

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Kortizol jako indikátor bolesti u koní

Diplomová práce

Bc. Natálie Pelantová

Zájmové chovy zvířat

Ing. Cyril Neumann, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Kortizol jako indikátor bolesti" 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. Nástroje AI jsem využila v souladu s vnitřními předpisy univerzity a principy akademické integrity a etiky.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Cyrilu Neumannovi, Ph.D, vedoucímu mé diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup v průběhu celého zpracování.

Dále děkuji své rodině za trpělivost, podporu a motivaci, kterou mi po celou dobu studia poskytovala.

Kortizol jako indikátor bolesti u koní

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá problematikou bolesti u koní a možností jejího objektivního hodnocení prostřednictvím sledování koncentrace kortizolu ve slinách. Kortizol je steroidní hormon vylučovaný kůrou nadledvin jako klíčový produkt aktivace hypothalamo-hypofyzárně-adrenální (HPA) osy. Jeho sekrece stoupá při působení stresových podnětů, mezi které patří i bolest. Měření kortizolu představuje cenný nástroj k hodnocení aktuálního stavu zvířete, přičemž odběr slin umožňuje získat relevantní údaje neinvazivní a zvíře minimálně zatěžující metodou. Práce si klade za cíl ověřit dvě výzkumné hypotézy – že hladina kortizolu ve slinách může sloužit jako spolehlivý indikátor bolesti, a že věk koně má vliv na cirkadiánní rytmus jeho sekrece.

V teoretické části práce je podrobně popsána fyziologie bolesti, její dělení na akutní a chronickou, a mechanismy vnímání bolesti včetně aktivace nociceptorů a přenosu bolestivých podnětů do centrálního nervového systému. Dále jsou diskutovány fyziologické souvislosti stresové reakce, funkce HPA osy, a význam kortizolu jako hlavního stresového hormonu. Pozornost je věnována rozdílu mezi jednotlivými biologickými matricemi pro odběr kortizolu (krev, moč, srst, sliny) a výhodám slinného kortizolu při studiu stresu a bolesti. Součástí řešení jsou také přehledy behaviorálních a fyziologických metod hodnocení bolesti u koní, včetně škál obličejových výrazů, změn chování a srdeční frekvence.

Praktická část práce byla realizována na souboru zdravých koní různého věku a koní hospitalizovaných s bolestivými stavy. Odběry slin byly prováděny v několika časových intervalech během dne, aby bylo možné zachytit denní variabilitu hladin kortizolu. Vzorky byly analyzovány pomocí metody ELISA. Výsledky ukázaly, že koně trpící bolestí vykazovali signifikantně vyšší hladiny kortizolu oproti zdravým jedincům, a to zejména v ranních hodinách, kdy je kortizol přirozeně nejvyšší. Tím byla potvrzena hypotéza o využitelnosti slinného kortizolu jako biomarkeru bolesti. Co se týče věku, bylo zjištěno, že starší koně mají tendenci vykazovat nižší denní variabilitu v hladinách kortizolu, avšak rozdíly nebyly statisticky významné, což znamená, že vliv věku nelze jednoznačně potvrdit.

Závěrem lze konstatovat, že hladina kortizolu ve slinách představuje perspektivní doplňkový ukazatel bolesti u koní, který může být efektivně využit v klinické praxi i výzkumu. Tato metoda umožňuje objektivní a neinvazivní hodnocení aktuálního stavu zvířete a může přispět ke zvýšení úrovně welfare a kvality veterinární péče. Výsledky této práce mohou být inspirací pro další výzkum zaměřený na monitorování stresu a bolesti u hospodářských i zájmových zvířat.

Klíčová slova: kůň, kortizol, sliny, bolest

Cortisol as a pain indicator in horses

Summary

This thesis focuses on the issue of pain assessment in horses and the potential use of salivary cortisol concentration as a non-invasive biomarker. Cortisol is a steroid hormone secreted by the adrenal cortex as a key product of the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis. Its levels increase in response to various stressors, including pain. Measuring cortisol levels allows for an objective evaluation of the animal's current physiological state, and saliva sampling provides a non-invasive and low-stress method, which is particularly important in animal welfare assessment. The main aim of the thesis was to verify two hypotheses: that salivary cortisol can serve as a reliable indicator of pain, and that the circadian rhythm of cortisol secretion is influenced by the age of the horse.

The theoretical part of the thesis discusses the physiology of pain, including the distinction between acute and chronic pain and the mechanisms of nociception. It also explores the physiological background of stress responses, the function of the HPA axis, and the role of cortisol as a principal stress hormone. Differences between various biological matrices for cortisol sampling (blood, urine, hair, saliva) are discussed, with emphasis on the advantages of salivary sampling. In addition, behavioral and physiological pain assessment methods in horses are reviewed, including facial expression scales, behavioral signs, and heart rate monitoring.

The experimental part was conducted on a sample of healthy horses of various ages and horses hospitalized due to painful conditions. Saliva samples were collected at several intervals during the day to capture the circadian variability of cortisol levels. Samples were analyzed using the ELISA method. Results showed that horses experiencing pain had significantly higher cortisol levels compared to healthy individuals, particularly in the morning when cortisol naturally peaks. This finding supports the hypothesis that salivary cortisol can serve as a biomarker of pain. In terms of age, older horses tended to show less variation in daily cortisol levels, although the differences were not statistically significant. Thus, the influence of age remains inconclusive.

In conclusion, salivary cortisol appears to be a promising complementary indicator for pain assessment in horses, suitable for both research and clinical practice. This method offers an objective, stress-free, and ethically sound approach to monitoring equine welfare. The findings of this thesis may serve as a foundation for further studies focusing on stress and pain diagnostics in both livestock and companion animals.

Keywords: horse, cortisol, saliva, pain

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Bolest	9
3.1.1	Fyziologie bolesti.....	9
3.1.2	Akutní bolest.....	11
3.1.3	Chronická bolest	11
3.2	Stres a bolest	11
3.3	Hypothalamo-hypofyzární osa (HPA).....	12
3.4	Kortizol	13
3.4.1	Matrice pro odběr vzorků kortizolu	14
3.5	Faktory ovlivňující hladiny kortizolu	15
3.5.1	Cirkadiánní rytmus kortizolu	15
3.5.2	Cirkanuální rytmus kortizolu	17
3.5.3	Tělesná kondice	18
3.5.4	Věk.....	18
3.6	Metody měření bolesti u koní.....	19
3.6.1	Fyziologické měření	19
3.6.2	Chování odrážející bolest	20
3.6.3	Horse Grimace Scale	20
3.6.4	Systém kódování mimických reakcí	22
3.6.5	Kompozitní škála měření bolesti	23
3.7	Rychlotest na kortizol	23
3.8	Kortizol jako indikátor bolesti.....	24
4	Metodika	28
4.1	Experiment	28
4.1.1	Odběr slin.....	29
4.1.2	Popis testovaných koní	30
4.1.3	Analýza vzorků	32
4.1.4	Statistická analýza	34
5	Výsledky	35
5.1	Cirkadiánní rytmus kortizolu	35
5.2	Vliv bolesti na hladiny kortizolu u koní.....	38
5.2.1	Hladiny kortizolu během odběrů u koní s prokazatelnou bolestí	38
5.2.2	Hladiny kortizolu u koní s prokazatelnou bolestí a u kontrolní skupiny ..	40
5.2.3	Hladiny kortizolu během odběrů	41
5.3	Vliv věku na hladiny kortizolu u koní.....	44
6	Diskuze	46
7	Závěr.....	49
8	Literatura.....	50
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	57

1 Úvod

Bolest představuje zásadní fyziologický i behaviorální fenomén, který významně ovlivňuje zdraví, pohodu a kvalitu života všech živočichů, včetně koní (Hernández-Avalos et al. 2021). Ačkoliv je bolest subjektivním prožitkem, u zvířat ji nelze přímo verbalizovat, a její hodnocení se proto opírá o nepřímé ukazatele – fyziologické změny, chování či výrazy obličeje (Prunier et al. 2013). U koní, jakožto zvířat s vysokou mírou instinktivního potlačování projevů slabosti, je objektivní detekce bolesti obzvláště náročná. Z tohoto důvodu je hledání validních, spolehlivých a přitom šetrných indikátorů bolesti velmi důležité, jak z hlediska veterinární medicíny, tak z pohledu welfare zvířat (van Loon & Van Dierendonck 2018).

Jedním z perspektivních ukazatelů fyziologické reakce na bolest je hladina kortizolu – steroidního hormonu, který se vylučuje jako odpověď na aktivaci hypothalamo-hypofyzárně-adrenální osy (HPA) během stresových situací (Contreras-Aguilar et al. 2018; Hinds & Sanchez 2022; Hurcombe 2011). Kortizol se přirozeně vyskytuje v různých biologických matricích a jeho koncentrace v krvi, moči, srsti či slinách poskytuje cenné informace o míře stresového zatížení organismu. Zvláště sliny představují atraktivní alternativu k tradičním invazivním metodám, neboť umožňují neinvazivní odběr bez dalšího zatížení zvířete (Sikorska et al. 2023).

Dosavadní výzkumy naznačují, že hladina kortizolu ve slinách může odrážet nejen obecný stres, ale také bolestivé stavy. Přesto však zůstává otázkou, do jaké míry je tento ukazatel spolehlivý a zda jej lze efektivně využít v praxi. Dále není zcela objasněno, jak velkou roli v sekreci kortizolu hraje věk koně a zda starší jedinci vykazují jiné vzorce v jeho denním rytmu než mladší zvířata.

Z výše uvedených důvodů se tato diplomová práce zaměřuje na sledování hladin kortizolu ve slinách koní v souvislosti s bolestí a věkem. Cílem je ověřit hypotézu, že hladina kortizolu ve slinách může sloužit jako indikátor bolesti, a zároveň prozkoumat, zda existuje rozdíl v jeho cirkadiánní variabilitě mezi mladými a staršími koňmi. Výsledky této práce by mohly přispět k rozšíření dostupných metod hodnocení bolesti u koní a podpořit zavádění šetrných a objektivních přístupů k monitorování jejich zdravotního stavu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce je prostřednictvím experimentálního výzkumu ověřit platnost dvou hypotéz, které se zaměřují na využití hladiny kortizolu ve slinách jako potenciálního indikátoru bolesti a vliv věku na jeho cirkadiánní variabilitu. Na základě získaných výsledků budou vyvozeny příslušné závěry, které mohou přispět k lepšímu porozumění fyziologickým reakcím koní na bolest a stárnutí, a tím i k lepšímu řízení jejich zdraví a pohody. Práce bude pracovat se vzorkem zdravých koní různého stáří a s koňmi s bolestivými zraněními ve veterinární nemocnici.

Hypotéza 1: Zvýšená hladina slinného kortizolu je u koně indikátorem bolesti.

Tato hypotéza vychází z předpokladu, že kortizol, který je klíčovým stresovým hormonem, se zvyšuje v reakci na bolestivé podněty. Z toho vyplývá, že sledování hladin kortizolu ve slinách by mohlo poskytnout spolehlivý biomarker, který by veterinářům a chovatelům umožnil objektivně posoudit, zda koně zažívají bolest, a to bez nutnosti invazivních zásahů. V rámci této práce bude experimentálně zkoumáno, zda změny v hladinách slinného kortizolu skutečně odrážejí přítomnost bolesti u koní. Výzkum se zaměří na měření těchto hladin v různých situacích, které mohou být spojeny s bolestí, a na analýzu, zda existuje statisticky významná korelace mezi zvýšenou hladinou kortizolu a projevem bolesti.

Hypotéza 2: Stárnutí koně snižuje hladinu slinného kortizolu

Tato hypotéza je založena na předpokladu, že stárnutí přináší změny v organismu, včetně nárůstu chronických zánětlivých procesů, které mohou způsobovat bolest a tím i ovlivňovat hladiny kortizolu. Starší koně, kteří trpí těmito dlouhodobými zdravotními problémy, by tak mohli vykazovat odlišné vzorce sekrece kortizolu ve srovnání s mladšími jedinci. V této hypotéze je důležité předem zjistit, zda daný kůň netrpí Cushingovým syndromem, pro který je zvýšený kortizol hlavním ukazatelem. Cílem této části práce je zjistit, zda existují významné rozdíly v hladinách kortizolu mezi mladšími a staršími koňmi, a pokud ano, jaký vliv na tyto rozdíly má věk zvířete. Výzkum bude zahrnovat srovnání hladin kortizolu ve slinách u různých věkových skupin koní a zkoumání, zda jsou tyto hladiny ovlivněny nejen věkem, ale také přítomností chronických bolestivých stavů.

Výsledky tohoto výzkumu by mohly poskytnout nové poznatky o tom, jak efektivněji monitorovat zdravotní stav koní, a přispět k vývoji lepších metod pro hodnocení bolesti a zvládání stresu u těchto zvířat. Tato práce by mohla být přínosem nejen pro akademickou sféru, ale i pro praktickou veterinární medicínu a chov koní.

3 Literární rešerše

3.1 Bolest

Bolest je komplexní a subjektivní smyslový prožitek. Tento zážitek je nejen psychickým, ale i fyzickým stavem, který je ovlivněn jak tělesnými, tak emocionálními faktory (Gracely 1999). Bolest je výsledkem interakce mezi periferním a centrálním nervovým systémem, kdy specifické receptory, nazývané nociceptory, reagují na podněty jako teplo, chlad, chemikálie nebo tlak. Aktivace těchto receptorů spouští signály, které putují přes nervové dráhy až do mozku, kde jsou následně zpracovány jako bolestivý vjem. Tento proces je nezbytný pro ochranu organismu, neboť umožňuje včasnou reakci na škodlivé podněty (Guedes 2017).

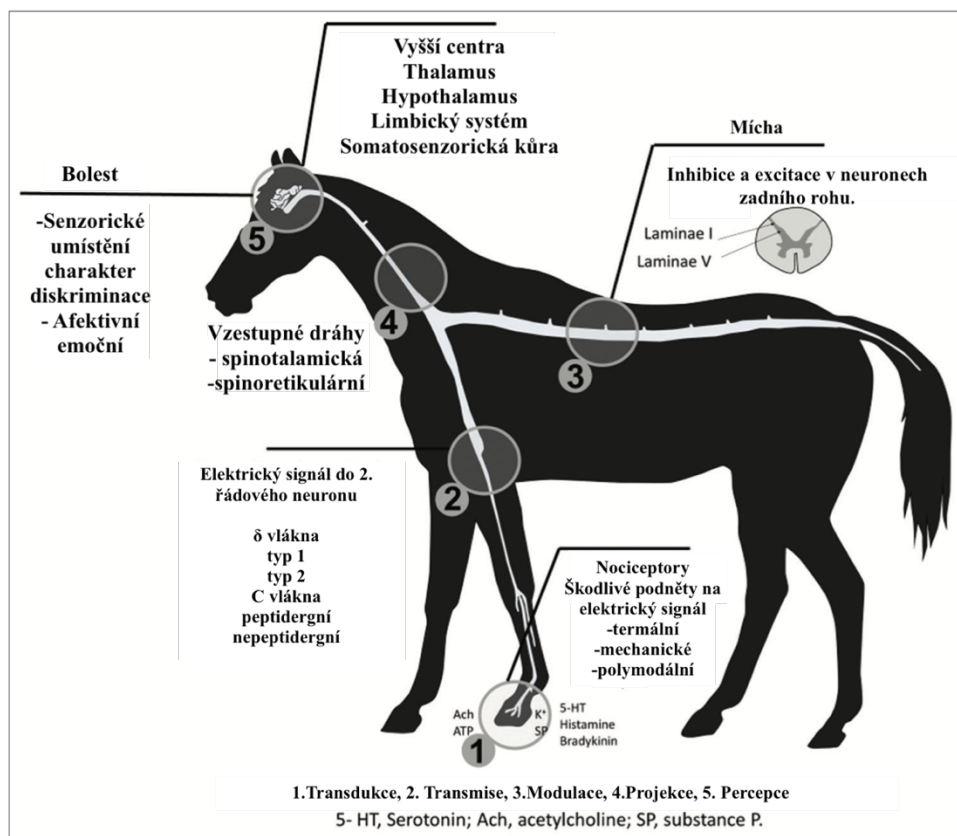
Bolest, i když často nepříjemná a obtížná, je neoddelitelnou součástí každodenního života. Její význam přesahuje pouhé vnímání diskomfortu; funguje jako zásadní mechanismus, který upozorňuje na potenciální nebezpečí a poškození těla. Ve své podstatě je bolest klíčovým adaptivním prvkem, který přispívá k přežití jednotlivce i celého druhu. Bez tohoto mechanismu by organismy mohly být náchylné k vážnému poškození nebo dokonce smrti, protože by nepoznaly hrozbu, na kterou je třeba reagovat (Guedes 2017; Walters 2023).

Bolest je fenoménem, který postihuje nejen lidi, ale i zvířata. Výzkum bolesti u zvířat je klíčový pro pochopení jejich chování, welfare a pro zlepšení podmínek v chovu a veterinární péči. Přestože zvířata nejsou schopná vyjádřit bolest slovy, jsou schopná ji prožívat a vykazují specifické reakce, které naznačují, že trpí (Sneddon et al. 2014).

Ve veterinární medicíně je rozpoznání a management bolesti u zvířat stále více uznáváno jako klíčová oblast, která má přímý vliv na jejich welfare (Molony & Kent 1997). Zvířata jsou navíc schopná prožívat jak akutní, tak chronickou bolest, což má zásadní vliv na jejich zdraví a kvalitu života (Sneddon et al. 2014).

3.1.1 Fyziologie bolesti

Bolest u koní začíná aktivací nociceptorů, což jsou specializované receptory citlivé na škodlivé podněty, jako jsou mechanické (např. tlak nebo poranění), chemické (např. zánětlivé mediátory) nebo termální (např. extrémní teploty) stimuly. Tyto nociceptory se nacházejí v periferním nervovém systému, především v kůži, svalech, kloubech a vnitřních orgánech. Existují tři typy nociceptorů: termální (reakce na teploty $>45^{\circ}\text{C}$ nebo $<5^{\circ}\text{C}$), mechanické (reakce na dotykové podněty) a polymodální (reakce na různé mechanické, termální a chemické podněty). Nociceptory jsou stimulovány látkami uvolněnými v poškozených tkáních, jako jsou draslíkové ionty, bradykinin, histamin, substance P, serotonin, acetylcholin a ATP. Jakmile jsou nociceptory aktivovány, vyšlou elektrické impulzy přes periferní nervy do míchy. Tento přenos vede k aktivaci vyšších center, jako je hypotalamus, thalamus, limbický systém a některé kortikální oblasti (Obrázek 1) (Hernández-Avalos et al. 2021).



Obrázek 1: Neurofyzilogická dráha nociceptivní bolesti, převzato a upraveno od Hernández-Avalos et al. (2021)

Nervy, které přenášejí bolest, se dělí na dva typy: **δ vlákna** rychle přenášejí ostrou, okamžitou bolest (např. píchnutí) a **C vlákna**, která pomaleji přenášejí tupou, pálivou nebo pulzující bolest, například po úrazu. V míše dochází k prvotnímu zpracování a přenosu signálu do vyšších mozgových center, jako je thalamus a kůra mozgová, kde dochází k vědomému vnímání bolesti. Nocicepce je tedy varovný systém těla, který chrání tkáň před poškozením. Bolest, kterou způsobuje, nám pomáhá reagovat na nebezpečné situace a vyhnout se dalšímu poškození (Ashley et al. 2005; Muir 2010).

Za normálních fyziologických podmínek mají periferní nociceptory vysoký práh aktivace, což znamená, že pouze škodlivé podněty jsou schopné vyvolat a přenášet nervové signály (akční potenciály). Při opakovaném poškození nebo zánětu však dochází ke změnám jak ve funkci, tak ve struktuře nervových drah, které ovlivňují jak periferní, tak centrální nervový systém. Tyto změny mohou nastat velmi rychle (Guedes 2017; Fischer et al. 2010).

