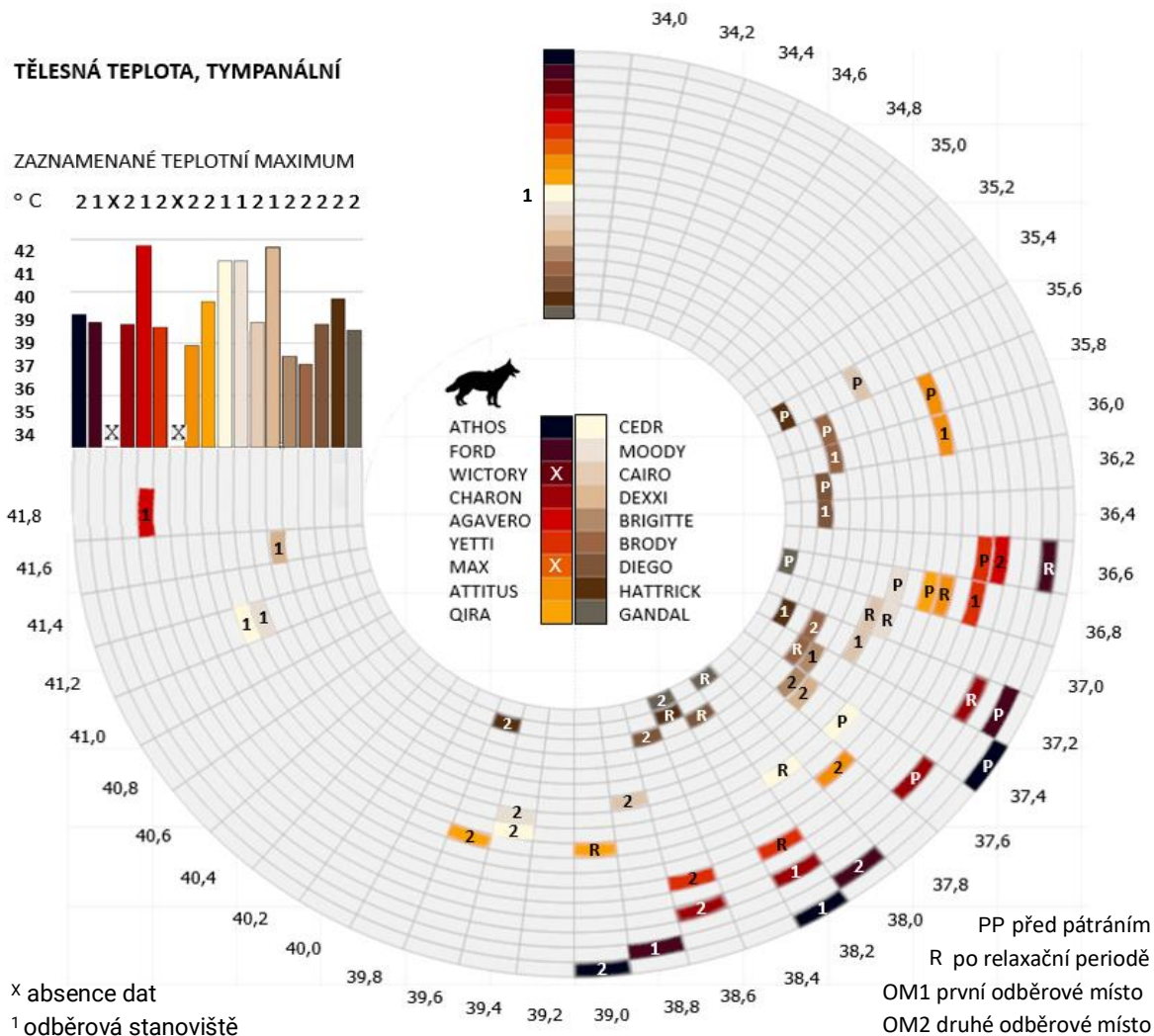


5.4 Vliv prostupu individuálními segmenty na Δc salivárního kortizolu

Delta koncentrace salivárního kortizolu psů byla signifikantně ovlivněna prostupem individuálními segmenty zatížení ($F_{(1,34)} = 9,11$; $P = 0,0048$), přičemž markantní vzestup Δc salivárního kortizolu nastal při prostupu prvního segmentu (PP-OM1), tj. mezi odběrem před započítáním pátrání a prvním odběrovým místem ($28,31 \text{ ng/ml} \pm 8,3$; LS means \pm S.E.), viz graf 5, str 50. Prostupem druhého segmentu (OM1-OM2) Δc salivárního kortizolu naopak poklesla ($-7,01 \text{ ng/ml} \pm 8,3$; LS means \pm S.E.). Pro stanovení podrobné diference zátěžových segmentů byl aplikován t-test s Tukey-Kramerovo konfigurací a následně tak spočten t-parametr pro segment PP-OM1 ($t = 3,41$) a pro segment OM1-OM2 ($t = -0,86$).

² Vytvořeno v Tableau Public (©2024 Salesforce, Inc.)

Graf 4²: Naměřené parametry $\Delta t_{t_{\text{tymp}}}$ (°C), (Sanitas SFT 53; Genius™)



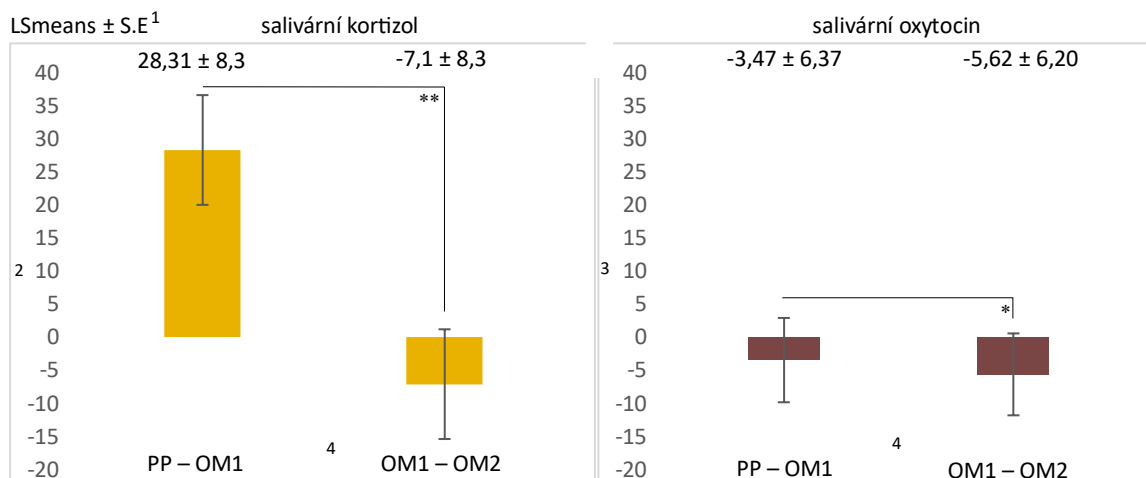
5.5 Vliv prostupu individuálními segmenty na Δc salivárního oxytocinu

Výsledky neprokázaly signifikantní vliv prostupu individuálními segmenty zatížení na vzestup Δc salivárního oxytocinu ($F_{(1,35)} = 0,06$; $P = 0,81$). Zátěž prostupem jak prvním, tak druhým segmentem se nelišila v dynamice Δc salivárního oxytocinu, kdy v obou zátěžových segmentech tato Δc klesala. Mezi oběma segmenty není v kontextu poklesu Δc výrazná diference; nejprve nastal pokles ($-3,47 \text{ ng/ml} \pm 6,38$; PP-OM1), poté následný pokles ($-5,62 \text{ ng/ml} \pm 6,20$; OM1-OM2).

Podrobné diference byly stanoveny parametrem ($t = -0,54$) pro zátěžový segment PP-OM1 a ($t = -0,91$) pro zátěžový segment OM1-OM2. Standardní chyba Δc oxytocinu prostupem mezi vybranými zátěžovými segmenty přesahuje průměr minimálních čtverců, což naznačuje vysokou variabilitu mezi subjekty zapojenými do pátrání.

² Vytvořeno v Tableau Public (©2024 Salesforce, Inc.)

Graf 5: Δc kortizolu a oxytocinu prostupem individuálními segmenty (ng/ml)



¹ LSmeans ± S.E.: průměry nejmenších čtverců ± standardní chyba OM1 první odběrové místo PP odběr před
² Δc salivárního kortizolu (ng/ml) ³ Δc salivárního oxytocinu (ng/ml) OM2 druhé odběrové místo aktivním pátráním
*na hladině významnosti 0,05 (P = 0,81), **na hladině významnosti 0,01 (P = 0,0048)

