

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Kortizol jako marker stresu při sportovním využití psů

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eliška Hružová

Management zdraví a welfare zvířat

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

© 2022/2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Kortizol jako marker stresu při sportovním využití psů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D. za odborné rady, vedení a trpělivost při psaní této práce. Také bych ráda poděkovala mé rodině a blízkým za podporu během celého studia.

Kortizol jako marker stresu při sportovním využití psů

Souhrn

V posledních letech vzrostl zájem veřejnosti o životní pohodu zvířat. Zájem široké veřejnosti se týká také psů, kteří by při práci a sportu měli pociťovat co nejmenší míru stresu, což je možné zajistit jen tak, že budou existovat neinvazivní metody, které stresovou zátěž a narušený welfare budou schopny kvantifikovat.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda se koncentrace hormonu kortizolu mění během dne u psů v cirkadiálním rytmu, zhodnotit hladiny salivárního kortizolu u psů v průběhu pracovní zátěže během pátrací akce a zjistit, zda hormon vykazuje změny v koncentraci v závislosti na pohlaví.

Pro tento účel bylo odebráno 21 vzorků salivárního kortizolu od 5 fen a 16 psů během simulovaných pátracích akcí na 4 různých místech. Psi pátrali každý den celkem 3x po dobu 1,5 až 3 hodin s dvěma hodinovými pauzami mezi pátráními. Hladina salivárního kortizolu byla měřena 6krát denně. Pro stanovení cirkadiálního střídání koncentrace kortizolu byla hladina hormonu sledována ve dvouhodinových intervalech během 24 hodin u psů bez zátěže v domácích podmínkách. Koncentrace kortizolu byla vždy měřena ve vzorcích pomocí ELISA metody.

V práci bylo prokázáno, že u psů během dne dochází k cirkadiálním změnám v koncentraci hladiny slinného kortizolu. Podobně jako u člověka hladina kortizolu ve slinách psů roste v ranních hodinách těsně po probuzení. Vzhledem k tomu, že má kortizol cirkadiální střídání, je nezbytné v budoucích experimentech zohlednit čas odběru vzorků. Koncentrace tohoto hormonu se liší u psů a fen, což je také vzít v potaz při sestavování experimentů a hodnocení jejich výsledků. V práci bylo rovněž potvrzeno, že míra fyzické zátěže má vliv na koncentraci salivárního kortizolu. Kortizol může být využit jako ukazatel stresu psů, zejména v situacích, které jsou spojené s fyzickou námahou. Nicméně bude vhodné tento marker doplnit o sledování dalších vybraných hormonálních ukazatelů a behaviorálními pozorováními, jedině tak je možné získat komplexní popis stresových reakcí psů, ale i dalších zvířat.

Klíčová slova: pes; sliny; hormony; kortizol; stres; zátěž; cirkadiální střídání

Cortisol as a stress marker during dog's sports

Summary

In recent years, public interest in animal welfare has increased. The interest of the general public also concerns dogs, which should feel as little stress as possible during work and sports, which can only be ensured if there will be non-invasive methods that will be able to quantify the stress load and impaired welfare.

The aim of the thesis was to find out whether the concentration of the hormone cortisol changes during the day in dogs in a circadian rhythm, to evaluate the levels of salivary cortisol in dogs during the workload during a search operation and to find out whether the hormone shows changes in concentration depending on gender.

For this purpose, 21 salivary cortisol samples were collected from 5 bitches and 16 dogs during simulated searches at 4 different locations. The dogs searched a total of 3 times each day for 1.5 to 3 hours with two 1-hour breaks between searches. Salivary cortisol level was measured 6 times a day. To determine the circadian alternation of cortisol concentration, the level of the hormone was monitored in two-hour intervals during 24 hours in dogs without stress in home conditions. Cortisol concentration was always measured in the samples using the ELISA method.

In the work, it was demonstrated that in dogs there are circadian changes in the concentration of the salivary cortisol level during the day. Similar to humans, cortisol levels in dogs' saliva rise in the morning hours just after waking up. Since cortisol has a circadian alternation, it is essential to consider the time of sampling in future experiments. The concentration of this hormone differs in dogs and females, which is also to be taken into account when setting up experiments and evaluating their results. The work also confirmed that the degree of physical exertion has an effect on the concentration of salivary cortisol. Cortisol can be used as an indicator of stress in dogs, especially in situations that involve physical exertion. However, it will be appropriate to supplement this marker with the monitoring of other selected hormonal indicators and behavioral observations, only in this way is it possible to obtain a comprehensive description of the stress reactions of dogs as well as other animals.

Keywords: dog; salivary; hormones; cortisol; stress; burden; circadian alternation

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
	2.1 Cíl práce	2
	2.2 Vědecké hypotézy	2
3	Literární rešerše.....	3
	3.1 Stres	3
	3.1.1 Stresor	3
	3.1.2 Stresová reakce	4
	3.1.3 Stresové dráhy	5
	3.2 Stresové hormony a nadledviny	6
	3.2.1 Kůra nadledvin	7
	3.2.2 Dřeň nadledvin	8
	3.2.3 Další stresové markery	8
	3.3 Kortizol – marker stresu u psů	9
	3.3.1 Funkce a účinky kortizolu	11
	3.3.2 Sekrece kortizolu.....	11
	3.3.3 Poruchy regulace sekrece kortizolu	12
	3.3.4 Cirkadiánní rytmus uvolňování kortizolu	13
	3.4 Fyzická zátěž a její vliv na organismus.....	14
	3.5 Laboratorní diagnostika hladiny kortizolu a sledování dalších markerů stresu 15	
	3.5.1 Salivární vzorky	16
	3.6 Sliny	17
	3.6.1 Sekrece slin a její řízení	17
	3.6.2 Složení slin.....	18
	3.6.3 Tvorba slin	19
4	Metodika	20
	4.1 Materiál	20
	4.1.1 Experiment	20
	4.1.2 Zvířata	21
	4.1.3 Technické zařízení	22
	4.1.4 Přírodní podmínky	24
	4.2 Metodika experimentu.....	24
	4.2.1 Odběr biologického materiálu.....	24
	4.2.2 Stanovení koncentrace slinného kortizolu ve vzorcích.....	25
	4.2.3 Statistické zpracování dat.....	26
5	Výsledky	27

6	Diskuse.....	32
7	Závěr	34
	Literatura.....	35
	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

V posledních letech vzrostl zájem veřejnosti o welfare zvířat. Zájem široké veřejnosti se týká také psů, kteří by při pracovním a sportovním využití měli pociťovat co nejmenší míru stresu, což je možné zajistit jen tak, že budou existovat neinvazivní metody, které stresovou zátěž a narušený welfare budou schopny kvantifikovat. Jako jeden z možných neinvazivních markerů stresu může sloužit salivární hormon kortizol.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda se hladina hormonu kortizolu mění během dne u psů v cirkadiálním rytmu, zda hormon vykazuje změny v koncentraci mezi pohlavími, a především zhodnotit změny hladiny salivárního kortizolu u psů v průběhu pracovní zátěže.

2.2 Vědecké hypotézy

Hypotéza 1:

Hladina kortizolu ve slinách psů vykazuje cirkadiální změny.

Hypotéza 2:

Hormon kortizol ve slinách může sloužit jako marker stresu psů při zátěži.

Hypotéza 3:

Hladina salivárního kortizolu je spojena s pohlavím.

3 Literární rešerše

3.1 Stres

Termín „stres“ byl odvozen od anglického „to stress“ – mačkat, tlačit, zdůrazňovat a zavedl ho Selye (1956). Biologický stres je vymezován jako stav, který je odpovědí na nepříznivé fyziologické a emocionální podmínky a způsobí tak narušení homeostázy (Manser, 1992). Homeostáza je udržení stabilního vnitřního prostředí organismu, které je nezbytné pro jeho existenci. Tělo je neustále vystavováno situacím, při kterých může nastat rozrušení rovnováhy vnitřního prostředí, které způsobí například hypoglykémie, poruchu termoregulace nebo infekci. Tyto podněty jsou nazývány stresory. Savci však disponují kompenzačními mechanismy, jež je možné schématicky rozdělit do 3 fází (Poplachová reakce, adaptační fáze a fáze vyčerpání) (Mourek, 2012).

Z evolučního hlediska je stres, a především proces adaptace na něj, velmi důležitou součástí života jedince. Díky zkušenosti má organismus možnost se učit vyrovnávat s novými situacemi a zároveň se stávat odolnějším (Veselovský, 2005). Stres je velmi často vnímán jako negativní stimul, ne vždy tomu tak je, může být i stimul s pozitivním vlivem na organismus (Kittnar et al., 2020).

Existují dva typy stresu – eustres (akutní) a distres (dlouhodobý/chronický) (Selye, 1956). Přestože eustres a distres jsou oba typy stresu, mají zcela odlišné účinky na jedince. Eustres může být výhodný, zatímco distres může být škodlivý pro zdraví a psychickou vyrovnanost jedince. (Kamarck a Lovallo, 2003). Eustres je typ stresu, který je vnímán jako pozitivní a má motivační účinek na jedince. Tento typ stresu může zvýšit fyzickou a mentální výkonnost jedince (Selye, 1956). Distres je typ stresu, který je vnímán jako negativní a může vést k negativním dopadům na zdraví a pohodu jedince. Tento typ stresu může způsobit únavu, bolesti hlavy, úzkost a depresi (Lazarus a Folkman, 1984).

Reakce organismu vždy probíhá v odpovědi na nějaký podnět, tedy stresor (Selye, 1956).

3.1.1 Stresor

Stresorem je impuls, který dokáže vyvolat stresovou reakci. Stresory mohou mít různý původ. Zakladní rozdělení je na stresory fyzikální (vysoké teploty, hluk, vibrace), chemické (chemikálie ve vodě, různé toxiny) a psychosociální (nerovnovážné složení sociální skupiny, nedostatek potravy a pití pro konzumaci) (Palme, 2002). Rovněž je možné nalézt stresory, které

ovlivňují emoční stránku jedince, tedy stránku psychickou. Pomocí těchto stresorů je možné vyvolat strach, agresi nebo úzkost (Reeder et Kramer, 2005). Individualita daného jedince určuje, jakým způsobem bude stresor působit (Mills et al., 2014). Informace o vnějším a vnitřním prostředí jsou získávány organismem pomocí receptorů (Kittnar, 2015).

Prakticky všechny druhy savců, včetně člověka, žijí v sociální komunitě, a právě jedním z nejsilnějších stresorů je narušení sociálních vazeb v komunitě, což má za následek vznik chronického stresu (Koolhaas et al., 2006)

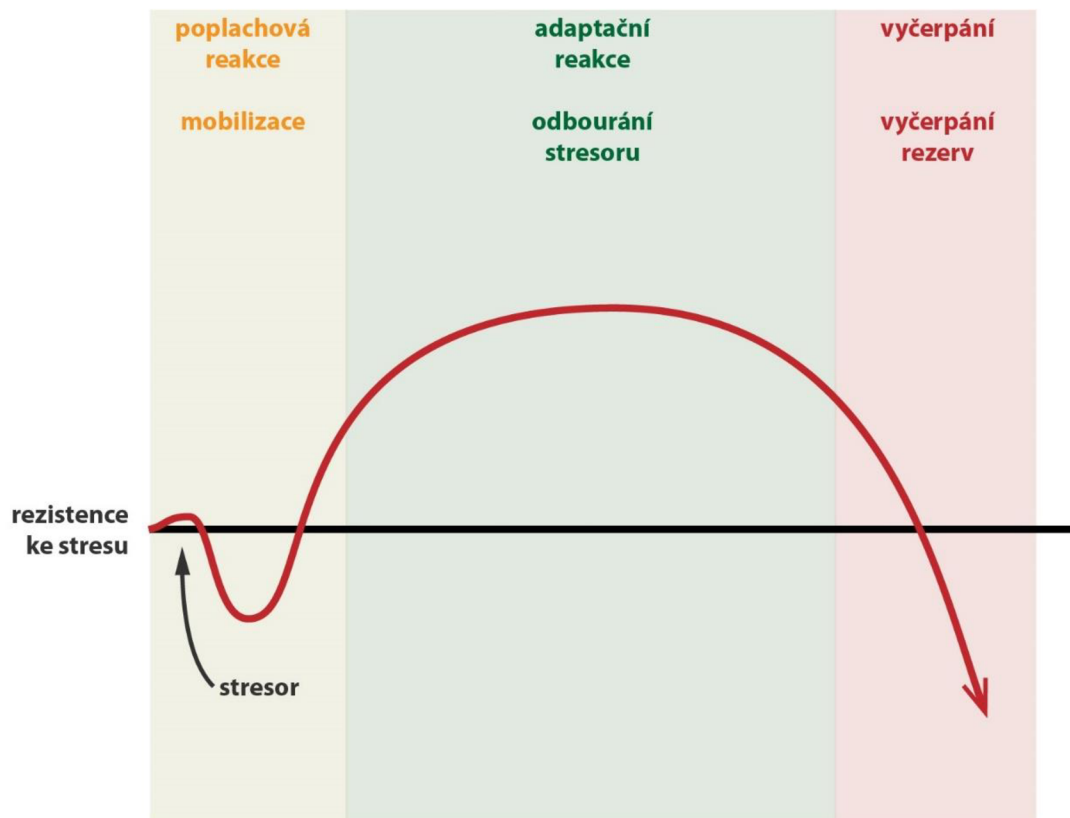
3.1.2 Stresová reakce

Jestliže je organismus vystaven nebezpečí, stresové situaci, spustí se stresová reakce, tedy odpověď, která je komplexem nespecifických fyziologických, hormonálních a behaviorálních odpovědí, jež mají jedince chránit před nežádoucími vlivy stresoru (Skarlandtová et al., 2010).

Charakter reakce je závislý na délce působení a intenzitě stresoru. Jestliže se stimul vyskytne znenadání a organismus je mu vystaven je po krátkou dobu, dojde k odpovědi FFS, neboli „flight and fight syndrom“ („uteč nebo boj“). Následkem působení podnětu se z dřene nadledvin začínají vyplavovat hormony, adrenalin a noradrenalin. Tyto hormony způsobují zvýšenou tepovou frekvenci, rozšíření cév zásobujících svalstvo, pravým opakem jsou pak cévy zásobující povrch těla a trávicí trakt, jež se zužují (Veselovský, 2005).

