

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Vliv prováděné fyzioterapie u psů se zdravotními  
problémy na hladinu jejich stresových hormonů**

**Diplomová práce**

**Bc. Šárka Benešová  
Zájmové chovy zvířat**

**Mgr. Ing. Tereza Krejčová, Ph.D.**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv prováděné fyzioterapie u psů se zdravotními problémy na hladiny jejich stresových hormonů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Ing. Tereze Krejčové, Ph.D. a MVDr. Martině Frühauf Kolářové

# Vliv prováděné fyzioterapie u psů se zdravotními problémy na hladinu jejich stresových hormonů

## Souhrn

Fyzioterapie se v současnosti u psů stává standardní součástí terapie mnoha ortopedických i neurologických problémů. Díky možnosti využití velkého množství rozdílných fyzioterapeutických přístupů se ovšem pes často při samotném fyzioterapeutickém ošetření setkává se zcela novými a pro něj neznámými podněty, které u něho mohou vyvolat stresovou reakci. Těmito podněty může být například koupel ve vodě, manipulace a dotýkání se částí těla cizím člověkem, což je často spojené i s určitou bolestivostí, polohování do pozic, které nejsou pro psa zcela přirozené a nemusí být pro psa komfortní. Reakce na všechny tyto fyzioterapeutické přístupy jsou u psů samozřejmě velice individuální a mohou významně ovlivnit účinnost prováděné fyzioterapie. Stejně tak individuální jsou i reakce na ostatní stresové podněty. Obecně se stresovou reakcí spouští regulace mechanismů, která má za cíl ochránit jedince před jakýmkoliv nebezpečím. Může se jednat o reakci útoku nebo útěku, ale i reakci na molekulární úrovni, která má za cíl udržet rovnováhu vnitřního prostředí organismu – tzv. homeostázu. Stresová reakce je vysoce koordinovaným souborem fyziologických reakcí organismu, které provází změny hladin klíčových hormonů, především hormonů kůry a dřeně nadledvin. Tyto hormony lze využít jako markery stresu. U psů se nejčastěji jako marker posouzení míry stresu používá stanovení hladiny kortizolu a sledování změn jeho hladiny, ke kterým v průběhu stresové reakce dochází.

Cílem této diplomové práce bylo sledováním změn hladin stresových hormonů (kortizolu) ověřit hypotézu, že psi, u kterých byla opakovaně prováděna fyzioterapie v rámci řešení jejich zdravotních problémů, budou mít v průběhu času nižší stresovou odezvu na samotnou fyzioterapii, která se projeví i nižší hladinou uvolněných stresových hormonů.

K ověření této hypotézy byla navázána spolupráce s fyzioterapeutickým centrem pro psy – DOGGURU, kde byly psům odebírány vzorky slin vždy těsně před fyzioterapeutickým ošetřením a také ihned po jeho skončení. Ke stanovení hladiny kortizolu ze získaných vzorků poté byla využita metoda ELISA.

Provedenými experimenty na testovaném souboru psů se stanovenou hypotézu nepodařilo potvrdit. Je možné, že velikost souboru sledovaných psů nebyla dostatečná, neboť kompletní soubor vzorků slin byl získán pouze od 6 jedinců. Také je možné, že očekávaného výsledku by bylo dosaženo častějšími opakováními fyzioterapeutického ošetření, v této diplomové práci byli hodnoceni psi pouze během 3 po sobě jdoucích ošetření. V této diplomové práci bylo ověřeno, že míra stresové reakce na fyzioterapeutické ošetření byla velice individuální a v tomto případě nebyla závislá na věku, velikosti, ani pohlaví psa, a dokonce ji neovlivňovala ani denní doba provedené fyzioterapie.

K doplnění výsledků a ověření stanovené hypotézy by bylo vhodné rozšířit soubor sledovaných psů i počet opakování jednotlivých fyzioterapeutických ošetření v rozsáhlejší studii, která by lépe reflektovala danou problematiku a lépe zhodnotila účinnost fyzioterapie v souvislosti s mírou stresové reakce, kterou u psa vyvolává.