Poškození tkání a zánět uvolňují chemické látky (např. prostaglandiny, histamin), které zvyšují citlivost nervových receptorů na bolest. To vede k senzibilizaci, kdy může organismus vnímat normálně neškodné podněty jako bolestivé (alodynie), škodlivé podněty mohou vyvolat silnější bolest (hyperalgie) a spontánní nervové výboje mohou způsobit spontánní bolest. To vše ukazuje na přítomnost patologického stavu bolesti (Guedes 2017; Muir 2010).

Zajímavé je, že bolest vycházející z vnitřních orgánů (viscerální bolest) je přenášena výhradně pomalými C vlákny. To vysvětluje, proč je taková bolest často doprovázena silnými fyzickými reakcemi, jako je zrychlený tep, pocení nebo zvýšený krevní tlak (Muir 2010).

Fyziologické reakce na bolest zahrnují zvýšení srdeční frekvence, zvýšenou dechovou frekvenci a zvýšení hladiny kortizolu v krvi, což jsou ukazatele stresu. Tyto reakce jsou často využívány jako nepřímé měřítko bolesti u koní, zvláště v případech, kdy behaviorální projevy nejsou dostatečně zjevné. Studie ukazují, že změny v autonomní nervové soustavě, jako je například zvýšená srdeční frekvence, mohou sloužit jako důležitý indikátor bolesti u koní (Taylor et al. 2002; Middleton 2003).

3.1.2 Akutní bolest

Akutní bolest u koní je významným klinickým problémem, který se může objevit v důsledku širokého spektra zdravotních stavů a událostí. Mezi nejčastější příčiny patří trauma, například zlomeniny, pohmožděny nebo natažení svalů a vazů, chirurgické zákroky, koliky, které jsou běžné u koní kvůli složitému trávení, a onemocnění pohybového aparátu, jako je artritida. Přestože akutní bolest je často signálem pro nutnost lékařského zásahu, koně mají přirozenou tendenci svou bolest maskovat. Toto maskování bolesti vyplývá z jejich přirozených instinktů přežití v divočině, kde by přílišná viditelnost slabosti mohla znamenat snadný cíl pro predátory. Tento fakt znesnadňuje diagnostiku bolesti pouze na základě vnějších projevů, což činí přesnou a včasnou detekci bolesti velmi obtížnou pro veterináře a chovatele. Proto je potřeba pečlivé monitorování chování zvířete, kde mohou i drobné změny signalizovat bolest (Gleerup & Lindegaard 2016).

Akutní bolest u koní vzniká stimulací nociceptorů, receptorů vnímání bolesti, v důsledku poškození tkání. Tyto receptory přenášejí informace do centrálního nervového systému, kde je bolest zpracována. Během akutní bolesti dochází k zánětlivým procesům, které vedou ke zvýšení citlivosti a intenzitě bolesti (Dalla Costa et al. 2014).

3.1.3 Chronická bolest

Chronická bolest je definována jako bolest, která přetrvává i po uplynutí běžné doby hojení a trvá nebo se vrací po dobu delší než 3–6 měsíců. Chronickou bolest, zejména pokud se vyvíjí postupně, je obtížné posoudit, přesto však může významně ovlivnit pohodu koní (van Loon & Macri 2021). Chronická bolest je považována za maladaptivní. Tento maladaptivní stav postupně způsobuje změny ve fyzických složkách periferního a centrálního nervového systému, včetně změn v membránových proteinech, neurotransmiterech, neuromodulátorech a synaptické konektivitě. U koní je toto rozpoznáno při muskuloskeletálních onemocněních (např. chronická laminitida, navikulární syndrom) (Daglish & Khursheed 2016).

3.2 Stres a bolest

Bolest a stres jsou klíčové oblasti v oblasti welfare zvířat, které významně ovlivňují jejich zdraví a chování. Bolest a stres jsou odlišné procesy, ale mají mnoho společného. Stres je reakce těla na výzvy nebo nebezpečné situace, které vyžadují změny v tělesné rovnováze, aby se obnovila stabilita. Bolest je vnímání škodlivých podnětů, které tělo vnímá jako nebezpečné, což

vyvolává nejen fyzické, ale i emocionální reakce (Abdallah & Geha 2017; Hannibal & Bishop 2014).

Tyto stavy nejsou izolované, ale vzájemně se ovlivňují a prolínají, což může mít dalekosáhlé důsledky pro fyzické a psychické zdraví zvířat. Porozumění této interakci je zásadní pro efektivní řízení a zlepšování životních podmínek zvířat (Abdallah & Geha 2017). Ukazuje se, že počáteční úroveň úzkosti může být silným ukazatelem bolesti, deprese a nižší kvality života. Důležité je, že bolest sama o sobě působí jako stresor, a maladaptivní (nepřizpůsobivá) reakce na akutní bolest může zhoršit samotnou bolest a spustit fyziologickou stresovou reakci, která zesiluje vnímání bolesti. Když je tato stresová reakce na bolest nebo jiné stresory příliš silná, dlouhodobá nebo opakovaná, může to vést k ještě větší bolesti a invaliditě (Hannibal & Bishop 2014).

Oba procesy, bolest i stres, mají ochrannou funkci. Pomáhají organismu vyhnout se zraněním nebo jiným hrozbám, jako je hlad. Ale pokud se stres nebo bolest stane chronickým, může to mít negativní dopad na tělo a mysl, což může vést k problémům, jako jsou dlouhodobé zdravotní potíže nebo zhoršení celkového zdraví (Abdallah & Geha 2017; Aboushaar & Serrano 2024).

3.3 Hypothalamo-hypofyzární osa (HPA)

Aktivace hypothalamo-hypofyzární (HPA) osy je komplexní biologický proces, který hraje klíčovou roli v adaptaci organismu na různé stresové podněty. Tato reakce se projevuje nejen v odpovědi na vnitřní fyziologické regulace, ale také na vlivy z vnějšího prostředí, jako jsou například psychický stres, změny teploty nebo infekce (Medill et al. 2023).

Význam hypothalamus-hypofyzární osy u savců je dobře známý. Tento vysoce regulovaný a propojený systém hraje klíčovou roli v udržování homeostázy, která zahrnuje kontrolu meziproduktového metabolismu, imunitních odpovědí, tělesné teploty, hladu, žízně, růstu, reprodukce a kardiovaskulárních funkcí, přičemž to je jen několik příkladů jeho široké funkce. Hypotalamus je zodpovědný za koordinaci řady hormonálních a behaviorálních cirkadiánních rytmů, stejně jako za složité neuroendokrinní vstupy a výstupy. Tento proces zahrnuje i různé chování, jako je úroveň vědomí, nálady, instinktivní chování (například mateřské instinkty) a chování spojené s příjmem potravy (Hurcombe 2011).

HPA osa je zásadní pro vyvolání biologických reakcí na vnitřní a vnější stresory. Aktivace této osy spolu se sympatickým nervovým systémem vede k sekreci kortikosteroidů a katecholaminů z nadledvin. Tyto biologicky aktivní molekuly ovlivňují klíčové procesy, jako je zvýšená bdělost, mobilizace a využívání glukózy, regulace cévního tonu, srdeční výdej a zajištění lepšího přísunu metabolických paliv (zejména glukózy a kyslíku), stejně jako odstraňování metabolických odpadních produktů (kyselina mléčná a oxid uhličitý) během fyziologického a patologického stresu. Primární funkcí této reakce je připravit tělo na zvýšené energetické nároky v situacích, které vyžadují okamžitou reakci, jako jsou únikové situace nebo fyzická námaha. Uvolnění glukózy z rezerv, zejména z jater, zajišťuje, že jsou dostupné dostatečné energetické zdroje pro svaly a další orgány, které potřebují zvýšenou energii. Současně však dochází k odklonu zdrojů z jiných důležitých fyziologických procesů, jako je

růst, reprodukce a imunita, což může mít dlouhodobější dopady na zdraví organismu (Medill et al. 2023; Hurcombe 2011).

Stejně jako u mnoha biologických systémů má tato reakce své limity a kapacitu, a pokud jsou tyto limity dosaženy nebo překročeny, dysfunkce HPA osy může vést k vážným problémům, které mohou zvýšit riziko morbidity a mortality. Dysfunkce HPA osy může ovlivnit mnoho fyziologických funkcí a v případě závažnosti může být i životu nebezpečná. Existují individuální a druhové rozdíly v aktivaci HPA osy, její stimulaci, hormonální sekreci a reakcích efektorových orgánů. Poruchy hypotalamo-hypofyzární osy byly podrobněji prozkoumány v lidské literatuře, přičemž dostupné informace o koních jsou omezené. U lidí je dysregulace HPA osy spojena například se sepsí nebo septickým šokem, traumatickým centrálním diabetem a syndromem nevhodné sekrece antidiuretického hormonu (Hurcombe 2011).

3.4 Kortizol

Kortizol, steroidní hormon, je nejdůležitější glukokortikoid savců známý jako biomarker stresu. Produkuje se v reakci na širokou škálu stresových faktorů (fyzických i psychických) (Mohammadi et al. 2024). Kortizol je produkováný kůrou nadledvin. Jeho syntéza je stimulována kortikotropin uvolňujícím hormonem (CRH) z hypothalamického jádra, adrenokortikotropinem (ACTH) z hypofýzy a sekrečními buňkami kůry nadledvin. Kortizol sám také reguluje svou produkci prostřednictvím zpětnovazebního mechanismu (Chmelíková et al. 2020; Turpeinen & Hämäläinen 2013). Hormon kortizol, podobně jako ostatní steroidní hormony, je rozpustný v tucích. Díky své lipofilní povaze nemohou být glukokortikoidy syntetizovány a skladovány v nadledvinách předem, ale musí být rychle syntetizovány (pomocí několika enzymatických reakcí) na podnět ACTH. Tento mechanismus zpětné vazby v rámci HPA osy je vyvážen negativní zpětnou vazbou, kdy glukokortikoidy působí na přední část hypofýzy a v rámci hypotalamu, čímž inhibují další uvolňování ACTH a kortikotropin uvolňujícího hormonu (Ramamoorthy & Cidlowski 2016; Ponec et al. 1986).

Biologicky aktivní glukokortikoidy se vyrábějí z cholesterolu prostřednictvím procesu zvaného steroidogeneze. ACTH stimuluje nadledviny, což aktivuje protein kinázu A a ovlivňuje proteiny, které jsou zapojeny do výroby glukokortikoidů. Tento proces zahrnuje fosforylaci lipázy, která zvyšuje hladinu cholesterolu v buňkách, a také podporuje transport cholesterolu do mitochondrií, kde se přemění na pregnenolon. Dále probíhají enzymatické reakce, které vedou k tvorbě glukokortikoidů, které jsou následně uvolněny do krevního oběhu (Ramamoorthy & Cidlowski 2016).

Kortizol při normálních hladinách podporuje funkci imunitního systému a pomáhá tlumit zánětlivé a alergické reakce. Pokud však jeho hladina stoupne na nadměrné hodnoty může naopak imunitní systém oslabovat. Hyperkortizolismus bývá spojován s nemocemi, které jsou charakteristické imunosupresí a sníženou schopností organismu bojovat proti infekcím. Zároveň ale může zvyšovat riziko vzniku chronických zánětlivých a autoimunitních onemocnění, stejně jako dalších chorob spojených se záněty (King & Hegadoren 2002). Nerovnováha hladin kortizolu může vést k onemocněním, jako je Cushingův syndrom, charakterizovaný nadměrnou produkcí kortizolu, nebo Addisonova choroba, která odráží nedostatek kortizolu (Balasamy et al. 2024; Reincke & Fleseriu 2023).

Kortizol aktivuje katabolické procesy spojené s mobilizací energetických zásob, stimuluje glukoneogenezi, ovlivňuje metabolismus bílkovin a tuků prostřednictvím proteolýzy a lipolýzy a potlačuje dočasně nežádoucí imunitní reakce. Mechanismus účinku kortizolu zahrnuje interakci se specifickými receptory v cytoplazmě a jádře buněk, což ovlivňuje transkripci genů a vyvolává různé fyziologické odpovědi (Balasamy et al. 2024).

Kortizol, který se v krvi vyskytuje ve své volné formě, se do slin a potu uvolňuje prostřednictvím jemného procesu ultrafiltrace. Úroveň sekrece kortizolu je u každého savce odlišná a má jedinečný cirkadiánní rytmus. Kortizol cílově ovlivňuje všechny buňky v těle, s výjimečným zaměřením na nervové buňky, kde hraje klíčovou roli v regulaci širokého spektra fyziologických a psychických funkcí (Chmelíková et al. 2020; Mohammadi et al. 2024).

3.4.1 Matrice pro odběr vzorků kortizolu

Hladiny kortizolu lze měřit v různých biologických vzorcích, včetně krve, moči, trusu, chlupů a slin (Balasamy et al. 2024; Gatti et al. 2009; Sikorska et al. 2023). Tyto matrice vykazují variace v několika charakteristikách. Nejvýznamnější rozdíl však spočívá v časovém rámci, který hormony z nich získané představují. Krev, sliny, moč a stolice primárně odrážejí nedávné koncentrace cirkulujících hormonů a jsou často ovlivňovány denními rytmy nebo jinými nepředvídatelnými událostmi. Naopak pomalu rostoucí matrice, jako jsou chlupy, nabízejí pohled na akumulaci glukokortikoidů během delších časových období (Sikorska et al. 2023).

Při měření hladin kortizolu z moči se zjišťují jeho metabolity, protože většina kortizolu se v játrech přeměňuje na tetrahydrokortison. Tento proces znamená, že v moči je přítomno pouze malé množství volného kortizolu, zatímco metabolity jsou dostupnější a snazší na měření. To znamená, že v moči je metabolit snazší zachytit a změřit než samotný volný kortizol. Nicméně množství kortizolu v moči neukazuje přímo aktivitu nadledvin, protože závisí na tom, jak rychle se kortizol v těle zpracovává a jak rychle se moč vylučuje. Kortizol má poměrně krátký poločas rozpadu, přibližně 30 minut. Moč odebraná hned po experimentu může obsahovat kortizol a jeho metabolity z několika hodin, protože se vylučují pomalu během plnění močového měchýře. Aby bylo možné posoudit celkovou aktivitu osy HPA, je potřeba sbírat moč celých 24 hodin, což je ale často obtížné zvládnout. Proto většina studií raději měří hladinu kortizolu v krvi nebo ve slinách, protože tyto metody jsou jednodušší a přesnější (King & Hegadoren 2002).

Jedním z možných způsobů získání kortizolu je také odběr vzorků ze srsti koní. Kortizol v srsti odráží dlouhodobé stresové reakce, protože vstupuje do srsti pasivní difuzí z krve, potu a mazu. Růst chlupů probíhá v cyklech, které se skládají ze tří fází: aktivního růstu, přechodové fáze a klidové fáze. Kortizol může do chlupu difundovat pouze během fáze aktivního růstu. V tomto případě difúze probíhá ve vlasovém folikulu, který se nachází několik milimetrů pod povrchem kůže. Tímto způsobem vzniká časové zpoždění mezi difúzí kortizolu do chlupu a okamžikem, kdy tento úsek chlupu dosáhne povrchu kůže. Tento proces umožňuje posoudit aktivitu osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny během delšího časového období, přičemž se hodnotí rychlost růstu a délka srsti. Změny v koncentracích kortizolu v těle lze detekovat segmentováním delší srsti, jako je hříva nebo ocas, což umožňuje monitorování chronických změn ve stresových odpovědích koně (Heimbürge et al. 2019; Lelláková et al. 2022).

Pro odběr kortizolu se velmi často využívá krev. Hladina kortizolu v krvi poskytuje důležité informace o akutní stresové reakci koně a může být považována za okamžitý ukazatel jeho aktuálního stavu. Zvýšená hladina kortizolu v krvi obvykle signalizuje nedávný stres nebo aktivaci HPA osy u koní. Z tohoto důvodu se měření koncentrace kortizolu v krvi často využívá v klinických situacích pro posouzení akutních stresových reakcí, hodnocení pohody koní, diagnostiku onemocnění souvisejících s kortizolem a k určení účinnosti různých léčebných metod. Koncentrace kortizolu v krvi se obvykle měří v plazmě nebo séru. Z tohoto důvodu je vzorek krve nejčastěji získáván venepunkcí. Tato metoda je však invazivní a potenciálně stresující pro koně, zejména pokud jsou nervózní nebo neochotní během odběru. Manipulace se zvířaty potřebná k odběru krve může způsobit dodatečný stres, který může mít vliv na konečné výsledky (Sikorska et al. 2023).

Nejefektivnějším způsobem určování koncentrace kortizolu u zvířat se zdá být využití jejich slin (Strzelec et al. 2011).

Kortizol ve slinách je ultrafiltrát plazmatického kortizolu a odráží hladiny biologicky aktivního, na bílkoviny nevázaného kortizolu v séru. Tento způsob měření přináší výhodu snadného a neinvazivního odběru vzorku, což činí testování kortizolu ve slinách pohodlným a přístupným nástrojem pro hodnocení hormonálních hladin (Turpeinen & Hämäläinen 2013). To je obzvláště výhodné v případech, kdy by odběr krve mohl být složitý nebo nepraktický. Kromě toho, na rozdíl od odběru krve, sběr slin nevyžaduje přítomnost vysoce kvalifikovaných a certifikovaných pracovníků. Z důvodu etických obav se dřívější studie zaměřovaly především na hodnocení koncentrace kortizolu ve slinách, protože metody, které zahrnují odběr krve, mohou u zvířat vyvolávat strach a stres. Díky tomu se praktická a neinvazivní technika měření koncentrace kortizolu ve slinách čím dál častěji používá k minimalizaci stresu a zajištění pohody koní a dalších zvířat (Sikorska et al. 2023).

Kortizol se dostává do slin pasivní difúzí přes slinné žlázy, což je přímo úměrné jeho koncentraci v krvi. Proces trvá přibližně 15-30 minut od začátku stresové reakce, než je dosaženo maximální hladiny kortizolu (Peeters et al. 2011; Shirtcliff et al. 2015)

Navíc, vyrovnaní koncentrace kortizolu ve slinách probíhá rychle: celý proces trvá méně než 5 minut. Z těchto důvodů je určování hladiny kortizolu pomocí slin výhodnější metodou než použití krevního séra (Strzelec et al. 2011).

3.5 Faktory ovlivňující hladiny kortizolu

Koncentrace kortizolu u koní může být ovlivněna řadou faktorů. Jedná se nejen o stres nebo nemoc, ale také o fyzickou aktivitu, denní dobu či dokonce roční období (Sikorska et al. 2023).