Dle Mourka (2012) se dají kompenzační mechanismy rozdělit do 3 fází. První, fáze poplachová, je charakterizována velmi rychlou aktivací sympathoadrenálního systému (SAS) a následným rychlým vyplavením ketocholaminu, noradrenalinu a dalších hormonů ze dřene nadledvin. Charakteristickými jevy fáze je zvýšení hladiny glykémie, zvýšení srdečního tepu a hyperventilace. Dochází ke stresové hypertenzi, která zvyšuje fyzickou výkonost, za současné zvýšené sekrece hormonů kůry nadledvin aktivitou hypothalamu, hypofýzy a adrenokortikotropní hormon (ACTH). Hormony kůry nadledvin je zajišťována stálost vnitřního prostředí z hlediska energetických zdrojů, koncentrace sodíku a draslíku a objemu vody. Fáze druhá, adaptační, přichází s až s dlouhým působením stresoru. i v této fázi dochází k aktivaci ACTH a následnému vyplavení hormonů kůry nadledvin, kde se uplatňuje kortizol. Jeho účinkem je zajištěn dostatečný přísun substrátu, jež je potřeba pro metabolické děje, jako je glukoneogeneze, lipolýza a proteolýza. Dochází k imunosupresi, analgezií a potřebě zvýšeného příjmu potravy. v této fázi je tělo savce proti stresu nejodolnější. Jako třetí nastává fáze vyčerpání, a to pouze tehdy, pokud stresor působí příliš dlouho či je moc silný. Všechny energetické zdroje jsou vyčerpány a je narušena sekrece kortizolu. Stálost vnitřního prostředí

je porušena a organismus stresu podléhá. Nastává šok, hypotenze a srdeční selhání (Mourek, 2012).



Obrázek 1 - Fáze stresová reakce

Dostupné z: < <http://fbllt.cz/skripta/xi-regulacni-mechanismy-1-endokrinni-regulace/9-stres/> >

U živočichů je možné sledovat behaviorální nebo fyziologickou reakci na stres, tedy strategii, jak se jedinec se stresem vyrovnává. Behaviorální reakcí na stres může být vyhýbavé či únikové chování, potlačení reprodukčního chování a další (Reeder et Kramer, 2005). Působení stresoru je u zvířat spojeno s aktivací dvou stresových drah – sympato-adrenomedulární (SAM) a hypothalamo-hypofyzární (HPA) (Kyrou & Tsigos 2009).

3.1.3 Stresové dráhy

Stresové dráhy mohou být aktivovány různými stresory, jako jsou fyzikální, psychologické či sociální faktory. Jejich špatná regulace může vést k různým onemocněním a poruchám, včetně úzkosti, deprese a kardiovaskulárních chorob. (McEwen, 2007)

3.1.3.1 Hypothalamo-hypofyzární osa (HPA)

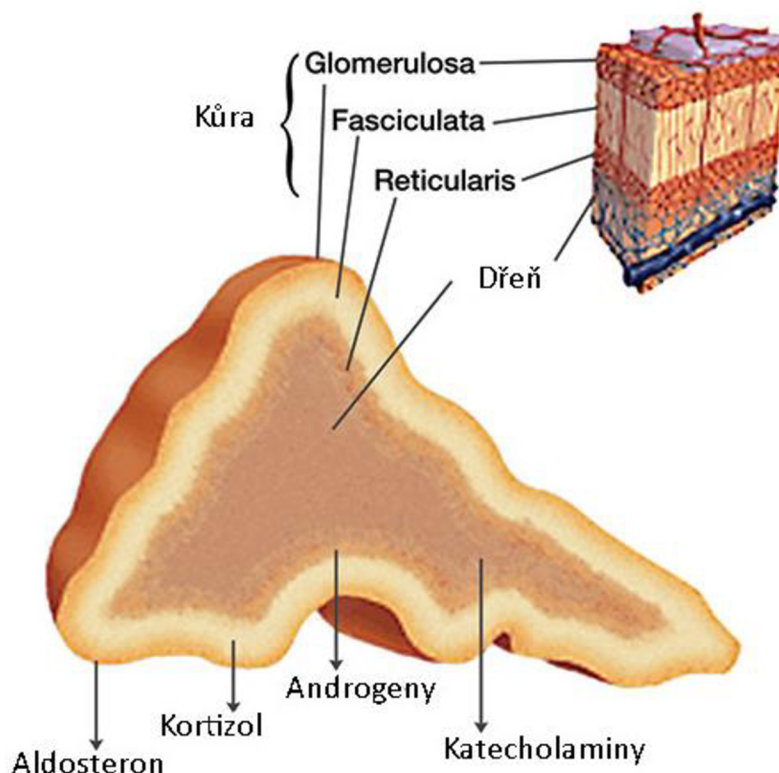
Osa hypothalamo-hypofyzární (HPA) je neuroendokrinní osa, která je zodpovědná za reakce na stresové podněty. Tato osa se skládá ze tří částí: hypothalamu, hypofýzy a nadledvin. Hypotalamus uvolňuje hormon kortikoliberin (CRH), který stimuluje uvolňování hormonu adrenokortikotropního hormonu (ACTH) v hypofýze. ACTH pak cestuje do nadledvin, kde stimuluje produkci kortizolu a dalších hormonů (Kudielka et al., 2003).

3.1.3.2 Sympato-adreno-medulární osa (SAM)

Osa sympato-adreno-medulární (SAM) je součástí neuroendokrinního systému, která se aktivuje během akutní stresové reakce a podílí se na uvolňování katecholaminů, zejména adrenalinu a noradrenalinu. Tyto hormony zvyšují srdeční frekvenci, způsobují zvýšení krevního tlaku a dýchací frekvence a také zvyšují hladinu krevního cukru. Aktivace osy SAM je většinou krátkodobá a slouží k přizpůsobení organismu na akutní stresor (Lupien et al., 2009; McEwen & Akil, 2020).

3.2 Stresové hormony a nadledviny

Nadledviny patří mezi párové orgány, jsou malé a nachází se kraniálně od ledvin. Nadledviny se skládají z kůry a dřene, tyto dvě struktury mají odlišnou stavbu, původ i funkci (Grim, 2005). Kůra nadledvin je morfologicky rozlišena na tři zóny – povrchová zóna produkující mineralokortikoidy, zóna *fasciculata* a zóna *reticularis* vytvářející androgeny, mineralokortikoidy a glukokortikoidy, jež jsou steroidní povahy (Kittnar, 2020). Dřeň nadledvin je uložena uvnitř orgánu. Jedná se o specializovanou tkáň sympatoadrenálního systému. Dochází zde k tvorbě katecholaminů – adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu. ve všech třech případech jde o jednoduché peptidy odvozené od aminokyseliny tyrozinu (Mourek, 2012; Trojan, 2003).



Obrázek 2 – Řez nadledvinou psa
Dostupné z: <www.autismpedia.org>

3.2.1 Kůra nadledvin

Hlavním glukokortikoidem je kortizol, často nazývaný též „stresový hormon“ mezi ně je řazen také kortikosteron a kortizon (Reynolds et al., 1999).

Jedním z důležitých úkolů kortizolu je pro organismus zajistit dostatek živin a také případně energii po vyčerpání zásob z jater (Bernášková et Polách, 2016). u většiny savců je hlavním stresovým hormonem, který má zajistit organismu homeostázu. Jeho hladina je řízena složitou zpětnou vazbou (Esposito et Bianchi, 2012).

Z nadledvin je kortizol transportován krví navázan na plazmatický globulin. Globulin je velmi vazný s kortizolem, a naopak k ostatním steroidním hormonům má nižší afinitu. Poločas kortizolu v oběhu je okolo 70 minut. v jádře cílové buňky se komplex váže na místo v blízkosti genů, které jsou kortizolem aktivovány. Co kortizol nakonec způsobí, závisí na genetické výbavě buňky, jeho možnosti působení mají velmi širokou škálu možností. Mezi biologické účinky kortizolu patří metabolické – sacharidy, podílí se na regulaci glykémie a v játrech stimuluje glykogenolýzu; proteiny, blokuje tvorbu proteinů ve svalech; lipidy. Dále pak kortizol ovlivňuje kardiovaskulární systém, napomáhá zvýšit sílu srdeční kontrakce

a krevní tlak. Mezi důležité účinky je řazena schopnost zvýšit tvorbu erythropoetinu a snížení počtu T-lymfocytů. Produkce kortizolu je řízena hypothalamo – hypofyární osou (Kittnar, 2020).

Zvýšená produkce kortizolu u psa může mít za následek propuknutí nemoci, Cushingův syndrom, který se projevuje alopecií – ztrátou ochlupení, polyurií – nadměrným výdejem moči nebo polydipsií – nadměrnou žízní. Opakem je snížená produkce a onemocnění zvané Addisonova choroba, která vede k selhání činnosti nadledvin (Castillo et al, 2009).

3.2.2 Dřeň nadledvin

Hormony dřeň nadledvin jsou noradrenalin a adrenalin a dopamin, jež jsou nazývány ketocholaminy. Dřeň obsahuje dva typy buněk – A-buňky a N-buňky. Adrenalin je produkován A-buňkami, byl objeven jako první a jeho produkce představuje 80 % ketocholaminů, které jsou z dřeň vylučovány do krve. Uvolňování adrenalinu je na základě nervových podnětů, nejčastěji při fyzickém či psychickém stresu. Je také nejrychleji působícím hormonem, a tak jeho metabolické účinky zvyšují hladinu glykémie. Noradrenalin je produkován N-buňkami, jeho působením v těle nastává kontrakce cév (mimo srdečních) a tím zvýšení krevního tlaku. Jeho vazokonstrikční účinky jsou důležité, jelikož díky nim se navýší počet stahů srdce a nastává lipolýza, díky které se volné mastné kyseliny stávají zdrojem energie. Poločas rozpadu ketocholaminů je kolem 20–40 sekund (Reece, 2011).

3.2.3 Další stresové markery

Mimo kortizolu je možné pro analýzu akutního stresu využít i dalších markerů. Tyto markery jsou charakteristické pro fyziologickou reakci organismu na stresory.

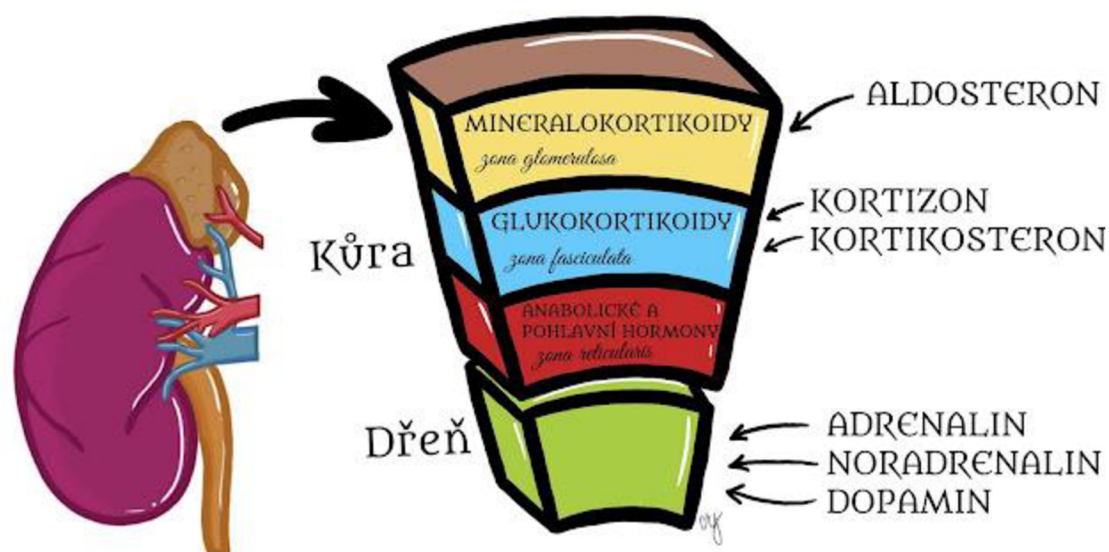
Prolaktin má primárně metabolické účinky, avšak jeho hladina stoupá při stresu až stonásobně. Je také aktivátorem imunitní odpovědi. Ta funguje následovně, na periferii se naváže na imunitní buňky a aktivuje T-lymfocyty a tím pádem i buněčnou imunitu. v případě působení stresu dlouhodobě může ovlivňovat reprodukci (Bernášková et Polách, 2016).

Somatotropní hormon (STH), také nazývaný růstový, během stresu jeho hladina stoupá. Zvýšená hladina přetrvává zhruba 2 hodiny. Hlavní úlohou tohoto hormonu jsou však metabolické účinky (Bernášková et Polách, 2016).

Slinná alfa-amyláza (sAA) a Chromagranin a (CgA) jsou biomarkery stresové osy SAM. sAA byl prokázáno ve slinách u psů, ačkoliv je obecně známo, že psi sAA ve slinách nemají. sAA bylo prokázáno u nemocí stresovaných psů (Hong et al., 2019). CgA je vylučován

při akutním stresu společně s ketocholaminy. Hladina CgA se při stresu velmi rychle zvyšuje a stejně tak pak i snižuje. CgA je analyzován zejména pro zjištění úzkosti či vzrušení (Lensen et al., 2019).

Pro dráhu HPA je to slinný imunoglobulin a (sIgA), kdy jeho hladina se mění během akutního stresu. Oproti kortizolu se však jeho hladina nezvyšuje, ale naopak snižuje, jelikož právě kortizol jeho sekreci potlačí. (Kikkawa et al., 2003; Svobodová et al., 2014; Lensen et al., 2019).