**Klíčová slova:** fyzioterapie, kortizol, pes, sliny, zoorehabilitace

# **The effects of physiotherapy treatment on stress levels of dogs with health problems**

## **Summary**

Physical therapy is becoming a standard part of therapy dealing with both orthopedical and neurological issues in dogs. Due to plethora of different approaches to physical therapy a dog may be faced with unknown stimuli during the physical therapy session which can cause a stress reaction. Examples of said stimuli include baths, strangers manipulating with and touching the dog sometimes causing pain as well as forcing the dog into postures that can be unnatural and uncomfortable. Reactions to any kind of physical therapy of course differ in each dog and their particular reactions significantly influence the effectiveness of physical therapy. Different dogs react to a stress stimulus differently. A stress reaction at its core serves to protect an individual against danger. Such reactions include fight or flight and even a reaction on molecular level that seeks to keep balance inside an organism – a homeostasis. A stress reaction is a highly coordinated set of physiological reaction of an organism accompanied by changes in levels of key hormones primarily those excreted by adrenal glands. These hormones can be used as stress markers. The most commonly used stress level marker is the hormone cortisol.

This thesis is meant to confirm the hypothesis that dogs repeatedly exposed to physical therapy will in time exhibit a lessened stress response to it. Stress response will be measured by changes in stress hormone (cortisone) levels.

To confirm this hypothesis a collaboration was established with a canine physical therapy center, 'Dogguru'. Samples of saliva were taken from dogs immediately before and after a physical therapy session. The ELISA method was used to determine the cortisone levels in the saliva samples.

The hypothesis was not confirmed by the experiment. The sample size was perhaps insufficient as a complete set of saliva samples was obtained from only six dogs. It is possible that the hypothesized outcome would be reached if physical therapy sessions were held more often. Dogs included in this experiment were only exposed to physical therapy in three consecutive sessions. The stress levels in reaction to physical therapy in dogs included in this experiment were not correlated to a dog's age, size or sex. There was no indication that the time of day of the session had any effect on the dog's stress level.

And additional experiment with a larger sample size and more consecutive physical therapy sessions should be ran to determine the validity of the hypothesis.

**Keywords:** physiotherapy, cortisol, dog, saliva, zoorehabilitation

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Fyzioterapie .....</b>	<b>11</b>
3.1.1	Průběh fyzioterapie .....	11
3.1.2	Metody fyzioterapie .....	11
3.1.2.1	Hydroterapie .....	12
3.1.2.2	Termoterapie .....	12
3.1.2.3	Aktivní fyzické cvičení.....	13
3.1.2.4	Manuální metody fyzioterapie .....	13
3.1.3	Masáž .....	13
<b>3.2</b>	<b>Stres.....</b>	<b>15</b>
3.2.1	Stresor .....	15
3.2.2	Stresová reakce .....	16
3.2.2.1	Osa sympato-adreno-medulární (SAM) .....	17
3.2.2.2	Osa hypotalamo-hypofyzární (HPA).....	18
3.2.3	Vliv stresu na zdraví jedince .....	18
<b>3.3</b>	<b>Stresové hormony .....</b>	<b>19</b>
3.3.1	Hormony kůry nadledvin .....	19
3.3.1.1	Glukokortikoidy .....	19
3.3.2	Hormony dřene nadledvin .....	20
3.3.2.1	Adrenalin a noradrenalin .....	20
<b>3.4</b>	<b>Laboratorní možnosti stanovení hladiny kortizolu a dalších markerů stresu</b>	<b>21</b>
3.4.1	Salivární vzorky .....	21
3.4.2	Vzorky krve.....	22
3.4.3	Vzorky srsti.....	22
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Odběr a zpracování dat.....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>38</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>43</b>

**10 Samostatné přílohy..... I**



# 1 Úvod

Fyzioterapie je nejenom u psů, ale i u dalších zvířat v zájmových chovech stále více využívaná, a to buď u jedinců se zdravotními problémy, nebo i jako účinná prevence potíží (Price 2014). Ve veterinární medicíně lze využitím fyzioterapie dosáhnout mnohdy výborných terapeutických výsledků, a to je také důvodem současného intenzivního rozvoje této oblasti (Mahaseth & Raghul 2021). v dnešní době je tedy fyzioterapie a rehabilitace zvířat většinou již standardní součástí terapie při rekonvalescenci ortopedických či neurologických pacientů (Price 2014)

Fyzioterapeutické metody se postupně vyvíjí již od roku 1939 (Price 2014). Fyzioterapie obecně zahrnuje komplexní péči o pohybový aparát a zahrnuje mnoho léčebných metod jako hydroterapii, termoterapii, aktivní cvičení, či manuální metody. Zároveň se tyto techniky často propojují (Canapp et al. 2009).