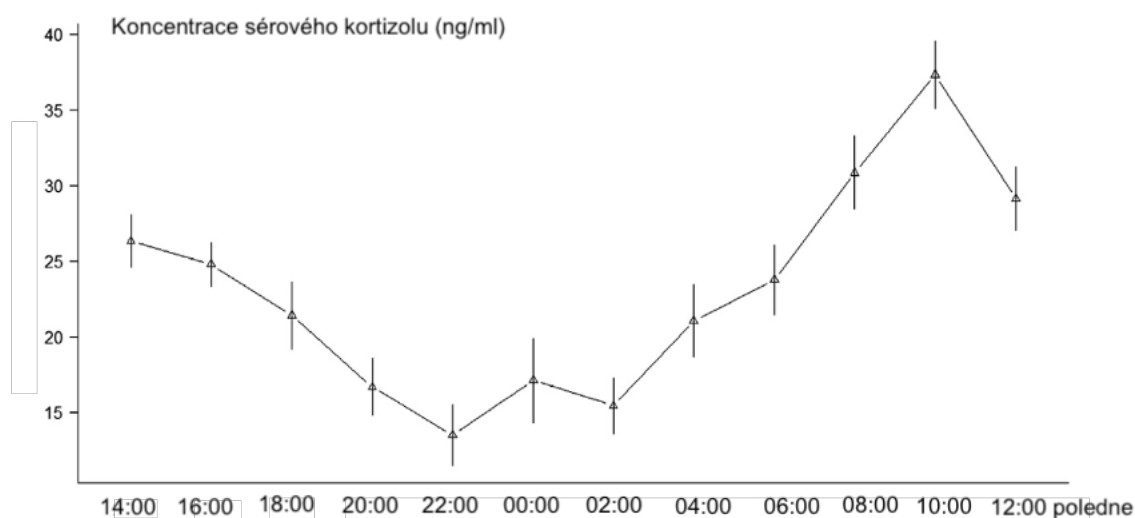
3.5.1 Cirkadiánní rytmus kortizolu

U koní, podobně jako u jiných zvířat a lidí, se intenzita mnoha biologických procesů během dne mění. Některé hormony v krvi a slinách mohou vykazovat cirkadiánní (denní) vzorec (Bohák et al. 2013).

Kortizol má charakteristický cirkadiánní rytmus, který je ovlivněn spánkem. Za normálních podmínek jsou hladiny kortizolu nižší na začátku spánku a postupně se zvyšují ke

konci spánkového cyklu, přičemž svého vrcholu dosahují těsně před probuzením (Mohd Azmi et al. 2021).

Studie autorů Bohák et al. z roku 2013 se zabývala přítomností cirkadiánního rytmu kortizolu jak v séru, tak ve slinách koní. Do studie bylo zařazeno 20 zdravých koní ve věku 3-13 let. Tento výzkum probíhal během léta, konkrétně v srpnu a vzorky byly odebírány každé dvě hodiny po dobu 24 hodin. Tato studie potvrdila významnou přítomnost cirkadiánního rytmu jak v sérovém, tak ve slinném kortizolu. V obou případech vrchol hladiny kortizolu nastal v dopoledních hodinách. U sérového kortizolu se vrchol objevil v 10 hodin a 50 minut a u slinného kortizolu v 10 hodin (Obrázek 2).



Obrázek 2: Převzato a upraveno od Bohák et al. z roku 2013, 24hodinový profil průměrné $\pm$ SEM koncentrace sérového kortizolu odebíraného od 20 koní.

Studie autorů Contreras-Aguilar et al. z roku 2020 se zaměřila na denní a sezónní změny hladin kortizolu ve slinách koní. Studie byla prováděna na 5 zdravých koní, kterým se odebíraly vzorky slin. Vzorky slin byly odebírány každé dvě hodiny od 6:30 do 20:30 během dvou dnů během dvou různých sezón (v zimě a na jaře). Výsledky ukázaly, že kortizol vykazuje jasný denní rytmus. Nejvyšší hodnoty kortizolu byly zaznamenány ráno, přibližně v 6:10 během jarního období. Mesor (střední hodnota) kortizolu byl 10,21 nmol/l s amplitudou 2,48 nmol/l. Během dne hladiny kortizolu postupně klesaly. Tento rytmus odpovídá dřívějším studiím, které ukázaly, že u koní dochází k vrcholům hladin kortizolu ráno mezi 6:00 a 10:00 a poté k jejich poklesu během dne.

Studie autorů Aurich et al. z roku 2015 analyzovala koncentraci kortizolu ve slinách. Výzkum probíhal tak, že vzorky slin byly odebírány jednou měsíčně během jednoho dne v různých časech (6:00, 12:00 a 18:00). Pro analýzu kortizolu byla použita metoda na bázi ELISA. Vzorky byly zmrazeny a následně laboratorně analyzovány. V případě plemenných hřebců a klisen byly navíc odebírány krevní vzorky pro analýzu testosteronu a progesteronu. Denní rytmus kortizolu ve slinách ukázal nejvyšší koncentrace ráno, například v 6:00, s následným poklesem během dne.

Tento rytmus je úzce propojen s cyklem spánku a bdění, což naznačuje, že kortizol hraje důležitou roli při probouzení. Jinými slovy, kortizol je klíčovým prvkem cirkadiánního systému, který ovlivňuje téměř všechny tkáně a orgány v těle a reguluje některé biologické cyklické funkce. Výrazné změny v hladinách kortizolu během dne a noci mohou objasnit jeho roli ve zdraví a při nemoci (Mohd Azmi et al. 2021).

Tento rytmus může být však citlivý na i drobné rušivé vlivy, jako je přesun koně z jeho obvyklého prostředí. Taková změna může vést k nepřírozenému zvýšení hladin kortizolu během běžného minima a tím k narušení přirozeného denního rytmu. Ačkoliv ale ustájení a separace koní od jejich vrstevníků mohou akutně podnítit zvýšení uvolňování kortizolu do krve a slin, koně si na tyto nové podmínky rychle adaptují. Tento proces přizpůsobení vede k tomu, že takové vlivy nemají dlouhodobý dopad, ale pouze krátkodobý dopad na denní rytmus kortizolu (Aurich et al. 2015; Irvine & Alexander 1994).

Tato pozorování ukazují, jak složité je přesně určit stav kortizolu u koní, neboť měření jsou silně ovlivněna nejen denní dobou a přítomností ultradiánních fluktuací, ale také tím, jak klidný a uvolněný je kůň v daném odběrovém prostředí (Irvine & Alexander 1994).

3.5.2 Cirkanuální rytmus kortizolu

Dle studie autorů Cordero et al. z roku 2012 může rytmus kortizolu podléhat také sezónním variacím. Kortizol, který je klíčovým hráčem v metabolismu energie a v odpovědi na stres, může vykazovat sezónní výkyvy u koní, které odrážejí očekávané změny v dostupnosti potravy a energetických nárocích během podzimních a zimních měsíců. Koncentrace kortizolu se také může měnit v reakci na stresující environmentální podmínky, jako jsou nadměrné teplo, chlad nebo vlhké podmínky.

Studie „Effect of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses“ sledovala změny koncentrací kortizolu u 94 koní stejného plemene po dobu 6 měsíců, od prosince do května. Cílem studie bylo zjistit, jak různé faktory, jako je roční období, věk, pohlaví a způsob ustájení, ovlivňují koncentrace kortizolu v slinách koní. Jednou z hlavních hypotéz této studie bylo, že koncentrace kortizolu sledují nejen cirkadiánní rytmus, ale také cirkanuální rytmus (roční cyklus). Porovnání mezi jednotlivými měsíci ukázalo významné rozdíly v koncentracích kortizolu v průběhu času. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány v měsíci prosinci, což naznačuje, že roční období může mít významný vliv na hladiny tohoto stresového hormonu u koní (Aurich et al. 2015).

Studie autorů Banse et al. z roku 2020 se zabývala analýzou koncentrací kortizolu v srsti u koní s Cushingovou chorobou v různých obdobích roku, s cílem zjistit, zda se koncentrace kortizolu liší mezi koňmi s Cushingovou chorobou a kontrolními koňmi, a zda jsou tyto rozdíly sezónní. Výsledky ukázaly, že rozdíly v koncentraci kortizolu mezi koňmi s Cushingovou chorobou a kontrolními koňmi byly nejvýraznější na konci podzimu (říjen a listopad), kdy koně s Cushingovou chorobou vykazovali vyšší koncentrace kortizolu. Naopak v květnu a září nebyly žádné rozdíly. Studie také zjistila, že koncentrace kortizolu v srsti byly ovlivněny délkou srsti, přičemž koně s Cushingovou chorobou měli v listopadu vyšší koncentrace po normalizaci na délku srsti. Celkově studie ukazuje, že akumulace kortizolu v srsti u koní s Cushingovou chorobou má sezónní variabilitu, která souvisí s cyklickými změnami v produkci ACTH a s růstem srsti. Tento výsledek naznačuje, že některé chronické choroby, jako je Cushingova

choroba, mohou narušit přirozený cirkadiální rytmus kortizolu a změnit sezónní vzorce jeho koncentrací.

3.5.3 Tělesná kondice

Studie „Effect of Age, Season, Body Condition, and Endocrine Status on Serum Free Cortisol Fraction and insulin Concentration in Horses“ se zaměřila na změny koncentrací kortizolu u koní a jejich souvislost s různými zdravotními stavy. Studie využívala sérové vzorky, odebírané sezónně, od zdravých zvířat a archivované sérové vzorky od koní s Cushingovým syndromem a Koňským metabolickým syndromem. Bylo zjištěno, že zvýšená frakce volného kortizolu je spojena s obezitou u zdravých koní, což naznačuje, že chronické zvýšení hladin kortizolu může hrát roli při vzniku obezity. Alternativně může být obezita samotná primárním stimulem pro globální nadměrnou aktivaci osy HPA, což vede ke zvýšení koncentrací kortizolu v krvi, nebo může zvýšit dostupnost či aktivitu kortizolu na úrovni cílových tkání (Hart et al. 2016).

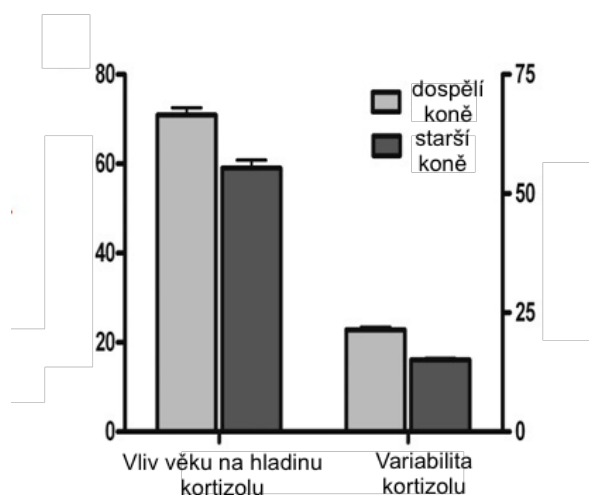
3.5.4 Věk

Dle Stamou et al. 2023 je stárnutí spojeno s různými změnami v endokrinním systému, včetně těch, které postihují nadledviny. S věkem dochází k alteracím osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny (HPA), což vede k nárůstu hladin kortizolu, narušení jeho negativní zpětné vazby a změně denního rytmu jeho vylučování.

Studie autorů Mongillo et al z roku 2014 byla provedena na 311 psech a jejím cílem bylo zjistit, zda věk ovlivňuje koncentrace plazmatického kortizolu. Věk psů se v této studii pohyboval v rozmezí od dvou měsíců do 16 let. Během studie nebyly zaznamenány žádné významné variace v plazmatických koncentracích kortizolu mezi pre-a peri-pubertálním obdobím, ani během dospělosti. I když byly u některých psů přítomny určité rozdíly mezi jednotlivými věkovými skupinami, výsledky naznačují, že celkový vliv věku na koncentrace kortizolu v plazmě není výrazný.

Studie autorů Aurich et al. z roku 2015 se zabývala zkoumáním vlivu věku na hladiny kortizolu u koní. Do výzkumu bylo zařazeno celkem 94 teplokrevných koní z Braniborského státního hřebčína v Neustadtu. Kortizol byl měřen ze vzorků slin, které byly odebírány v období od prosince do května. Koně byli ustájeni v různých podmínkách, buď ve skupinových stájích, nebo individuálních boxech, a jejich krmení i režim pohybu byly detailně sledovány. Výsledky studie ukázaly, že pohlaví ani věk nemají zjevný vliv na bazální koncentrace kortizolu ve slinách.

Také studie autorů Cordero et al. z roku 2012 se zabývala korelací mezi věkem a hladinou kortizolu. Studie zjistila, že věk ovlivňuje variabilitu kortizolu, přičemž starší koně mají nižší míru variability (Obrázek 3).



Obrázek 3: Převzato a upraveno od Cordero et al. z roku 2012, Vliv věku na hladinu kortizolu a variační koeficient denních koncentrací plazmatického kortizolu u zdravých koní.

3.6 Metody měření bolesti u koní

Léčba bolesti a utrpení zvířat je základní složkou poskytování kvalitní veterinární péče (Mama & Hendrickson 2002). Objektivní posouzení bolesti je klíčové pro zlepšení pohody a kvality života koní. Osvobození od bolesti a nemocí patří mezi základních „pět svobod“ potřebných k zajištění dobrých životních podmínek zvířat (van Loon & Macri 2021). Abychom mohli efektivně zmírnit bolest, je klíčové ji nejprve správně rozpoznat, což může představovat značnou výzvu. U lidí je hodnocení bolesti usnadněno tím, že pacienti mají schopnost verbálně vyjádřit své pocity. Mohou popsat kvalitu bolesti, jako je například její pálivost nebo tupost, určit její umístění v těle a také sdělit, jak silná bolest je. Tato schopnost komunikace umožňuje lékařům a odborníkům na zdravotní péči lépe posoudit stav pacienta a zvolit vhodné metody léčby. Na druhou stranu, když přijde na hodnocení bolesti u zvířat, situace je mnohem komplikovanější. Zvířata nemají možnost verbálně vyjádřit své pocity, což komplikuje proces diagnostiky a léčby. U zvířat, jako jsou koně nebo psi, musíme sledovat změny v jejich chování, pohybu nebo chuti k jídlu. Tato situace zdůrazňuje důležitost schopnosti pozorovatele vnímat a interpretovat jemné signály, které mohou naznačovat bolest, a hledat alternativní metody hodnocení bolesti u zvířat (Gleerup & Lindegaard 2016).

3.6.1 Fyziologické měření

Když jsou koně vystaveni bolestivým nebo stresujícím situacím, jejich tělo spustí přirozenou fyziologickou reakci na tyto podněty. Tuto reakci lze posoudit měřením změn v životních parametrech, jako je srdeční a dýchací frekvence. Fyziologické odpovědi zahrnují aktivaci dvou hlavních os: hypothalamo-hypofyzárně-nadledvinové osy (HPA) a sympaticko-adrenomedulární osy (SAM). Sympatická osa zajišťuje okamžité reakce, kdy dochází k uvolnění katecholaminů (adrenalinu a noradrenalinu), které stimulují glykogenolýzu. Adrenalin

zvyšuje srdeční frekvenci a dilataci cév pro lepší prokrvení důležitých orgánů, zatímco noradrenalin způsobuje zúžení cév v méně důležitých orgánech, což vede k tachykardii, hypertenzi a snížení aktivity trávicího systému (Hernández-Avalos et al. 2021).

3.6.2 Chování odrážející bolest

U koně trpícího bolestí lze pozorovat určité obecné změny v chování, které se nezdají být závislé na typu bolesti, kterou prožívá. Mezi tyto obecné projevy bolesti patří výrazný neklid, podráždění a úzkost, které jsou často doprovázeny změnami v postoji a pohybových aktivitách, jako je strnulý postoj a neochota k pohybu. Koně trpící bolestí často stojí se sklopenou hlavou a jejich tělesná řeč signalizuje výrazné nepohodlí. Mezi další indikátory patří změny v obličejovém výrazu, kdy kůň mívá upřený pohled, rozšířené nozdry a sevřenou čelist, což jsou příznaky napětí a stresu. Také může dojít k výrazné změně v interakci se svým okolím. Například kůň, který je za normálních okolností klidný, může začít projevovat agresivitu vůči vlastnímu hříběti nebo dokonce vůči ošetřovateli, jiným koním, předmětům, nebo dokonce vůči sobě samému. Koně jsou zvířata s instinktem útěku a boje, která preferují únik z ohrožujících situací, včetně bolesti. Pokud je jejich přirozené chování útěku omezeno, mohou se stát agresivní vůči majitelům nebo pečovatelům. Tato změna chování může být přímým důsledkem bolesti, kterou kůň prožívá (Andersen et al. 2018; Gleerup & Lindegaard 2016; Ashley et al. 2005).

Kromě obecných nespecifických projevů bolesti mohou určité postoje nebo události naznačovat bolest v konkrétních částech těla. Pro přesnější určení zdroje bolesti je potřeba sledovat chování, která jsou specifická pro daný problém. Například pro sledování behaviorálních projevů bolesti břicha u koní se využívají projevy jako sledování boku, kopání do břicha protahování či flémování (Pritchett et al. 2003).

Aby bylo chování koně považováno za objektivní, musí se projevovat delší dobu nebo častěji v souvislosti s bolestí a být snadno rozpoznatelné. Hodnocení bolesti u zvířat závisí na interpretaci chování, která může být ovlivněna různými faktory, což ztěžuje určení, co je způsobeno pouze bolestí. Koně podstupující diagnostiku a léčbu mohou vykazovat změny chování v důsledku stresu z nezvyklého prostředí nebo izolace od ostatních koní. Důležité je také znát normální chování koní pro správnou interpretaci bolesti. Koně obvykle reagují na nepříjemné podněty útekem, což ztěžuje rozlišení mezi bolestí a jinými nepříjemnými pocity. Kůň může například silně reagovat na relativně neškodný podnět, což opět komplikuje identifikaci bolesti (Taylor et al. 2002).

3.6.3 Horse Grimace Scale

Obličejové výrazy jsou často studovány a využívány k posuzování bolesti a dalších emocionálních stavů u lidí, kteří vykazují typický „bolestivý výraz“ (Nannarone et al. 2024). Podobně jako lidé mají i koně schopnost vytvářet širokou škálu obličejových výrazů. Tyto výrazy slouží jako důležitá forma komunikace, prostřednictvím které dokážou předávat značné množství informací ostatním členům stáda (Paladino et al. 2023). Vznikají díky pohybům obličejového svalstva jako rychlé a spontánní reakce na bolest. Z tohoto důvodu by mohly sloužit jako užitečný doplňkový nástroj pro hodnocení pohody zvířat (Nannarone et al. 2024).

Horse Grimace Scale (HGS) (Obrázek 4) je systém hodnocení bolesti na základě výrazu obličeje koně, který zahrnuje šest samostatně hodnocených obličejových projevů: pevně stažené uši dozadu, sevřené oči, napětí v oblasti nad očima, výrazně napnuté žvýkácké svaly, napjatá huba s výraznou bradou a napjaté nozdry se zploštěním profilu. Každá z šesti variant obličejového výrazu je hodnocena kvalitativně podle stupně přítomnosti: nepřítomná (0), mírně přítomná (1) nebo výrazně přítomná (2). Skóre 0 znamená, že pozorovatel byl přesvědčen o nepřítomnosti dané akční jednotky. Skóre 1 ukazuje vysokou jistotu v její mírnou přítomnost. Skóre 2 pak značí vysokou jistotu v její výraznou přítomnost. (Dalla Costa et al. 2017; Werner et al. 2024). Použití HGS umožňuje klinickou identifikaci změn ve výrazech obličeje zvířat způsobených bolestí. Každý obličejový projev je doprovázen popisem a anatomickými detaily, které pomáhají hodnotiteli. HGS se osvědčila jako účinný nástroj při hodnocení bolesti po chirurgických zákrocích, jako je kastrace, nebo při akutních stavech, jako jsou koliky. Tato metoda je rychlá a neinvazivní, což usnadňuje její použití v klinické praxi (Dalla Costa et al. 2014; Werner et al. 2024). Nicméně morfologické popisy některých hodnocených obličejových projevů v HGS nejsou dostatečně podrobné, což může bránit přesné interpretaci (Werner et al. 2024).