Obrázek 3 - Hormony kůry nadledvin

Dostupné z: <<https://www.axon-med.cz/2021/10/nadledviny stres.html>>

3.3 Kortizol – marker stresu u psů

Kortizol je steroidním hormonem patřícím mezi glukokortikoidy a také hlavním stresovým hormonem psů. Je možné jej izolovat z krevní plazmy, moči, slin (Beerda et al, 1996), výkalů a chlupů (Cobb et al, 2016). Glukokortikoidy, jež jsou obsahem výkalů či srsti, ukazují hladinu dlouhodobého stresu. Tytéž hormony obsažené v slinách a krevní plazmě jsou naopak ukazateli stresu krátkodobého, tzn., odrážejí současnou stresovou situaci jedince (Beerda et al, 1996). Hodnoty krevních markerů mohou být použity jako přímý ukazatel fyziologických změn, avšak samotný odběr krve je invazivní metodou a v dnešní době jsou upřednostňovány metody, které uznávají welfare zvířat čili jejich „životní pohodu“. Odběr taktéž vyžaduje zaškolený a způsobilý personál, nejlépe tedy veterinárního lékaře. Samotný

odběr krve ze žíly na periférii, tedy končetině, způsobuje nárůst hladiny kortizolu, je tedy pro zvíře stresorem (Draschel, 2009). Odběr slin pro zjištění hladiny kortizolu je psy lépe tolerovaná metoda, neb je neinvazivní a snadno se dá psa přivyknout k odběru slinného vzorku. Není potřeba způsobilé osoby, odběr zvládne i majitel sám doma po zaškolení (Cobb et al, 2016).

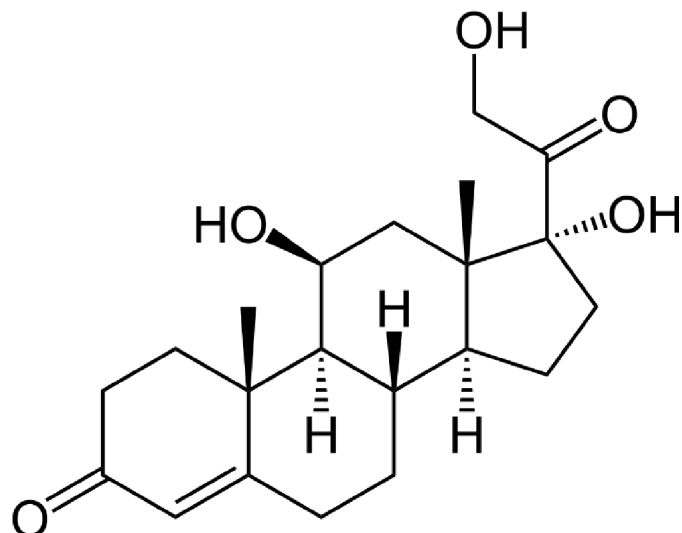
Kortizol odebraný ze slin může být vhodnějším fyziologickým indikátorem akutního stresu než plazmatický kortizol, protože je přímým odrazem biologické aktivity. u psů nebyly zaznamenány žádné rozdíly v bazálních hladinách kortizolu mezi pohlavími, tedy samcem a samicí. Bazální hladina je však ovlivněna velikostí a věkem jedince, nikoliv však fází cyklu u fen. u plemen je tedy možné říci, že menší plemena mívají bazální hladinu kortizolu vyšší než plemena větší. Také, že mláďata mají bazální hladiny kortizolu vyšší než dospělí jedinci. ve stresové situaci pak u samic je naměřená hodnota kortizolu vyšší než u samců a u mláďat nižší než u starších jedinců (Coppola et al. 2006).

Koncentrace kortizolu ve slinách psa je mezi 4–12 % koncentrace nacházející se v krevní plasmě (Wenger-Riggenbach 2010).

Kortizol je v organismu přenášen vazebnými proteiny, zejména globulinem a albuminem. Kortizol se váže na tyto proteiny, což umožňuje jeho přenos k cílovým tkáním v těle a také regulaci jeho koncentrace v krevním oběhu (Liu et al., 2017)

Nemoc a léky ovlivňují vazbu na proteiny a tím mohou snížit korelaci mezi plazmatickými a slinnými koncentracemi kortizolu. Za normálního stavu hodnoty kortizolu v krevní plasmě a slinách korelují (Cobb et al, 2016).

Cobb et al. (2016) ve své studii porovnával 5153 vzorků slin celkem 1205 psů. na základě výsledků, tedy hodnotu hladin kortizolu, stanovil průměrnou hladinu bazálního salivárního kortizolu u psů, 0,45 µg/dL se standardní chybou 0,13.



Obrázek 4 – Molekula kortizolu

Dostupné z: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Cortisol>>

3.3.1 Funkce a účinky kortizolu

Kortizol má několik biologických účinků. Prvním jsou metabolické účinky, podílí se na regulaci glykémie tak, že zvyšuje koncentraci glukózy v krvi (hlavní zdroj energie pro svaly a mozek) a v játrech stimuluje glykogenolýzu, dále pak blokuje tvorbu proteinů ve svalech. Dalším, druhým, účinkem je, že zvyšuje tvorbu erythropoetinu. Také blokuje imunitní odpověď, snižuje počet T-lymfocytů a způsobuje atrofii brzlíku. Svým komplexním působením na organismus zajišťuje homeostázu při stresu – dodává dostatečné množství glukózy pro správnou činnost mozku a stimuluje kardiovaskulární systém (Kittnar, 2011).

Kortizol také snižuje vychytávání glukózy ve svalech a to proto, aby šetřil glukózu, tedy energii, pro mozek, nýbrž zásobárna energie pro svaly je jiná. Hyperglykemický účinek kortizolu je důležitý pro zvýšení hladiny krevního cukru a šetří tím energii pro mozek. Toto je velmi důležité během stresových reakcí „flight or flight“ (Sigmund et al, 2014).

Glukokortikoidové receptory je možné nalézt takřka ve všech tkáních těla savců. i díky tomu je kortizol schopen ovlivnit téměř všechny orgánové soustavy v těle, především nervový, imunitní, reprodukční, dýchací a kardiovaskulární (Thau et al, 2020).

3.3.2 Sekrece kortizolu

Sekreci kortizolu řídí hypothalamo-hypofyzární osa nadledvin (HPA) (Bergeron et al., 2002). Kortizol se uvolňuje v návaznosti na působení psychologického či fyziologického

stresu. Pokud se jedná o akutní stres, pak se kortizol uvolňuje během několika málo minut od začátku působení stresoru (Maimon et al. 2020).

Hormon kortikotropin (CRH) je uvolňován paraventriculárním jádrem hypothalamu, který následně působí na hypofýzu a uvolňuje tak adrenokortikotropní hormon (ACTH), který poté působí na kůru nadledvin (Thau et al, 2020).

3.3.3 Poruchy regulace sekrece kortizolu

Při diagnostice poruch spojených s produkcí kortizolu se používá metoda vzorku salivárního kortizolu, tak odběr krve a stanovení plazmatického kortizolu (Thau et al., 2020).

Cushingův syndrom je onemocnění, které u psů může způsobit nadměrná produkce kortizolu, pro tuto nemoc jsou charakteristické projevy, jako je polydipsie, polyurie, kožní změny jako alopecie a další. Oproti tomu Addisonova choroba se u psů může vyskytnout v případech snížené produkce kortizolu (Castillo et al., 2009)

Hyperkorticismus

Také nazýván jako Cushingův syndrom. Jedná se o onemocnění, které se vyskytuje u jedinců, kterých je jejich tělo vystaveno vysoké hladině kortizolu po dlouhou dobu. Tato choroba se velmi často vyskytuje u psů středního a staršího věku (Peterson, 2001).

Cushingův syndrom může mít endogenní či exogenní původ. Exogenní původ je způsoben systémovým podáváním kortikosteroidů. Naopak endogenní je způsoben nadprodukcí kortizolu nadledvinami. Cushingův syndrom je často jako následek benigního nádorového onemocnění např. hypofýzy (Galasko, 2015; Thau et al., 2020).

Mezi časté příznaky Cushingova syndromu patří únava, celková slabost a přibírání na váze. u mláďat byl pozorován zpomalený růst (Lacroix et al., 2019). Dále se mohou u jedinců vyskytovat příznaky jako hyperglykemie, vyšší náchylnost k tvorbě hematomů či špatné hojení ran. Celkově zvýšená produkce kortizolu značně ovlivňuje funkci imunitního systému a hrozí riziko častějších infekcí. Diagnostika hyperkorticismu je velmi náročná s ohledem na množství možných příznaků onemocnění a vyžaduje delší a detailnější vyšetření (Galasko, 2015).

Hypokorticismus

Primární adrenální insuficience, známá také jako Addisonova choroba, je nejčastěji způsobena autoimunitní adrenalitidou, tedy onemocněním kůry nadledvin, konkrétně nedostatečnou produkcí adrenokortikálních hormonů. Mezi další příčiny patří malignita,

krvácení nebo infekce nadledvin. Adrenální insuficience je způsobena nedostatečnou tvorbou ACTH hypofýzou (Thau et al., 2020).

Adrenokortikální hormony jsou jedny ze základních regulátorů homeostázy vody a energetické bilance. a proto toto onemocnění může mít velmi vážné až život ohrožující následky – adrenální selhání (Barthel et al. 2018). Mezi příznaky adrenální insuficience patří úbytek hmotnosti, únava hypotenze.

3.3.4 Cirkadiánní rytmus uvolňování kortizolu

Cirkadiánní rytmus uvolňování kortizolu odkazuje na přirozený cyklus, během kterého se kortizol uvolňuje v průběhu dne. Tento cyklus je regulován hormonálním systémem, zejména hormonem ACTH, který stimuluje uvolňování kortizolu z nadledvin. Poruchy cirkadiánního rytmu kortizolu mohou mít negativní dopad na zdraví (Dickerson, 2004)

Oster et al. (2016) uvádí, že hladina kortizolu během dne je u člověka rozdílná. Nejvyšší hodnoty jsou naměřeny v ranních hodinách, tedy ihned po probuzení, mezi 4:00 až 10:00, během dne hladina kortizolu kolísá a nejnižší naměřené hodnoty jsou během nočních hodin, kdy člověk spí.

Cirkadiánní rytmus uvolňování kortizolu u psů je velmi zajímavé téma a přítomnost tohoto rytmu je stále nejasná. v některých studiích se uvádí, že u psa není cirkadiánní rytmus kortizolu prokázán (Castillo et al., 2009). Giannetto et al. (2014) uvádí, že cirkadiánní rytmus u psů je přítomen bez ohledu na denní aktivitu.

Kolevská et al (2003) ve studii monitorovali koncentraci kortizolu po dobu 24 hodin z krevního séra u 23 psů. Psi byli rozděleni do tří experimentálních skupin, první skupina byla kontrolní bez jakéhokoliv cvičení, druhou skupina experimentální a třetí skupinou byli psi pracující. Krev byla psům odebírána v intervalech 90 až 180 minut. Vzorky byly následně mezi sebou porovnávány pomocí Kruskal-Wallis testu. Výsledky se lišily v rámci porovnání jednotlivých skupin. Cirkadiánní rytmy byly nelezeny u psů v kontrolní skupině, avšak ve skupině experimentální a pracovních psů nikoliv. Koncentrace kortizolu v krvi podléhají během dne mnoha změnám, kdy záleží na denních a nočních činnostech.

Výsledky některých studií uvádějí, že hladina u psů se mění cirkadiálně během dne, nejvyšší naměřenou hodnoty dosahují vzorky z ranních hodin a koncentrace kortizolu do večere klesá a v nočních hodinách se hodnoty pohybují na nejnižší hladině (Romero et al., 2008).

3.4 Fyzická zátěž a její vliv na organismus

Během fyzické zátěže potřebuje tělo zvýšené množství energie. Aby tělo potřebnou energii získalo, je organismem uvolňována glukóza, ta vzniká štěpením glykogenu. Všechny tyto procesy jsou fyziologické a během zátěže díky nim je tělo schopno přechodně zvýšit výkon. Avšak jeli zátěž ještě zvýšena, popřípadě trvá příliš dlouhou dobu, tak dochází k vyčerpání energetických zdrojů organismu a následkem může být oxidační stres a poškození organismu (Juda, 2008).

Jako oxidační stres je nazývána nerovnováha mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku, které jsou tvořeny jako vedlejší produkt látkové výměny, oksylichování, schopnosti organismu odbourávat a detoxikovat reaktivní meziprodukty. Za ideálních podmínek je tělo schopno neutralizovat účinky volných radikálů (Ondruš, 2007; Pasquini et al., 2010; Russo et Bracarense, 2016).

Rhabdomyolýza je důležitým pojmem. Při vysoké a intenzivní zátěži velmi často dochází ke tkáňovým zraněním a postižení orgánů, a právě důvodem těchto vzniklých potíží je rhabdomyolýza, jež je způsobena oxidativním stresem. k postižením a zraněním dochází kvůli působení agresivních oxidačních látek, jež se vytvářejí během aerobního energetického metabolismu. Oxidační látky jsou vytvářeny mimo jiné i v játrech, a to z důvodu zvýšení VO₂ při aerobní svalové práci, je s tím mimo jiné spojeno i zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) (Novotný, 2016). Oxidačními látkami nejsou poškozeny jen proteiny a lipidy, ale také samotná DNA (deoxyribonukleová kyselina) v buněčných jádrech, tedy samotný genetický kód (Russo et Bracarense, 2016).

Produkce ROS se s časem hromadí a její následky je možné spojovat s charakteristickými degenerativními změnami fyziologických systémů. Mimo jiné vedou i chronickým onemocněním srdce, ale i dalších orgánů, neurodegenerativním onemocněním, jakým jsou například Alzheimerova a Parkinsonova choroba, ale také přispívají k výskytu rakoviny (Alessio et Hagerman, 2006).

U psů vedlo objevení existence oxidačního stresu k výzkumu optimálního tréninkového plánu, kdy bylo zjištěno, že k lepší regeneraci organismu dochází po delší fyzické aktivitě oproti pomalé regeneraci po krátkém tréninku (Pasquini et al., 2010).