Během samotného průběhu fyzioterapeutického ošetření se dané zvíře může setkat pro něj se zcela novými, a ne vždy příjemnými podněty, které u něho mohou vyvolat stresovou reakci. Příkladem lze uvést koupel ve vodě nebo polohování do pozic, které nejsou pro daného jedince komfortní a mohou být spojeny i s určitou mírou bolesti, zvláště při terapii potíží ortopedického charakteru. Spuštěním stresové reakce se v organismu aktivují mechanismy, které mají ve svém důsledku jedince chránit před nebezpečím (Möstl & Palme 2002). Stresová reakce je komplexním souborem fyziologických kaskád, které vedou ke zvýšení hladin klíčových hormonů, především kůry a dřeně nadledvin (Roth 2021). Hladiny těchto hormonů lze tedy využít jako vhodné markery stresu.

Vystavení jedince stresovému podnětu během fyzioterapeutického ošetření může vést k výraznému snížení účinnosti takového ošetření. Pokud je jedinec opakovaně vystavován stejnému typu stresového podnětu, většinou se do určité míry jeho organismus dokáže na tento podnět adaptovat (Koolhaas et al. 2006). Tato schopnost adaptace je však velice individuální a je těžké její míru predikovat.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem této diplomové práce je sledováním změn hladin stresových hormonů ověřit hypotézu, že psi, u kterých je opakovaně prováděna fyzioterapie v rámci řešení jejich zdravotních problémů, budou mít v průběhu času nižší stresovou odezvu na samotnou fyzioterapii, která se projeví i nižší hladinou uvolněných stresových hormonů.

## 3 Literární řešerše

### 3.1 Fyzioterapie

Veterinární léčení zahrnující fyzioterapeutické metody se vyvíjí již od roku 1939 (Price 2014). Průkopníkem fyzioterapie zvířat byl humánní fyzioterapeut, Sir Charles Strong, který kromě léčby členů královské rodiny, léčil také jejich koně. Zároveň byl autorem jedné z prvních knih o fyzioterapii zvířat (Veenman 2006; Calatayud 2019). v současnosti je fyzioterapie ve veterinární medicíně čím dál častěji využívána jako účinná součást terapií, a to především pohybového aparátu. Výrazných výsledků dosahuje i při řešení potíží neurologického charakteru. Metody fyzioterapie jsou zaměřeny na zlepšení a udržení mobility daného jedince. Účinky fyzioterapie jsou prokázány řadou studií, a to jak na lidech, tak i na zvířatech (Mahaseth & Raghul 2021). U psů byl například sledován její přínos při terapii dysplazie kyčelního kloubu nebo onemocnění meziobratlových plotének. Efekt fyzioterapie byl prokázán u mladých, starších i geriatrických zvířat (Price 2014). Pro některé pacienty může být účinná fyzioterapie jedinou možnou pomocí, například pokud pacienta nelze z určitých důvodů operovat nebo je daná problematika chirurgicky neřešitelná (Shumway 2007). U zvířat se fyzioterapie nejčastěji využívá u pacientů po operacích, dále u pacientů s neurologickými potížemi, a také u geriatrických pacientů (Wetzel 2009). Po operaci vhodná rehabilitace urychluje proces rekonvalescence, snižuje bolest, zvyšuje pohyblivost, a dokonce snižuje pravděpodobnost rozvoje zánětu. Cílem fyzioterapie je regenerace nebo rychlejší zhojení zraněné či traumatizované tkáně. Fyzioterapeutické ošetření by mělo probíhat v klidném prostředí, kde pacienta nic nerozptyluje. v takovémto prostředí se zvíře lépe zrelaxuje, díky čemuž je k samostatnému ošetření vnímavější (Shumway 2007).