5.6 Vliv prostupu individuálními segmenty na Δt_{tymp}

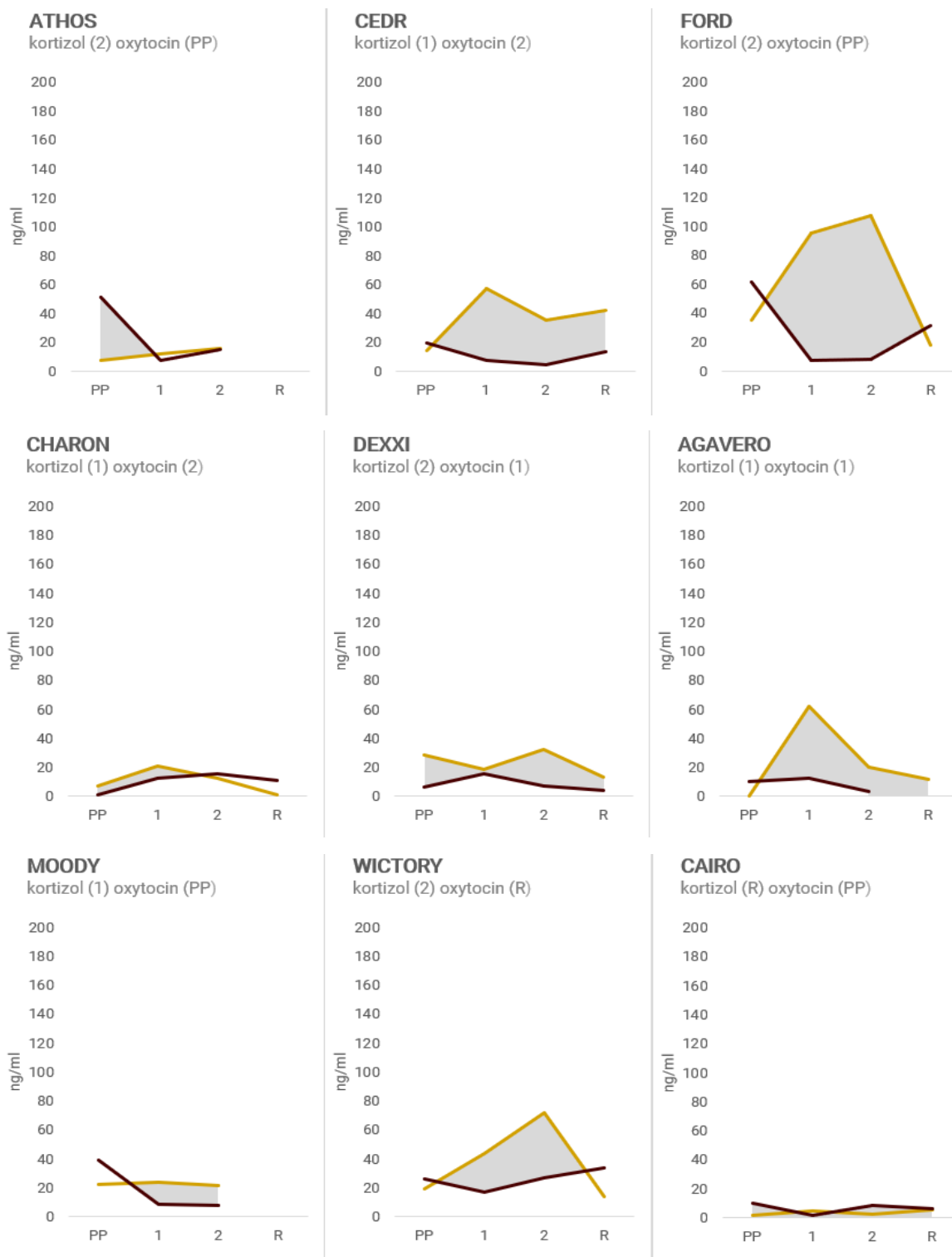
Delta v hodnotách tělesné teploty vykazuje tendenci ovlivnění faktorem prostupu individuálních segmentů zátěže ($F_{(1,25)} = 3,1$; $P = 0,09$). Prostupem prvního segmentu (PP-OM1) zátěže Δt_{tymp} vzrostla ($1,4 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 0,59$), nicméně vzestup Δt_{tymp} průchodem druhého byl již zanedbatelný $0,21 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 0,52$ a docházelo tudíž ke stabilizaci. Naměřené parametry tělesné teploty měřené tympanálními teploměry (Sanitas SFT 53; Genius™) ilustruje graf 4 (viz str. 50), v kombinaci s grafem 3 (viz str 49), který umožňuje porovnání s měřeními provedenými bezkontaktním teploměrem (A200 Rohson). Vzestupy Δt_{tymp} prostupem individuálními segmenty reflektuje graf 6, viz níže. Relativně vysoká standardní chyba měření pravděpodobně souvisí s neúplností dat některých subjektů, neboť psi neumožnili odběr vzorků bez nadměrného stresu.

Graf 6: Δt_{tymp} prostupem individuálními segmenty ($^\circ\text{C}$)



¹ LSmeans ± S.E.: průměry nejmenších čtverců ± standardní chyba ³OM1 první odběrové místo PP odběr před
² Δt_{tymp} mezi zátěžovými segmenty ($^\circ\text{C}$) OM2 druhé odběrové místo aktivním pátráním
*na hladině významnosti 0,05 (P = 0,09)

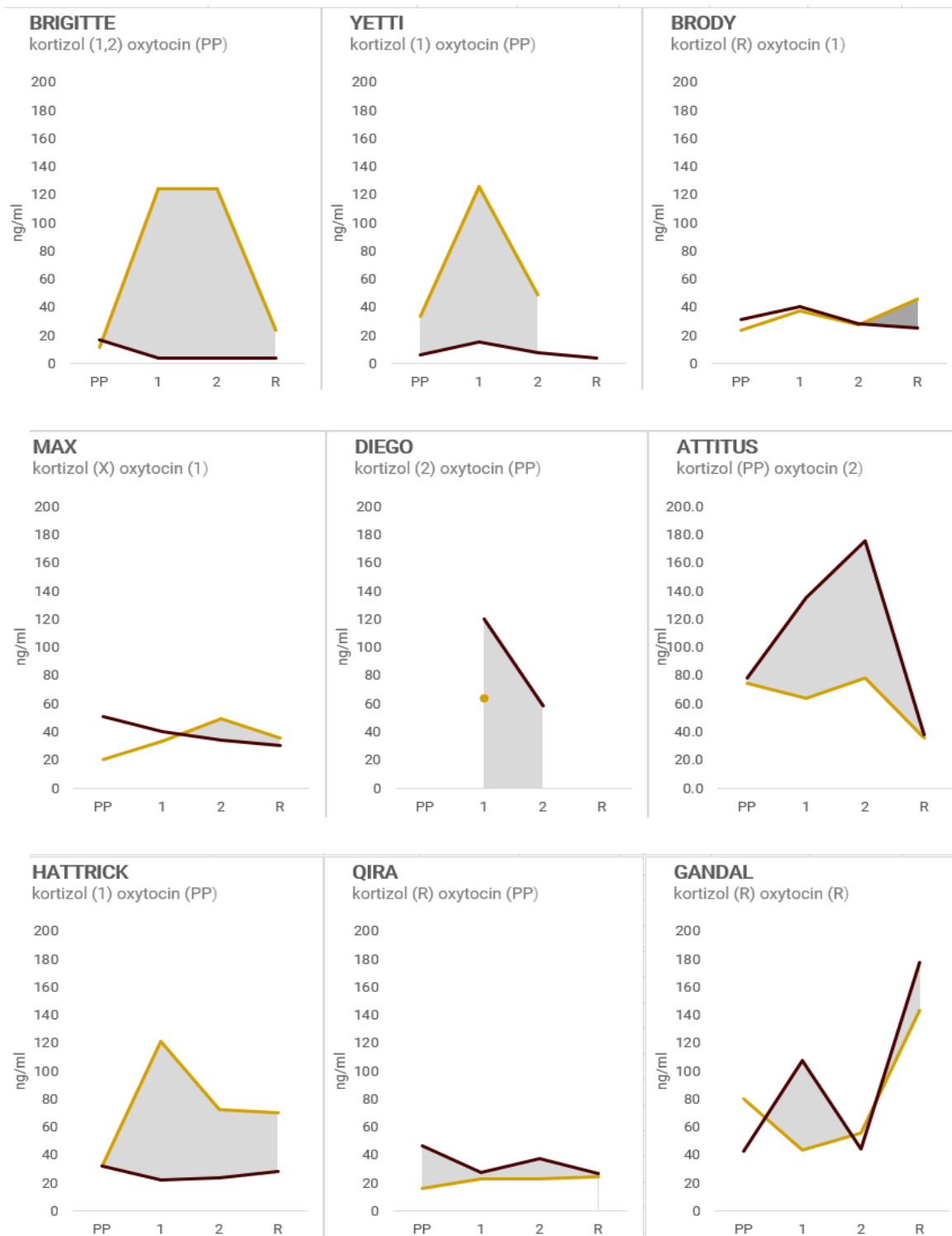
Graf 7: Koncentrace kortizolu a oxytocinu (ng/ml), analyzovaní SAR psi ^{1/2}



PP před pátráním 1 první segment 2 druhý segment R po relaxační periodě

● salivární kortizol ● salivární oxytocin

Graf 7: Koncentrace kortizolu a oxytocinu (ng/ml), analyzování SAR psi ^{2/2}



PP před pátráním 1 první segment 2 druhý segment R po relaxační periodě

● salivární kortizol ● salivární oxytocin

V souladu se stanovenou hypotézou „(H1): S prodlužující se dobou strávenou aktivním pohybem nastane vzestup delty koncentrace delty hodnot i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu iii) tělesné teploty.“ Byl prokázán vzestup Δc salivárního kortizolu s prodlužující se fyzickou zátěží pátrajících psů, nicméně nebyl potvrzen vzestup Δc salivárního oxytocinu ani tělesné teploty s ohledem na tento faktor.

Dále bylo navzdory předpokladům „(H2): Čím delší vzdálenost pes urazí volným pohybem v terénu (množství překonaných km na trase), tím markantnější je vzestup koncentrace a hodnot: i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu iii) tělesné teploty“ zjištěno, že vliv uražené vzdálenosti, tzn. počet překonaných kilometrů psem nemá přímou souvislost se vzestupem Δc ani jednoho z analyzovaných hormonů, ale naopak bylo potvrzeno, že s narůstající uraženou vzdáleností $\Delta t_{\text{tym p}}$ klesala.