3.5 Laboratorní diagnostika hladiny kortizolu a sledování dalších markerů stresu

Hladina kortizolu je měřena a používána pro zjištění fyziologických reakcí organismu na dlouhodobou či krátkodobou stresovou zátěž (Heimbürge et al., 2019). v laboratorní diagnostice se používá hned několik metod pro stanovení hladiny kortizolu. Jedná se o odběr těchto biologických materiálů séra, plazmy, moči, výkalů, srsti a slin. Kortizol v krvi se vyskytuje ve dvou formách v biologicky neaktivní formě, vázán na transkortin anebo volně se pohybující, nevázaný, biologicky aktivní. První forma se vyskytuje v 92 % a druhá výše zmíněná forma v 8% zastoupení (Ledvina et al., 2009).

Při získávání biologického materiálu pro stanovení hladiny kortizolu je užíváno mnoho metod, avšak u zvířat je sběr velmi náročný. Proto je často volena méně invazivní metoda, které je schopné zvíře si přivyknout a nezpůsobuje tak další stres (Draschel et Granger, 2009). u zvířat je v současnosti nejvíce využívána metoda měření kortikosteroidů, jako biomarkeru stresu (Sheriff et al., 2011). u psů je hojně využívána metoda salivárního odběru, psi je většinou velmi dobře tolerována i bez předchozí zkušenosti, navíc je technicky velmi snadná. Odebíraný vzorek nesmí být kontaminován krví, jelikož by krev mohla ovlivnit výsledky (Draschel et Granger, 2009).

Odběr vzorku slin je nejčastěji prováděn bavlněným tampónkem, který je vložen psu do tlamy (lícních laloků). Sliny jsou následně extrahovány ve stříkačce. Extrahování probíhá následujícím způsobem, odběrový bavlněný tampon je vložen do stříkačky, kde je zmáčknut. Pro odběr jsou ale velmi často používány speciální 5 ml zkumavky značky Salivette, u kterých je součástí komora s otvorem a sliny jsou izolovány centrifugací z odběrového tamponu. Jednotlivé studie se často liší v době centrifugace (10–20 min), ale také v počtu otáček (3000–3500), tyto parametry mají však velký vliv na výsledné hodnoty. Aby bylo možné výsledky jednotlivých studií porovnávat je nutné proces centrifugace standardizovat a používat pro publikaci výsledků stejných jednotek (Clow et al., 2010). Jestliže není měření vzorků provedeno ihned po odběru je nutné salivární vzorky zamrazit. Mrazem je zabráněno změně ve složení, a navíc jsou sliny méně vazké, toto se děje díky rozpadu mukopolysacharidů, tedy mucinu (Stalder et al., 2016).

Koncentrace kortizolu v tělních tekutinách, krvi, moči a slinách, se u psů zvyšuje výrazně 15–30 minut po působení stresoru, jež je důkaz zvýšené aktivity HPA osy (Hekman et al., 2014).

Jednou z dalších možností, kterou lze použít pro diagnostiku stresu, je sledování tělesné teploty zvířat po celém povrchu těla. Bylo totiž prokázáno, že teplota organismu se během akutního stresu zvyšuje a následně po skončení působení stresoru velmi rychle klesá zpět na svou bazální hodnotu. Díky tomuto poznatku je tedy možné stres u savců sledovat pomocí infračervené termografie, tedy technologie IRT. i přes fakt neinvazivnosti této metody byl při pokusech u psů odhalen značný diskomfort během měření termokamerou, ta musí být celou dobu natočena čelem k jedinci a ti vykazovali mnoho konejšivých signálů, jako je například odvrácení tváře směrem od kamery či olizování se (Travain et al., 2015).

3.5.1 Salivární vzorky

Salivární vzorky se ukázaly jako vhodné pro zjištění, jak moc jsou zvířata stresována, jelikož zrcadlí koncentraci volných glukokortikoidů v krvi (Oyama et al., 2014). Svobodová et al. (2014) ve své studii uvádí, že salivární kortizol je výborným neinvazivním markerem chronického i akutního stresu. ve slinách se nachází pouze 7-12 % volného kortizolu, který je z krevního řečiště (Sheriff et al., 2011). Hodnoty naměřeného salivárního kortizolu se mohou lišit od těch naměřených z plazmy, jelikož zhruba 30 % volného kortizolu je ve slinách přeměněno na kortizon. Hladina kortizolu v slinných vzorcích může být také ovlivněna různými léky, nemocemi a dalšími faktory (Hellhammer et al. 2009).

Dle Cobb et al. (2016) nebyly nalezeny ani prokázány výrazné rozdíly mezi jednotlivými plemeny, barvou, hmotností a výškou psa.

Psa je možné samotnému odběru přivyknout, pokud bude trénink simulace odběru probíhat alespoň týden před samotným odběrem (Sherman et al., 2015). Pro zvýšení salivace u psů je možné použít různých stimulantů. Jako příklady lze uvést pamlsky (zrakově či čichově identifikovatelné), kyselinu citrónovou či octovou (Cobb et al., 2016). Doporučení, které uvádí Colussi (2018) je, aby pes alespoň 20 minut před samotným odběrem nedostal žrádlo ani pití.

Pro samotné měření glukokortikoidů ve slinách, tedy jejich koncentrace, je využíváno mnoho metod. Jako příklad lze uvést radioimunotest (RIA) či enzymový imunotest (EIA). Obě metody jsou imunologickými metodami, velmi vnímavými a jejich principem je soupeření mezi antigenem (ten je měřen, kortizol) a formou antigenu, jež je označena. Antigeny samotné je možné označit enzymy (EIA) a radioizotopy (RIA) (Johnston et al., 1978). Pro analýzu slinného kortizolu u psů bývá nejčastěji užitá metoda EIA. v různých studiích bývají použity různé jednotky, které jsou pro měření kortizolu používány, nejčastěji se užívá jednotek – nmol/l, ng/ml či µg/dl (Clow et al., 2010).

3.6 Sliny

Sliny jsou čirá, vazká a pěnicí tekutina, která je produkována slinnými žlázami dutiny ústní. Obsahem je voda, enzymy a minerální látky (Carpenter, 2013).

Jsou důležitou tekutinou v dutině ústní, protože omývají zuby a zvlhčují měkké tkáně a případně potravu. pH slin a obsah minerálů vápníku (Ca), fosforu (P), sodíku (Na) a draslíku (K) je důležité při procesu mineralizace a demineralizace zubů a při tvorbě zubního kamene (Lavy et al, 2012).

Jsou nezbytnou součástí těl živočichů, jelikož jsou významné pro správnou funkci dutiny ústní, jícnu a žaludku (Trojan, 2003). Sliny zastávají mnoho důležitých funkcí, usnadňují polykání, udržují vlhkost dutiny ústní a slouží jako rozpouštědlo pro molekuly, které stimulují chuťové pohárky, také napomáhají při zvukovém projevu, usnadňují pohyb rtů a jazyku a udržují zuby čisté (Ganong, 1995). Sliny také mohou působit antibakteriálně, proto u jedinců s poruchou tvorby slin, se mohou vyskytovat kazy zubů (Lavy et al, 2012).

Sliny u psa mají nezbytnou funkci při termoregulaci, při tzv. evaporativním ochlazování. Pes může sliny vylučovat až 10x rychleji než člověk, pokud je to nezbytně nutné. Vypařováním slin z povrchu jazyka a sliznice dutiny ústní tak dochází k ochlazování psa, podobně jako u člověka vypařováním potu z povrchu kůže těla (Narac et al, 2006).

3.6.1 Sekrece slin a její řízení

Sekrece slin je stálá, avšak se může měnit v závislosti na situaci, ve které se pes nachází či hydrataci jeho organismu. Bazální neboli stálá, sekrece slin se pohybuje okolo 0,5ml/min, může, však výrazně stoupnou -> vyvolaná sekrece maximálně 4-7 ml/min. Během spánku se může sekrece slin snížit až na jen 0,1ml/min (Trojan, 2003).

Zvýšená produkce slin je způsobena stimulací centra pro tvorbu slin v prodloužené míše a také mechanickým drážděním receptorů v dutině ústní (Reece, 2011). Podněty pro sekreci mohou být zrakové, čichové, ale i abstraktní – hovor o odměně (Trojan, 2003).

Sliny jsou sekretem velkých slinných žláz, konkrétně tři – příušní, podčelistní a podjazykové a množstvím žlázek drobných, které jsou rozmístěné po celé dutině ústní (Trojan, 2003). Podjazykové žlázy a přidružené drobné žlázy produkují sliny vazké, jsou bohaté na mucin a jsou označovány jako mucinózní. Žlázy příušní produkují naopak řídký sekret s vyšším obsahem α -amylázy. a poslední párové žlázy v dutině ústní, podčelistní, jsou smíšené – seromuciózní (Kittnar, 2011).

Během stresových situací dochází k omezení sekrece ze slinných žláz, díky čemuž dochází k suchu v ústech. Nižší produkce slin klesá také, když vysychá v ústech a hltanu, je možné spojit s pocitem žízně a dehydratací (Carpenter, 2013).

Sekrece slin je řízena výhradně nervovým systémem, konkrétně vegetativním, tedy sympatikem a parasympatikem, který sekreci ovládá výrazně více. Stimulaci parasympatiku je docíleno vazodilatace žláz a tím i vyšší produkci slin. Naopak stimulací sympatiku je vyvolána vazokonstrikce a s tím související nižší sekrece slinných žláz, zejména ze submandibulární, tedy podčelistní, žlázy (Kittnar, 2011; Ganong, 1995).

3.6.2 Složení slin

Sliny u psů jsou nezbytné především pro zvlhčování soustavy potravy. Objem slin vyloučený psem během jednoho dne, tedy 24 h, se pohybuje mezi 0,1 – 0,15 l, pH slin u psa se nachází v rozmezí 7,34 – 7,8 (Hegewald et Kawich, 1996). Oproti tomu člověk denně vyprodukuje asi 1,5 – 2 l slin (Kittnar, 2011).

Sekrece slin se zvyšuje ve chvíli, kdy pes vidí potravu, popřípadě se dá sekrece vyvolat i podmíněným reflexem, tedy například slovem „dobrota“, po kterém následuje odměnění psa pamlskem (Hegewald et Kawich, 1996).

Sliny dle Kittnara (2011) a Trojana (2003) obsahují cca 90,4% vody, organické (mucin, α -amylázu, lysozym, imunoglobulin A, jazyková lipáza) a anorganické látky (H_2O , HCO_3^- , I^- , K^+ , Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} , fosfáty, malá množství dalších látek). Mucin je velmi významnou látkou ve slinách, díky kterému je sousto kluzké a tím je velmi usnadněné polykání a také žvýkací pohyby.

V luminální oblasti buněk acinů jsou umístěna sekreční granula (zymogeny), která obsahují dva trávicí enzymy. Prvním je α -amyláza a druhým je jazyková lipáza. Imunoglobuliny slouží k ochraně před infekcí, bakteriemi a viry, lysozym narušuje bakteriální stěnu a laktoferrin váže železo a má bakteriostatický účinek (Ganong, 1995). α -amyláza způsobuje trávení sacharidů v dutině ústní, avšak u psa, tedy v jeho slinách, není přítomna (Carpenter, 2013).

Během bazální sekrece slin převažuje v obsahu draslík a fosfor. Na samotné stimulaci slin se podílejí dva mechanismy – sekreční a filtrační.

- a) **Sekreční mechanismus**, který vede k postupnému snižování obsahu bílkovin, fosforu, a nakonec také draslíku, složení slin je tedy obdobné jako složení krevní plasmy, tento mechanismus se uplatňuje, pokud je podmět delší než 20-40 minut a je unavitelný

b) Filtrační mechanismus, který využívá zvýšeného prokrvení žláz a není unavitelným (Kittnar, 2011; Trojan, 2003)

3.6.3 Tvorba slin

Slinné žlázy jsou tvořeny aciny, na které navazuje systém vývodů. v těchto acinech se tvoří primární slina, která je poté upravována ve slinných vývodech a do dutiny ústní se již dostává jako slina sekundární (Kittnar, 2011).

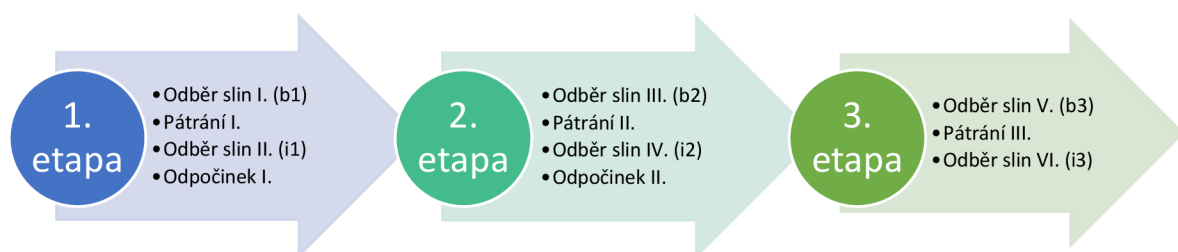
4 Metodika

Kapitola „Metodika“ je rozdělena do dvou podkapitol. v první, je popsán samotný experiment, který byl proveden, zvířata, kterým byly odebírány vzorky slin, prostředí, ve kterém probíhaly simulované pátrací akce a také technické zařízení použité při studii. ve druhé podkapitole je uvedeno, jak probíhal samotný odběr vzorků a jeho následné vyhodnocení v laboratoři a jeho statistická analýza.

4.1 Materiál

4.1.1 Experiment

Data byla získána během simulovaných pátracích akcí v terénu, které byly součástí projektu „Využití vyspělých technologií a čichových schopností psů pro zvýšení efektivity vyhledávání pohřešovaných osob v terénu.“ Tento projekt byl financován z grantu Ministerstva vnitra České republiky mezi lety 2017 až 2020 a měl přiděleno číslo VI2017202008. Všechna terénní cvičení probíhala za spolupráce Policie ČR, Horské služby ČR a Svazu záchranných brigád kynologů ČR. Jednotlivé vzorky byly psům odbírány během čtyřech simulovaných terénních cvičení (Žihle, Nové Město, Hamry a Poušť). Simulovaného cvičení se účastnilo 21 pátracích týmů, které jsou součástí jednotlivých pátracích složek příslušných orgánů. Tým byl vždy složen z psovoda a jeho vycvičeného psa. Cílem terénních cvičení bylo nalezení figuranta v určené oblasti. Prohledávané území bylo rozděleno na menší úseky s 0-3 figuranty, kteří byli psy vyhledáváni. Psovod předem nevěděl, kolik figurantů se na území nachází. Jednotlivé oblasti, kde týmy pátraly, byly rozděleny mezi psovody náhodně, jejich rozloha byla 20–30 hektarů. Doba, po kterou týmy vyhledávaly, se pohybovala v rozmezí 1,5 – 3 hodiny. Doba se odvíjela, dle náročnosti, v jakém terénu se dvojice pohybovala. Nalezení figuranta (pohřešované osoby) ohlašoval pes štěkotem.