Tato stupnice hodnocení bolesti se používá především pro hodnocení akutní bolesti koní. Nicméně studie autorů van Loop & Macri z roku 2021 se zabývala použitelností této stupnice při hodnocení chronické bolesti. Studie využívala Horse Chronic Pain Scale (HCPS). HCPS je stupnice složená ze dvou částí: složené stupnice chronické bolesti u koní (Horse Chronic Pain Composite Pain Scale, HCP CPS) s behaviorálními parametry a EQUUS-FAP (Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain). Stupnice byla testována u 26 koní s různými typy chronické bolesti (osteoartritida, chronická laminitida, chronické problémy zad a krku či chronické dentální onemocnění) a 27 zdravých kontrolních koní. Autoři dospěli k závěru, že HCPS je spolehlivá stupnice bolesti, která je vhodná pro hodnocení chronické bolesti u koní. Avšak ověření těchto výsledků na širším vzorku koní a k posouzení její použitelnosti u specifických typů chronických bolestivých stavů jsou však zapotřebí další studie.



Obrázek 4: Horse grimace Pain Scale, převzato a upraveno od Dalla Costa et al. (2014)

3.6.4 Systém kódování mimických reakcí

Systém kódování mimických reakcí (Facial Action Coding Systém-FACS) poskytuje metodu pro identifikaci a zaznamenávání mimických výrazů na základě pohybu podkladových obličejových svalů. FACS je založen na anatomických základech a zaznamenává všechny možné pohyby obličeje, místo toho, aby se zaměřoval pouze na specifické konfigurace pohybů spojené s konkrétními situacemi. Díky tomu je FACS využitelný pro široké spektrum

výzkumných otázek, protože poskytuje univerzální nástroj pro analýzu mimických projevů v různých kontextech. FACS podrobně popisuje veškeré pozorovatelné mimické chování prostřednictvím svalových pohybů, které jej tvoří, pomocí prvků nazývaných akční jednotky (AU – Action Units). Každá AU je označena číselným kódem, který odpovídá pohybům určité skupiny obličejových svalů. Kódování v systému FACS se zakládá na přímém pozorování pohybů obličejových svalů a změn obličejové morfologie (například poloha obočí, velikost či tvar úst, rtů nebo očních víček, výskyt rýh, záhybů či boulí kůže). Interpretace emočního významu pozorovaných AU se provádí až po jejich kódování (Andersen et al 2018; Wathan et al. 2015).

3.6.5 Kompozitní škála měření bolesti

Kompozitní škály měření bolesti (CMP-Composite Measure Pain Scale) představují pokročilé metody hodnocení bolesti u koní, které spojují behaviorální a fyziologické indikátory bolesti. Tyto škály byly využity především při hodnocení bolestivých stavů, jako jsou abdominální či ortopedické bolesti. Ukázaly se jako spolehlivý nástroj, zejména v experimentálních modelech bolesti, kde poskytly konzistentní výsledky (Andersen et al. 2018).

Aby byla škála bolesti efektivním nástrojem pro hodnocení bolesti, musí být nejen snadno použitelná, ale také musí zahrnovat parametry, které umožňují opakovatelnou interpretaci výsledků mezi různými hodnotiteli a poskytují konzistentní výsledky. Důležité je, aby parametry jasně rozlišovaly přítomnost či nepřítomnost bolesti a umožnily co nejpresnější určení jejího stupně, i když není možné komunikovat verbálně se zvířetem. Taková škála by měla být schopná hodnotit nejen intenzitu bolesti, ale také její typ a vliv na chování či fyziologické reakce pacienta (Bussi  res et al. 2008).

3.7 Rychlotest na kortizol

Kortizol slouží jako biomarker stresu, přičemž jeho hladina se často m  r   ve slinách, protože tato metoda je neinvazivní. Hlavn   překážkou včasného stanoven   jeho koncentrace je   asov   prodleva při analýze vzorků pomocí imunoanalýzy. Výsledky jsou dostupn   a   s odstupem dn   či t  dn  , tedy dlouho po  , co osoba či zv  re j  z n  i ve stavu, ve kter  m vzorek poskytl (Shirtcliff et al. 2015). Detekce kortizolu jako biomarkeru stresu z  iskala v posledních letech velkou pozornost. Přestože LFT (laterární pr  tokov   testy) nabízejí nízkou invazivnost, jednoduchost pou  it   a n  zk   v  robn   náklady, v  t  šina zařizení vy  žaduje další testování a validaci u pacientů (Khelifa et al. 2022).

Studie autorů Shirtcliff et al. z roku 2015 se zaměřila na vývoj inovativn   technologie pro měření hladiny kortizolu ve slinách pomocí laterálních průtokových testů (LFT). Tato metoda umo   ňuje z  iskat výsledky j  z během 20 minut od odběru vzorku. Testovací systém se skládá ze zařizení na sběr slin a přenosného analyzátoru, kter   výsledky zpracovává a p  en    . Technologie je snadno p  enosn   a vhodn   pro pou  it   v terénu, laborato  r  ch i dalších p  ost  ed  ch. Výsledky z  isk  n   pomocí LFT korelují s tradičními imunotesty. Mezi hlavn   výhody LFT pat  r   rychlost analýzy, odstranění pot  řeby drahého laboratorního vybaven   a mo  znost provádět měření v re  ln  m čase. Tato technologie tak představuje efektivn   řešení pro rychl   a spolehliv   měření kortizolu.

Studie autorů Apilux et al. z roku 2018 se zabývala vývojem jednoduchého, citlivého a rychlého testu na měření hladiny kortizolu ve slinách. Autoři použili metodu laterálního toku (lateral flow immunoassay) v kombinaci s technologií zlatých nanočástic a stříbrného zesílení signálu, což umožňuje snadnou vizualizaci výsledků pouhým okem. Tento test funguje na principu kompetitivní reakce, kde kortizol obsažený ve vzorku soutěží s kortizol-BSA (bovinní sérový albumin) sloučeninou přichyceným v testovací zóně. Zlaté nanočástice slouží jako značkovací materiál a stříbrné zesílení zvyšuje citlivost testu. Detekční limit byl stanoven na 0,5 ng/mL, což je 3,6krát citlivější než metoda bez stříbrného zesílení (1,8 ng/mL). Test pokrývá klinicky relevantní rozsah hladin kortizolu ve slinách (0,5–150 ng/mL) a výsledky se ukázaly jako srovnatelné s komerčními ELISA kity. Test byl úspěšně aplikován na skutečné vzorky slin a prokázal potenciál pro rychlé, neinvazivní a snadné screeningové vyšetření kortizolu.

Studie „Aptamer-Based Lateral Flow Biosensor for Rapid Detection of Salivary Cortisol“ autorů Dalirirad et al. z roku 2020 se zabývala na vývojem jednorázového biosenzoru pro měření hladiny kortizolu ve slinách. Biosenzor využívá laterální průtokový test (LFT) s aptamery – krátkými sekvencemi DNA nebo RNA, které se vážou na konkrétní molekuly. Když je kortizol přítomen, aptamerový komplex se rozpadne, což způsobí barevnou změnu na testovací linii. Intenzita barvy odpovídá množství kortizolu ve vzorku. Test dokáže detekovat kortizol už od 0,37 ng/mL a pracuje v rozmezí 0,5 až 15 ng/mL, což zahrnuje běžné hladiny tohoto hormonu ve slinách. Přesnost testu byla potvrzena standardní metodou ELISA a vykazovala spolehlivé výsledky. Biosenzor se ukázal jako velmi selektivní – rozlišuje kortizol od jiných biomarkerů. Tento biosenzor by mohl být využit pro rychlé a přesné měření kortizolu i dalších biomarkerů v různých tělních tekutinách.

3.8 Kortizol jako indikátor bolesti

Studie autorů Pritchett et al. z roku 2003 se zaměřila na koncentrace kortizolu v plazmě u koní v reakci na chirurgický stres. Studie zahrnovala tři skupiny koní. Skupina 1 (Kontrolní) sestávala z 10 zdravých koní, s průměrným věkem 10,2 let a zastoupením plemen jako plnokrevník a arabský kůň. Skupina 2 (Anestezie) zahrnovala 10 koní ve vlastnictví klientů, kteří podstoupili bezbolestný zákrok MRI. Skupina 3 (Chirurgie) se skládala ze 7 koní s akutními gastrointestinálními problémy vyžadujícími chirurgický zásah, průměrný věk této skupiny byl 13,4 let. Tito koně dostávali specifickou léčbu. Výsledky ukázaly, že koně po chirurgickém zákroku vykazovali vyšší hladinu kortizolu než koně v kontrolní a anestezizované skupině. Tento rozdíl v hladinách kortizolu byl patrný ve všech časových bodech měření. Nicméně, u skupiny koní po operaci nebylo možné provést analýzu ve stejných časových bodech jako u ostatních skupin, což mohlo mít vliv na srovnatelnost výsledků. Dále se ukázalo, že zvýšené koncentrace kortizolu mohou souviset nejen se samotným chirurgickým zásahem, ale také s rozsahem chirurgického poranění nebo základním onemocněním koně.

Studie „The Association between Heart Rate, Heart Rate Variability, Endocrine and behavioural Pain Measures in Horses Suffering from Laminitis“ z roku 2004 probíhala u 19 koní, 9 hřebců a 10 klisen ve věku od 3 do 28 let, kteří trpěli laminitidou. Tato studie nepozorovala žádné změny hladin hormonů, a to ani u kortizolu, ani u adrenalinu či

noradrenalinu. Čas odběru krve byl však více než 16 hodin po začátku kulhání, přičemž všichni koně nadále pociťovali různou míru bolesti při zatěžování. Předpokládá se, že délka onemocnění hraje tedy důležitou roli v regulaci hypotalamo-hypofyzárně-adrenokortikální osy. U koní s dlouhodobým onemocněním může docházet k potlačení uvolňování kortizolu. Nicméně, ve srovnání se zdravými jedinci byly absolutní koncentrace naměřené v této studii zvýšené, což je třeba posuzovat s ohledem na denní kolísání. Je známo, že koně ve svém přirozeném prostředí vykazují denní kolísání kortizolu, s nižšími koncentracemi v odpoledních hodinách. Zůstává však nejasné, zda mírně zvýšené koncentrace kortizolu v této studii byly způsobeny výhradně bolestí, protože jednodenní aklimatizace na nové prostředí nemusí být dostatečně dlouhá na to, aby vyloučila vliv na zrušení denního kolísání kortizolu. Tato studie naznačuje, že kortizol není spolehlivým ukazatelem bolesti v klinických studiích na koních (Rietmann et al. 2004).

Studie autorů Lawson et al. z roku 2020 se zaměřila na asociaci mezi kompozitní škálou bolesti u koní (CPS) a koncentracemi sérového kortizolu a plazmatického adrenokortikotropního hormonu u koní s kolikou. Studie probíhala u 49 koní s kolikou. Tato studie zaznamenala pozitivní asociaci mezi CPS a hladinou kortizolu. Nejvyšší hladiny kortizolu se projeví v nejbolestivějších okamžicích, kdy se koncentrace zvýšila dvakrát více než při průměrném měření. Toto zjištění naznačuje, že stres a bolest jsou vzájemně propojené. Důležitým zjištěním je, že vztah mezi bolestí a hladinou kortizolu není lineární. Hladiny kortizolu se zpočátku zvyšují pomalu, dokud nedosáhnou určité prahové hodnoty bolesti. Jakmile je tato prahová hodnota překročena, dochází k výraznějšímu vzrůstu kortizolu. Tento mechanismus naznačuje, že jakmile koně zažijí určitý stupeň bolesti, jejich tělo reaguje mnohem intenzivněji, což se projevuje zvýšenou produkcí kortizolu. Tato zjištění posilují názor, že měření hladin kortizolu může poskytnout důležité informace o úrovni bolesti a stresu, které koně zažívají, a tím mohou přispět k lepšímu pochopení a řízení bolestivých stavů u těchto zvířat.

Studie „Plasma levels of heat shock protein 72 (HSP72) and β -endorphin as indicators of stress, pain and prognosis in horses with colic“ z roku 2010 se kromě jiného zabývala korelací plazmatického kortizolu a závažností kolitidy. Studie zahrnovala 77 koní s klinickými příznaky kolitidy a 15 zdravých kontrolních koní, kteří byli do nemocnice přivezeni za účelem darování krve, kovářských zákroků nebo kastrace. Poníci do studie nebyli zařazeni. Každý kůň byl do výzkumu zařazen pouze jednou. Všichni koně byli klinicky vyšetřeni, přičemž byly zaznamenány jakékoli známky kolitidy a byla stanovena předběžná diagnóza. Během této studie bylo zjištěno, že hladiny plazmatického kortizolu vzrůstaly s rostoucí závažností kolitidy, což činí kortizol potenciálním markerem pro detekci kolitidy a přítomnosti bolesti u koní (Niinistö et al. 2010).

Studie „Preliminary Investigations of Pain and Analgesia Assessment in Administered Phenylbutazone or Placebo After Arthroscopic Surger“ se zaměřila na vypracování metodiky pro hodnocení bolesti u koní při zkoumání účinnosti analgezie během operace. Výzkum probíhal na 25 koních, z nichž 15 dostalo analgetikum, zatímco zbývajících 10 koní obdrželo placebo v podobě fyziologického roztoku. U obou skupin byly odebírány vzorky žilní krve pro analýzu kortizolu a dalších hormonů před medikací a až 72 hodin po operaci. Výsledky ukázaly, že kortizol v plazmě se nezdá být spolehlivým ukazatelem bolesti u koní. I když byly koncentrace kortizolu nižší u koní, kteří dostali analgetikum, neprokázaly se významné rozdíly

ve srovnání se skupinou placebo. Další faktory, jako je denní rytmus nebo předchozí zkušenosti s bolestí, mohou ovlivnit hladiny kortizolu, což komplikuje jeho použití jako spolehlivý biomarker pro hodnocení bolesti (Raekallio et al. 1997).

Studie autorů Sellon et al. z roku 2004 měla za cíl vyhodnotit účinnost butorfanolu při zmírnění bolesti u koní po břišní operaci. Byla provedena na 31 koních, přičemž jedna skupina dostávala kontinuální intravenózní infuzi butorfanolu, zatímco druhá skupina byla léčena izotonickým roztokem jako kontrolní skupina. Kortizol byl použit jako marker bolesti a stresu, a to na základě jeho změn v plazmě po operaci. Výsledky ukázaly, že koně léčení butorfanolem vykazovali výrazně nižší hladiny kortizolu v plazmě než koně v kontrolní skupině.

Studie autorů Carlesso et al. z roku 2016 se sice zabývala ženami s osteoartritidou, avšak naznačuje, že u žen s tímto onemocněním je bolest pozitivně spojena s vyššími průměrnými hladinami kortizolu. To znamená, že čím větší je závažnost bolesti, tím vyšší jsou hladiny kortizolu. Výsledky také ukazují, že ženy trpící větší bolestí mohou mít změněnou funkci osy HPA, což může ovlivnit jejich reakci na stres a bolest.

Studie autorů Merl et al. z roku 2000 se zaměřila na to, zda bolest zvyšuje koncentraci kortizolu ve výkalech koní, kteří procházeli bolestivými stavy. První skupina koní se skládala z 10 hřebců, kteří byli kastrováni. Vzorky byly odebírány denně po dobu 10 dní. Druhá skupina zahrnovala 29 koní, kteří byli převezeni do veterinární nemocnice kvůli známkám koliky. U této skupiny byly vzorky odebírány dvakrát denně po dobu 6 dnů. Výsledky studie ukazují, že měření metabolitů kortizolu ve výkalech může být spolehlivou metodou pro posouzení bolesti a stresu u koní. Po kastraci došlo k nárůstu vylučování těchto metabolitů, což naznačuje, že hladiny kortizolu stoupají v reakci na bolest. Nejvyšší koncentrace metabolitů kortizolu byly naměřeny přibližně 36 hodin po kastraci. U koní trpících kolikou byly zjištěny zvýšené koncentrace metabolitů kortizolu ve výkalech, což odráží bolest způsobenou tímto stavem. Časový interval mezi výskytem příznaků koliky a zvýšením hladiny metabolitů kortizolu se lišil u jednotlivých koní, což může být ovlivněno změnami v motilitě střev. Studie také ukázala, že hladiny těchto metabolitů zůstávaly zvýšené i po určitou dobu po odeznění bolesti, což naznačuje, že analýza kortizolových metabolitů ve výkalech může pomoci detekovat bolest, která se objevila již před jedním až dvěma dny.

Studie „Development of a composite orthopaedic pain scale in horses“ se zaměřila na vývoj a validaci multifaktorové škály bolesti (CPS) u koní v experimentálním modelu akutní ortopedické bolesti. Do studie bylo zařazeno 18 koní, kteří byli rozděleni do dvou skupin. Kontrolní skupina dostala sedaci a epidurální analgézii, zatímco experimentální skupina podstoupila bolest způsobenou injekcí do tarsokrurálního kloubu. Pro analgézii byly použity různé přístupy, včetně intravenózního podání fenylobutazonu nebo epidurální směsi. Studie ukázala, že některé behaviorální a fyziologické ukazatele, jako reakce na dotek bolestivé oblasti a změny v postojích, mohou dobře odrážet intenzitu bolesti. Významná korelace mezi skóre CPS, krevním tlakem a hladinami kortizolu potvrdila, že multimodální analgésie podaná před operací poskytuje lepší výsledky v řízení bolesti než jiné přístupy. Ze studie také vyplynulo, že kortizol může pomoci identifikovat bolestivé situace, pokud jsou během sledování prováděna častá měření. Pro validaci škály bolesti nebo pro experimentální hodnocení bolesti by bylo potřeba častějších měření, ale zpoždění mezi odběrem vzorků a výsledky činí tento parametr nepřijatelným pro praktické použití ve škálách bolesti (Bussi eres et al. 2008).

Studie „Assessment of salivary alpha-amylase and cortisol as a pain related stress biomarker in dogs pre-and post-operation“ od autorů Kang et al. z roku 2022 měla za cíl zhodnotit, zda hladiny slinných biomarkerů, jako jsou alfa-amyláza a kortizol, odrážejí stres související s bolestí u psů. Studie byla prováděna na 35 psech trpících bolestí spojenou se zdravotním stavem, kteří podstoupili ortopedické operace a operace měkkých tkání. Výsledky studie naznačují, že závažná bolest spojená se zdravotním stavem může způsobit zvýšený psychologický stres u pacientů, což by mohlo vést ke zvýšení hladin kortizolu v séru a slinné alfa-amylázy ve skupině s vysokým skóre bolesti.

Studie autorů Blum et al. z roku 2022 se zaměřila na účinky akutní bolesti na hladiny kortizolu. Výzkum byl prováděn na skupině dobrovolníků, kteří podstoupili elektrofyziologickou stimulaci bolestivého podnětu. Během stimulace došlo k výraznému poklesu hladiny kortizolu v krvi, což bylo překvapivé, protože se očekávalo, že bolest povede ke zvýšení hladiny tohoto hormonu. Tento výsledek naznačuje, že při akutní bolesti mohou být mechanismy regulace kortizolu složitější, než se původně předpokládalo. Pokles kortizolu v reakci na bolest může mít souvislost s aktivací jiných fyziologických procesů, které ovlivňují hormonální rovnováhu v těle během bolesti.

4 Metodika

Tato práce se zaměřila na stanovení hladiny stresového hormonu kortizolu ve slinách a zkoumá potenciál využití této metody pro monitorování výskytu bolesti u koní. Kortizol, jako hlavní indikátor stresové reakce organismu, je považován za významný ukazatel fyziologického a psychického stavu zvířat. Měření jeho hladiny ze slin představuje neinvazivní a relativně snadno dostupnou metodu, která by mohla přinést nové možnosti v oblasti sledování welfare koní. Hlavním cílem této práce je zjistit, zda změny v hladině kortizolu mohou spolehlivě odrážet přítomnost bolesti, a tím přispět k lepšímu pochopení a hodnocení zdravotního stavu a pohody těchto zvířat.