Pátrání po pohřešovaných osobách představuje pro záchranné psy významný stresor, který se projevuje sekrecí a vzestupem koncentrace salivárního kortizolu závislosti na stresujícím charakteru této fyzicky náročné a potenciálně stresující práce, která vyžaduje dlouze udržovanou ostražitost (Colussi et al. 2018). Vztah mezi zvýšením hladin kortizolu, stresem z fyzické aktivity v náročném terénu a hladinou kortizolu byl diskutován např. Rovira et al. (2008), která naznačuje v souladu se zvýšením Δc v této diplomové práci, že délka a intenzita pohybu může hrát významnější roli při uvolňování koncentrace salivárního kortizolu než uražená vzdálenost. Rozsáhlejší plochy, které jsou předmětem plošného pátrání v porovnání s prostředím sutin, si totiž žádají delší dobu strávenou aktivním pohybem k důkladnému prozkoumání vzhledem k složitějšímu průchodu terénem.

Ranní odběry této diplomové práce nereprezentují klidový stav zvířete, ale stav, kdy je excitováno z blížícího se pracovního nasazení. Koncentrace salivárního kortizolu během ranního odběru (PP) v čase 7-8 h byla 25,2 ng/ml a může též představovat přirozený ranní vzestup s ohledem na cirkadiánní aktivitu. Přestože se koncentrace kortizolu v této práci pohybovala na mnohonásobně vyšší úrovni, byl zjištěn vzestup Δc během pátrání, tedy během zátěžové situace, jak uvádějí např. (Colussi et al. 2018). Po expozici dvouhodinové zátěži (OM1) dokonce 54,1 ng/ml a po další hodině 47,0 ng/ml (OM2). Tyto zvýšené koncentrace salivárního kortizolu připomínají pozorování loveckých psů během prodlouženého fyzického vypětí, kteří při hledání

kořisti svým čenichem soustředěně značí místo jejího skrytu a naznačují zvýšení koncentrací ve srovnání s neutrálními podmínkami a tedy nižší koncentrace kortizolu v klidovém stavu (Colussi et al. 2018). Signifikantní vzestup koncentrace kortizolu, pozorovaný kolektivem Colussi et al. (2018) nastal mezi odběrovými časy (diference 258 minut), z T1 do T2 ($4,61 \pm 1,38$ ng/ml a $16,33 \pm 4,52$ ng/ml). Tento jev lze přirovnat k nasazení psů v integrovaném záchranném systému, kde je také vyžadován vysoký výkon, dostatek energie a dlouhotrvající svalová práce. Negativní energetická bilance, která vzniká v důsledku fyzické aktivity, stimuluje produkci kortizolu, což potvrzují i předchozí studie (Royer et al. 2005).

Průměrné koncentrace kortizolu u zkoumaných psů v klidovém režimu autorskými kolektivy kolísají mezi 1,89 ng/ml (Beerda et al. 1998), 3 ng/ml (Colussi et al. 2018) a 0,48 ng/ml (Wenger-Riggenbach et al. 2010). Koncentrace slinného kortizolu dle studie Wojtas et al. (2020) zkoumající dopad dlouhodobé fyzické zátěže se pohybovaly mezi 4,2 ng/ml před intervencí a 4,89 ng/ml po aktivní fázi pátrání. Psi mohou projevovat behaviorální změny v důsledku stresu i bez současného zvýšení koncentrací kortizolu ve slinách, zřejmě kvůli krátkému trvání cvičení jež aktivuje pouze sympatický systém. Pouze mírné změny byly pozorovány v souvislosti se stopováním krve anebo lovem kopytníků (nejvyšší hodnota $3,04 \pm 0,66$ ng/ml), což potvrzuje dřívější pozorování německých ovčáků, kteří podstoupili stopařské výzvy soutěže IPO, kde aktivace osy HPA byla nižší, pokud úkony vyžadovaly výraznější bdělost a soustředění (Colussi et al. 2016). Z korelační analýzy v rámci této diplomové práce nebyla patrna závislost mezi dobou strávenou pohybem a uraženou vzdáleností. Korelační koeficient vykazoval pouze velmi slabou závislost; konzistentní čas strávený pátráním byl synchronně distribuován mezi pozorovanými psy, avšak nebyl podmíněn vynaložením zátěže, jelikož byl výsledkem individuální aktivity psů s možností volného pohybu.

Přestože optimální časový okamžik pro měření volné frakce oxytocinu ve slinách psů zatím nebyl definitivně stanoven a jeho salivární vazebné vlastnosti objasněny, je volná frakce ve slinách spíše detekovatelná než v plazmě (MacLean et al. 2017), což umožňuje měření salivárního oxytocinu pomocí ELISA i bez potřeby extrakce pevné fáze. Dělty koncentrací oxytocinu zjištěné metodou ELISA nevykazovaly významný vzestup Δc během průchodu individuálními segmenty s prodlužujícím se časovým horizontem u většiny sledovaných psů v této diplomové práci. Naopak, násobné změny Δc v případě oxytocinu v porovnání se vzorky odebranými před zahájením aktivního pátrání ve většině případů vykazovali kontinuální pokles vzhledem k inhibici prekurzoru-kortizolu a adaptaci stresorům během procházení obou segmentů ($-3,47$ ng/ml $\pm 6,38$; PP-OM1), a poté následný pokles ($-5,62$ ng/ml $\pm 6,20$; OM1-OM2), viz tabulka 8, str 41. K sekreci oxytocinu může tudíž docházet vlivem akutního, ale i při expozici dlouhodobějšího stresového zatížení a tedy v různé fázi pátrání, viz **hypotéza 3 a 4**. Rassovsky et al. (2019) pozorovali zvýšené koncentrace oxytocinu nejen při vytrvalostní zátěži, ale i při tréninku bojových umění s vysokou úrovní fyzické aktivity, a to i v krátkodobém fyzickém výkonu, což nejspíš opět souvisí s jeho okamžitou reakcí na nadměrnou sekreci kortizolu. Dynamika Δc salivárního oxytocinu stejně jako jeho příslušné koncentrační zvýšení v přítomnosti stresorů, nebyla v rámci záchranných psů doposud zkoumána.

Na druhou stranu $\Delta t_{t_{ymp}}$ se snižovala v souvislosti s uraženou vzdáleností, a to přestože všichni měření psi měli na konci pátrání (OM2) vyšší tělesnou teplotu než na začátku (PP). Nejčtenější vzestupy $\Delta t_{t_{ymp}}$ v prvotní fázi pátrání jsou pravděpodobně způsobeny dočasně mobilizovaným metabolismem, který byl pozorován v průběhu studie Rovira et al. (2008). Nejčastější vzestup tělesné teploty psů je taktéž spojen s disbalancí alostáze a s vyčerpáním metabolických rezerv energie, které jsou mobilizovány jako reakce na nastupující fyzický výkon. Ačkoliv může intenzivní fyzická aktivita na počátku pátrání přispět k vzestupu $\Delta t_{t_{ymp}}$, s překonáním většího množství kilometrů dochází k adaptaci služebních psů s adekvátní fyzickou kondicí tomuto pracovnímu nasazení a tudíž i k poklesu $\Delta t_{t_{ymp}}$.

Výsledky diplomové práce prokázaly tendenci vzestupu $\Delta t_{t_{ymp}}$ během prvních dvou hodin zátěže ($1,4 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 0,59$), což vzhledem k charakteru dlouhodobějšího fyzického vyčerpání před odpočinkem na odběrovém místě vykazuje patrnější vzestup, než v případě 10 min práce psů ve studii Diviero et al. (2016). Rovira et al. (2008) rovněž demonstrovali změny tělesné teploty u SAR psů při mírnějších venkovních teplotách ($21,2 \text{ } ^\circ\text{C}$), kdy prokázali vrchol rektální teploty $40,64 \text{ } ^\circ\text{C}$, který ovšem nevykazoval výrazný pokles po celou dobu půlhodinového pátrání. V případě této diplomové práce, sice v prvním segmentu tělesná $\Delta t_{t_{ymp}}$ vzrostla, při pokračování v pátrání následující hodinu se již takřka nezměnila, avšak psi uběhli různý počet kilometrů přičemž bylo prokázáno, že čím více kilometrů pes uběhl, tím byla $\Delta t_{t_{ymp}}$ nižší. Předchozí studie (Rovira et al. 2008; Craig & Gillette 2011; Diverio et al. 2016; O'Briend et al. 2017; Baker & Davis 2018; Pellegrino et al. 2018) naznačují vzestup tělesné teploty psů během fyzické aktivity krátkodobého až středně trvajícího charakteru, jako je např. aktivní pohyb či pátrání po pohřešovaných osobách, a to i při stálém teplotním prostředí (Robbins et al. 2017).

Nicméně v této prezentované studii, uražením delší vzdálenosti psem tzn. při dlouhodobějším pracovním nasazení bez možnosti relaxace, byla zjištěna stabilizace $\Delta t_{t_{ymp}}$ s následovným pozvolným poklesem, vzhledem k vybudované kondici služebních psů. Pozvolná klesající rozdíl $\Delta t_{t_{ymp}}$ v diplomové práci je pravděpodobně ovlivněn, jak též pozoroval kolektiv Novák et al. (2022) rostoucím fyzickým vysílením psů, kdy dochází k degradaci vynaložené efektivity a nastolení rychlostně šetrnější pohybové aktivity psů a zřejmě i úspoře energetických rezerv metabolismu. Pro dosažení adekvátní fyzické kondice je totiž zapotřebí kombinace fyzických i mentálních stimulů, neboť organismus psa musí být schopen distribuovat své energetické rezervy a korigovat svou aktivitu v souladu s individuálními metabolickými procesy, aby nedocházelo k jeho přetížení. Absence dostatečného tréninku znemožňuje vznik požadované kondiční úrovně (Schneider & Slotta-Bachmayr 2009; Lee & Kim 2020). Trénování psi s vybudovanou kondicí dosahují teplotního vrcholu nejvíce při intenzivní zátěži (v prvotní fázi), kdežto psi bez předchozí přípravy projevují neustálý vzestup (Diviero et al. 2016; Baker et al. 2020).