Obrázek 5 – Osa simulovaných pátracích akcí

Dny, během kterých probíhalo pátrání byly rozděleny na 3 testovací období (etapy), během kterých vždy proběhlo pátrání, odpočinek psa i psovoda a sběr dat. Jestliže tým prohledával náročnější terén, absolvoval tým jen 2 etapy pátrání.

Data pro analýzu cirkadiálního střídání koncentrace hormonu kortizolu byla získána během dne, kdy psi byli v domácím prostředí a nebyli vystaveni pracovní zátěži.

4.1.2 Zvířata

Figuranti simulující pohřešované osoby byli plošně vyhledáváni 21 vycvičenými psy, u kterých byly měřeny hodnoty slinného kortizolu. Z celkového počtu 21 psů bylo do pátrání zařazeno 16 psů a 5 fen, jejich věk se pohyboval mezi 3-10 lety. Škála zastoupených plemen zahrnovala 11 německých ovčáků (NO), 2 belgické ovčáky malinois (BOM), dále pak jednoho australského ovčáka (AUO), hovawarta (HWT), labradorského retrívra (LR), border kolii (BOC), gordonsetra (GS), chesapeake bay retrívra (CBR) a 2 křížence. Počet testovaných pátracích psů byl 21, avšak 2 týmy se zúčastnily pátrání na dvou místech a tím pádem celkový počet testovaných zvířat byl 23 (n=23).

Všechna testovaná zvířata byla klinicky zdravá, netrpěla paradontózou ani jinou chorobou způsobující případné krvácení v dutině ústní, které by mohlo ovlivnit výsledky testování. Psi byli způsobilí chováním k odběru vzorku pro měření salivárního kortizolu. Před samotnými odběry slin byli psi navykáni tréninkem 3 dny předem.

4.1.3 Technické zařízení

Pro odběr slin byly použity speciální zkumavky Salivette[®] Cortisol (Sarstedt, Německo). Součástí sady jsou dvě zkumavky v sobě, kdy do vnitřní, menší zkumavky, se vkládá tampon nasáklý slinami psa. Vnitřní zkumavka má otvor, kterým sliny odcházejí během centrifugace do vnější (větší) zkumavky. z vnější zkumavky je vzorek slin extrahován a použit pro další analýzu.



Obrázek 6 – Odběrová zkumavka Salivette[®] Cortisol

Dostupné z <<https://www.medplus.cz/zkumavka-salivette-cortisol-odber-slin-100-ks/>>

Pro analýzu hladiny koncentrace slinného kortizolu byl použit komerční kit Salivary Cortisol ELISA SLV-2930 (DRG Instruments, Německo).

Pro určení výsledné koncentrace slinného kortizolu bylo užito spektrofotometru BioTek[™] Elx800[™] Absorbance Plate Reader (Boston Industries, USA).



Obrázek 7 – Komerční kit Salivary Cortisol ELISA SLV-2930

Dostupné z: <https://store.drg-international.com/pc_product_detail.asp?key=2EAFBB068F3341EF8772F433DA7255B4>

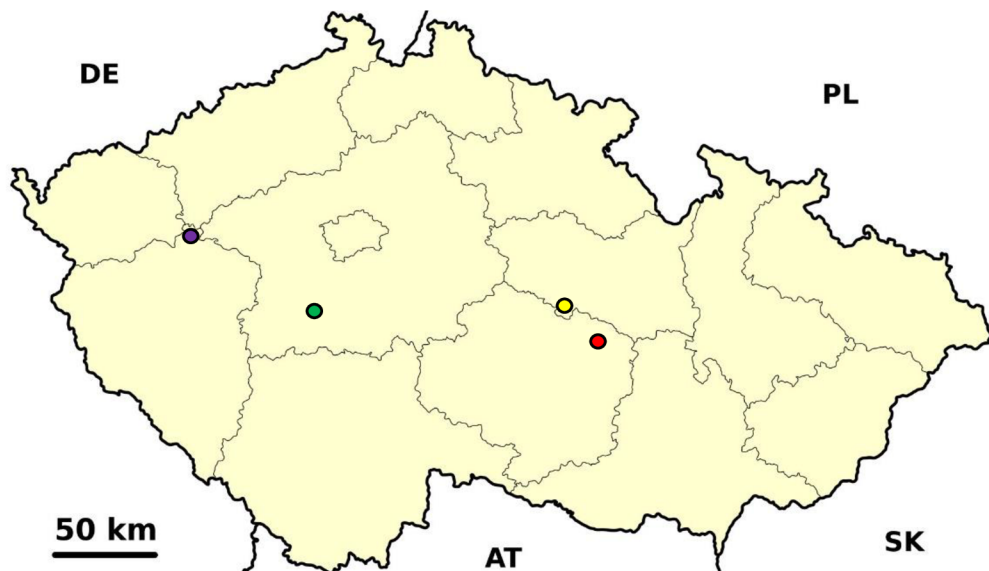


Obrázek 8 – Čtečka mikrotitračních destiček BioTek™ ELx800™

Dostupné z: <<https://www.bdl.cz/laboratorni-pristroje-3k/opticke-pristroje-a-mikroskopy-20k/ctecky-a-promyvacky-mikrotitracnich-desticek-137k/ctecka-mikrodesticek-elx808-1944p>>

4.1.4 Přírodní podmínky

Prohledávání terénů se odehrávalo v blízkém okolí měst – Nové Město na Moravě (kraj Vysočina), Poušť (Středočeský kraj), Hamry (Pardubický kraj) a Žihle (Plzeňský kraj). Prohledávané oblasti byly různorodé a zahrnovaly husté lesy, mýtiny, cesty, skály a různě zvlněné terény. Průměrná rozloha každého prohledávaného úseku byla 20 až 30 hektarů.



Obrázek 9 – Města, kde se uskutečnily simulované pátrací akce.

Fialová – Žihle, zelená – Poušť, žlutá – Hamry, červená – Nové město na Moravě.

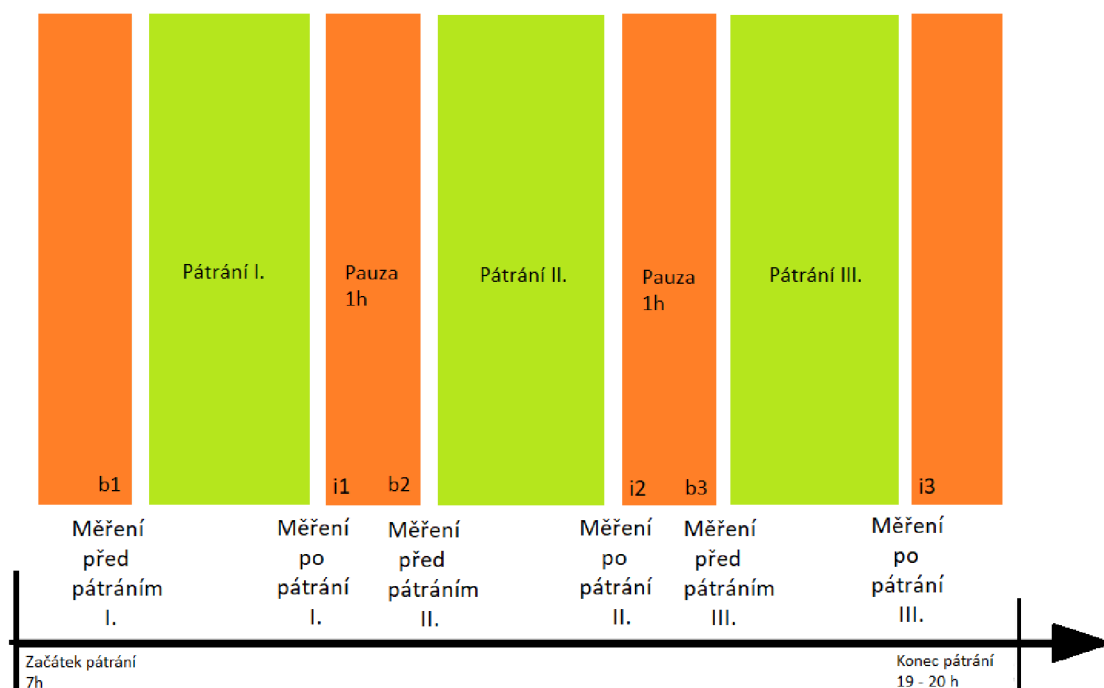
Mapa dostupná z: <https://physics.mff.cuni.cz/kchfo/MIB17/travel.html>

4.2 Metodika experimentu

4.2.1 Odběr biologického materiálu

Pro sledování cirkadiálních změn v koncentraci salivárního kortizolu byly vzorky slin odebírány ve dvouhodinových intervalech v průběhu 24 hodin, konkrétně v čase 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00, 20.00, 22.00, 24.00.

Během pátracích akcí (fyzické zátěže) byl odběr slin proveden 6x u každého testovaného jedince. Pátrací den byl rozdělen do tří etap, jak bylo popsáno výše. Měření probíhalo před prvním pátráním (b1), po prvním pátrání v oblasti (i1), před druhým pátráním, po odpočinku (b2) a po druhém pátrání v oblasti (i2), před třetím pátráním, po odpočinku (b3) a po posledním třetím pátrání v oblasti (i3).



Obrázek 10 – Časová osa sběru vzorků během pátracích akcí

Pro zvýšení salivace bylo psům před odběrem dáno čichnout k pamlskům. Odběr slin z dutiny ústní byl proveden tampónem, který byl pinzetou umístěn do obou lícních vaků, kde byl ponechán, aby se dostatečně nasákl slinami. Po vyjmutí tampónu z tlamy psa byl následně umístěn do odběrové zkumavky, která byla popsána příslušným identifikačním číslem psa a dobou odběru a následně zamražena v hlubokomrazícím boxu na teplotu -80°C .

4.2.2 Stanovení koncentrace slinného kortizolu ve vzorcích

Ke stanovení koncentrace salivárního kortizolu v odebraných vzorcích byla použita imunologická metoda ELISA. Princip metody spočívá v detekci přítomnosti kortizolu ve slinách pomocí protilátek a enzymu. Slinný kortizol reagoval s protilátkami, které jsou pro něj specifické a vytváří se tak komplex hormon-protilátka. Pokud byl kortizol přítomen v testovaném vzorku, docházelo k vazbě směsi na povrchové antigenní místo mikrotitrační jamky. Následně byla mikrotitrační destička několikrát promyta, aby se odstranily nepřílnavé molekuly a byl přidán enzym křenová peroxidáza, která se navázala na protilátku a vytvořila enzymatickou reakci s přidáním substrátu. Tato reakce vytvářela detekovatelný signál, obvykle barevnou změnu, která je přímo úměrná množství kortizolu v původním vzorku slin. Signál byl měřen pomocí spektrofotometru, posuzovala se absorpce vzorku a následně byla zjištěna

koncentrace kortizolu ve vzorcích slin pomocí pomoci křivky absorbance koncentrace známých standardů – S1 0,1 ng/ml, S2 0,5 ng/ml, S3 1,5 ng/ml, S4 4 ng/ml, S5 10 ng/ml a S6 30 ng/ml.

Komerční kit Salivary Cortisol ELISA SLV-2930, který byl užit, obsahuje všechny potřebné reagenty, včetně mikrotitračních destiček, kalibračních standardů, kontrolních vzorků, enzymového konjugátu, substrátu, stopovacího roztoku enzymatické reakce a mycího roztoku.

Odebrané vzorky slin byly zamrazeny a před analýzami rozmrazeny a odstředěny po dobu 15 minut při 3000 x g. Díky předchozím krokům procesu vznikl bezbarvý supernatant, který byl připraven k pipetování. Pokud byl vzorek zabarven krví nebylo možné provést jeho analýzu.

Pro analýzy je nezbytné, aby všechny součásti detekčního kitu měly pokojovou teplotu, pro každý vzorek byla použita nová špička pipety z důvodu možné kontaminace předchozím vzorkem. Samotná imunologická reakce nesmí být přerušována.

Imunologický test byl realizován přesně podle popisu v příloženém manuálu. Mikrotitrační destičky byly upevněny do držáku a do každé jamky bylo přidáno 100 µl vzorku, popřípadě standardního roztoku. Následně bylo do jamek napipetováno 200 µl enzymového konjugátu, poté byl každý vzorek pečlivě promíchán a inkubován při pokojové teplotě 60 minut. Následovalo vytřepání obsahu jamek na třepačce a propláchnutí promývacím roztokem, ředěným destilovanou vodou. Pro zamezení zkreslení testu musí být z jamek odstraněn všechen zbytkový materiál pomocí savého papíru.

4.2.3 Statistické zpracování dat

Ke statistickému zpracování dat by použit program STATISTICA, verze 12.

Pro popisné statistické parametry byl použit průměr, medián, směrodatná odchylka, maximální a minimální hodnota a variační koeficient. Vliv činnosti/pauzy byl v této práci stanovován pomocí smíšeného lineárního modelu procedurou Proc Mixed. Místo, kde pachové práce probíhaly bylo akceptováno jako náhodný faktor.