4.1 Experiment

Pro účely této práce bylo vybráno celkem 21 koní. Tito koně tvořili dvě odlišné skupiny, které se lišily svými podmínkami a účelem využití. První skupinu tvořilo celkem 13 koní, kteří byli přijati na Veterinární kliniku v Heřmanově Městci. Tito koně podstupovali na klinice různé operační zákroky, a proto byli zvoleni jako vzorek pro odběr slin u zvířat s prokazatelnou bolestí. Skupina sloužila k analýze, jak může být přítomnost bolesti reflektována ve změnách hladiny kortizolu ve slinách. Tato data byla klíčová pro pochopení vztahu mezi fyziologickými reakcemi na bolest a hladinou stresového hormonu.

Druhá skupina, zvolená jako kontrolní, byla složena z 8 koní z oddělení služební hipologie Policie České republiky v Praze a ve Frýdlantu. Tito koně byli zahrnuti do výzkumu, protože se jednalo o zvířata v dobrém zdravotním stavu a bez známek akutní nebo chronické bolesti. Kontrolní skupina tak poskytla možnost porovnat hladiny kortizolu ve slinách koní, kteří nebyli vystaveni bolestivým podnětům, čímž se vytvořil důležitý výchozí rámec pro interpretaci výsledků první skupiny.

Výběr těchto dvou specifických skupin umožnil vytvořit kontrast mezi koňmi zažívajícími bolest a koňmi bez výrazných zdravotních problémů.

Odběr vzorků slin první skupiny probíhal v prosinci během 3 dnů. S ohledem na provoz veterinární kliniky byly vzorky odebírány každý den pouze jednou, a to v den příjezdu a následně další dva dny v dopoledních hodinách. Vzorky slin byly odebrány 1. den po transportu koní na kliniku, 2. druhý den probíhal odběr před nástupem na operaci, kdy koně byli sedováni a 3. den se uskutečnil poslední odběr vzorků, kdy byly koně v klidovém režimu po operaci.

Odběr vzorků slin u koní z druhé skupiny probíhal pravidelně, a to vždy jedenkrát měsíčně po dobu celkem jedenácti měsíců, konkrétně od dubna až do března. Sběr vzorků byl pečlivě naplánován a prováděl se podle přesného časového harmonogramu. Od každého koně byly během každého odběrového dne odebrány čtyři vzorky slin, přičemž jednotlivé odběry byly rozloženy do různých částí dne, aby se mohly zachytit případné změny hladiny kortizolu v průběhu dne.

První odběr probíhal brzy ráno, v 6:30 hodin, kdy hladina kortizolu bývá přirozeně nejvyšší, což je dáno biologickými rytmy zvířat. Druhý odběr byl proveden později dopoledne, konkrétně v 9 hodin. Následoval třetí odběr v 11 hodin, který umožňoval sledovat průběžné změny koncentrace kortizolu během dopoledne. Poslední, čtvrtý odběr se uskutečnil ve 13 hodin, tedy po poledni, což završilo celý denní cyklus sběru dat.

Tento systematický přístup k odběru vzorků umožnil získat komplexní přehled o denních výkyvech hladiny kortizolu ve slinách koní. Pravidelnost a dlouhodobost odběrů navíc zajistily dostatek dat pro přesnou analýzu, která mohla odhalit jak individuální rozdíly mezi koňmi, tak i celkové změny v koncentraci kortizolu během různých částí dne a měsíců sledovaného období.

4.1.1 Odběr slin

U všech sledovaných koní probíhal odběr vzorků slin jednotným způsobem, s důrazem na preciznost a dodržení stanovených postupů. Před samotným odběrem byla vždy pečlivě připravena kompletní testovací sada, která zahrnovala tampony, plastové sáčky, zkumavky a stahovací pásky (Obrázek 5). Na předem připravená stájová udidla byly s pomocí stahovacích pásek připevněny odběrové tampony, což umožnilo jednoduché a efektivní získání potřebných vzorků slin.



Obrázek 5: vlastní fotografie, odběrová sada

U koní z Veterinární kliniky v Heřmanově Městci byly použity tampony značky Facelle, které jsou vyrobeny ze 100% certifikované viskózy, neobsahují žádné chemické přísady ani parfemaci, čímž bylo zajištěno, že nedojde k ovlivnění přirozeného složení vzorků. U služebních koní z oddělení hipologie Policie České republiky byly pro odběr použity tampony značky O.B Original super. Tyto tampony jsou složeny z kombinace viskózy, polyesteru a bavlny a jsou taktéž zcela bez parfemace, což je klíčové pro zachování čistoty vzorků.

Při samotném odběru byla koním vložena připravená udidla s navázanými tampony do huby (Obrázek 6), kde zůstala po dobu 10 minut. Po uplynutí této doby byl tampon opatrně vyjmut, odstřižen a uložen do předem připraveného plastového sáčku. Pro usnadnění další

manipulace byl plastový sáček na rohu odstřižen, což umožnilo vymačkání odebraných slin přímo do zkumavky. Každá zkumavka byla označena buď jménem koně (u služebních koní), nebo písmenem (v případě koní z Veterinární kliniky, v souladu s pravidly GDPR). Součástí označení bylo také číslo odběru, které reflektovalo časový sled jednotlivých vzorků.

Kromě označení zkumavek byl každý odběr pečlivě evidován na záznamovém archu, který obsahoval informace o jménu, věku koně a přesném čase odběru, což poskytovalo důležitý kontext pro následné analýzy.

Jakmile byly vzorky odebrány, byly uchovány v lednici, aby se minimalizovala degradace biologického materiálu. Po dokončení odběrů v daném dni byly všechny vzorky transportovány v chladícím boxu do školní laboratoře pro další zpracování a analýzy. Výjimku tvořily vzorky odebrané na Veterinární klinice v Heřmanově Městci, které byly dopraveny do školní laboratoře až po třetím odběrovém dni, čímž byl zajištěn efektivní a organizovaný transport většího množství vzorků najednou.



Obrázek 6: vlastní fotografie, odebírání vzorků

4.1.2 Popis testovaných koní

Koně z Veterinární kliniky v Heřmanově Městci byli přijati na kliniku především z důvodu ortopedických obtíží, které se projevovaly příznaky kulhání. U většiny těchto koní byla jako terapeuticko-diagnostická metoda zvolena artroskopie.

Výjimku však tvořili dva koně, jejichž diagnóza a léčebný postup se lišily. Prvním z nich byl kůň označený jako H, který podstoupil zákrok zvaný hemiplegie. V případě koní se pojem hemiplegie nejčastěji spojuje s paralýzou hrtanu, kdy dochází k částečnému nebo úplnému oslabení hlasivkového svalu. Tento stav může ovlivnit schopnost dýchání a vyžaduje chirurgický zákrok, který pomáhá obnovit průchodnost dýchacích cest.

Druhým zmiňovaným případem byl kůň označený jako L, který podstoupil tenoskopii. Tenoskopie je rovněž minimálně invazivní chirurgická technika, která se zaměřuje na vyšetření a léčbu šlachových pošev nebo vazů. V rámci tohoto zákroku je pomocí artroskopu vizualizována šlachová pochva, což umožňuje diagnostikovat a léčit onemocnění, jako jsou záněty, poranění šlach nebo přítomnost volných tělísek.

Koně z oddělení služební hipologie Policie České republiky v Praze a ve Frýdlantu byli do výzkumu zařazeni díky svému dobrému zdravotnímu stavu a absenci jakýchkoliv projevů akutní či chronické bolesti.

Rozdělení koní pro zjištění vlivu bolesti na hladiny kortizolu

Vybraní jedinci byli rozděleni do dvou hlavních skupin. První skupinu tvořili koně s prokazatelnou bolestí, jejichž přehled je uveden v Tabulce 1. Druhou skupinou byli koně kontrolní, kteří nevykazovali žádné známky bolesti, a jejich údaje jsou shrnuty v Tabulce 2.

Kůň	Věk	Pohlaví	Operace
A	3 roky	Valach	Artroskopie LF spěnka
B	3 roky	Klisna	Artroskopie LH
C	2 roky	Hřebec	Artroskopie LF spěnka
D	3 roky	Valach	Artroskopie LH hlezno
E	5 let	Valach	Artroskopie LH
F	3 roky	Hřebec	Artroskopie LH koleno
G	1 rok	Hřebec	Artroskopie LF spěnka, LH hlezno
H	7 let	Valach	Hemiplegie
I	7 let	Valach	Artroskopie LF kopyto
K	6 let	Valach	Artroskopie LH spěnka
L	12 let	Klisna	Tenoskopie LH
M	5 let	Klisna	Artroskopie LH spěnka
N	6 let	Klisna	Artroskopie RH, LF spěnka

Tabulka 1: Skupina 1, koně s prokazatelnou bolestí

Kůň	Věk	Pohlaví
IRON	7 let	Valach
DUTCH	6 let	Valach
TIMOR	11 let	Valach
GERRY	7 let	Valach
QUENTIN	12 let	Valach
ANGELO	7 let	Valach
SOLO	8 rok	Valach
CAMARO	7 let	Valach

Tabulka 2: Skupina 2, kontrolní koně

Rozdělení koní pro zjištění vlivu věku na hladiny kortizolu

Dále bylo možné rozdělit koně ze skupiny policejních koní podle věku do dvou věkových kategorií. Vznikly následující podskupiny: mladí koně ve věku do 8 let (Tabulka 3), koně starší 8 let (Tabulka 4).

Kůň	Věk	Stáj
DUTCH	6 let	Praha
IRON	7 let	Praha
GERRY	7 let	Praha
SOLO	8 let	Liberec
ANGELO	7 let	Liberec
CAMARO	7 let	Liberec

Tabulka 3: Starší koně ve věku 7 a 8 let.

Kůň	Věk	Stáj
TIMOR	11 let	Praha
QUENTIN	12 let	Liberec

Tabulka 4: Staří koně nad 10 let věku.

4.1.3 Analýza vzorků

Analýza vzorků slin probíhala v laboratoři České zemědělské univerzity v Praze, kde byly všechny vzorky pečlivě zpracovávány za přísných laboratorních podmínek. Po transportu z terénního odběru byly vzorky slin uloženy do mrazících boxů v laboratorním skladu při teplotě -80 °C, což zajistilo optimální podmínky pro zachování jejich biologické

kvality a zabránilo degradaci kortizolu. Tyto podmínky jsou nezbytné pro zajištění přesnosti a spolehlivosti následné analýzy, která se zaměřovala na měření koncentrace slinného kortizolu.

Pro stanovení hladiny kortizolu ve slinách byl použit certifikovaný komerční kit založený na principu ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Obrázek 7). ELISA je spolehlivá a citlivá metoda, která se často využívá k měření biologicky aktivních látek, včetně hormonů, jako je kortizol.



Obrázek 7: Ilustrační ELISA kit, dostupné z: <https://www.unibiotech.in/category/elisa-kits/elk-biotechnology-elisa-kits/human-iga-immunoglobulin-a-elisa-kit.html>

Samotný proces analýzy probíhal následovně: mikrotitrační destičky, které byly součástí ELISA kitu, obsahovaly v každé jamce pevně navázané protilátky, které specificky vážou molekuly kortizolu. Do každé jamky byl následně přidán vzorek slin a speciální konjugát, obsahující enzym navázaný na protilátku. Tento krok umožňuje, aby se molekuly kortizolu přítomné ve vzorku navázaly na připravená vazebná místa v jamkách destičky, což je fáze, která je vizuálně znázorněna růžovou barvou.

Po přidání vzorků a konjugátu byla destička inkubována při přesně definované teplotě a čase, což umožnilo dokončení vazebné reakce. Následně se do každé jamky přidal substrát, který reaguje s enzymem obsaženým v konjugátu. Tato reakce vedla ke vzniku modré barvy, což signalizuje aktivitu enzymu. Destička byla poté podrobena druhé inkubační fázi, která zajistila dokončení této enzymatické reakce. Reakce byla nakonec zastavena přidáním specifického činidla, což vedlo ke změně barvy z modré na žlutou.

Intenzita žlutého zabarvení, která se vyvinula v každé jamce mikrotitrační destičky, byla klíčovým ukazatelem koncentrace kortizolu ve vzorku. Principem měření je, že intenzita barvy je nepřímo úměrná množství kortizolu přítomného ve vzorku – čím více kortizolu vzorek obsahoval, tím slabší byla výsledná barva. Pro přesné zhodnocení barevné intenzity

a následný výpočet koncentrace kortizolu byla destička analyzována pomocí přístroje známého jako ELISA reader, který měří absorbanci při vlnové délce 450 nm.

Celý proces analýzy probíhal pečlivě a v souladu s protokoly stanovenými výrobcem ELISA kitu. Tento postup zajistil vysokou přesnost, opakovatelnost a spolehlivost výsledků, což je zásadní pro správné vyhodnocení hladiny kortizolu ve vzorcích slin a jejich následnou interpretaci v rámci výzkumu.

4.1.4 Statistická analýza

Veškerá získaná data byla analyzována statistickým programem SAS 9.4. Pro vyhodnocení vlivu jednotlivých fixních efektů bylo využito analýzy rozptylu procedury GLM. Průkaznost rozdílů byla hodnocena na hladinách významnosti 0,05 a 0,001. Dále byly sledovány vztahy mezi sledovanými ukazateli pomocí korelační a regresní analýzy procedury CORR a REG.

Data byla zpracována na základě analýzy hodnot z měření u dvou skupin koní. U koní policejních byly z analýzy vyloučeny hodnoty odběrů (Tabulka 5), které přesahovaly 5 ng/l, jelikož tyto hodnoty byly vyšší než obvyklá fyziologická hladina kortizolu. V tabulce číslo 9 jsou zobrazeny právě hodnoty, které byly z analýzy vyřazeny. Celkem bylo ze souboru zdravých koní vyřazeno 13 odběrů, které měly hladinu kortizolu vyšší než 5 ng/l. Tyto hodnoty byly považovány za extrémní a potenciálně ovlivněné nefyziologickými vlivy (např. akutní stres, zátěž). Nejvyšší zaznamenaná hodnota přesáhla 25 ng/l. Rozložení těchto odlehlých měření nebylo omezeno na jeden konkrétní měsíc nebo čas odběru, což naznačuje, že nejde o systematický jev.

Kůň	Měsíc	Čas	Kortizol (ng/l)
TIMOR	duben	4	5,70
GERRY	červenec	3	5,37
GERRY	září	3	8,83
QUENTIN	srpen	1	5,44
SOLO	srpen	2	6,11
SOLO	listopad	2	8,65
ANGELO	květen	3	25,24
ANGELO	listopad	4	7,80
ANGELO	prosinec	3	6,97
CAMARO	duben	1	5,99
CAMARO	červenec	2	11,46
CAMARO	listopad	1	15,78
CAMARO	listopad	2	7,48

Tabulka 5: Jednotlivé odběry u zdravých koní, jejichž hladina kortizolu přesáhla hranici 5 ng/l.

5 Výsledky

Tato kapitola se zaměřuje na analýzu výsledků měření hladin kortizolu ve vztahu k několika klíčovým faktorům. V následujících podkapitolách budou podrobně rozebrány tři hlavní oblasti, které mohou ovlivnit hladiny kortizolu: cirkadiánní rytmus, vliv bolesti a vliv věku. Každá z těchto podkapitol poskytuje pohled na to, jak tyto faktory modifikují sekreci kortizolu a jaký vliv mají na tělesné procesy.

5.1 Cirkadiánní rytmus kortizolu

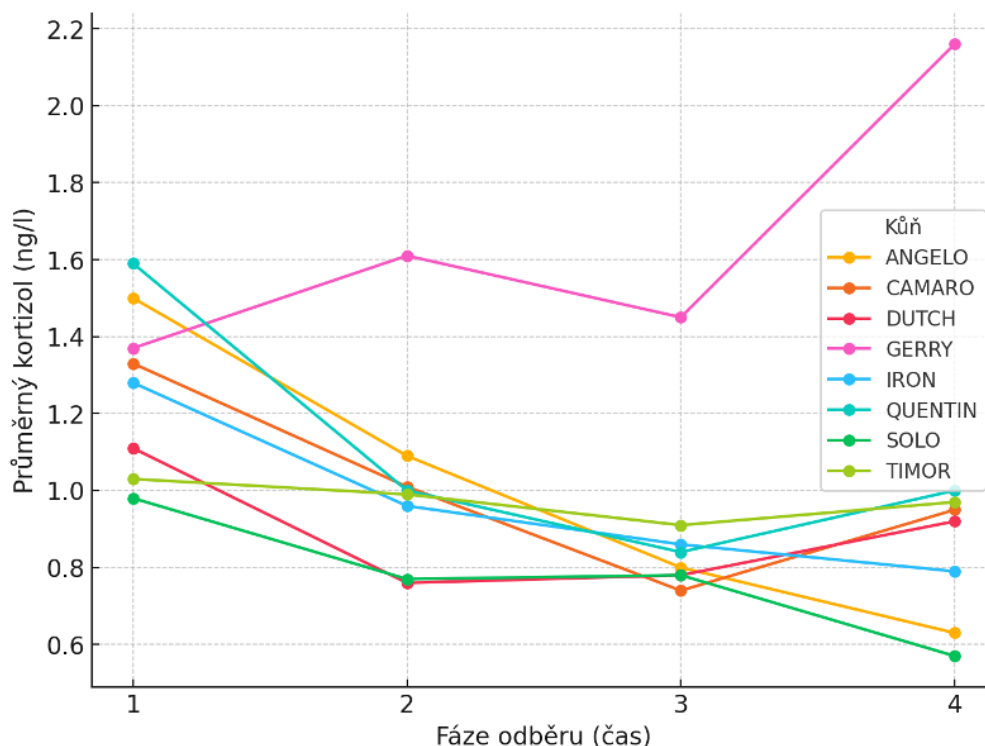
Tato část se zaměřuje na zkoumání cirkadiánního rytmu u policejních koní, přičemž se věnuje změnám hladin kortizolu v různých fázích odběrů.

U policejních koní byla data zpracována také s ohledem na cirkadiánní rytmus kortizolu (Tabulka 6), protože byly provedeny čtyři odběry během dne. První odběr probíhal v 6:30, druhý v 9:00, třetí v 11:00 a čtvrtý odběr ve 13:00. Tento časový rozvrh umožnil sledovat změny hladiny kortizolu v závislosti na denní době.

čas	Průměr	Medián	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum
6:30	1,27	1,31	0,22	0,98	1,59
9:00	1,02	1,0	0,26	0,76	1,61
11:00	0,9	0,82	0,23	0,74	1,45
13:00	1,0	0,94	0,5	0,57	2,16

Tabulka 6: Cirkadiánní rytmus kortizolu u policejních koní.

Graf (Obrázek 9) ukazuje postupný pokles hladiny kortizolu u většiny zvířat, přičemž mezi jednotlivými koňmi existují určité rozdíly. Kůň Angelo vykazuje výraznější pokles, zatímco kůň Camaro si udržuje stabilní hladiny. Výsledky statistického testování ukázaly, že i když jsou hodnoty kortizolu v jednotlivých fázích odběrů odlišné, tyto rozdíly nejsou statisticky významné. Změny mezi odběry nebyly dostatečně silné, aby byly považovány za statisticky relevantní.



Obrázek 8: Graf cirkadiánního rytmu u policejních koní.

Graf cirkadiánního rytmu (Obrázek 8) u policejních koní ukazuje postupný pokles hladiny kortizolu během jednotlivých fází odběrů u většiny koní. Tento pokles je konzistentní u většiny zvířat, což naznačuje, že hladiny kortizolu se přirozeně snižují v průběhu odběrů. Rozdíly mezi jednotlivými koňmi jsou rovněž patrné; kůň Angelo vykazuje výraznější pokles kortizolu, přičemž začíná s vyššími hodnotami, zatímco kůň Camaro má hladiny kortizolu stabilní po celou dobu měření. Kůň jménem Gerry vykazuje vyšší hladiny kortizolu a jiný průběh hladin kortizolu během dne.