Nebyl však zjištěn vliv prodloužené doby strávené pohybem. Je zřejmé, že v tomto případě by mohla hrát důležitou roli rychlost pohybu, protože zvýšená svalová aktivita a metabolismus vede k větší produkci tepla (Farley et al. 2021). Labradorští retrívři, kteří neměli dříve adekvátní fyzickou kondici a tudíž nepřivykli fyzické zátěži během pátrání ve volném terénu vykazovali významný nárůst tělesné teploty až o $3 \text{ } ^\circ\text{C}$, a to již po 5 min střední úrovně zátěže (Steiss et al.

2004), nicméně není známo, jaký by byl stav po jejich expozici zátěži po 2-3 hodinách aktivního pohybu.

(H3): Vzestup delty koncentrace a hodnot i) salivárního kortizolu ii) salivárního oxytocinu iii) delty tělesné teploty bude přítomen během průchodu obou segmentů zatížení.

Markantní vzestup Δc salivárního kortizolu jsme pozorovali u služebních psů během pátrání pouze v prvním segmentu (PP-OM1), po němž Δc salivárního kortizolu naopak poklesla. Delta koncentrace salivárního oxytocinu shodně klesala postupem obou zátěžových segmentů, mezi nimiž nebyla zaznamenána významná diference, zatímco $\Delta t_{t_{ymp}}$ vykazuje tendenci pro vzestup průchodem obou těchto segmentů.

(H4): Markantnější vzestup delty koncentrace i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu, iii) delty tělesné teploty nastane průchodem prvním segmentu zatížení v porovnání s druhým segmentem.

Ranní měření Δc salivárního kortizolu, nezávisle na zahájení pátrání, reflektovala s ohledem na poznatky (Clow et al. 2010; Stalder et al. 2016) nejvýraznější vzestup Δc salivárního kortizolu při prvním odběrovém místě (OM1), přestože ranní koncentrace mezi 6:00 až 8:00 bývají nejvyšší (Cobb et al., 2016). Jak bylo již diskutováno dříve, průměrné koncentrace salivárního kortizolu při ranním odběru diplomové práce byly zaznamenány na koncentraci 25,2 ng/ml, což přesahuje klidové hodnoty, pravděpodobně v důsledku přirozeného ranního vzestupu (po 7:00). Na druhou stranu, efekt ranního vrcholu kortizolu v kontextu reakce na probuzení (Colussi et al., 2018) není zcela jasně potvrzena, protože autoři Gianetta et al. (2014) lokalizují tento vrchol spíše v období kolem poledne. Tím pádem tyto nejasnosti v rámci studií komplikují exaktní hodnocení Δc salivárního kortizolu.

Může se také jednat o metabolickou odezvu kortizolu a jeho mobilizační role v rámci energetických rezerv, a to v kontextu emočního vzruchu, jenž předchází fyzické aktivitě, spíše než k reakci na stresovou odpověď vyvolanou potenciálními stresory (jak bylo evidováno v pracích autorského kolektivu Balodis et al. (2010) a Chmelíkova et al. (2020), kde byla zkoumána sportovní a pracovní zátěž jako faktory ovlivňující alostatický tlak na organismus (Bergamasco et al. 2010). Součástí tréninku SAR práce jsou psi obvykle odměňování potravy či hravými interakcemi s psovodem (Diverio et al. 2016), což přiměje psy k očekávání těchto pozitivních stimulů, které si tréninkem kontují s tímto typem práce a upevňují si motivaci, obzvláště v primárním segmentu realizovaným po ranním odběru (PP).

Mezi individuálními zátěžovými segmenty nebyl pro Δc salivárního oxytocinu zjištěn výrazný rozdíl, nýbrž při jejich prostupu došlo v obou případech k poklesu. Vyšší hodnoty oxytocinu se prokázaly zejména při prvním odběru (PP) než v následujících měřeních. Koncentrace dosahovala průměrně 32,8 (\pm 16,63) ng/ml, což naznačuje okamžitou reakci oxytocinu na přítomné podněty, ať už stresového nebo vzrušivého charakteru v souvislosti s kortizolem. Ke kontinuálnímu poklesu došlo pravděpodobně vlivem okamžitého zachycení volné frakce difundovaného oxytocinu ihned po adaptaci a inhibicí koncentrací kortizolu vůči zrovna prožitému podnětu během překonávání obou zátěžových segmentů (Handlin et al. 2011; MacLean et al. 2015).

Dynamika Δc oxytocinu spolehlivě reflektuje jak akutní stresory, tak vzrušením vyvolanou stimulaci nezávisle na fázi pátrání, s ohledem na zvýšené koncentrace salivárního kortizolu. Tento jev značí adaptaci testovaných psů na pracovní prostředí. Plazmatické koncentrace oxytocinu obvykle dosahují maxima již během první minuty po expozici stimulu, což vyvolá okamžitou sekreci do krevního oběhu. Handlin et al. (2011) demonstrovali vrchol oxytocinu u psů bezprostředně během první minuty interakce, s výrazně vyššími koncentracemi než před stimulací. Tento rychlý vzestup implikuje okamžité uvolnění hormonu do periferie, což vykazuje druhovou závislost a variabilitu, podobně jako u slinného kortizolu. Rychlé uvolňování volné frakce oxytocinu do slin potvrdila i studie MacLean et al. (2018), která zaznamenává nárůst koncentrací ve slinách okamžitě po 5 minutách pozitivní interakce. Zaznamenané výsledky Δc salivárního oxytocinu diplomové práce též vypovídají v kontextu ranního odběru a průchodu prvním segmentem (PP-OM1) o vzájemné sekreci oxytocinu společně s kortizolem, nejspíše během počáteční excitace z pátrání (PP-1), kdy byla maxima samotné koncentrace oxytocinu nejčtenější (počet případů 10x).

Diference v $\Delta t_{t_{ymp}}$ se zdají být podmíněny překonáním specifického zátěžového segmentu, přičemž byla zaznamenána tendence k vzestupu $\Delta t_{t_{ymp}}$ zejména v počáteční fázi aktivního pátrání (PP-OM1), po níž se tělesné teploty psů stabilizovaly. Jak již bylo výše diskutováno, postupný pokles $\Delta t_{t_{ymp}}$ je pravděpodobně spojen s narůstajícím fyzickým vysílením psů, což vede k degradaci vynaloženého úsilí a šetrnější pohybovou aktivitu certifikovaných psů, a zřejmě i úspoře energetických rezerv metabolismu. Přesto však objem zátěže zcela nepochybně ovlivňovaly faktory jakými jsou vegetační pokryv a sklonitost terénu, společně s nižší viditelností a tudíž náročnějším prostupem. Tendence vlivu prostupu konkrétními segmenty je taktéž pouze orientační ($P=0,09$), jelikož nebylo u vybraných psů možné odebrat parametry zevního zvukovodu bez vyvolání stresové reakce, a pro adekvátní posouzení je třeba získat výběrový vzorek s větším množstvím subjektů.

Závěrem lze konstatovat, že byla prokázána souvislost mezi prodlužující se dobou aktivního pohybu a nárůstem koncentrace salivárního kortizolu, podobně jako souvislost mezi uraženou vzdáleností na deltu tělesné teploty, čím delší vzdálenost zkušební záchraný pes urazil, tím se $\Delta t_{t_{ymp}}$ snížila, pravděpodobně důsledkem adaptace na zvýšenou svalovou aktivitu a mobilizovaný metabolismus. Důležitým faktorem je adekvátní trénink a příprava služebních psů, aby se předešlo jejich přetížení, protože neschopnost adaptace na fyziologické nároky v kontextu pátrání může vést k únavě a selhání organismu z přetěžování, a to i k specifickým onemocněním a zraněním, které ovlivňují stav vitálního organismu psa a jeho životní pohody.

Monitoring diplomové práce se zabýval simulovaným pátráním s dlouhým časovým rámcem s přesahem mnoha studií, které se nezaměřily na celodenní zátěž, avšak nedokáže posoudit dlouhodobý stres u služebních psů v důsledku náročného a často stresujícího nasazení při vyhledávání pohřešovaných osob. Literatura neposkytuje dostatek informací o dopadu intenzivního a fyzicky náročného pátrání záchraných psů na jejich fyziologický stav z dlouhodobé perspektivy a tudíž může tato závěrečná práce podnítit zkoumání v této otázce.

(H1): S prodlužující se dobou strávenou aktivním pohybem nastane vzestup delty koncentrace a delty hodnot i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu iii) tělesné teploty.

Nepozorovali jsme vliv prodlužující se doby strávené aktivním pohybem na Δc salivárního oxytocinu a ani $\Delta t_{t_{ymp}}$, avšak potvrzujeme jej pro Δc salivárního kortizolu. S prodlužující se dobou pohybu psů rovněž vzroste Δc salivárního kortizolu.

i) ✓, ii) ✗, iii) ✗ **Hypotézu 1 potvrzujeme pro Δc salivárního kortizolu.**

(H2): Čím delší vzdálenost pes urazí volným pohybem v terénu (množství překonaných km na trase), tím markantnější je vzestup koncentrace a hodnot: i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu iii) tělesné teploty.

Nebyl prokázán vliv uražené vzdálenosti na vzestup Δc salivárního kortizolu, ani Δc salivárního oxytocinu. Výsledky prokazují ovlivnění $\Delta t_{t_{ymp}}$ množstvím překonaných kilometrů, přičemž $\Delta t_{t_{ymp}}$ pozvolna klesala úměrně s množstvím překonaných kilometrů, tzn. delší uraženou vzdáleností psem

i) ✗, ii) ✗, iii) ✓ **Hypotézu 2 potvrzujeme pouze pro $\Delta t_{t_{ymp}}$**

(H3): Vzestup delty koncentrace a hodnot i) salivárního kortizolu ii) salivárního oxytocinu iii) delty tělesné teploty bude přítomen během průchodu obou segmentů zatížení.