#### 3.1.1 Průběh fyzioterapie

Před samotnou fyzioterapií provádí terapeut objektivní hodnocení, které zahrnuje sledování pacienta v klidu, při chůzi, v klusu a mnohdy i při přechodu z lehu do sedu. Po tomto hodnocení terapeut prohmata většinu hlavních svalových skupin, aby posoudil symetrii, tonus, případně, jestli je patrný otok či je bolestivé. v případě pooperační terapie lze rehabilitaci zahájit většinou ihned po operaci (Price 2014). Každá terapie je obvykle zahájena 2 až 3 minutovou masáží, která napomáhá relaxaci. Při rehabilitaci zaměřené na konkrétní končetinu leží obvykle pacient na boku s poškozenou končetinou nahoře. Při práci s určitým kloubem by se ostatní klouby dané končetiny neměly hýbat. Fyzioterapeut by měl neustále sledovat daného pacienta, aby mohl případně včas zareagovat, pokud by začal vykazovat známky nepohodlí či bolesti, jako odtažení se, vokalizaci, napnutí končetiny nebo otočení hlavy směrem k terapeutovi. Pokud by taková situace nastala, měl by terapeut manipulaci upravit (Shumway 2007).

#### 3.1.2 Metody fyzioterapie

Fyzioterapie zahrnuje mnoho léčebných metod a technik, které může fyzioterapeut nebo veterinární lékař využít (Price 2014). Metody lze také vhodně kombinovat, například spojení vodní terapie a vhodného typu suché terapie (Canapp et al. 2009). Při fyzioterapii se k léčbě

pohybového aparátu využívá celá řada fyzikálních faktorů, jako je teplo, chlad, nízkofrekvenční ultrazvuk, elektrická stimulace nebo laser (Owen 2006). Nejdůležitější je dbát při léčbě na individualitu každého pacienta (Canapp et al. 2009).

### 3.1.2.1 Hydroterapie

Hydroterapie je metoda, při které zvíře buď plave nebo chodí po podvodním běžeckém pásu. Nejčastěji bývá hydroterapie využívána při pooperační rekonvalescenci ortopedických a neurologických pacientů (Wetzel 2009). Zároveň může být využívána u pacientů s obezitou (Chauvet et al. 2011). Pohyb ve vodě je pro zvířata často jednodušší, a hlavně méně bolestivý než na pevném povrchu (Wang et al. 2007). Při hydroterapii se využívají unikátní fyzikální vlastnosti vody, jako její vztlak, relativní hustota, viskozita a odpor. Voda má oproti vzduchu vyšší hustotu a viskozitu, proto při pohybu ve vodě musí pacient vynaložit větší úsilí, aby odpor vody překonal. Hustota a viskozita dále působí tak, že je pro pacienta výrazně snazší držet ve vodě rovnováhu (Owen 2006). Ve vodě působí na tělo vztlak (Prankel 2008). Díky vztlaku je pak cvičení méně bolestivé a méně namáhavé na klouby (Wetzel 2009). Další výhodou hydroterapie je využití je hydrostatického tlaku vody, který celkově působí na tělo, podporuje cirkulaci krve a redukuje otok. Určité riziko hydroterapie může nastat u brachycefalických plemen při vyšším fyzickém výkonu, neboť kvůli hydrostatickému tlaku a většímu odporu vody dochází k mírnému stlačení hrudníku (Prankel 2008). Hydroterapie je vhodná především pro ochrnuté pacienty, pacienty s poškozením periferních nervů, pacienty po operaci kloubů, zejména kyčlí, kolen a loktů, pacienty s úrazy páteře a pacienty s artrózou nebo sníženou hybností kloubů (Wetzel 2009).

### 3.1.2.2 Termoterapie

Termoterapie je fyzioterapeutická metoda využívající pozitivní účinky tepelné energie. Bývá využívána hlavně ke zmírnění bolesti a otoků.

Jedna z možností termoterapie je terapie chladem nebo kryoterapie. Chlad napomáhá zvládnutí akutní fáze onemocnění tím, že inhibuje zánětlivý proces a částečně poskytuje analgezii. Kryoterapie se běžně používá k léčbě pooperačních zánětů, muskuloskeletálních traumat a svalových křečí (Shumway 2007). Existuje více způsobů aplikace této terapie. Je možné použít gelové obklady, ledové masáže, chladicí spreje a další (Millis & Levine 2014). Aby byla léčba co nejefektivnější, měl by být chlad aplikován ihned po úrazu nebo operaci. Tato terapie vede k lokálnímu snížení teploty postiženého místa (Owen 2006). Terapie chladem také ovlivňuje vazokonstrikci, pomáhá při zástavě krvácení a snižuje bolest (Canapp et al. 2009). Kryoterapie může být využívána také v prevenci proti návratu otoku. Chladivý obklad by nikdy neměl být přímo na kůži pacienta, vždy by mezi chladicí těleso a kůži zvířete měla být vložena izolační vrstva (Owen 2006).