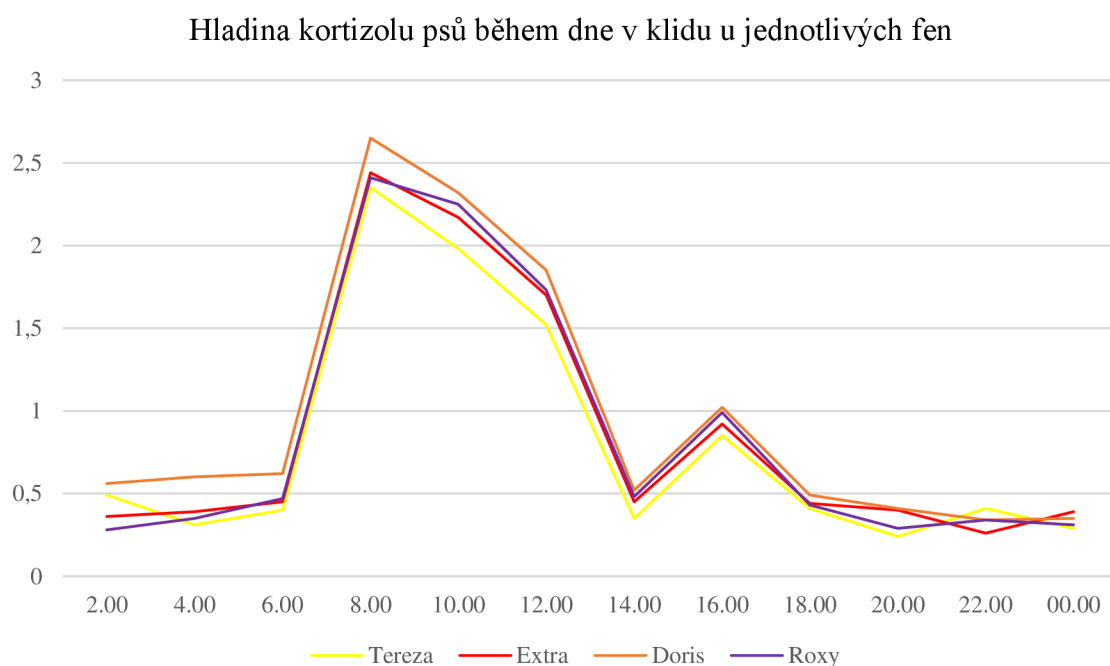
5 Výsledky

U 8 psů, z 21 testovaných, byla měřena koncentrace salivárního kortizolu během dne. Hladina salivárního kortizolu byla sledována ve dvouhodinových intervalech po dobu 24 hodin s počátkem v 6:00 hodin ráno. v tabulce 1 jsou uvedeny popisné statistické parametry pro koncentraci kortizolu během 24-hodinové periody naměřené u zvířat v domácím prostředí bez fyzické zátěže. z naměřených hodnot je patrné, že průměrná hladina kortizolu v rámci dne byla 0,89 ng/ml. v grafech 1 a 2 jsou znázorněny rozdíly v koncentraci slinného kortizolu fen (Graf 1) a psů (Graf 2) během 24-hodinového intervalu.

Výsledky potvrdily hypotézu 1, že u psů dochází ke střídání koncentrace kortizolu v průběhu dne. Nejvyšší hodnoty slinného kortizolu byly u psů naměřeny v 8,00 hodin ráno, podobně jako u lidí byl u psů popsán tzv. awakening efekt v ranních hodinách, následně došlo k postupnému poklesu koncentrace hormonu, přičemž v 16,00 hodin byl patrný mírný nárůst v koncentraci slinného kortizolu, který však už nebyl statisticky významný.

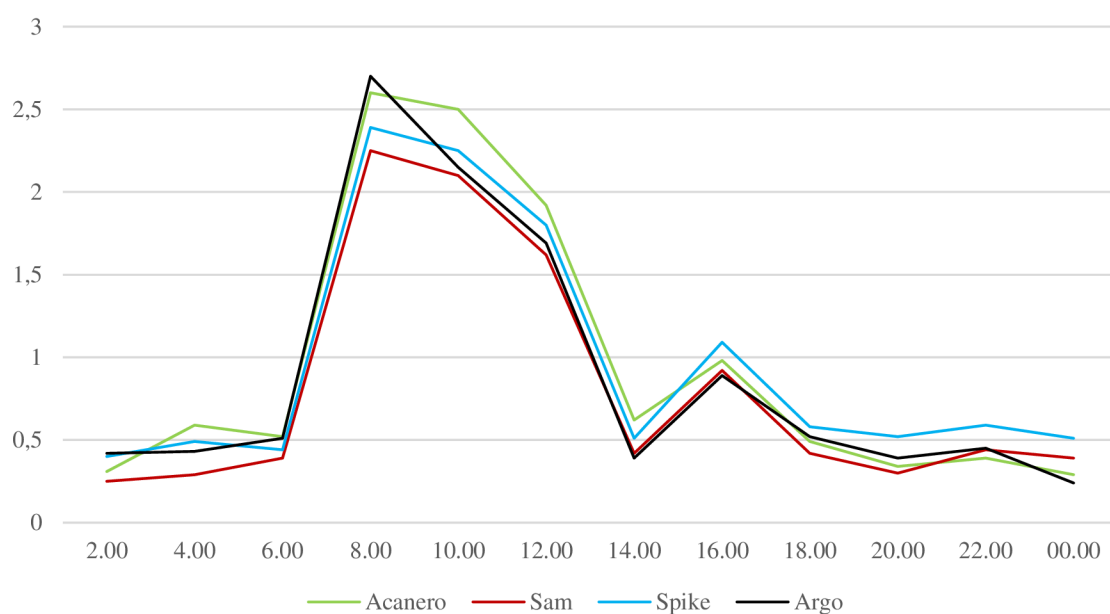
Tabulka 1: Popisné statistické parametry pro koncentraci kortizolu během 24-hodinového sledování

	n	Medián	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum	Variační koeficient
Celkově	8	0,47	0,89	0,79	0,2	3,71	0,88



Graf 1: Hladina kortizolu fen v průběhu dne

Hladina kortizolu psů během dne v klidu u jednotlivých psů



Graf 2: Hladina kortizolu psů v průběhu dne

V tabulce 2 jsou uvedeny popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu před a po fyzické zátěži během pátrací akce. v tabulce 3 jsou shrnuty popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu v jednotlivých situacích během pátracích akcí. Statistické šetření prokázalo významný vliv fyzické zátěže na hladinu slinného kortizolu. z naměřených dat zaznamenaných v tabulce 3 je patrné, že průměrná hodnota slinného kortizolu před zátěží (b1, b2, b3) nepřesahuje 1 ng/ml. Oproti tomu po zátěžové hodnoty slinného kortizolu (i1, i2, i3) prokazují vyšší hladinu, která v průměrných hodnotách jednotlivých situací neklesá pod 1 ng/ml. Graf 3 ukazuje průměrnou koncentraci kortizolu během jednotlivých etap pátrací akce.

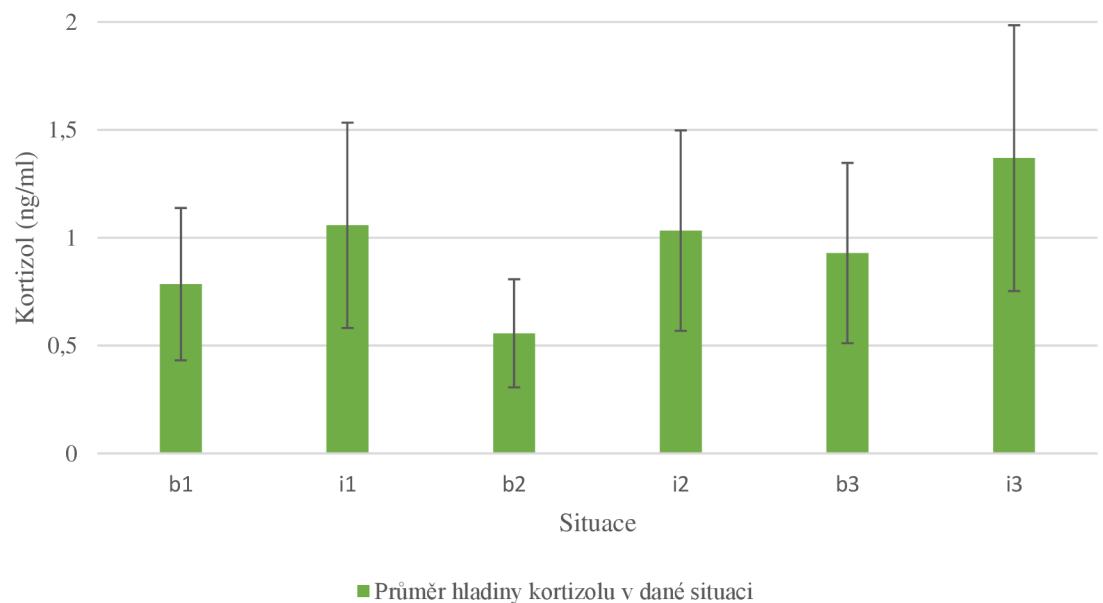
Z výsledků je evidentní, že fyzická a psychická zátěž ovlivňují změny v koncentraci slinného kortizolu psů během pátrací akce, hypotéza 2 byla tímto experimentem potvrzena.

Tabulka 2: Popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu před a po zátěži v ng/ml

	n	Medián	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum	Variační koeficient
Před zátěží (b1, b2, b3)	58	0,655	0,74927586	0,65715532	0,02	3,286	0,8770539
Po zátěži (i1, i2, i3)	57	0,66	1,13052632	1,40720263	0,03	8,25	1,2447323

Tabulka 3: Popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu v jednotlivých situacích

	n	Medián	Průměr	Směrodatná odchylna	Minimum	Maximum	Variační koeficient
Před zátěží (b1)	18	0,73	0,78	0,64	0,02	1,8	0,82
Po zátěží (i1)	23	0,58	1,06	1,19	0,03	4,57	1,13
Před zátěží (b2)	21	0,47	0,56	0,5	0,02	1,89	0,9
Po zátěží (i2)	20	0,88	1,03	0,63	0,13	2,36	0,61
Před zátěží (b3)	20	0,79	0,93	0,79	0,02	3,29	0,85
Po zátěží (i3)	16	0,56	1,37	2,2	0,04	8,25	1,61

Průměrná hladina kortizolu v jednotlivých situacích**Graf 3:** Průměrná hladina kortizolu v jednotlivých situacích

Graf 3 ukazuje hladiny slinného kortizolu v jednotlivých situacích, kdy hodnota b1 je mírně vyšší než hodnota b2, toto ukazuje na stres zvířete před začátkem práce, například z nového prostředí. Hodnota i1 je zhruba stejně vysoká jako i2 a ukazuje na stres během pracovního nasazení zvířete. Hodnota b3 je pak z před zátěžových hodnot nejvyšší, stejně tak

jako hodnota i3. Tyto hodnoty vypovídají o přicházející únavě a mohou být spojené s fyzickým i psychickým vyčerpáním jedince.

V tabulkách 4-6 jsou shrnuty výsledky týkající se měření koncentrace slinného kortizolu u fen a psů po zátěži.

Statistickým šetřením u psů (tabulka 4) byla zjištěna před zátěží průměrná hodnota 0,76 ng/ml, po zátěži byla průměrná hodnota u psů 1,21 ng/ml. u fen (tabulka 5) bylo dojito statistický šetřením k průměrným hodnotám před zátěží 0,72ng/ml a po zátěži 0,85 ng/ml.

Tabulka 4: Popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu před a po zátěži u psa

PES	n	Medián	Průměr	Směrodatná odchylna	Minimum	Maximum	Variační koeficient
Před zátěží (b1, b2, b3)	45	0,64	0,76	0,72	0,02	3,29	0,96
Po zátěži (i1, i2, i3)	45	0,67	1,21	1,57	0,03	8,25	1,29

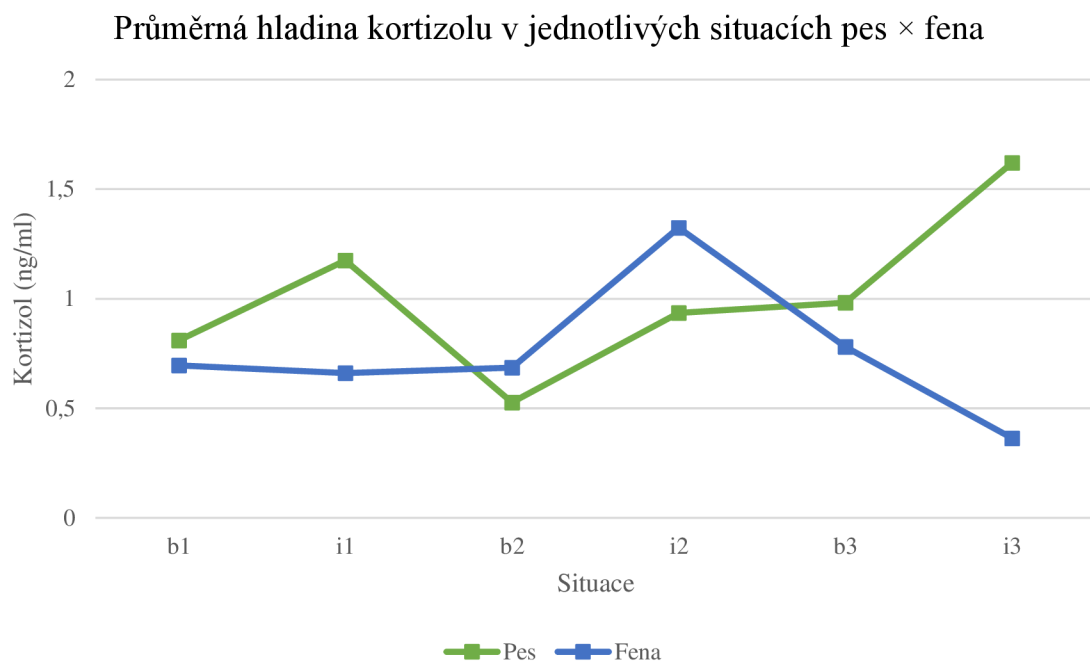
Tabulka 5: Popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu před a po zátěži u fen

FENA	n	Medián	Průměr	Směrodatná odchylna	Minimum	Maximum	Variační koeficient
před zátěží (b1, b2, b3)	13	0,77	0,72	0,35	0,02	1,31	0,49
po zátěži (i1, i2, i3)	12	0,6	0,85	0,69	0,04	2,23	0,82

Tabulka 6: Průměrná hladina kortizolu v jednotlivých situacích u psů a fen

	b1	i1	b2	i2	b3	i3
Pes	0,81	1,17	0,53	0,94	0,98	1,62
Fena	0,69	0,66	0,69	1,32	0,78	0,37

V tabulce 6 jsou průměrné hodnoty slinného kortizolu v jednotlivých situacích. z tabulky 6 je možné vyčíst, že feny byly v situacích b1, i1, b3 a i3 méně stresovány.