Markantní vzestup Δc salivárního kortizolu jsme pozorovali u služebních psů během pátrání pouze v prvním segmentu (PP-OM1), po němž Δc salivárního kortizolu naopak poklesla. Delta koncentrace salivárního oxytocinu shodně klesala postupem obou zátěžových segmentů, mezi nimiž nebyla zaznamenána významná diference, zatímco $\Delta t_{t_{ymp}}$ vykazuje tendenci pro vzestup průchodem obou těchto segmentů.

i) ✗, ii) ✗, iii) ✓ **Hypotézu 3 potvrzujeme pouze pro $\Delta t_{t_{ymp}}$**

(H4): Markantnější vzestup delty koncentrace i) salivárního kortizolu, ii) salivárního oxytocinu, iii) delty tělesné teploty nastane průchodem prvního segmentu zatížení v porovnání s druhým segmentem.

Mezi individuálními zátěžovými segmenty nebyl pro Δc salivárního oxytocinu zjištěn výrazný rozdíl, nýbrž při jejich prostupu došlo v obou případech k poklesu. Významný vzestup byl zjištěn v případě Δc salivárního kortizolu vstupem prvního segmentu, po němž následoval pokles. Podobná tendence byla zaznamenána pro $\Delta t_{t_{ymp}}$ s diferencí prostupu druhým segmentem, během něhož $\Delta t_{t_{ymp}}$ vzrostla ($1,4 \text{ } ^\circ \text{C} \pm 0,59$) a poté došlo ke stabilizaci s tendencí k pozvolnému poklesu.

i) ✓ , ii) ✗ , iii) ✓ **Hypotézu 4 potvrzujeme pro Δc salivárního kortizolu a $\Delta t_{t_{ymp}}$.**

Dlouhodobá a intenzivní práce služebních psů má vliv na jejich fyziologický stav, a to zejména co se týče Δc salivárního kortizolu a $\Delta t_{t_{ymp}}$, kdy oxytocin zejména reflektuje vzestupy Δc salivárního kortizolu. Zkušeni a trénovaní psi využití v této práci prokázali dostatečnou adaptaci organismu na tento fyzický výkon, která je klíčová pro prevenci únavy a zranění. Avšak dosud není známo, jaké jsou dlouhodobé dopady zátěže u psů určených pro plošné pátrání. Tato diplomová práce tak podněcuje další výzkum v této oblasti.

Seznam použité literatury

8

-
- Accorsi PA, Carloni E, Valsecchi P, Viggiani R, Garnberoni M, Tarnanini C, Seren E. 2008. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen Comp Endocrinol* 155:398–402.
- Aguilera G. 2011. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neuropeptides. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 7:327-336.
- Alahi MEE, Mukhopadhyay. 2017. Detection Methodologies for Pathogen and Toxins: A Review. *Sensors* 17(8) (1885) doi: 10.3390/s17081885.
- Alexander BM, Friend T, Haug L. 2011. Obedience training effects on search dog performance. *Applied Animal Behaviour Science* 132(3-4):152–159.
- Ahrens F, Knies K, Schneider M, Kohler F, Erhard M. 2005. Influence of different training and outdoor conditions on plasma histamine and cortisol concentrations in search-and-rescue dogs. *Inflamm. Res.* 54:34–35.
- Ando I, Karasawa K, Shioya T, Matsuda H, Tanaka A. 2020. Evaluation of stress status using the stress map for guide dog candidates in the training stage using variations in the serum cortisol with nerve growth factor and magnesium ions. *Veterinary and Animal Science* 10 (100129) doi: 10.1016/j.vas.2020.100129.
- Angle CT, Wakshlag JJ, Gillette RL, Stokol T, Geske S, Adkins TO, Gregor C. 2009. Hematologic, serum biochemical, and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high intensity exercise in sled dogs. *Vet Clin Pathol.* 38(3):370–374.
- Ayidin S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72:4-15.
- Baker J, Davis MS. 2018. Effect of conditioning on exercise-induced hyperthermia and post-exercise cooling in dogs. *Comp. Exerc. Physiol.* 14:91–97.
- Baker J, Dechant M, Jenkins E, Moore G, Kelsey K, Perry E. 2020. Body temperature responses during phases of work in human remains detection dogs undergoing a simulated deployment. *Animals* 10(4) (673) doi: 10.3390/ani10040673.

- Balodis IM, Wynne-Edwards KE, Olmstead MC. 2010. The other side of the curve: Examining the relationship between pre-stressor physiological responses and stress reactivity. *Psychoneuroendocrinology* **35**:1363-1373.
- Baritaki S, de Bree E, Chatzaki E, Pothoulakis C. 2019. Chronic stress, inflammation, and colon cancer: a crh system-driven molecular crosstalk. *Journal of Clinical Medicine* **8**(10) (1669) doi: 10.3390/jcm8101669.
- Barret EJ. 2016. The adrenal gland. The adrenal cortex: cortisol. Cortisol is the primary glucocorticoid hormone in humans. Pages 1018-1043 in Boron WF, Boulpaep EL, editors. *Medical Physiology*, third edition, Elsevier, Philadelphia. ISBN 978-1-4557-4377-3.
- Beerda B, Schilder M, Bernadina W, Van Hooff J, De Vries H, Mol J. 1999. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. *Physiology & Behaviour* **66**(2):243–254.
- Beerda B, Schilder MBH, Van Hooff J, De Vries HW, Mol J. 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Appl. Anim. Behaviour Science* **58**(3-4):365–381.
- Beetz A, Uvnas-Moberg K, Julius H, Kotrschal K. 2012. Psychosocial and psychophysiological effects of human-animal interactions: the possible role of oxytocin. *Front. Psychol.* **3**:234.
- Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. 2004. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **287**(1):87–96.
- Bennett A, Hayssen V. 2010. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domest. Anim. Endocrinol.* **39**(3):171–180.
- Bensky MK, Gosling SD, Sinn DL. 2013. The world from a dog's point of view: A review and synthesis of dog cognition research. *Advances In The Study Of Behaviour* **45**:209–406.
- Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* **4**(7):1167–1183.
- Bergamasco L, Osella MC, Savarino P, Larosa G, Ozella L, Manassero, M, Badino P, Odore R, Barbero R, Re G. 2010. Heart rate variability and saliva cortisol assessment in shelter dog: Human–animal interaction effects. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **125**(1-2): 56–68.
- Bergeron R, Scott SL, Émond JP, Mercier F, Cook NJ, Schaefer AL. 2002. Physiology and behavior of dogs during air transport. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne Recherche* **66**(3):211–6.
- Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. 2008. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.* **19**(5):175-180.
- Boster Biological Technology (antibody and ELISA experts). 2023. Boster Bio, antibody and ELISA experts. ELISA principle. Boster Biological Technology, 3942 Valley Ave Pleasanton, CA 94566, United States of America. Available from: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle> (accessed April 2023).

- Bray EE, Sammel MD, Seyfarth RM, Serpell JA, Cheney DL. 2017. Temperament and problem solving in a population of adolescent guide dogs. *Anim. Cogn.* 20(5):923–939.
- Brown J, Walker S, Steinman K. 2004. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park. Endocrine Workshop on Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species. Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand.
- Browne C, Stafford K, Fordham R. 2006. The use of scent-detection dogs. *Irish Veterinary Journal* 59(2): 97-104.
- Brucks D, Marshall-Pescini S, Range F. 2019. Dogs and wolves do not differ in their inhibitory control abilities a non-social test battery. *Anim. Cogn* 22(1):1-15.
- Bruchim Y, Horowitz M, Aroch I. 2017. Pathophysiology of heatstroke in dogs – revisited. *Temperature* 4(4): 356-370.
- Cannas S, Palestrini C, Canali E, Cozzi B, Ferri N, Heinzl E, Minero M, Chincarini M, Vignola G, Dalla Costa E. 2018. Thermography as a non invasive measure of stress and fear of humans in sheep. *Animals* 8: 146.
- Carodoso C, Ellenbogen MA, Orlando MA, Bacon SI, Joober R. 2013. Intranasal oxytocin attenuates the cortisol response to physical stress: A dose-response study. *Psychoneuroendocrinology* 38(3):399-407.
- Carter AJ, Hall EJ. Investigating factors affecting the body temperature of dogs competing in cross country (canicross) races in the UK. *Journal of Thermal Biology* 72: 33-38.
- Cobb ML, Iskandarani K, Chinchilli VM, Dreschel NA. 2016. A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domest. Anim. Edocrinol.* 57: 31-42.
- Clow A, Hucklebridge F, Stalder T, Evans P, Thorn L. 2010. The cortisol awakening response: more than a measure of HPA axis function. *Neurosci Biobehav Rev.* 35(1):97–103.
- Colussi A, Sandri M, Stefanon B. 2016. Salivary cortisol: a marker of the adaptive response of the organism to environmental stimuli. *Veterinaria.* 30:3.
- Colussi A, Stefanon B, Adorini C, Sandri M. 2018. Variations of salivary cortisol in dogs exposed to different cognitive and physical activities. *Italian Journal of Animal Science* 17:1030–1037.
- Craw OA. 2016. Assessing the role of anticipation in psychobiological stress responding [PhD. Thesis]. Faculty of Health and Life sciences, University Northumbria, Newcastle.
- Craig AT, Gillette RL. 2011. Telemetric measurement of body core temperature in exercising unconditioned labrador retrievers. *Can. J. Vet. Res.* 75:157–159.
- Crowther JR. 2000. The ELISA guidebook. Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, New Jersey. ISBN 0-89603-950-1.
- Crowther JR. 2009. The ELISA guidebook, second edition. Humana Press in series Springer Protocols, Methods in Molecular biology. Totowa, New Jersey. ISBN 978-1-60327-253-7.