Z grafu (Obrázek 9) je patrné, že i když některé křivky vykazují značné rozdíly v hodnotách, statistický test ukázal, že rozdíly mezi fázemi odběrů nejsou statisticky významné, což znamená, že změny mezi fázemi nejsou natolik výrazné, aby se daly považovat za statisticky relevantní.

Výsledky statistické analýzy ukázaly, že v prvním časovém bodě (čas 1) byla průměrná hodnota 1,27, přičemž medián dosáhl hodnoty 1,31. Směrodatná odchylka činila 0,22, což naznačuje, že hodnoty se od průměru lišily o 0,22. Minimum a maximum v tomto bodě byly 0,98 a 1,59, což ukazuje rozsah hodnot. Ve druhém časovém bodě (čas 2) byla průměrná hodnota 1,02, což je nižší než v prvním časovém bodě. Medián byl 1,0 a směrodatná odchylka vzrostla na 0,26, což naznačuje větší variabilitu než v předchozím období. Hodnoty se pohybovaly mezi 0,76 a 1,61. Ve třetím časovém bodě (čas 3) průměr klesl na 0,9, s mediánem 0,82. Směrodatná odchylka činila 0,23, což naznačuje menší variabilitu než v předchozích bodech. Hodnoty se pohybovaly mezi 0,74 a 1,45. Ve čtvrtém časovém bodě (čas 4) průměr vzrostl na 1,0, přičemž medián byl 0,94. Směrodatná odchylka vzrostla na 0,5, což naznačuje větší variabilitu než v předchozích časových bodech. Minimum bylo 0,57 a maximum 2,16.

Výsledky statistické analýzy prokázaly, že průměrná hodnota v jednotlivých časových bodech vykazuje jisté fluktuace, ale rozdíly mezi fázemi odběrů nebyly statisticky významné.

Výsledky byly provedeny s 95% pravděpodobností $p < 0,05$), což znamená, že i když některé křivky vykazovaly rozdíly, tyto rozdíly nejsou dostatečně silné, aby byly považovány za statisticky relevantní.

5.2 Vliv bolesti na hladiny kortizolu u koní

5.2.1 Hladiny kortizolu během odběrů u koní s prokazatelnou bolestí

V této podkapitole byly nejdříve sledovány hladiny kortizolu u koní s prokazatelnou bolestí během tří různých dnů. Cílem bylo vyhodnotit změny v hladinách kortizolu mezi jednotlivými odběry, které se uskutečnily v různých fázích léčby koní na klinice.

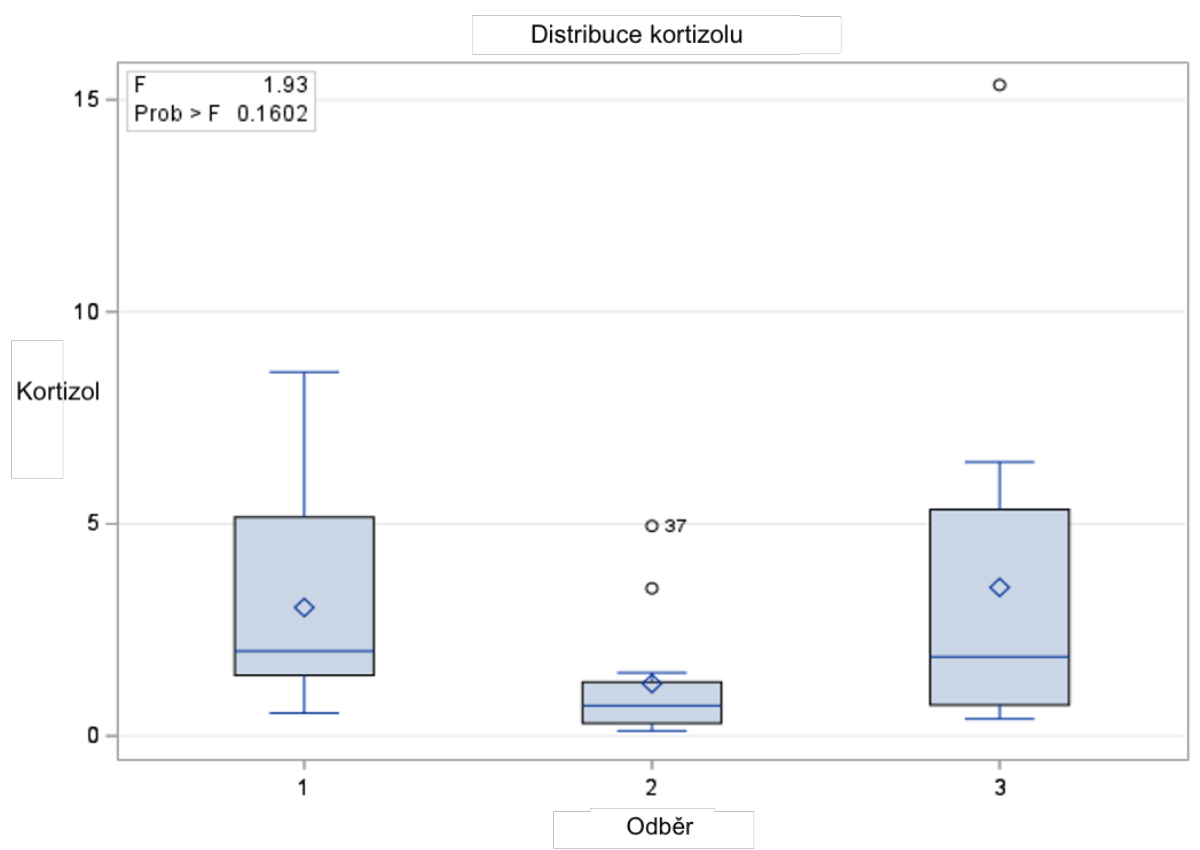
	Počet odběrů	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum
1. odběr	13	3,03	2,49	0,54	8,58
2. odběr	12	1,23	1,48	0,12	4,95
3. odběr	12	3,50	4,31	0,40	15,35

Tabulka 7: Hodnoty kortizolu u koní s bolestí během odběrů

Tabulka 7 zobrazuje statistické údaje o hladinách kortizolu u koní s prokazatelnou bolestí, které byly sledovány během tří různých odběrů. Cílem bylo sledovat změnu hladin kortizolu mezi jednotlivými odběry u koní, a to v den příjezdu na kliniku (1. odběr), v den operace, kdy byli koně sedováni (2. odběr), a po operaci (3. odběr).

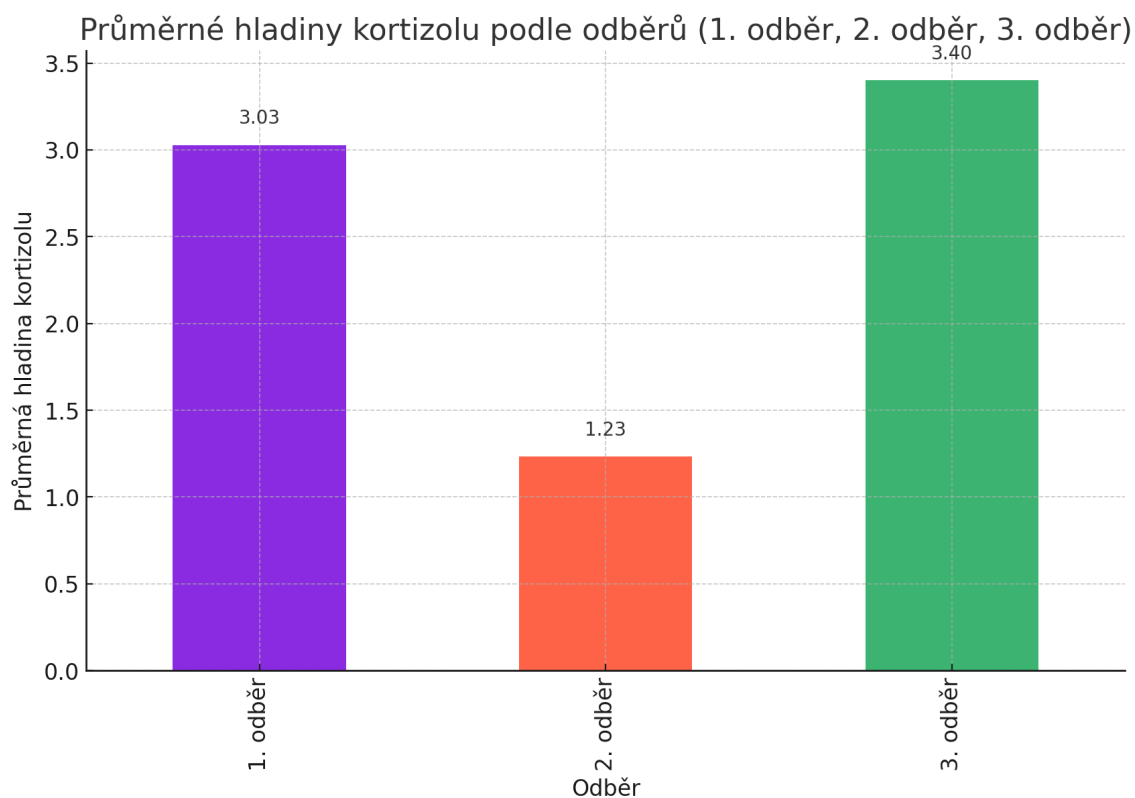
U 1. odběru, který probíhal v den příjezdu koní na kliniku, byla průměrná hladina kortizolu 3,03, s hodnotami, které se pohybovaly od minima 0,54 do maxima 8,58. Směrodatná odchylka byla 2,49, což ukazuje na určitou variabilitu v hodnotách. V době 2. odběru, který se uskutečnil v den operace, kdy byli koně sedováni, byla průměrná hladina kortizolu výrazně nižší, konkrétně 1,23. Minimum v této skupině bylo 0,12 a maximum 4,95, přičemž směrodatná odchylka byla 1,48, což naznačuje menší variabilitu než u 1. odběru.

U 3. odběru, který probíhal po operaci, kdy byli koně již po zákroku, došlo k výraznému nárůstu průměrné hladiny kortizolu na hodnotu 3,50. Hodnoty kortizolu se pohybovaly mezi minimem 0,40 a maximem 15,35, přičemž směrodatná odchylka byla 4,31, což ukazuje na vysokou variabilitu v hladinách kortizolu u jednotlivých koní po operaci.



Obrázek 9: Boxploty pro změny hladin kortizolu během odběrů u koní s bolestí

Boxplot (Obrázek 9) zobrazuje rozdělení hladin kortizolu u koní s prokazatelnou bolestí během tří odběrů, které probíhaly v různých časových fázích léčby.



Obrázek 10: Hladiny kortizolu podle odběrů

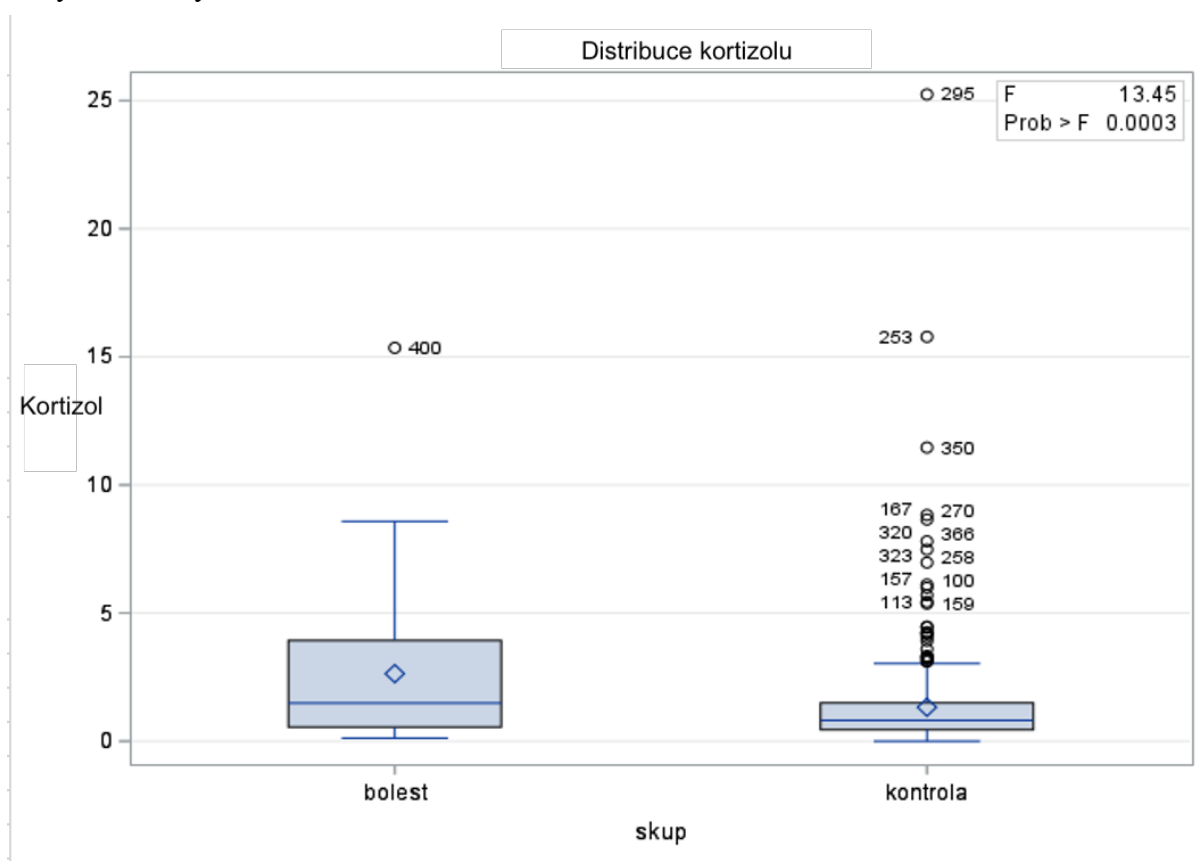
Obrázek 10 graficky zobrazuje rozložení hladin kortizolu během 3 odběrů. 1. odběr značí odběr v den příjezdu koně na kliniku, 2. odběr značí odběr v den sedace před operací a 3. odběr značí odběr v den klidového režimu po operaci.

P-hodnota vyšla 0,16, což naznačuje, že rozdíl mezi podmínkami není statisticky významný. To znamená, že změna hladin kortizolu mezi odběry (1., 2. a 3.) není dostatečně silná na to, aby byla považována za významnou v rámci této práce.

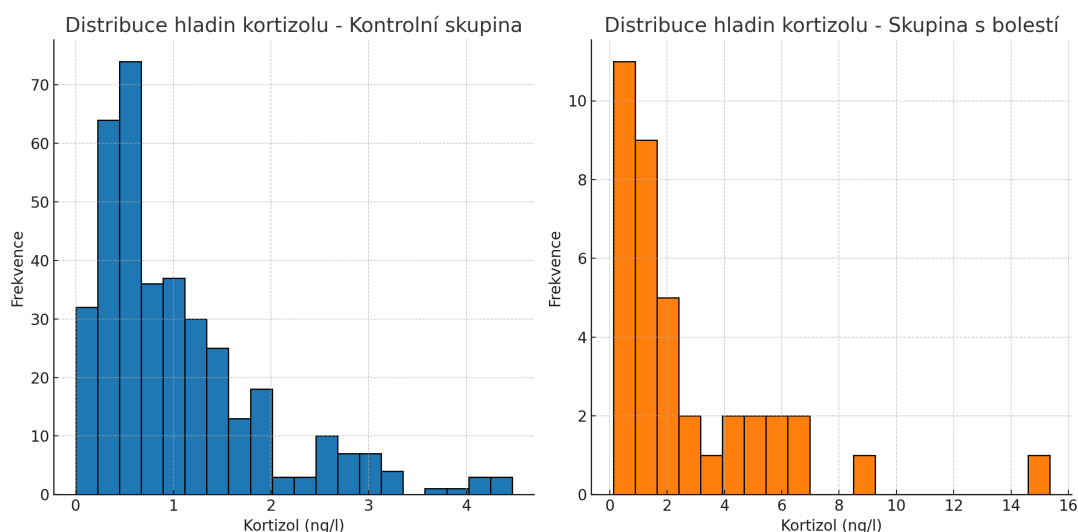
5.2.2 Hladiny kortizolu u koní s prokazatelnou bolestí a u kontrolní skupiny

Dále se tato kapitola zabývala hypotézou, zda mají koně s bolestí vyšší hladiny kortizolu než kontrolní skupina.

Výsledky analýzy (Tabulka 10) ukazují, že koně s bolestí mají vyšší hladiny kortizolu než koně bez bolesti (kontrolní skupina). Průměrná hladina kortizolu u koní bez bolesti je 1,05 ng/l, zatímco u koní s bolestí dosahuje 2,63 ng/l, což je více než dvojnásobek. Kontrolní skupina vykazuje relativně nízké hodnoty, přičemž maximální hladina kortizolu byla 4,47 ng/l. Naopak u koní s bolestí byly zaznamenány hodnoty až 15,35 ng/l, což naznačuje, že bolest může vyvolat výrazně vyšší hladiny tohoto stresového hormonu.



Obrázek 11: Porovnání hladin kortizolu mezi skupinami koní bez bolesti (kontrola) a koní s bolestí (bolest).



Obrázek 12: Rozložení hladin kortizolu.

Boxový graf (Obrázek 11) a graf rozložení hladin kortizolu (Obrázek 12) ukazují, že koně s bolestí mají nejen vyšší průměrné hodnoty kortizolu, ale také větší rozptyl a přítomnost odlehlých hodnot. To naznačuje, že bolest může způsobovat nejen zvýšení hladin kortizolu, ale také výraznou variabilitu v reakci jednotlivých koní na bolest. Koně bez bolesti mají hladiny kortizolu stabilní a relativně nízké.

P-hodnota byla 0,00032, což je výrazně nižší než běžně používaný práh statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Na základě tohoto výsledku lze konstatovat, že rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou koní s bolestí je statisticky významný.

Analýza ukázala, že koně s bolestí vykazují vyšší hladiny kortizolu než koně bez bolesti, což potvrzuje hypotézu, že koně s bolestí mají vyšší hladiny kortizolu. Statistický test prokázal, že tento rozdíl je statisticky významný.

Hypotéza byla potvrzena.