Graf 4: Průměrná hladina kortizolu v jednotlivých situacích pes × fena

V grafu 5 jsou vyobrazeny spojnicovým grafem hodnoty slinného kortizolu v jednotlivých situacích (b1, i1, b2, i2, b3 a i3). Statistická analýza ukázala, že hodnoty slinného kortizolu jsou v situacích před zátěží (b1, b2, b3) podobné a jsou blízko sebe, na rozdíl od hodnot po zátěži (i1, i2, i3), které jsou odlišné.

Rovněž hypotéza 3 byla potvrzena, hladina salivárního kortizolu během zátěže je spojena s pohlavím.

6 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda se koncentrace hormonu kortizolu mění během dne u psů v cirkadiálním rytmu, zhodnotit hladiny salivárního kortizolu u psů v průběhu pracovní zátěže během pátrací akce a lze jej využít jako ukazatel stresu u psů při zátěži a zjistit, zda hormon vykazuje změny v koncentraci v závislosti na pohlaví.

Naše experimenty potvrdily, že u psů dochází v klidovém režimu ke střídání koncentrace kortizolu během 24hodinového intervalu sledování a také byl potvrzen tzv. awakening effect kolem osmé hodiny ráno, kdy u psů prudce roste koncentrace kortizolu ve slinách. Výsledky našeho měření se shodují s výsledky studie několika autorů (Beerda et al., 1996; Colussi et al., 2018; Takahashi et al., 1981). Cirkadiální rytmus je synchronizován hodinami světla v mozku a odráží spánkové charakteristiky daného druhu (Kemppainen and Sartin, 1984). Naproti tomu řada autorů cirkadiální střídání hladin tohoto hormonu u psů popírá (Gröschl, 2008; Dreschel and Granger, 2005; Cobb et al., 2016). ve vědeckém tisku byly také publikovány výsledky, podle kterých koncentrace slinného kortizolu psů, kteří nejsou ve výcviku vykazují cirkadiální rytmus, zatímco pracující psi tento trend nevykazují (Fratkin et al., 2013). z našich výsledků plyne, že pokud mají být data ve studiích porovnávána, je třeba vzorky odebírat ve stejném čase. Některé zveřejněné studie obsahují data z kontinuálního měření kortizolu v čase, v některých jsou uvedeny pouze výsledky jednoho měření nebo průměrné hodnoty z denního měření kortizolu, což znemožňuje srovnat individuální hodnoty jednotlivých zvířat v různých studiích.

Dále bylo prokázáno, že se koncentrace salivárního kortizolu mění v důsledku pracovní zátěže, a že ke změnám v koncentraci hormonu během pachových prací dochází také v závislosti na pohlaví. Průměrná hodnota koncentrace kortizolu při měření po zátěži byla 1,13 ng/ml. k podobným výsledkům dospěli také Beerda et al. (1996), kteří uvádějí, že koncentrace kortizolu po zátěži se u psů pohybuje kolem hodnoty 1,89 ng/ml. Colussi et al. (2018) vypočetli průměrnou hodnotu koncentrace salivárního kortizolu u psů po zátěži 3 ng/ml. Glenk et al. (2014) naměřili koncentrace hormonu o 1 ng/ml vyšší. Žádná z publikovaných studií se netýkala koncentrace kortizolu ve slinách psů při záchranných pracích. Pouze Wojtás et al. (2020) porovnávali hodnoty salivárního kortizolu, kdy vzorky byly odebírány během sportovních zkoušek záchranných psů. Průměrná hodnota koncentrace kortizolu se u psů pohybovala kolem hodnoty 4,5 ng/ml. Štěrbová et al. (2013) monitorovali průměrnou koncentraci hormonu kortizolu u policejních psů během jejich výcviku a naměřili průměrné hodnoty v rozmezí 2,49-10,04 ng/ml. Wernsdörfer et al. (2016) uvádějí, že se průměrná hodnota

kortizolu u psů během asistenčních aktivit pohybuje kolem hodnoty 3,35 ng/ml. Orlandi et al. (2018) měřili průměrné hodnoty kortizolu v rozmezí od 5,53 do 6,57 ng/ml u psů v během soutěže záchranných psů. Stefanini et al. (2020) zaznamenali, že u psů běžící ve spřežení před výkonem byla průměrná hodnota kortizolu 1,7 ng/ml a po zátěži se v průměru zvýšila na 5,8 ng/ml.

V naší studii bylo rovněž prokázáno, že se koncentrace hormonu kortizolu při zátěži liší mezi pohlavími. Feny mohou vůči stresorům vykazovat relativní HPA hyperaktivitu (Beerda et al., 1997), takže je nezbytné ve výsledcích studií uvádět pohlaví sledovaných zvířat a také údaje týkající se jejich případné kastrace. Taylor a kol. (2000) se domnívají, že odlišné účinky stresu ve vazbě na pohlaví jsou způsobeny androgen-inhibičním a estrogen-stimulujícím vlivem oxytocinu.

Ke stanovení akutního stresu psů mohou být kromě hormonu kortizolu použity také další ukazatele stresu, které hodnotí fyziologickou odpověď těla na stresory a jsou podobně jako kortizol vylučovány do slin. Chromatogranin a (CgA) je vylučován společně s katecholaminy jako je adrenalin nebo noradrenalin během akutní stresové reakce. CgA je více stabilní, a tudíž vhodnější pro použití jako ukazatel stresu (Conley et al., 2014; Ryan et al., 2019). Také hormony katestatin (CST) a vasostatin (VS) mohou sloužit jako markery stresu. Na rozdíl od kortizolu nejsou ovlivněny pohlavím, plemenem ani denní dobou (Srithunyarat et al., 2017). Dalším potencionálním neinvazivním stresovým markerem odrážejícím aktivaci stresové dráhy může být slinná alfa-amyláza (sAA). Contreras-Aquilar a kol. (2017) popsali nárůst aktivity tohoto enzymu, i když je známo, že sliny psů obsahují fyziologicky jen velmi malá množství sAA.

Kromě hormonů jsou významnými markery stresu behaviorální pozorování, která mohou u psů zahrnovat nadměrné olizování, skákání, kousání, škrábání, vyhýbání se kontaktu s lidmi, třepání a zvýšenou citlivost na zvuky. Studie také ukázaly, že psi vystavení stresoru vykazují výrazně nižší frekvenci otáčení ušních boltců a ocasu (Landsberg et al., 2003; Beerda et al., 1998). Ideální při monitoringu stresu je zkombinovat hormonální a behaviorální markery, ale je třeba brát v potaz, že behaviorální stresové symptomy nejsou vždy v pozitivním vztahu s produkcí stresových hormonů typu glukokortikoidů, mezi které patří také kortizol.

7 Závěr

Kortizol ve slinách psů je možným ukazatelem akutního stresu psů při pátracích akcích, nicméně jeho využití má některé nevýhody, které mohou vést ke špatné interpretaci naměřených dat. Klíčovým aspektem je standardizovaná metoda odběru vzorků a jejich zpracování. Při přípravě schématu pokusu je třeba brát v potaz individuální rozdíly mezi zvířaty a vliv denní doby na koncentraci salivárního kortizolu. Použití kortizolu jako stresového ukazatele by mělo být doplněno sledováním chování, ale je třeba brát v potaz, že behaviorální stresové symptomy nejsou vždy v pozitivním vztahu s produkcí stresových hormonů typu glukokortikoidů, mezi které patří také kortizol. Komplexní povaha stresové odpovědi vyžaduje doplnění měření kortizolu o další stresové markery jako je chromatogranin A, catestatin, nebo vasostatin či slinná alfa amyláza.

Literatura

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.

Alessio, H., Hagerman, A. 2006. *Oxidative stress, exercise, and aging.* distributed by World Scientific Pub. Hackensack, NJ. ISBN: 978-186-0946-196.

Angle, C., Wakshlag, J., Gillette, R., Stokol, T., Geske, S., Adkins, T., Gregor, C. 2009. Hematologic, serum biochemical, and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high-intensity exercise in sled dogs. *Veterinary Clinical Pathology.* 38 (3). 370-374.

Arlt W, Stewart PM. 2005. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism and action. *Endocrinology and Metabolism clinics of North America.* 34:293–313.

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

Beerda B, Schilder MBH, van Hooff J, de Vries HW, Mol JA. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Appl Anim Behav Sci* 1998;58:365-381.

Bennett a, Hayssen V. 2010. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic animal Endocrinology* 39:171-180.

Bergeon R, Scott SL, Emont JP, Mercier F, Cook NJ, Schaefer AL. 2002. Physiology and behavior of dogs during air transport. *Canadian Journal of Veterinary Research=Revue Canadienne de Recherche* 66:211-216.

Bernášková K, Polách, J. 2016. Vegetativní nervový systém a jeho poruchy, krátkodobý a dlouhodobý stres. *Obecná patologická fyziologie.* 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy. Praha.

Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-bornstein M, Herman JP. 2008. Dissociation of aCTH and glucocorticoids. *Trends in Endocrinology* 19:175-180.

Carpenter GH. 2013. The secretion, components, and properties of saliva. *Annual review of food science and technology.* 4:267–276.

Castillo VA, Cabrera Blatter MF, Gómez NV, Sinatra C, Gallelli MF, Ghersevich MC. 2009. Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Research in Veterinary Science* 86: 223-229.

Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, Goullé JP, Ludes B. 2000. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. *Forensic science international* 107:381-8.

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

Cobb ML, Iskandarani K, Chinchilli VM, Dreschel NA. a systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domest Anim Endocrinol* 2016;57:31-42.

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

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

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

Creel S. 2001. Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology* 16:491-497.

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

Čihák R, Grim M. *Anatomie. 2. upr. a dopl vydání. Praha : Grada Publishing, 2002. 470 s. sv. 2. ISBN 80-247-0143-X.*

Dickerson, S. S., & Kemeny, M. E. (2004). Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychological bulletin*, 130(3), 355-391.

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

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

Esposito a, Bianchi V. 2012. Cortisol: physiology, regulation and health implications. Nova Science Publishers, New York.

Fratkin, J. L., Sinnott, R. Q. a Patronek, G. J. Understanding support for animal hoarding legislation: A qualitative study. *Society & Animals*, [online]. 2013, roč. 21, č. 2, s. 160-180. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/15685306-12341236>

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. *Journal of Applied Biomedicine*. 12 (4). 229-233.

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

Gröschl, M. Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry* 2008

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

Grim M., Druga R. *Základy anatomie*. 1. vydání. Praha : Galén, 2005. ISBN 8072623028.

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

Heimbürge, S., Kanitz, E., Otten, W. 2019. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General and Comparative Endocrinology*. 270. 10-17.

Hekman, J., Karas, A., Dreschel, N. 2012. Salivary cortisol concentrations and behavior in a population of healthy dogs hospitalized for elective procedures. *Applied Animal Behaviour Science*. 141 (3-4). 149-157.

Hong, S. H., et al. Effect of Salivary Alpha-Amylase Levels and Gene Polymorphisms on Caries in Primary Dentition. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, [online], 2019, vol. 16, no. 16, s. 2859. DOI: 10.3390/ijerph16162859. ISSN 1660-4601.

Johnoson, R. A., McGlone M. C., Dunn J. L., Shike D. D., Smith J. R. 2006. Effects of Dietary Ascorbic Acid on Cortisol Response to Corticotropin-Releasing Hormone and Temperature-Humidity Exposure in Stressed Growing Pigs. *Journal of Animal Science*. Vol. 84, no. 6, pp. 1577-1584. DOI: 10.2527/2006.

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

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

Juda, P. 2008. Stres: co dělá organismus vystavený zátěži. *Metodika* [online]. Velké Meziříčí. Dostupné z: <http://metodika.cvf.cz/psychologicke-souvislosti/stres-co-dela-organismus-vystaveny-zatezi>;

Kamarck, T. W., Lovallo, W. R. Cardiovascular reactivity to psychological challenge: conceptual and measurement considerations. *Psychosomatic Medicine*, 2003, 65(1), 9-21.

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

Kikkawa, A., Uchida, Y., Nakade, T., Taguchi, K. 2003. Salivary secretory IgA concentrations in beagle dogs. *J Vet Med Sci*. 65 (6). 689-693.

Kittnar O, Frynta D, Fraňková M, Skarlandtová H. 2010. Stress and stress hormones in mammals. *Československá fyziologie*. 59:32-36.

Kittnar O. 2011. *Lékařská fyziologie*. Praha, Grada Publishing a. s.

Kittnar, O. et al. 2011. *Lékařská fyziologie*. Grada. Praha. 790 s. ISBN: 8024730685.

Koivunen, M., Krogsrud, R. 2006. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Laboratory Medicine*. 37 (8). 490-497.

Kolevská, J., Brunclík, V., Svoboda, M. 2003. Circadian Rhythm of Cortisol Secretion in Dogs of Different Daily Activities. *Acta Veterinaria Brno*. 72 (4). 599-605. Kudielka, B. M., & Kirschbaum, C. (2003). Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biological psychology*, 69(1), 113-132.

Koyama, T., Omata, Y., Saito, A. 2003. Changes in Salivary Cortisol Concentrations During a 24-Hour Period in Dogs. *Hormone and Metabolic Research*. 35 (6). 355-357.

Kyrou, I. & Tsigos, C. 2009. Stress mechanisms and metabolic complications. *Metabolism: clinical and experimental*. 59(2), 61-78. ISSN 0026-0495.