- Cugmas B, Šušterič P, Gorenjec NR, Plavec T. 2020. Comparison between rectal and body surface temperature in dogs by the calibrated infrared thermometer. *Veterinary and Animal Science* **9**:1-8.
- Dabrowska J, Hazra R, Ahern TH, Guo JD, McDonald AJ, Mascagni F, Muller JF, Young LJ, Rainnie DG. 2011. Neuroanatomical evidence for reciprocal regulation of the corticotrophinreleasing factor and oxytocin systems in the hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: Implications for balancing stress and affect. *Psychoneuroendocrinology* **36**(9):1312–1326.
- Davis MS. 2009. Physiological demands and adaptations of working dogs. Pages 245–262 in Helton WS, editor. *Canine ergonomics: the science of working dogs*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, United States of America. ISBN 978-1-4200-7991-3.
- de Jong TR, Menon R, Bludau A, et al. 2015. Salivary oxytocin concentrations in response to running, sexual self-stimulation, breastfeeding and the TSST: the Regensburg oxytocin challenge (ROC) study. *Psychoneuroendocrinology* **62**:381–8.
- Dief A, Sivukhina E, Jirikowski G. 2018. Oxytocin and stress response. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases* **8**:93-104.
- Diverio S, Barbato O, Cavallina R, Guelfi G, Iaboni M, Zasso R, Di Mari W, Santoro M, Knowles T. 2016. A simulated avalanche search and rescue mission induces temporary physiological and behavioural changes in military dogs. *Physiol. Behav.* **163**:193–202.
- Dragoş D, Tănăsescu MD. 2010. The effect of stress on defense systems. *J. Med. Life* **3**:10-18.
- Dreschel NA, Granger DA. 2009. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Horm. Behav.* **55**:163–168.
- Duque-Wilckens N, Torres LY, Yokoyama S, Minie VA, Tran AM, Petkova SP, Hao R, Ramos-Maciel S, Rios RA, Jackson K, Flores-Ramirez FJ, Garcia-Carachure I, Pesavento PA, Iñiguez SD, Grinevich V, Trainor BC. 2020.
- Evans HE, de Lahunta A. *Miller's Anatomy of the Dog*, 4th ed. 2023. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, USA. ISBN 9781-4377-0812-7.
- Extrahypothalamic oxytocin neurons drive stress-induced social vigilance and avoidance. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**(42):26406-26413.
- Durocher LL, Hinchcliff KW, Williamson KK, McKenzie EC, Holbrook TC, Willard M, Royer CM, Davis MS. 2007. Effect of strenuous exercise on urine concentrations of homovanillic acid, cortisol, and vanillylmandelic acid in sled dogs. *Am J Vet Res.* **68**:107–111.
- Engvall E. 2010. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Chemistry* **56**(2):319-320.
- Farley CM, Kaynaroglu P, Magness D, Riegel RJ, Otto CM. 2021. Thermal Imaging Following Exercise in Working Dogs. *Front Vet Sci.* **8** (705478) doi: 10.3389/fvets.2021.705478.
- Feldman R. 2012. Oxytocin and social affiliation in humans. *Hormones and Behavior* **61**(3):380–391.
- Feldman R, Bakermans-Kranenburg M. 2017. Oxytocin: A parenting hormone. *Current Opinion in Psychology* **15**:13–18.

- Ferasin L, Marcora S. 2009. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 179:839–845.
- Foyer P, Svedberg AM, Nilsson E, Wilsson E, Olsen Faresjö Å, Jensen P. 2016. Behavior and cortisol responses of dogs evaluated in a standardized temperament test for military working dogs. *J. Vet. Behav.* 11:7–12.
- Fratkin JL, Sinn DL, Patall EA, Gosling SD. 2013. Personality consistency in dogs: a meta-analysis. *PLoS One* 8(1) (e54907) doi 10.1371/journal.pone.0054907.
- Fergestad ME, Jahr TH, Krontveit RI, Skancke E. 2016. Serum concentration of gastrin, cortisol and C-reactive protein in a group of Norwegian sled dogs during training and after endurance racing: a prospective cohort study. *Acta Vet Scand* 58: 24.
- Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo E. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clin. Biochem.* 42:1205–1217.
- Gazit I, Terkel J. 2003. Explosives detection by sniffer dogs following strenuous physical activity. *Applied Animal Behaviour Science* 81:149–161.
- Giannetto C, Fazio F, Assenza A, Alberghina D, Panzera M, Piccione G. 2014. Parallelism of circadian rhythmicity of salivary and serum cortisol concentration in normal dogs. *J Appl Biomed.* 12:229–233.
- Gillette RL. 2013. Conditioning And Training In The Canine Athlete, Proceedings. Animal Health & Performance Program, Auburn University, AL. Conference AVCS Veterinary Symposium, San Antonio. 508-510.
- Grinevich V, Ludwig M. 2021. The multiple faces of the oxytocin and vasopressin systems in the brain. *Journal of Neuroendocrinology* 33(11) (e13004) doi: 10.1111/jne.13004.
- Grinevich V, Stoop R. 2018. Interplay between oxytocin and sensory systems in the orchestration of socio-emotional behaviors. *Neuron.* 99:887–904.
- Glenk LM, Kothgassner OD, Stetina BU, Palme R, Kepplinger B, Baran H. 2014. Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: a pilot study. *J Vet Behav.* 9:98–106.
- Gordon C, Lavie P. 1985. Day-night variations in urine excretions and hormones in dogs: role of autonomic innervation. *Physiol Behav* 35:175–81.
- Gordon LE. 2018. The contribution of rescue dogs during natural disasters. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Int Epiz.* 37:213–221.
- Granger DA, Kivlighan KT, Fortunato C, Harmon AG, Hibell LC, Schwartz EB, Whembolua GL. 2007. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: Problems and solutions for collecting specimens. *Physiol. Behav.* 92:583–590.
- Hall EJ, Carter AJ. 2017. Comparison of rectal and tympanic membrane temperature in healthy exercising dogs. *Comparative physiology* 13(1):37-44.

- Handlin L, Hydbring-Sandberg E, Nilsson A, Ejdeback M, Jansson A, Uvnäs-Moberg K. 2011. Short-term interaction between dogs and their owners: effects on oxytocin, cortisol, insulin and heart rate – an exploratory study. *Anthrozoos* 24(3):301-315.
- Haverbeke A, Diederich C, Depiereux E, Giffroy JM. 2008. Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiol. Behav.* 93:59–67.
- Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju Ch. 2023. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Pages 1-18 in Matson RS, editor. *ELISA: methods and protocols*. Humana Press in series Springer Nature 2023 (Springer Protocols), *Methods in molecular biology*. New York Plaza, New York, United States of America. ISBN 978-1-0716-2902-4.
- Hellhammer D, Wust S, Kudielka B. 2009. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 34(2):163–171.
- Helton WS. 2009. *Canine ergonomics: the science of working dogs*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, United States of America. ISBN 978-1-4200-7991-3.
- Hennessy MB. 2013. Using hypothalamic-pituitary-adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: a review. *Appl Anim Behav Sci* 149:1–12.
- Herman JP, Mcklveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B. 2012. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45:292-298.
- Herman JP, Mcklveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. 2016. Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr. Physiol* 6:603-621.
- Hew-Butler T, Noakes TD, Soldin SJ, Verbalis, JG. 2008. Acute changes in endocrine and fluid balance markers during high-intensity, steady-state, and prolonged endurance running: unexpected increases in oxytocin and brain natriuretic peptide during exercise. *European Journal of Endocrinology* 159(6): 729–737.
- Hodges JK, Heisterman M. 2011. Field endocrinology: monitoring hormonal changes in free-ranging primates. Pages 353-367 in Setchell JM, Curtis DJ, editors. *Field and Laboratory Methods in Primatology: A Practical Guide*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Horvath Z, Igyarto BZ, Magyar A, Miklosi A. 2007. Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. *Horm Behav* 52:621–630.
- Huntingford JL, Levine CB, Mustacich DJ, Corrigan D, Downey RL, Wakshlag JJ. 2014. The effects of low intensity endurance activity on various physiological parameters and exercise induced oxidative stress in dogs. *Open J Vet Med.* 4:134-144.
- Chmelíková E, Bolechová P, Chaloupková H, Svobodová, I, Jovičić M, Sedmíková M. 2020. Salivary cortisol as a marker of acutestress in dogs: A review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 72 (106428) doi: 10.1016/j.domaniend.2019.106428.