5.2.3 Hladiny kortizolu během odběrů

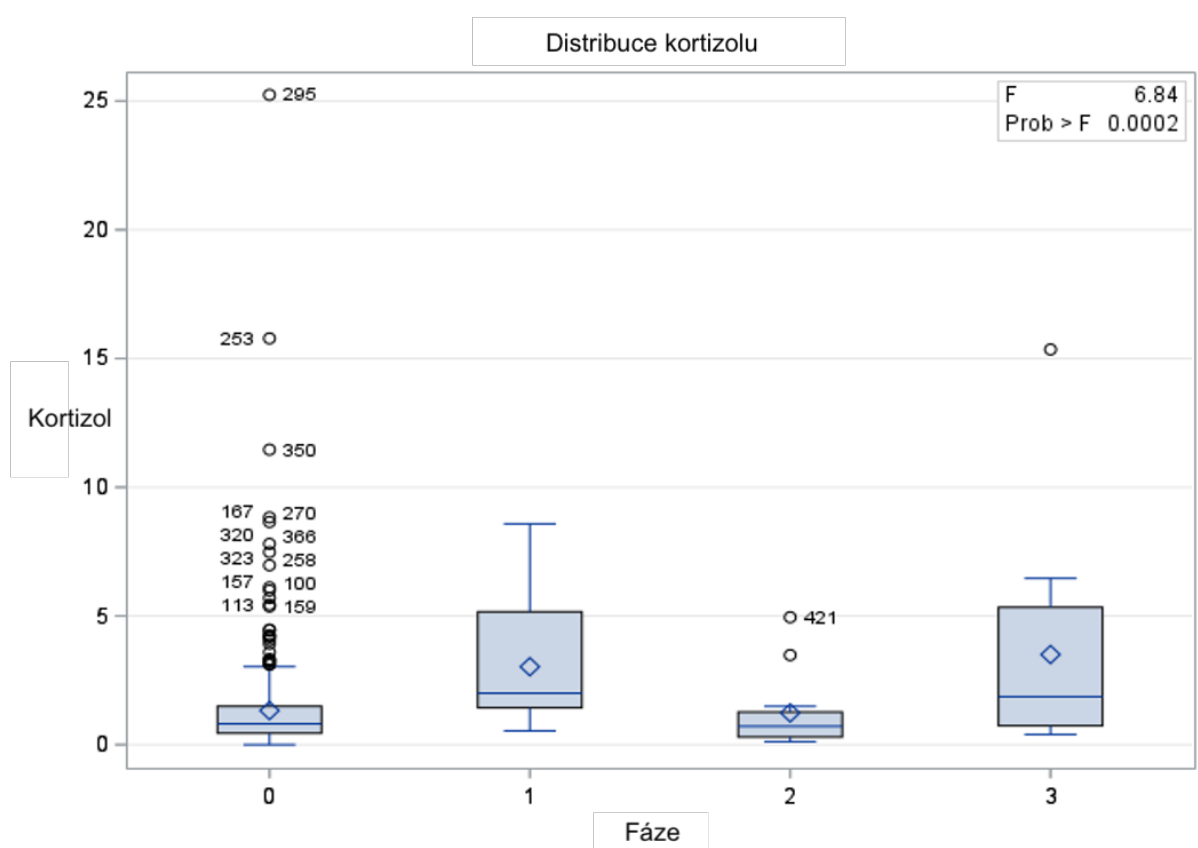
Tato část práce byla zaměřena na zkoumání hladiny kortizolu v jednotlivých fázích odběru u koní s prokazatelnou bolestí, stejně jako u kontrolní skupiny bez známek bolesti. Srovnávala jednotlivé odběry koní s bolestí s kontrolní skupinou.

Fáze 0 značí odběr u koní policejních, fáze 1 značí první odběr u koní s bolestí, tedy odběr v den příjezdu na kliniku, fáze 2 značí druhý odběr u koní z kliniky během sedace před operací a fáze 3 značí třetí odběr u koní s bolestí v den klidu po operaci.

fáze	Počet odběrů	N	Průměr	Sm. odchylka	Minimum	Maximum
0	384	384	1,33	1,99	0,0	25,24
1	13	13	3,03	2,49	0,54	8,58
2	12	12	1,23	1,48	0,12	4,95
3	12	12	3,50	4,31	0,40	15,35

Tabulka 8: Hladiny kortizolu u koní s bolestí dle odběrů a kontrolní skupinou

Tabulka 8 zobrazuje výsledky měření hladiny kortizolu u koní v různých fázích odběru vzorků. Data jsou rozdělena do čtyř fází, přičemž každá fáze představuje jiný časový okamžik nebo podmínky odběru vzorků u koní s prokazatelnou bolestí a kontrolní skupiny.



Obrázek 13: Hladiny kortizolu u kontrolní skupiny a koní s bolestí

Obrázek 13 zobrazuje průměrné hladiny kortizolu v různých fázích odběru vzorků, které byly provedeny u kontrolní skupiny a u koní s prokazatelnou bolestí v několika různých časových bodech.

Fáze 0 - Kontrolní skupina (průměrná hladina kortizolu 1,33): Tato fáze reprezentuje odběr vzorků z kontrolní skupiny, která nebyla vystavena žádné bolesti. Průměrná hladina kortizolu je relativně nízká a variabilita mezi jednotlivými vzorky je značná.

Fáze 1 - Odběr u koní s bolestí první den po transportu (průměrná hladina kortizolu 3,03): Tato fáze ukazuje zvýšení průměrné hladiny kortizolu. Variabilita mezi jednotlivými vzorky je stále vysoká.

Fáze 2 - Odběr u koní s bolestí druhý den při sedaci před operací (průměrná hladina kortizolu 1,23): V této fázi, kdy byly koně sedováni před operací, je průměrná hladina kortizolu nižší než u kontrolní skupiny. Variabilita mezi jednotlivými vzorky je přítomná, avšak hladina kortizolu je nižší než průměrná hodnota kortizolu v kontrolní skupině.

Fáze 3 - Odběr u koní s bolestí po operaci, kdy byly v klidu (průměrná hladina kortizolu 3,50): V této fázi je průměrná hladina kortizolu opět vyšší než v předchozích fázích. Opět je zde významná variabilita mezi jednotlivými vzorky.

P-hodnota byla 0,2, což je větší než 0,05. To znamená, že na základě této analýzy nejsou rozdíly mezi skupinami statisticky významné.

5.3 Vliv věku na hladiny kortizolu u koní

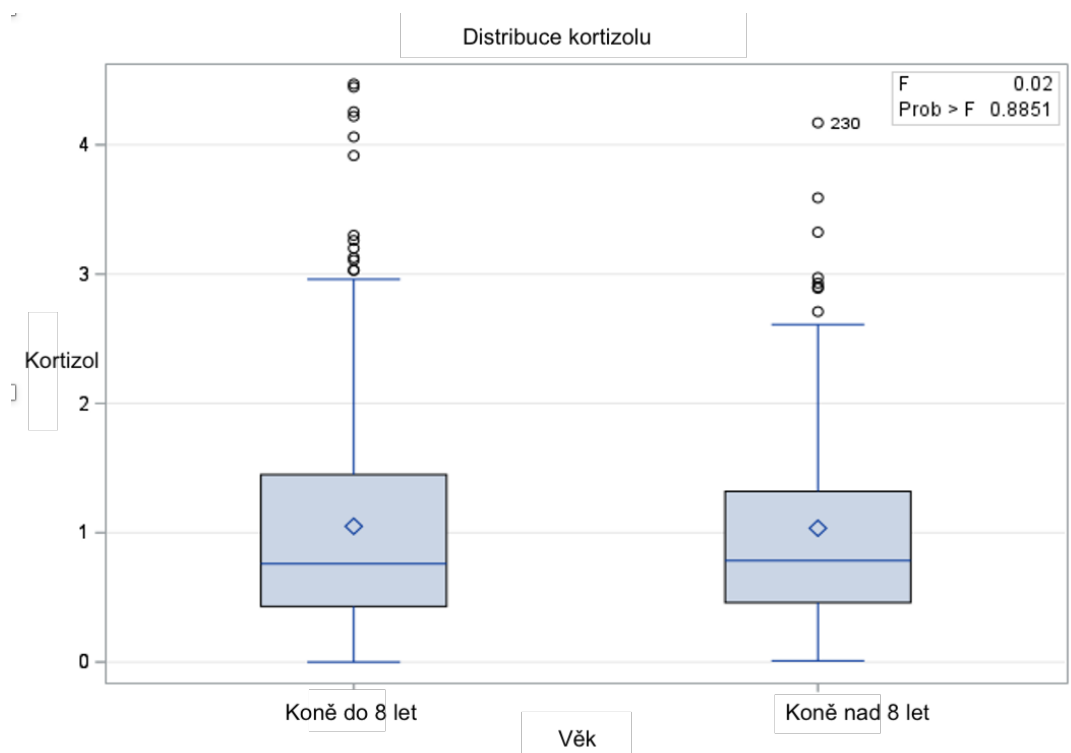
Na základě analýzy dat byly zjištěny následující výsledky (Tabulka 9): První skupina čítala 277 odběrů, jednalo se o koně do 8 let věku, přičemž průměrná hladina kortizolu byla 1,05. Směrodatná odchylka činila 0,88, což naznačuje míru rozptýlení jednotlivých hodnot okolo průměru. Hladiny kortizolu v této skupině se pohybovaly v rozmezí od 0 do 4,47.

Druhá skupina zahrnovala 94 odběrů, jednalo se o koně starší 8 let věku. Průměrná hodnota kortizolu zde dosahovala 1,03, se směrodatnou odchylkou 0,85. Rozmezí hodnot bylo od 0,01 do 4,17.

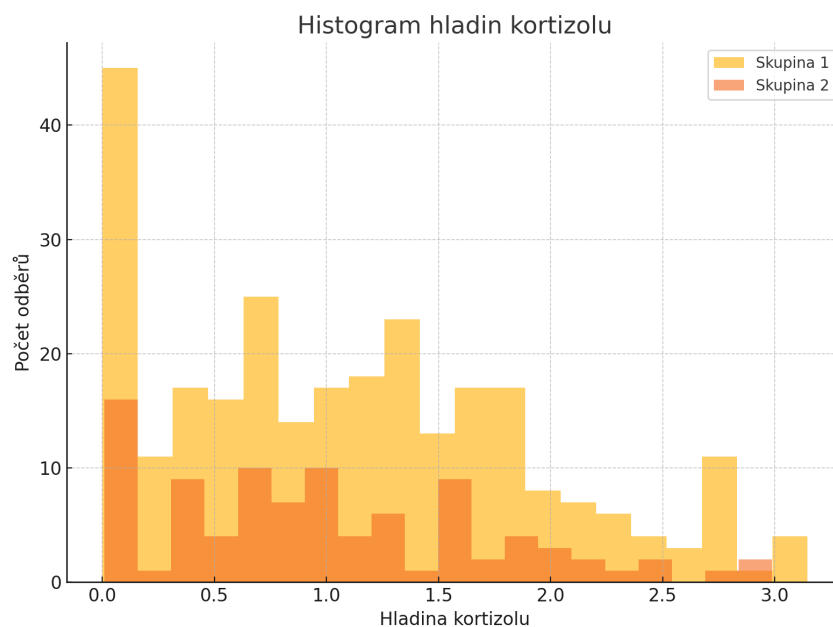
Hladiny kortizolu se mezi oběma skupinami lišily jen minimálně (Obrázek 14). Rozdíl v průměrných hodnotách byl zanedbatelný, stejně tak i rozdíl v rozptýlení dat (Obrázek 15).

Skupina	Počet odběrů	N	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum
Koně do 8 let	277	277	1,05	0,88	0,00	4,47
Koně nad 8 let	94	94	1,035	0,85	0,01	4,17

Tabulka 9: Hodnoty kortizolu u koní rozdělených do dvou věkových skupin



Obrázek 14: Rozložení hladin kortizolu u koní do 8 let věku a nad 8 let věku



Obrázek 15: Grafické znázornění rozložení hladin kortizolu

P-hodnota z analýzy výsledků je 0,89, což je vyšší než běžně používaný prahový limit 0,05. Tento výsledek naznačuje, že rozdíly mezi průměrnými hladinami kortizolu u koní v různých věkových skupinách nejsou statisticky významné. To znamená, že věk koní nemá vliv na hladiny kortizolu v rámci této práce.

Hypotéza nebyla potvrzena.

6 Diskuze

Tato práce se zaměřila na analýzu hladin kortizolu u policejních koní s cílem ověřit dvě hlavní hypotézy: H1: Koně s bolestí mají vyšší hladiny kortizolu a H2: Stárnutí kobě snižuje hladinu slinného kortizolu. Výsledky měření hladin kortizolu v různých podmínkách a skupinách koní umožnily posoudit vliv těchto faktorů na sekreci tohoto stresového hormonu.

První hypotéza, která předpokládala, že koně s bolestí mají vyšší hladiny kortizolu, byla potvrzena. Výsledky ukázaly, že koně s bolestí vykazují výrazně vyšší průměrné hladiny kortizolu než koně bez bolesti (kontrolní skupina). Průměrná hladina kortizolu u koní bez bolesti byla 1,05 ng/l, zatímco u koní s bolestí dosahovala 2,63 ng/l. Tento rozdíl je nejen statisticky významný (p -hodnota = 0,00032), ale také naznačuje, že bolest je možným faktorem vyvolávajícím zvýšenou sekreci kortizolu. Dále boxový graf ukázal, že koně s bolestí vykazují nejen vyšší průměrné hodnoty kortizolu, ale také širší rozptyl, což naznačuje větší variabilitu v reakci jednotlivých koní na bolest. Naopak koně bez bolesti vykazují stabilní a relativně nízké hladiny kortizolu. Tyto výsledky podporují názor, že bolest může nejen zvyšovat hladiny kortizolu, ale také způsobit významné individuální rozdíly v reakci na stresovou situaci.

Pro získání ještě přesnějších výsledků by však byl vhodný delší výzkum, který by zahrnoval širší vzorek jedinců, včetně koní s různými zdravotními komplikacemi. Tento výzkum by poskytl lepší přehled o vlivu dalších faktorů na hladiny kortizolu a variabilitu reakce na bolest. V této práci bylo výběrové období a počet jedinců omezený s ohledem na provoz veterinární kliniky, což mohlo ovlivnit velikost a rozmanitost vzorku.

Na výsledky této práce tématicky navazují vybrané poznatky z literatury, které potvrzují závěry této hypotézy. Koně zažívající bolest nebo stres, zejména ti s kolikou nebo akutními břišními onemocněními, vykazují změněné hladiny kortizolu. Koně s akutním břišním onemocněním měli výrazně vyšší hladiny kortizolu ve slinách ve srovnání se zdravými koňmi (Contreras-Aguilar et al. 2018). Studie autorů Lawson et al. z roku 2020, která hodnotila aplikaci modifikované equinní škály bolesti (CPS) a její asociaci s hladinami kortizolu a ACTH u koní s kolikou, také potvrzuje, že bolest u koní je silně spojena se zvýšenou sekrecí kortizolu. Tento výzkum ukázal, že čím vyšší je skóre bolesti podle CPS, tím vyšší jsou koncentrace kortizolu v séru koní, což je statisticky významné jak v okamžiku největší bolesti, tak i v průběhu hospitalizace. Tyto výsledky podtrhují roli bolesti jako faktoru, který vyvolává stres a zvyšuje hladiny kortizolu u koní trpících kolikou.

Nicméně jedna studie zjistila, že koně s narušeným blahobytem, včetně chronické bolesti, ve skutečnosti vykazovali nižší hladiny kortizolu v plazmě a nižší hladiny metabolitů kortizolu ve stolici (Pawluski et al. 2017). Tato zjištění naznačují, že zatímco akutní bolest obecně může zvyšovat hladiny kortizolu u koní, chronický stres může vést k složitější reakci kortizolu. Celkově však mohou měření kortizolu sloužit jako užitečný biomarker pro bolest a stres u koní, zejména v akutních podmínkách.

V této diplomové práci byly také sledovány hladiny kortizolu u koní s prokazatelnou bolestí ve třech různých fázích jejich hospitalizace – při příjezdu na kliniku, v den operace (kdy byli koně sedováni) a po operaci. Průměrná hladina kortizolu při příjezdu činila 3,03 ng/l, v den operace výrazně klesla na 1,23 ng/l a po operaci opět vzrostla na 3,50 ng/l. Nejvyšší variabilita

v naměřených hodnotách byla zaznamenána po operaci. Statistická analýza však ukázala, že rozdíly mezi jednotlivými odběry nebyly statisticky významné ($p = 0,16$). Tento průběh hladin kortizolu by mohl být způsobený tím, že při prvním odběru byly koně v bolesti, v důsledku své zdravotní komplikace. Toto tvrzení podporuje také studie autorů Ayala et al. (2012), která zaznamenala, že koně se zdravotními komplikacemi vykazují vyšší hladiny kortizolu. Při druhém odběru se hladiny kortizolu snížily, zřejmě v důsledku sedace koní před operací. S touto domněnkou souhlasí studie autorů Raekallio et al. z roku 2010. Při třetím odběru mohly být hladiny kortizolu opět vyšší například v důsledku bolesti po operaci nebo stresem způsobeným operací. Stegmann & Jones (1998) také zaznamenali zvýšené plazmatické koncentrace kortizolu během a po operaci.

Dále se práce se zaměřila na porovnání hladin kortizolu mezi koni s prokazatelnou bolestí v různých fázích léčby a kontrolní skupinou zdravých koní. Kontrolní skupina (fáze 0) vykazovala průměrnou hladinu kortizolu 1,33 ng/l. U koní s bolestí byla průměrná hladina kortizolu nejvyšší v den příjezdu na kliniku (fáze 1, 3,03 ng/l), výrazně klesla při sedaci před operací (fáze 2, 1,23 ng/l) a opět stoupla po operaci (fáze 3, 3,50 ng/l). Nejnížší hodnoty byly zaznamenány během sedace. Navzdory těmto rozdílům nebyly změny statisticky významné ($p = 0,2$). Možné vysvětlení těchto výsledků ve srovnání s kontrolní skupinou může souviset s fyziologickou reakcí organismu na bolest, stres a podávaná sedativa. Ve srovnání s kontrolní skupinou, která nebyla vystavena bolestivým ani stresujícím podnětům, jsou tyto výkyvy logickým odrazem stresových a fyzických podnětů spojených s onemocněním a léčbou. Studie autorů Robertson et al. (1990) také zaznamenala zvýšené hladiny kortizolu u koní po operaci. Kontrolní skupina sice vykazovala určitou variabilitu, ale průměrná hladina kortizolu zůstala relativně nízká, což odpovídá klidovému stavu bez přítomnosti bolesti nebo stresu.

Druhá hypotéza, která se zaměřila na vliv věku koní na hladiny kortizolu, nebyla potvrzena. Analýza ukázala, že mezi věkovými skupinami (koně do 8 let a koně nad 8 let) nebyly žádné statisticky významné rozdíly v průměrných hladinách kortizolu (p -hodnota = 0,89). Rozdíly mezi jednotlivými věkovými skupinami nebyly dostatečně silné na to, aby byly považovány za statisticky významné. Výsledky naznačují, že věk nemusí mít vliv na hladiny kortizolu u policejních koní v této studii. Tento výsledek může být ovlivněn různými faktory, jako jsou individuální rozdíly v citlivosti na stres, zdravotní stav koní nebo jejich životní zkušenosti, které nebyly v této studii zohledněny.

V této práci bylo věkové rozpětí koní poměrně omezené, což bylo dáno výběrem jedinců, kteří se nacházejí na Oddělení policejní hipologie. Při podrobnějším výzkumu by bylo vhodné zvolit širší věkovou škálu koní a zahrnout větší počet jedinců, což by mohlo poskytnout podrobnější a přesnější výsledky v souvislosti s vlivem věku na hladiny kortizolu.

Ve vědecké literatuře se autoři neshodují s jednoznačným názorem. Mazzola et al. (2021) zjistili výrazně vyšší koncentrace kortizolu v srsti u koní starších než 15 let, bez ohledu na managementové strategie. AboEl-Maaty (2011) poznamenal, že různé faktory, včetně plemene, managementu a environmentálních podmínek, mohou ovlivnit hladiny kortizolu u koní. Ačkoli tyto studie poskytují důkazy o věkem podmíněných změnách v hladinách kortizolu, také zdůrazňují složitost reakcí na stres u koní, přičemž faktory jako zdravotní stav, cvičení a management hrají důležitou roli v regulaci kortizolu.

Pokud jde o cirkadiánní rytmus kortizolu u koní, výsledky ukázaly, že i když většina koní vykazuje postupný pokles hladiny kortizolu v průběhu jednotlivých fází odběrů, tyto změny nejsou statisticky významné, tudíž nelze v této práci s jistotou potvrdit přítomnost cirkadiánního rytmu. Odborná literatura opakovaně potvrzuje, že koně vykazují cirkadiánní rytmus v hladinách kortizolu. Studie ukázaly denní vzorec, přičemž vrchol koncentrací kortizolu nastává ráno a nejnižší hladiny jsou večer (Irvine & Alexander 1994; Bohák et al. 2013; Giannetto et al. 2012).