Landsberg, G.M., Hunthausen, W.L., Ackerman, L.J. (2003). *Handbook of Behavior Problems of the Dog and Cat*. Elsevier Health Sciences. ISBN 978-0-323-01789-3.

Lavy, E., Goldberger, D., Friedman, M., Steinberg, D. (2021). PH Values and Mineral Content of Saliva in Different Breeds of Dogs. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 67(4), 244-248.

Lazarus, R. S., Folkman, S. *Stress, appraisal, and coping*. New York: Springer Publishing Company, 1984.

. Ledvina M, Stoklasová A, Ceran J. 2009. *Biochemie pro studující medicíny II*. Praha, Karolinum.

Liu, Y., & Nakagawa, Y. (2017). Changing patterns of glucocorticoid receptor signaling underlie different physiological responses to stress. *General and Comparative Endocrinology*, 246, 11-17.

Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434-445.

Maimon, R., Gershoni, M., Barnea, M., Shahar, T., & Konfino, T. (2020). The Effect of Early-Life Stress on Glucocorticoid-Related Genes and Its Relationship to Cortisol Levels in Healthy Adults: A Systematic Review. *Journal of molecular neuroscience*, 70(10), 1564-1576.

Manser, C. E. 1992. *The Assessment Stress in Laboratory Animals*. RSPCA. Horsham Sussex.

McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews*, 87(3), 873-904.

McEwen, B. S., & Akil, H. (2020). Revisiting the stress concept: Implications for affective disorders. *Journal of Neuroscience*, 40(1), 12-21.

Mills, Daniel S. et al. Stress and fear behavior assessed by the stress response curve technique in Labrador retrievers. *Journal of veterinary behavior*, 2014, 9.6: 236-241. ISSN 1558-7878.

Moberg GP, Mench JA. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare 2000*;CAB International, Wallingford, UK 377pp.

Möstl, E., Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*. 23(1-2). 67-74.

Mourek, J. 2012. *Fyziologie – učebnice pro studenty zdravotnických oborů*, 2. doplněné vydání. Grada. Praha. 222 s. ISBN: 8024739186.

National Research Council a Division on Earth and Life Studies, 2006. *Nutrient requirements of dogs and cats*. National Research Council. ISBN 0309086280.

Novotný, J. 2016. *Human movement for health and oxidative stress*. Pedagogical Faculty of Masaryk University, Brno.

Okamoto, M., Sako, T., Ishihara, M., Kitahara, E., Itoh, T., & Sakurai, Y. (2021). Changes in salivary cortisol concentrations in search and rescue dogs during earthquake disaster training. *Journal of Veterinary Behavior*, 42, 44-49. doi: 10.1016/j.jveb.2021.03.002

Ondruš, J. 2007. *Oxidační stres a antioxidanty*. *Atletický trénink* [online]. Dostupné z: <https://web.archive.org/web/20090724084059/http://atletickytrenink.cz/Regenerace/antioxidanty.php> >

Orlandi, R., Semplicini, B., Mariti, C., Gatellaro, E., Fantoni, C., & Ricci, E. (2018). Cortisol response to a combined training and competition program in search and rescue dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 28, 31-35. doi: 10.1016/j.jveb.2018.06.004

Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcakova, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, M., Eichele, G. 2006. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metabolism*. 4 (2). 163-173.

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

Pasquini, A., Luchetti, E., Cardini, G. 2010. Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise. *Research in Veterinary Science*. 89 (1). 120-123.

Pastore C, Pirrone F, Balzarotti F, Faustini M, Pierantoni L, Albertini M. Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. *J Vet Behav-Clin Appl Res* 2011;6:188-194

Peterson, M. 2007. *Diagnosis of Hyperadrenocorticism in Dogs*. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 22 (1). 2-11. Reece WO. 2009. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada Publishing a. s., Praha.

Reeder D., Kramer K. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ECOLOGY, and natural history. *Journal of Mammalogy*. 2005;86:225-235.

Reynolds PD, Ruan Y, Smith DF, Scammell JG. 1999. Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84:663-9.

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

Russo, C., Bracarense, A. 2016. Oxidative stress in dogs. *Semina: Ciências Agrárias*. 37 (3). 1431-1440.

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

Sapolsky R M, Romero L M, Munck a U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrinology Reviews* 21:55–89.

Selye, H. 1956. *The stress of life*. Vol. 5. McGraw-Hill Book. New York. 324 p.

Sheriff M, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. 166:869-887.

Sieber-Ruckstuhl N, Boretti F, Wenger M, Maser-Gluth C, Reusch C. 2008. Serum concentrations of cortisol and cortisone in healthy dogs and dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Veterinary Record*. 163:477-481.

Sigmund M, Kvintová J, Šafář M. 2014. *Vybrané kapitoly z manažerské psychologie*. Univerzita Palackého v Olomouci.

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

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

Stavroula, K. A., & Darviri, C. (2016). Does stress management training affect individuals' cortisol levels? a systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 68, 167-181.

Stefanini, C., Balzarini, M., Mazzola, S. M., Coppola, C. L., Verga, M., & Roncoroni, C. (2020). Salivary cortisol concentrations in sled dogs before and after exercise: a pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 36, 9-14. doi: 10.1016/j.jveb.2020.06.004

Štěřbová, J., Bedáňová, I., & Ceplecha, V. (2013). Changes in cortisol concentration during a police dog training programme. *Acta Vet. Brno*, 82(3), 267-272. doi: 10.2754/avb201382030267

Taylor SE, Klein LC, Lewis BP, Gruenewald TL, Gurung RAR, Updegraff JA. Biobehavioural responses to stress in females: Tend-and-befriend, not fight-orflight. *Psychol Rev* 2000;107:411-429.

Thau L, Gandhi J, Sharma S. 2020. *Psychology, Cortisol*. Star Pearls Publishing, treasure Island. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538239/> (Accesed january 2021).

Travain T, Colombo E, Heinzl E, Bellucci D, Prato Previde E., Valsecchi, P. 2015. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)—A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*. 10:17-23.

Trojan S. 2003. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing a. s., Praha.

Veselovský, Z. 2005. *Etologie: biologie chování zvířat*. Academia. Praha. 408 s. ISBN: 8020013318.

Wernsdörfer, C., Futschik, A., Kostal, L., & Palme, R. (2016). Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: a pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 13, 1-6. doi: 10.1016/j.jveb.2015.10.007

Wojtaś, J., Karpiński, M., Czyżowski, P. 2020. Salivary Cortisol Interactions in Search and Rescue Dogs and Their Handlers. *Animals*. 10 (4).

Samostatné přílohy

Příloha 1 - Seznam použitých zkratk a symbolů

ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADH	antidiuretický hormon
ATP	adenosintrifosfát
CgA	Chromogranin A
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EIA	enzymový imunotest
FFS	flight and fight syndrom
GIT	gastro-intestinální trakt
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HPA	osa hypothlamo-hypofyzární
IRT	infračervená termografie
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
RIA	radioimunotest
RNA	ribonukleová kyselina
SAA	slinná alfa-amyláza
SAM	osa sympato-adreno-medulární
STH	somatotropní hormon

Příloha 2 - Tabulka – seznam účastníků pátrání

Místo	Pes	Psovod	Věk	Pohlaví	Plemeno	Situace b	Kortizol b (ng/ml)	Situace i	Kortizol i (ng/ml)
Pouště	Roxy	Čiperová	9,7	fena	GS	b1	-	i1	0,161
						b2	-	i2	1,77
						b3	1,14	i3	0,45
Pouště	Sam	Hlubocká	8,2	pes	CBR	b1	1,789	i1	1,427
						b2	1,176	i2	0,377
						b3	3,286	i3	1,51
Pouště	Class	Smejkal	5	pes	NO	b1	1,12	i1	0,562
						b2	0,089	i2	0,783
						b3	-	i3	-
Žihle	Spike	Hubnerová	8,6	pes	LR	b1	0,04	i1	0,59
						b2	0,038	i2	2,36
						b3	0,95	i3	0,22
Žihle	Chaime	Sudzina	3,1	pes	NO	b1	-	i1	3,98

						b2	0,76	i2	-
						b3	-	i3	5,09
Žihle	Ergo	Uher	4	pes	NO	b1	0,47	i1	0,66
						b2	0,38	i2	0,65
						b3	1,2	i3	-
Žihle	Bentley	Šimek	10	pes	BOM	b1	0,27	i1	1,32
						b2	0,09	i2	2,1
						b3	-	i3	8,25
Žihle	Leosh	Hrubešová	3	pes	MIX	b1	-	i1	2,19
						b2	0,65	i2	0,57
						b3	0,02	i3	0,26
Nové Město	Argo	Godzman	5,8	pes	NO	b1	-	i1	0,03
						b2	0,47	i2	0,69
						b3	0,49	i3	1,5

Nové Město	Kilian	Kůžel	4,7	pes	NO	b1	0,06	i1	0,08
						b2	0,17	i2	0,13
						b3	1,44	i3	0,27

Nové Město	Bart	Mrazík	9	pes	NO	b1	0,02	i1	0,2
						b2	0,18	i2	-
						b3	0,64	i3	0,22

Nové Město	Greeny	Šťastný	5	pes	NO	b1	1,74	i1	0,76
						b2	0,02	i2	0,32
						b3	0,03	i3	0,56

Nové město	Doris	Krč	7,2	fena	HWT	b1	0,77	i1	0,08
						b2	0,02	i2	0,68
						b3	0,46	i3	0,04

Nové Město	<u>Leosh</u>	Hrubešová	3	pes	MIX	b1	0,06	i1	0,47
						b2	0,26	i2	0,16
						b3	0,69	i3	0,71

Nové Město	Sam	Hlubocká	8,2	pes	CBR	b1	0,26	i1	4,57
						b2	1,89	i2	1,69
						b3	0,03	i3	0,18
Hamry	Amar	Procházka	4,9	pes	NO	b1	1,59	i1	1,33
						b2	1,07	i2	0,59
						b3	0,99	i3	-
Hamry	Charlie	Bazinková	6,9	pes	BOC	b1	1,27	i1	-
						b2	-	i2	1,25
						b3	1,54	i3	0,67
Hamry	Orna	Špaldoňová	3	fena	NO	b1	0,39	i1	0,55
						b2	0,94	i2	1,15
						b3	0,39	i3	0,6
Hamry	Vuk	Kovář	5	pes	NO	b1	1,8	i1	0,37
						b2	0,66	i2	-
						b3	-	i3	-

Hamry	Extra	Gabrišová	9,3	fena	NO	b1	0,68	i1	0,28
						b2	0,47	i2	1,73
						b3	1,12	i3	-

Hamry	Fantom	Blažek	3	pes	BOM	b1	-	i1	0,35
						b2	0,28	i2	0,97
						b3	2,05	i3	-

Hamry	Acanero	Bomer	5,5	pes	AUO	b1	0,85	i1	1,07
						b2	0,77	i2	1,39
						b3	0,39	i3	-

Hamry	Tereza	Paterová	5,4	fena	MIX	b1	0,94	i1	2,23
						b2	1,31	i2	1,29
						b3	0,79	i3	-

Příloha 3 - Tabulka – seznam psů s hodnotami odebraných během dne (hodnoty hladin salivárního kortizolu jsou uvedeny v ng/ml)

Jméno psa	Plemeno	Pohlaví	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00	12.00	14.00	16.00	18.00	20.00	22.00	00.00
Acanero	AUO	pes	0,31	0,59	0,52	2,6	2,5	1,92	0,62	0,98	0,49	0,34	0,39	0,29
Sam	CBR	pes	0,25	0,29	0,39	2,25	2,1	1,62	0,42	0,92	0,42	0,3	0,44	0,39
Spike	LR	pes	0,4	0,49	0,44	2,39	2,25	1,8	0,51	1,09	0,58	0,52	0,59	0,51
Argo	NO	pes	0,42	0,43	0,51	2,7	2,15	1,69	0,39	0,89	0,52	0,39	0,45	0,24
Tereza	MIX	fena	0,49	0,31	0,4	2,35	1,98	1,52	0,35	0,85	0,41	0,24	0,41	0,29
Extra	NO	fena	0,36	0,39	0,45	2,44	2,17	1,7	0,45	0,92	0,44	0,4	0,26	0,39
Doris	HWT	fena	0,56	0,6	0,62	2,65	2,32	1,85	0,52	1,02	0,49	0,41	0,34	0,35
Roxy	HWT	fena	0,28	0,35	0,47	2,41	2,25	1,73	0,48	0,99	0,43	0,29	0,34	0,31

Příloha 4 – Seznam obrázků

Obrázek 1 – Fáze stresová reakce	5
Obrázek 2 – Řez nadledvinou psa	7
Obrázek 3 – Hormony kůry nadledvin	9
Obrázek 4 – Molekula kortizolu.....	11
Obrázek 5 – Osa simulovaných pátracích akcí	20
Obrázek 6 – Odběrová zkumavka Salivette® Cortisol	22
Obrázek 7 – Komerční kit Salivary Cortisol ELISA SLV-2930	23
Obrázek 8 – Čtečka mikrotitračních destiček BioTek™ Elx800™	23
Obrázek 9 – Města, kde se uskutečnily simulované pátrací akce.....	24
Obrázek 10 – Časová osa sběru vzorků během pátracích akcí.....	25

Příloha 5 – Seznam tabulek

Tabulka 1: Popisné statistické parametry pro koncentraci kortizolu během 24-hodinového sledování 27

Tabulka 2: Popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu před a po zátěži v ng/ml²⁸

Tabulka 3: Popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu v jednotlivých situacích²⁹

Tabulka 4: Popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu před a po zátěži u psa. 30

Tabulka 5: Popisné statistické parametry pro hladinu kortizolu před a po zátěži u fen. 30

Tabulka 6: Průměrná hladina kortizolu v jednotlivých situacích u psů a fen..... 30

Příloha 6 – Seznam grafů

Graf 1: Hladina kortizolu fen v průběhu dne	27
Graf 2: Hladina kortizolu psů v průběhu dne	28
Graf 3: Průměrná hladina kortizolu v jednotlivých situacích.....	29
Graf 4: Průměrná hladina kortizolu v jednotlivých situacích pes × fena	31