- Institute for interdisciplinary salivary bioscience research (IISBR). 2023. Assay services, saliva immunoassay test, cortisol. International Society for the Advancement of Cytometry (ISAC) database. Available from: <https://iisbr.uci.edu/salivary-cortisol/> (accessed February 2023)
- Jean-Joseph H, Kortekaas K, Range F, Kortschal K. 2020. Context-specific arousal during resting in wolves and dogs: effect of domestication? *Front. Psychol* 11 (568199) doi: 10.3389/fpsyg.2020.568199.
- Jianwen H. 2013. Practical guide to ELISA development. Antibody or antigen reagents & affinity. Pages 378-393 in Wild D, editor. *The immunoassay handbook. Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*, fourth edition. Elsevier Science; 4th edition, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford. ISBN 978-0-08-097037-0.
- Jones KE, Dashfield K, Downend AB, Otto CM. 2004. Search-and-rescue dogs: an overview for veterinarians. *J Am Vet Med Assoc.* 225(6):854-860.
- Jong TR. 2017. Forced swimming-induced oxytocin release into blood and brain: effects of adrenalectomy and corticosterone treatment. *Psychoneuroendocrinology* 77:165–174.
- Johnston S, Mather E. 1978. Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay: clinical absence of diurnal variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests. *Am J Vet Res* 39:1766–70.
- Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ. 2010. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 35:2-16.
- Karatsoreos IN, McEwen BS. 2011. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. *Trends Cogn Sci* 15:576–84.
- King MA, Leon LR, Mustico DL, Haines JM, Clanton TL. 2015. Biomarkers of multiorgan injury in a preclinical model of exertional heat stroke. *J Applied Physiol* 118:1207-1220.
- Kirschbaum C, Read GF, Hellhammer D. 1992. *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*. Hogrefe & Huber. Seattle, Washington. ISBN 978-0-8893-7050-0.
- Knobloch SH, Charlet A, Hoffmann LC, et al. 2012. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear responses. *Neuron* 73:553-566.
- Kobelt AJ, Hemsworth PH, Barnett JL, Butler KL. 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in veterinary science* 75(2):157-161.
- Köhler F. 2004. *Vergleichende Untersuchungen zur Belastung von Lawinen-und Rettungshunden bei der Lauf-und Sucharbeit* [PhD. Thesis]. Faculty of Veterinary Medicine, University of Munich.
- Kortschal K, Schöberl I, Bauer B, Thibeaut AM, Wedl M. 2009. Dyadic relationships and operational performance of male and female owners and their male dogs. *Behavioural Processes* 81(3):383–391.
- Koyama, T.; Omata, Y.; Saito, A. Changes in Salivary Cortisol Concentrations During a 24-Hour Period in Dogs. *Horm. Metab. Res.* 2003, 35, 355–357.

- Laurent C, Penzer F, Letroye B, Carpentier A, Baudry S, Duchateau J.. 2016. Effect of a strenght training method characterized by an incremental number of repetitions across sets and a very short rest interval. *Scienc & Sports* 31(5):115-121
- Lee DY, Kim E, Choi MH. 2015. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Reports* 48(4):209-2016.
- Lee HS, Kim JH. 2020. The dog as an exercise science animal model: a review of physiological and hematological effects of exercise conditions. *Phys. Act. Nutr* 24(4):1-6.
- Leng, G, Ludwig M. 2008. Neurotransmitters and peptides: whispered secrets and public announcements. *The Journal of Physiology*, 586(23):5625–5632.
- Lequin RM. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 51(12):2415–2418.
- Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Lewis JG, Weller A. 2007. Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol Behav* 90:43–53.
- Li Y, Hassett AL, Seng JS. 2019. Exploring the mutual regulation between oxytocin and cortisol as a marker of resilience. *Arch Psychiatr Nurs*. 33(2):164-173.
- Lindsay SR. 2000. Handbook of applied dog behavior and training, vol. two: ethiology and assesement of behavior problems. Pages 433-548 in Lidsay SR, editor. *Impulsive, extrafamilial, and intraspecific aggression*. Iowa state University Press, Iowa. ISBN: 978-0-8138-0754-6
- Lit L, Boehm D, Marzke S, Schweitzer J, Oberbauer AM. 2010. Certification testing as an acute naturalistic stressor for disaster dog handlers. *Stress*. 13(5):392-401.
- Long RA, Donovan TM, Mackay P, Zielinski WJ, Buzas, JS. 2007. Effectiveness of scat detection dogs for detecting forest carnivores. *The Journal of Wildlife Management* 71(6), 2007-2017.
- Ludyga S, Ishihara T, Kamijo K. 2022. The Nervous System as a Pathway for Exercise to Improve Social Cognition. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 50(4):203-212.
- MacLean EL, Wilson S, Martin WL, Davis JM, Nazarloo HP, Carter CS. 2019. Challenges for measuring oxytocin: the blind men and the elephant? *Psychoneuroendocrinology* 107:225-231.
- Magnano CL, Diamond EJ, Gardner JM. 1989. Use of salivary cortisol measurements in young infants: a note of caution. *Child Dev* 60:1099–1101.
- Marin MF, Raymond C, Lupien SJ. 2019. Memory and stress. Pages 69-78 in Fink G, editor. *Stress, physiology, biochemistry and Pathology*. Handbook of stress series, volume 3. Academic Press, imprint of Elsevier. University of Melbourne, Parkville , Victoria, Australia.
- Marques AH, Silverman MN, Sternberg EM. Evaluation of stress systems by applying noninvasive methodologies: measurements of neuroimmune biomarkers in the sweat, heart rate variability and salivary cortisol. 2010. *Neuroimmunomodulation* 17:205-208.
- Matson RS. 2023. ELISA essentials: surfaces, antibodies, enzymes, and substrates. Pages 19-32 in Matson RS, editor. *ELISA: methods and protocols*. Humana Press in series Springer Nature 2023 (Springer Protocols), Methods in molecular biology, vol. 2612. New York Plaza, NewYork, United States of America. ISBN 978-1-0716-2902-4.

- Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos GP. 2005. Exercise and the stress system. *Hormones (Athens)* 4:73–89.
- Menchetti L, Guelfi G, Speranza R, Carotenuto P, Moscati L, Diverio S. 2019. Benefits of dietary supplements on the physical fitness of German Shepherd dogs during a drug detection training course. *PLoS ONE* 14(6) (e0218275) doi: 10.1371/journal.pone.0218275
- Meunier LD. 2006. Selection, Acclimation, Training, and Preparation of Dogs for the Research Setting. *ILAR Journal* 47:326-347.
- Miklósi A. 2009. Evolutionary approach to communication between humans and dogs. *Vet. Res. Commun.* 33(1):53-59.
- Miller WL. 2008. Steroidogenic enzymes. *Endocr. Review* 13:1-18.
- Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. 2003. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119:887-897.
- Moberg GP, Mench JA. 2000. *The biology of animal stress: basic principles and Implications for animal welfare.* CAB International, Wallingford, UK. ISBN 978-0-85199-359
- Möstl E, Rettenbacher S, Palmer R. 2005. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046:17-34.
- Musiata N, Hołynska-Iwan I, Olszewska-Słonina D. 2018. Cortisol inspection in the physiology and stress. *J. Lab. Diagn.* 54:29–36.
- Myers B, McKlveen JM, Herman JP. 2012. Neural regulation of stress response: the many faces of feedback. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32:683-694.
- Neumann ID, Landgraf R. 2012. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in Neurosciences* 35(11):649-659.
- Novák K, Chaloupková H, Bittner V, Svobodová I, Kouba M. 2022. Factors affecting locomotor activity of search and rescue dogs: the importance of terrain, vegetation and dog certification. *Applied Animal Behaviour Science* 253(4) (105674) doi:10.1016/j.applanim.2022.105674.
- O'Brien C, Karis AJ, Tharion WJ, Sullivan HM, Hoyt RW. 2017. Core Temperature Responses of Military Working Dogs During Training Activities and Exercise Walks. *US Army Med. Dep. J.* 3-17:71–78.
- Onaka T, Takayanagi Y. 2021. Role of oxytocin in the control of stress and food intake. *J. Neuroendocrinol* 31(3) (e12700) doi: 10.1111/jne.12700.
- Ogi A, Mariti C, Baragli P, Sergi V, Gazzano A. 2020. Effects of stroking on salivary oxytocin and cortisol in guide dogs: Preliminary Results. *Animals* 10(4):708.
- Osorio C, Probert T, Jones E, Young AH, Robbins I. 2016. Adapting to stress: understanding the neurobiology of resilience. *Journal of Behavioral Medicine* 43(4):307-322.
- Osterkamp T. 2020. *Detector Dogs and Scent Movement: Detector Dogs and Scent Movement.* CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida. ISBN 9780429020704.

- Ottenheimer Carrier L, Cyr A, Anderson RE, Walsh CJ. 2013. Exploring the dog park: relationships between social behaviours, personality and cortisol in companion dogs. *Appl Anim Behav Sci* 146:96–106.
- Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Mostl E. 2005. Stress hormones in mammals and birds - comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. Pages 162-172 in Vaudry H, Roubos E, Schoofs L, Fiik G, Larhammar D, editors. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology*. New York: Annals of the New York Academy of Sciences.
- Palme R. 2012. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assesment in farm animals. *Animal Welfare – The UFAW Journal* 21(3):331-337.
- Pastore C, Pirrone F, Balzarotti F, Faustini M, Pierantoni L Albertini M. 2011. Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 6:188-194.
- Patterson EE, Minor KM, Tchernatynskaia AV, Taylor SM, Shelton GD, Ekenstedt KJ, Mickelson JR. 2008. A canine DNM1 mutation is highly associated with the syndrome of exercise-induced collapse. *Nat Genetics* 40:1235-1239.
- Pellegrino FJ, Risso A, Vaquero PG, Corrada YA. 2018. Physiological parameter values in greyhounds before and after high-intensity exercise. *Open Vet. J.* 8:64–67.
- Piccione G, Casella S, Panzera M, Giannetto C, Fazio F. 202. Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained beagle dogs. *Exp Anim* 61:511–5.
- Poole, DC, Erickson, HH. 2011. Highly athletic terrestrial mammals: horses and dogs. *Compr. Physiol.* 1(1): 1–37.
- Popovic B, et al. 2019. Acute response to endurance exercise stress: focus on catabolic/anabolic interplay between cortisol, testosterone, and sex hormone binding globulin in professional athletes. *Journal of Medical Biochemistry* 38(1):6-12.
- Quintana DS, Lischke A, Grace S, Scheele D, Ma Y, Becker B. 2021. Advances in the field of intranasal oxytocin research: lessons learned and future directions for clinical research. *Mol. Psychiatry* 26:80-91.
- Radosevich PM, Nash JA, Lacy DB, O'Donovan C, Williams PE, Abumrad NN. 1989. Effects of low- and high-intensity exercise on plasma and cerebrospinal fluid levels of ir-betaendorphin, ACTH, cortisol, norepinephrine and glucose in the conscious dog. *Brain Research* 498(1):89-98.
- Raekallio MR, Kuusela EK, Lehtinen ME, Tykkylöinen MK, Huttunen P, Westerholm FC. 2005. Effects of exercise-induced stress and dexamethasone on plasma hormone and glucose concentrations and sedation in dogs treated with dexmedetomidine. *Am J Vet Res* 66:260–265.
- Ralph CR, Tilbrook AJ. 2016. Invited review: The usefulness of measuring glucocorticoids for assesing animal wlefare. *J. Anim. Sci* 94(2):457-70.