Opačným přístupem je terapie teplem. Tuto terapii je vhodné provádět těsně před protahováním nebo cvičením. Díky zvýšení teploty měkkých tkání dochází ke změnám jejich elasticity, což může vést k většímu rozsahu pohybu a snížení ztuhlosti kloubů (Millis & Levine 2014). Teplo může pronikat zhruba do hloubky 2 cm pod kůži. Při této technice mohou být zdrojem tepla vodní lázně, zábaly, či infračervené spektrum světla. Pokročilejší technikou je

termoterapie, při které teplo proniká do hlubokých částí těla. Tato technika je mnohem náročnější, neboť do tkání musí proniknout energie, která je až v daném místě přeměněna na tepelnou, toho lze dosáhnout pomocí ultrazvuku nebo krátkovlnné diatermie (Owen 2006).

### 3.1.2.3 Aktivní fyzické cvičení

Aktivní fyzické cvičení je většinou zaměřené na propriorecepci, rovnováhu, rozložení váhy těla, zesílení, správné držení těla a správnou chůzi. Ortopedický pacient se většinou vyhýbá používání a zatěžování postižené končetiny. Při aktivním fyzickém cvičení je pohyb řízený, a proto je aktivně zapojena i postižená končetina. Takovéto cvičení napomáhá flexi a extenzi, které jsou uskutečňovány aktivní kontrakcí a pasivním uvolňováním svalů (Owen 2006). Při cvičení se využívá chůze po nakloněné rovině, po schodech i přes překážky. Dále klus, přechody, skákání přes překážky a vstávání ze sedu do stoje, nebo z lehu do stoje (Millis & Levine 2014). Při cvičení se často využívají různé cvičební pomůcky, jako míče, překážky, běžecké pásy, balanční plošiny. Cvičební míče se mohou využívat pro nápravu špatného postavení končetin (Owen 2006). Cílem těchto cvičení je zvýšení pohyblivosti kloubů a zpevnění svalů. U psů je téměř nemožné posilovat jeden konkrétní sval, proto se většinou posilují celé svalové skupiny. Důležité je správně rozvrhnout délku cvičení a zátěž, a to s ohledem na povahu zranění (Levine et al. 2001).

### 3.1.2.4 Manuální metody fyzioterapie

Manuální metody fyzioterapie zahrnují pasivní i aktivní asistované pohyby. Účelem těchto metod je zvládnutí bolesti v případě poranění kosterní, nervové nebo svalové soustavy (McGowan et al. 2007). Pasivní terapie zahrnuje tři metody – pasivní rozsah pohybu, strečink, tedy maximální natažení šlach a svalů, a mobilizaci kloubů (Van Dyke 2009). Terapeut působí externí silou, která vytváří pohyb v kloubu a napíná či uvolňuje svaly. Díky tomu se také zvyšuje cirkulace krve, propriorecepce a stimuluje se proces hojení (Canapp et al. 2009). Pasivní terapie podporuje kvalitu synoviální tekutiny a kloubní výztuže, zabraňuje adhezi v kloubní dutině a napomáhá regeneraci měkkých tkání. Manuální metody fyzioterapie mohou také působit jako prevence zranění kloubů, svalů a šlach (Van Dyke 2009). Pomocí pasivního cvičení dochází k flexi a extenzi u všech kloubů poraněné končetiny v takovém rozsahu, jaký napodobuje přirozenou chůzi (Millis & Levine 2014). Pasivní cvičení zároveň zapojuje i poškozené svaly. Pokud je rozsah pohybu omezen narušením kloubního pouzdra je nutné zahájit odpovídající léčbu (Canapp et al. 2009). Při strečinku se tkáně protahují přes jejich přirozený rozsah, čímž se postupně zvyšuje jejich flexibilita (Millis & Levine 2014). Před strečinkem by vždy mělo dojít k zahřátí daných partií těla. To může probíhat ve formě zvýšení pohybové aktivity (chůze, klusu) či formou masáže. Předchází se tím poškození svalů, šlach, vazů či kloubních pouzder (Hourdebaigt 2012). Strečink snižuje napětí motorických nervů v celém těle, čímž dochází i ke zklidnění psa (Levine et al. 2001; Hourdebaigt 2012).