U 4.odběru nebyly vždy hladiny kortizolu nejnižší, což může být ovlivněno několika faktory. Tento výsledek může být ovlivněn například fyzickou aktivitou koní před odběrem, stresem z manipulace, změnami v prostředí, jako je teplota, hluchost nebo přítomnost jiných zvířat. Dále mohou hrát roli individuální rozdíly mezi koňmi. U koně jménem Gerry byl zaznamenán atypický průběh hladin kortizolu během dne a obecně vyšší hodnoty kortizolu, přičemž jednou z možných příčin této odchylky může být dlouhodobě působící stres. Tuto domněnku potvrzují Strzelec et al. 2011, kteří u koní účastnících se náročných aktivit pozorovali vyšší hladiny kortizolu. Dalším možným důvodem pro zvýšené hladiny kortizolu může být například přítomnost bolesti či onemocnění, což potvrzuje studie Maira et al. 2014, která potvrdila, že například koně s kolikou mají vyšší hladiny kortizolu.

7 Závěr

Tato diplomová práce poskytuje ucelený pohled na vliv různých faktorů na hladiny kortizolu u koní, s důrazem na bolest a věk. Výsledky ukázaly, že bolest významně ovlivňuje hladiny kortizolu, přičemž koně trpící bolestí vykazují vyšší koncentrace tohoto hormonu.

Tento závěr potvrzuje roli kortizolu jako biomarkeru pro identifikaci bolestivých stavů u koní, což je v souladu s předchozími studiemi, které naznačují silnou asociaci mezi bolestí a zvýšenými hladinami kortizolu. Měření kortizolu může pomoci včasné identifikovat koně trpící bolestí nebo stresem, což umožní efektivnější péči a zlepšení životních podmínek.

Naopak, vliv věku na hladiny kortizolu nebyl potvrzen, přičemž rozdíly mezi věkovými skupinami nebyly statisticky významné. Tento výsledek ukazuje na složitost faktorů, které ovlivňují reakci na stres a bolest. Je však třeba mít na paměti, že studovaný vzorek byl omezený a výsledky by mohly být ovlivněny širším spektrem individuálních rozdílů, zdravotního stavu a dalších proměnných, které nebyly v této práci podrobně zohledněny.

V oblasti cirkadiánního rytmu kortizolu byly pozorovány změny v hladinách kortizolu během dne, nicméně tyto změny nebyly dostatečně silné, aby byly považovány za statisticky významné. I přesto, že odborná literatura potvrzuje existenci cirkadiánního rytmu u koní, výsledky této práce naznačují, že individuální faktory, jako jsou aktivita koní a environmentální podmínky, mohou ovlivnit sekreci kortizolu, což brání prokázání jasného denního vzorce.

Celkově lze výsledky této práce považovat za krok k lepšímu pochopení reakce koní na stres a bolest, což je zásadní pro efektivní řízení jejich zdraví a pohody. Získané závěry mohou sloužit jako základ pro další výzkumy v oblasti fyziologie koní. Pro další potvrzení a rozšíření těchto výsledků by bylo vhodné provést výzkum s širším vzorkem koní, zahrnujícím různé věkové skupiny, zdravotní stavy a další faktory, které by mohly ovlivnit hladiny kortizolu.

8 Literatura

Abdallah CG, Geha P. 2017. Chronic Pain and chronic Stress: Two Sides of the Same Coin? *Chronic Stress* **1**:1-10

AboEl-Maaty AM. 2011. Stress and its effects on horses reproduction. *Veterinary Science Development* **1**(1): 54-57

Aboushaar N, Serrano N. 2024. The mutually reinforcing dynamics between pain and stress: mechanisms, impacts and management strategies. *Frontiers in Pain Research* **5**

Andersen PH, Glerup KB, Wathan J, Coles B, Kjellst rm H, Broom  S, Lee YJ, Rashid M, Sonder C, Rosenberg E, Forster D. 2018. Can a Machine Learn to See Horse Pain? An Interdisciplinary Approach Towards Automated Decoding of Facial Expressions of Pain in the Horse. *Measuring Behavior 2018-11th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research* 6-8 June, 2018

Apilux A, Rengpipat S, Suwanjang W, Chailapakul O. 2018. Development of competitive lateral flow immuno-assay coupled with silver enhancement for simple and sensitive salivary cortisol detection. *EXCLI Journal* **17**: 1198-1209

Ashley FH, Waterman-Pearson AE, Whay HR. 2005. Behavioural assessment of pain in horses and donkeys: application to clinical practice and future studies. *Equine Veterinary Journal* **37**(6): 565-575

Aurich J, Wulf M, Ille N, Erber R, von Lewinski M, Palme R, Aurich C. 2015. Effects of season, age, sex and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domestic Animal Endocrinology* **52**: 11-16

Ayala I, Martos NF, Silvan G, Gutierrez-Panizo, Clavel JG, Illera JC. 2012. Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in veterinary Science* **93**(1): 103-107

Balasamy S, Atchudan R, Arya S, Gunasekaran BM, Nesakumar N, Sundramoorthy AK. 2014. Cortisol: Biosensing and detection strategies. *Clinica Chimica Acta* **562**

Banse HE, Getachew F, Levy M, Smits J. 2020. Influence of season and pituitary pars intermedia dysfunction on hair cortisol concentration in horses. *Domestic Animal Endocrinology* **72** (106375)

Blum CA, Velly L, Brochet Ch, Zigler F, Tavolacci MP, Hausfater P, Ivovschi VE. 2022. Relevance of cortisol and copeptin blood concentration in an experimental pain model. *Scientific reports* **12** (4767)

- Bohák Zs, Szabó F, Beckers JF, Mělo de Sousa N, Kutasi O, Nagy K, Szenci O. 2013. Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology* **45**: 38-42
- Bussi  res G, Jacques C, Lainay O, Beauchamp G, Leblond A, Cador   J-L, Desmaizi  res L-M, Cuvelliez SG, Troncy E. 2008. Development of a composite orthopaedic pain scale in horses. *Veterinary Science* **85** (2): 294-306
- Carlesso LC, Sturgeon JA, Zautra AJ. 2016. Exploring the relationship between disease-related pain and cortisol levels in women with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **24** (12): 2048-2054
- Cordero M, Brorsen BW, McFarlane D. 2012. Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and α -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domestic Animal Endocrinology* **43** (4): 317-324
- Contreras-Aguilar MD, Escribano D, Martín-Cuervo M, Tecles F, Cer  n J. 2018. Salivary alpha-amylase activity and cortisol in horses with acute abdominal disease: a pilot study. *BMC Veterinary Research* **14**:156
- Contreras-Aguilar MD, Lamy E, Escribano D, Cer  n JJ, Tecles F, Quiles AJ, Hevia ML. 2020. Changes in Salivary Analytes of Horses Due to Circadian Rhythm and Season: A Pilot Study. *Animals* **10** (9)
- Daglish J, Mama KR. 2016. Pain: Its Diagnosis and Management in the Rehabilitation of Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **32**(1): 13-29
- Dalirirad S, Han D, Steckl AJ. 2020. Aptamer-Based Lateral Flow Biosensor for Rapid Detection of Salivary Cortisol. *ACS Omega* **5** (51): 32890-32898
- Dalla Costa E, Bracci D, Dai F, Lebelt D, Minero M. 2017. Do Different Emotional States Affect the Horse Grimace Scale Score? A Pilot Study. *Journal of Equine Veterinary Science* **54**: 114-117
- Dalla Costa E, Minero M, Lebelt M, Stucke D, Canali E, Leach M.C. 2014. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration **19**(3)
- Fischer MJM, Mak SWY, McNaughton PA. 2010. Sensitisation of Nociceptors-What are Ion Channels Doing? *The Open Pain Journal* **3**: 82-96
- Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. 2009. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clinical Biochemistry* **42**(12): 1205-1217

Giannetto C, Fazio F, Vazzana I, Panzera M, Piccione G. 2012. Comparison of cortisol and rectal temperature circadian rhythms in horses: the role of light/dark cycle and constant darkness. *Biological rhythm Research* **43**(6): 681-687

Gleerup KB, Lindegaard C. 2016. Recognition and quantification of pain in horses: A tutorial review. *Equine Veterinary Education* **28**(1): 45-57

Guedes A, 2017. Pain Management in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **33** (1): 181-211

Gracely RH. 1999. Pain measurement. *Acta Anesthesiol Scand* **43**(9): 897-908

Hannibal KE, Bishop MD. 2014. Chronic stress, cortisol dysfunction, and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation. *Physical Therapy* **94** (12):1816-1825

Hart KA, Wochele DM, Norton NA, Mcfarlane D, Wooldridge AA, Frank N. 2016. Effect of Age, Season, Body Condition, and Endocrine Status on Serum Free Cortisol Fraction and insulin Concentration in Horses. *Journal Veterinary Internal Medicine* **30** (2): 653-663

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

Hernández-Avalos I, Mota-Rojas D, Mendoza-Flores JE, Casas-Alvarado A, Flores-Padilla K, Miranda-Cortes AE, Torres-Bernal F, Gómez-Prado J, Mora-Medina P. 2021. Nociceptive pain and anxiety in equines: Physiological and behavioral alternations. *Veterinary World* **14**(11): 2984-2995

Hinds JA, Sanchez ER. The Role of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis in Test-Induced Anxiety: Assessments, Physiological Responses, and Molecular Details. *Stresses* **2**: 146-155

Hurcombe DA. 2011. Hypothalamic-pituitary Gland Axis Function and Dysfunction in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **27** (1):1-17

Chmelíková E, Bolechová P, Chaloupková H, Svobodová I, Jovičic, Sedmíková M. 2020. Salivary cortisol as a marker of acute stress in dogs a review. *Domestic Animal Endocrinology* **72** (106428)

Irvine CHG, Alexander SL, 1994. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic animal endocrinology* **11** (2): 227-238

- Kang EH, Park SH, Oh YI, Kyoung WS. 2022. Assessment of salivary alpha-amylase and cortisol as a pain related stress biomarker in dogs pre-and post-operation. *BMC Veterinary Research* **18** (31)
- Khelifa L, Hu Y, Jiang N, Yetisen AK. 2022. Lateral flow assays for hormone detection. *Lab Chip* **22** (2451)
- King SL, Hegadoren KM. 2002. Stress Hormones: How Do They Measure Up? *Biological Research For Nursing* **4** (2): 92-103
- Lelláková M, Lešková L, Florián M, Mesarčová L, Skurková L, Petřková B, Takáčová D, Kottferová J. 2022. Cortisol Concentration in Horsehair and its Relationship to Body Location, Coat Colour, and Gender. *Journal of Equine Veterinary Science* **115** (104010)
- Lawson AL, Opie RR, Stevens KB, Knowles EJ, Mair TS. 2020. Application of an equine composite pain scale and its association with plasma adrenocorticotrophic hormone concentrations and serum cortisol concentrations in horses with colic. *Equine Veterinary Education* **32** (11):20-27
- Mama KR, Hendrickson DA. 2002. Pain Management and Anesthesia. *Veterinary Clinics Equine Practice* **18**
- Mazzola SM, Colombani C, Pizzamiglio G, Cannas S, Palestini C, Dalla Costa E, Gzzonis AB, Bionda A, Crepaldi P. 2021. Do You Think I AM Living Well? A Four-Season Hair Cortisol Analysis on Leisure Horses in Different Housing and Management Conditions. *Animals* **11**(7)
- Medill SA, Janz DM, McLoughlin PD. 2023. Hair Cortisol Concentrations in Feral Horses and the Influence of Physiological and Social Factors. *Animal* **13** (2133)
- Merl S, Scherzer S, Palme R, Möstl E. 2000. Pain causes increased concentrations of glucocorticoid metabolites in horse feces. *Journal of Equine Veterinary Science* **20** (9): 586-590
- Middleton C. 2003. Understanding the physiological effects of unrelieved pain. *Nurs Times* **99** (37): 28-31
- Mohammadi F, Zahraee H, Mohammadali IK, Habibi ZS, Taghdisi SM, Abnous K, Khoshbin Z, Chen Ch. 2024. Recent advances in aptamer-based platforms for cortisol hormone monitoring. *Talanta* **266** (125010)
- Mohd Azmi NAS, Juliana N, Azmani S, Mohd Effendy N, Abu IF, Mohd Fahmi Teng NI, Das S. 2021. Cortisol on circadian rhytm and its effect on cardiovascular systém. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* **18** (2)

Molony V, Kent J.E. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *Journal of Animal Science*, **75**(1):266-272

Mongillo P, Prana E, Gabai G, Bertotto D, Marinelli L. 2014. effect of age and sex on plasma cortisol and dehydroepiandrosterone concentrations in the dog (*Canis familiaris*). *Research in Veterinary Science* **96** (1):33-38

Muir WW. 2010. Pain: Mechanisms and Management in Horses. *Vet Clin Equine* **26**: 467-480

Nannarone S, Ortolani F, Scilimati N, Gialletti R, Menchetti L. 2024. Refinement and revalidation of the Equine Ophthalmic Pain Scale: R-EOPS a new scale for ocular pain assessment in horses. *The Veterinary Journal* **304** (106079)

Niinistö KE, Korolainen RV, Raekallio MR, Mykkänen AK, Koho NM, Ruohoniemi MO, Leppäluoto J, Pösö AR. 2010. Plasma levels of heat shock protein 72 (HSP72) and β -endorphin as indicators of stress, pain and prognosis in horses with colic. *The Veterinary Journal* **184**: 100-104

Paladino S, Rankins EM, McKeever KH, Malinowski K. 2023. 109 Use of the Horse Grimace Scale to evaluate markers of stress in horses involved in equine assisted activities. *Journal of Equine Veterinary Science* **124**

Pawluski J, Jegu P, Henry S, Bruchet A, Palme R, Coste C, Hausberger M. 2017. Low plasma cortisol and fecal cortisol metabolite measures as indicators of compromised welfare in domestic horses (*Equus caballus*). *PLoS ONE* **12**(9)

Peeters M, Sulon J, Beckers JF, Ledoux D, Vandenheede M. 2011. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Veterinary journal* **43** (4): 487-493

Ponac M, Kempenaar J, Shroot B, Craon JC. 1986. Glucocorticoids: binding affinity and lipophilicity. *Journal of Pharmaceutical Science* **75**(10): 973-975

Pritchett LC, Ulibarri C, Roberts MC, Schneider RK, Sellon D. 2003. Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic. *Applied Animal Behaviour Science* **80**: 31-43

Prunier A, Mounier L, Le Neindre P, Leterrier C, Morméde P, Paulmier V, Prunet P, Terlouw C, Guatteo R. 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Animal* **7**(6): 998-1010

Raekallio M, Leino A, Vainio O, Scheinin M. 2010. Sympatho-adrenal activity and the clinical sedative effect of detomidine in horses. *Equine Veterinary Journal* **24**:66-68

- Raekallio M, Taylor PM, Bennett RC. 1997. Preliminary Investigations of Pain and Analgesia Assessment in Administered Phenylbutazone or Placebo After Arthroscopic Surger. *Veterinary Surgery* **26**:150-155
- Reincke M, Fleseriu M. Cushing Syndrome: A Review. *JAMA* **330**(2): 170-181
- Ramamoorthy S, Cidlowski JA. 2016. Corticosteroids: Mechanism of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am* **42** (1):15-31
- Rietmann TR, Stauffacher M, Bernasconi P, Auer JA, Weishaupt MA. 2004. The Association between Heart Rate, Heart Rate Variability, Endocrine and Behavioural Pain Measures in Horses Suffering from Laminitis. *J.Vet. Med.* **51**:218-225
- Robertson SA, Steele CJ, Chen Ch-L. 1990. Metabolic and hormonal changes associated with arthroscopic surgery in the horse. *Equine Veterinary Journal* **22**(5): 313-316
- Shirtcliff EA, Buck RL, Laughlin MJ, Hart T, Cole CR, Slowey PD. 2015. Salivary cortisol results obtainable within minutes of sample collection correspond with traditional immunoassays. *Clinical Therapeutics* **37**(3): 505-514
- Sikorska U, Maško M, Ciesielska A, Zdrojkowski L, Domino M. 2023. Role of Cortisol in Horse's Welfare and Health. *Agriculture* **13**(2219)
- Sellon DC, Roberts MC, Blikslager AT, Ulibarri C, Papich MG. 2004. Effects of continuous rate intravenous infusion of butorphanol on physiologic and outcome variables in horses after celiotomy. *J. Vet. Intern. Med.* **18**: 555-563
- Sneddon LU, Elwood RW, Adamo SA, Leach MC. 2014. Defining and assessing animal pain. *Animal Behaviour* **97**:201-212
- Stamou MI, Colling C, Dichtel LE. 2023. Adrenal aging and its effects on the stress response and immunosenescence. *Maturitas* **168**: 13-19
- Stegmann GF, Jones RS. 1998. Perioperative plasma cortisol concentration in the horse. *Journal of the South African Veterinary Association* **69**(4)
- Strzelec K, Kankofer M, Pietrzak S. 2011. Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise. *Acta Vet. Brno* **80**: 101-105
- Taylor PM, Pascoe PJ, Mama KR. 2002. Diagnosing and treating pain in the horse. Where are we today? *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **18**(1): 47-60
- Turpeinen U, Hämäläinen E. 2013. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology Metabolism* **27** (6): 795-801

UniBiotech. 2025. Human IgA (Immunoglobulin A) ELISA Kit. UniBiotech. India. Available from <https://www.unibiotech.in/category/elisa-kits/elk-biotechnology-elisa-kits/human-iga-immunoglobulin-a-elisa-kit.html> (accessed March 2025).

Van Loon JPAM, Macri L. 2021. Objective Assessment of Chronic Pain in Horses Using the Horse Chronic Pain Scale (HCPS): A Scale-Construction Study. *Animals* **11** (1826)

Van loon JPAM, Van Dierendonck MC. 2018. Objective pain assessment in horses. *The Veterinary Journal* **242**:1-7

Walters ET. 2023. Exaptation and Evolutionary Adaptation in Nociceptor Mechanisms Driving Persistent Pain. *Brain, Behavior and Evolution* **98**:314-330

Wathan J, Burrows AM, Waller BM, McComb K. 2015. The Equine Facial Action Coding System. *PLOS ONE* **10** (9)

Werner LC, de Oliveira GM, Daros RR, Dalla Costa E, Michelotto PV. 2024. Enhancing the Horse Grimace Scale (HGS): Proposed updates and anatomical descriptors for pain assessment. *The Veterinary Journal* **307** (106223)

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACTH – Adrenokortikotropní hormon (Adrenocorticotropic Hormone)

ATP – Adenosintrifosfát (Adenosine Triphosphate)

CMP – Composite Measure Pain Scale (kompozitní škála pro hodnocení bolesti, často používaná u zvířat)

CPS – Composite Pain Scale (validovaná multifaktorová škála bolesti, obsahující různé behaviorální i fyziologické parametry)

CRH – Kortikotropin uvolňující hormon (Corticotropin-Releasing Hormone)

DNA – Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)

ELISA – Enzymová imunosorbentní analýza (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EQUUS-FAP – Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (část hodnoticího systému bolesti koní podle výrazu obličeje)

FACS – Facial Action Coding System (systém kódování mimických změn (např. při bolesti) na základě aktivity obličejových svalů)

HCP CPS – Horse Chronic Pain Composite Pain Scale

HCPS – Horse Chronic Pain Scale: komplexní škála skládající se z behaviorální části (HCP CPS) a mimické části (EQUUS-FAP).

HGS – Horse Grimace Scale: nástroj pro hodnocení bolesti u koní podle výrazu obličeje (mimiky)

HPA – Hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osa (Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis)

LFT – Laterální průtokové testy (Lateral Flow Tests)

RNA – Ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)

SAM – Sympatoadrenální systém (Sympatho-Adrenal Medullary System)