- Rassovsky Y, Harwood A, Zagoory-Sharon O, Feldman R. 2019. Martial arts increase oxytocin production. *Sci. Rep.* 9(1) (12980) doi: 10.1038/s41598-019-49620-0.
- Romanov RA, Zeisel A, Bakker J, et al. 2016. Molecular interrogation of hypothalamic organization reveals distinct dopamine neuronal subtypes. *Nature Neuroscience* 20(2):176–188.
- Robbins PJ, Ramos MT, Zanghi, BM, Otto CM. 2017. Environmental and physiological factors associated with stamina in dogs exercising in high ambient temperatures. *Front. Vet. Sci.* 4:1–9.
- Rosell F. 2018. *Secrets of the Snout: The dog's incredible nose*. The University of Chicago Press. Chicago. ISBN 978-0-226-53636-1.
- Rovira S, Munoz A, Benito M. 2007. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet Clin Pathol* 36:30–5.
- Rovira, S, Munoz A, Benito M. 2008. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. *Vet. Med. Praha* 53:333–346.
- Royer CM, Willard M, Williamson K, Steiner JM, Williams DA, David M. 2005. Exercise stress, intestinal permeability and gastric ulceration in racing Alaskan sled dogs. *Equine Comp Exerc Physiol.* 2:53–59
- Sandri M, Colussi A, Perrotta MG, Stefanon B. 2015. Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context. *J Vet Behav* 10:302–306.
- Sapolsky RM. 2000. Stress hormones: good and bad. *Neurobiol Dis* 7:540–542.
- Selye HA. 1998. Syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *Neuropsychiatry Clin Neurosci* 10:230–31.
- Shah K, Manghsoudlou P. 2016. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine* 77(7):98-101.
- Sherman BL, Gruen ME, Case BC, Foster ML, Fish RE, Lazarowski L, DePuy V, Dorman DC. 2015. A test for the evaluation of emotional reactivity in labrador retrievers used for explosives detection. *J Vet Behav* 10:94–102.
- Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran M. 2001. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology* 26:165–73
- Shirtcliff EA, Vitacco MJ, Graf A, Gostisha JBAA, Merz LBAJ, Zahn-Waxler C. 2009. Neurobiology of empathy and callousness: Implications for the development of antisocial behavior. *Behav. Sci. Law* 27:137–171.
- Shivik JA. 2002. Odor-adsorptive clothing, environmental factors, and search-dog ability. *Wildlife Society Bulletin* 30:721-727.
- Schneider A, Erhard M. 2009. Effectiveness of and physical and mental strain in search and rescue dogs during a three-day search operation. *J. Vet. Behav.: Clin. Appl. Res.* 2(4):82.

- Schneider M, Slotta-Bachmayr L. 2009. Physical and Mental Stress of SAR Dogs during Search Work. Pages 263-279 in Helton WS, editor. *Canine Ergonomics: The Science of Working Dogs*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Sinn DL, Gosling SD, Hilliard S. 2010. Personality and performance in military working dogs: Reliability and predictive validity of behavioral tests. *Appl Anim Behav Sci* 127: 51–65.
- Sjaastad OV, Sand O, Hove K. 2016. *Physiology of domestic animals*, 3rd edition. Scandinavian Academic Pr, Scandinavia. ISBN: 978-8291743417.
- Slensky K, Drobotz K, Downend A, Otto C. 2004. Deployment morbidity among search-and-rescue dogs used after the September 11, 2001, terrorist attacks. *J Am Vet Med Assoc* 225:868–873.
- Smith SM, Vale WW. 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dial Clin Neurosci* 8(4):383.
- Sousa MG, Carareto R, Pereira-Junior VA, Aquino MCC. 2011. Comparison between auricular and standard rectal thermometers for the measurement of body temperature in dogs. *The Canadian Veterinary Journal* 52(4):403-406.
- Stalder T, Kirschbaum C, Kudielka BM, Adam EK, Pruessner JC, Wüst S, Dockray S, Smyth N, Evans P, Hellhammer DH, Miller R, Wetherell MA, Lupien SJ, Clow A. 2016. Assessment of the cortisol awakening response: expert consensus guidelines. *Psychoneuroendocrinology* 63:414–432.
- Steiss J, Ahmad HA, Cooper P, Ledford C. 2004. Physiologic responses in healthy Labrador Retrievers during field trial training and competition. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18:147–151.
- Steiss JE, Wright JC. 2008. Respiratory alkalosis and primary hypocapnia in labrador retrievers participating in field trials in high-ambient-temperature conditions. *Am J Vet Res* 69:1262–1267.
- Svobodová I, Chaloupková H, Končel R, Bartoš L, Hradecká L, Jebavý L. 2014. Cortisol and Secretory Immunoglobulin A Response to Stress in German Shepherd Dogs. *PLoS ONE* 9(3) (e90820) doi:10.1371/journal.pone.0090820.
- Takahashi Y, Ebihara S, Nakamura Y, Takahashi K. 1981. A model of human sleep-related growth-hormone secretion in dogs - effects of 3-hours, 6-hours and 12-hours of forced wakefulness on plasma growth-hormone, cortisol, and sleep stages. *Endocrinology* 109:262–272.
- Taylor SM, Shmon CL, Adams VJ, Mickelson JR, Patterson EN, Shelton GD. 2009. Evaluations of labrador retrievers with exercise-induced collapse, including response to a standardized strenuous exercise protocol. *J Am Animal Hospital Association* 45:3-13.
- Taylor S, Shmon C, Su L, Epp T, Minor K, Mickelson J, Patterson E, Shelton GD. 2016. Evaluation of dogs with border collie collapse, including response to two standardized strenuous exercise protocols. *J Am Animal Hospital Association* 52:281-290.
- Tizabi Y, Aguilera G. 1992. Desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following prolonged administration of corticotropin-releasing hormone or vasopressin. *Neuroendocrinology* 56:611–618.

- Travain T, Colombo ES, Heinzl E, Bellucci D, Prato Previde E, Valsecchi P. 2015. Hot dogs: thermography in the assessment of stress in dogs. *Journal of Veterinary Behavior* 10:17-23.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397–409.
- Vincent IC, Michell AR. 1992. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res Vet Sci* 53:342–345.
- Wenger-Riggenbach B, Boretti F, Quante S, Schellenberg S, Reusch C, Sieber-Ruckstuhl N. 2010. Salivary Cortisol Concentrations in Healthy Dogs and Dogs with Hypercortisolism. *J. Vet. Intern. Med.* 24:551–556
- Wild D. 2013. *The immunoassay handbook. Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques, fourth edition.* Elsevier Science; 4th edition, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford. ISBN 978-0-08-097037-0.
- Wilhelm SF. 2007. *Belastung von Rettungshunden während einer dreitägigen Trummersuche auf einem Katastrophenebungsgelände.* [PhD. Thesis]. Ludwig Maximilians University, Munich.
- Wilsterman K, Alonge MM, Ernst DK, Limber C, Treidel LA, Bentley GE. 2020. Flexibility in an emergency life-history stage: acute food deprivation prevents sickness behaviour but not the immune response. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287(1929) (20200842) doi: 10.1098/rspb.2020.0842.
- Whirledge S, Cidlowski JA. 2013. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 154:4450–4468.
- White-Traut R, Watanabe K, Pournajafi-Nazarloo H, Schwertz D, Bell A, Carter CS. 2009. Detection of salivary oxytocin levels in lactating women. *Developmental Psychobiology* 51(4):367-373.
- Wojtaś J, Karpiński M, Czyżowski P. 2020. Salivary Cortisol Interactions in Search and Rescue Dogs and their Handlers. *Animals (Basel)*. 10(4):595.
- Wojtas J, Karpiński M, Zieliński D. 2021. Salivary cortisol levels in search and rescue (SAR) dogs under rescue examination conditions. *Journal of Veterinary Behavior* 42:11-15.
- Wust C. 2006. *Einfluss der Hohenlage und Geländebeschaffenheit auf die leistungsphysiologischen Parameter von alpinen Rettungshunden* [PhD. Thesis]. Ludwig Maximilians University, Munich.
- Yamashita M, Takayanagi Y, Yoshida M, Nishimori K, Kusama M, Onaka T. 2013. Involvement of prolactin-releasing peptide in the activation of oxytocin neurones in response to food intake. *J. Neuroendocrinol.* 25:455-465.
- Yanmaz LE, Elif D, Zafer O, Senocak MG, Yildirim F. 2015. Comparison of rectal, eye and ear temperatures in kangal breed dogs. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 21(4):615-617.
- Yesko J. 1999. *Stock medical and veterinary illustrations.* Yesko J, Chicago, Illinois, USA. Available at: <http://www.yesko.com/stock-medical-veterinary-illustration.htm> (accessed november 2023).
- Yoshimoto S, Cerjak D, Babygirija R, Bulbul M, Ludwig K, Takahashi T. 2012. Hypothalamic circuit regulating colonic transit following chronic stress in rats. *Stress* 15:227-236.

Zheng J, Babygirija R, Bülbül M, Cerjak D, Ludwig K, Takahashi T. 2010. Hypothalamic oxytocin mediates adaptation mechanism against chronic stress in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(4):946-953.