### 3.1.3 Masáž

Masáž je jemnou manipulací se svaly a měkkými tkáněmi. Tahy by měly směřovat k srdci, což podporuje cirkulaci krve žilním oběhem. Při masáži terapeut používá celou ruku,

která je tedy v plném kontaktu s masírovanou částí těla. Tlak je rovnoměrný po celou dobu tahu. Manipulace rukou s měkkými tkáněmi vede k podpoře krevního i lymfatického oběhu, snížení otoků, uvolnění a natažení šlach nebo dokonce i k minimalizaci tvorby jizev. Mechanické účinky masáže také stimulují odstraňování odpadních látek z tkání (Millis & Levine 2014). Hlazení a různé dotyky používané při masáži snižují reakce psa na stres, zmírňují jeho úzkost a neklid (Shumway 2007). Díky masáži terapeut také získává další diagnosticky důležité informace, například o lokální teplotě dané části těla – horká oblast většinou upozorňuje na vyšší prokrvení tkáně, které může být spojené se zánětem, naopak chladná kůže signalizuje nedostatečné prokrvení tkáně, což může být spojeno s nefyziologickou svalovou kontrakcí či spasmem v dané oblasti. Dotykem lze také poměrně přesně detekovat případný otok. Cílem masáže může být uvolnění, zklidnění, stimulace svalů, zahřátí, nebo regenerace. Při masáži se uvolňují endorfiny, které pomáhají od bolesti (Hourdebaigt 2012). U úzkostných a nervózních pacientů se doporučuje masáž přidat na začátek všech fyzioterapeutických technik. Masáže nejsou vhodné pro pacienty s hypotenzí, horečkou nebo s infekčními nemocemi (Shumway 2007).

## 3.2 Stres

Termín stres a stresová reakce lze použít pro označení stavů vyvolaných v reakci na stresový podnět, který vede ke změnám vnitřního prostředí organismu (Creel 2001; Roth 2021). Většina definic popisuje stres jako stav narušující homeostázu neboli stálost vnitřního prostředí. Jednotlivé fáze stresové reakce organismu pak vedou k obnově této homeostázy (Reeder & Kramer 2005; Bartolomé & Cockram 2016). Stres je často vnímán spíše jako něco negativního, což však nemusí být vždy pravda (Kittnar et al. 2010). Stresová reakce slouží především k adaptaci organismu na daný podnět (Koolhaas et al. 2006) a je velice důležitá, pokud jedinci hrozí nebezpečí. Organismus díky stresové reakci spustí mechanismy potřebné k vlastní ochraně. Dochází k vyplavování stresových hormonů, zvýšení hladiny glukózy v krvi, zvýšení krevního tlaku a tepové frekvence a v důsledku těchto procesů také k lepšímu prokrvení životně důležitých orgánů. Reakce na běžné podněty, se kterými se jedinec musí vypořádat může mít pozitivní efekt a motivovat jedince k lepšímu výkonu. Taková reakce probíhá v reakci na eustres – mírný stres, který nevyvolává dlouhodobé narušení vnitřní homeostázy organismu. Díky zvýšení glykémie dochází například ke zlepšení kognitivních funkcí. Nebezpečný naopak může být dlouhodobý nebo chronický stres, který je označován jako distres (Kittnar et al. 2010). Ten nastává v případě, kdy tělo nedokáže obnovit homeostázu nebo když nadměrný psychogenní stres představuje hrozbu pro duševní zdraví (Hekman et al. 2014). Distres může ovlivnit fyzické, duševní i sociální zdraví zvířete. Bylo prokázáno, že distres zkracuje život zvířete. Navíc je spojen s různými poruchami fyzického zdraví, například poruchami imunitního systému. Ačkoli vystavení mírnému stresovému podnětu může zvýšit imunitní reakci vůči patogenu, chronický stres může naopak tlumit imunitní reakce organismu (Mills et al. 2014).

### 3.2.1 Stresor

Stresor je podnět, který vyvolává stresovou reakci. Stresory mohou být různého charakteru a původu. Mohou být vnitřní nebo vnější, například horečka, nedostatek potravy nebo nerovnováha v sociálním složení skupiny (Möstl & Palme 2002). Rovněž mohou být stresory takové, které mají vliv na emoce, tedy psychické stresory. Tyto stresory mohou vyvolávat úzkost, zlost nebo strach (Reeder & Kramer 2005). Působení stresoru se může lišit u různých jedinců v závislosti na individualitě daného jedince (Mills et al. 2014). Informace o vnitřních i vnějších podmínkách získává organismus pomocí receptorů (König v. Borstel et al. 2017). Mezi faktory ovlivňující schopnost adaptovat se na stresové podněty patří genotyp, zkušenost, věk a sociální podpora. Míra adaptability ovlivňuje intenzitu a délku trvání stresové reakce. Důležitá je také frekvence vystavení, délka trvání a intenzita působení daného stresoru. Stresová reakce na daný podnět se spustí okamžitě, jakmile centrální nervová soustava přijme informace z receptoru o působení stresoru (Reeder & Kramer 2005).

Prakticky všechny druhy savců žijí v nějaké formě společenství. Právě narušení sociálních vztahů je jedním z nejsilnějších stresorů, který může vyvolávat chronický stres. Naopak sociální podpora tento stres snižuje a tlumí (Koolhaas et al. 2006).

### 3.2.2 Stresová reakce

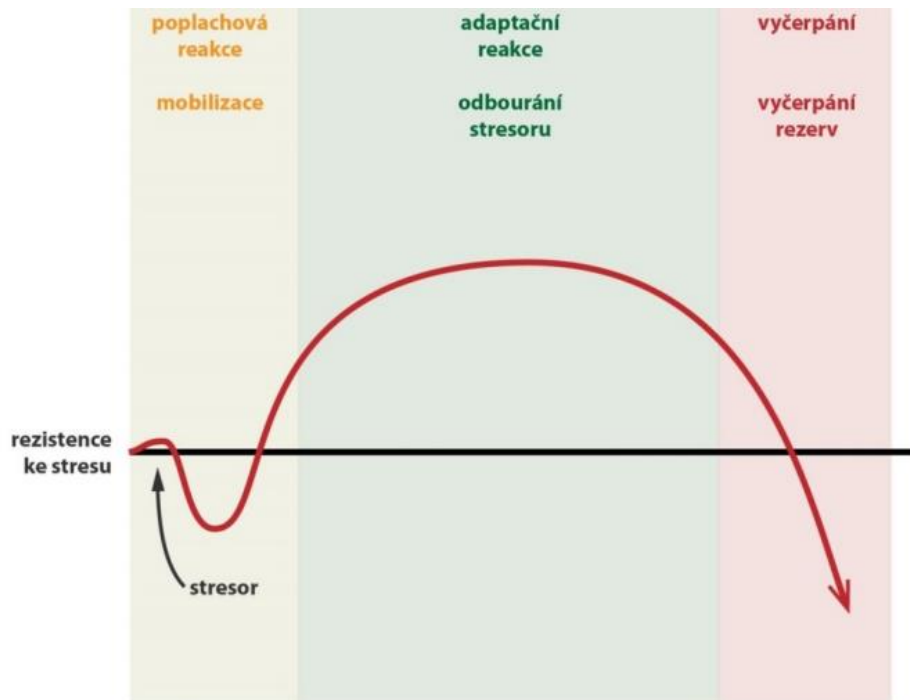
Stresové reakce je možné rozdělit z mnoha hledisek, například podle typu reakce organismu na behaviorální, fyziologické nebo reakce imunitního systému a další (Beerda et al. 1997). Typ reakce organismu na stresor je ovlivněn povahou stresoru (Mills et al. 2014; König et al. 2017).

V případě, že je organismus vystaven stresoru, spustí se stresová odpověď, která má za úkol ochránit jedince před negativním vlivem stresu. Ta vyvolává endokrinní a metabolické pochody v organismu. Odpověď probíhá jak na úrovni buněk, tak i na úrovni organismu jako celku (Möstl & Palme 2002). Stresová reakce začíná detekcí stresoru pomocí receptorů. Mozek vnímá podnět, zpracuje ho a vyšle zprávu do dřeně nadledvin, kde dojde k uvolnění adrenalinu. Zároveň vysílá podnět do hypofýzy ke stimulaci produkce adrenokortikotropního hormonu (ACTH). ACTH se krevním oběhem dostává do kůry nadledvin, kde také stimuluje sekreci hormonů (Roth 2021). Obvykle u obratlovců trvá 3-5 min, než tento proces vyústí ke zvýšení koncentrace glukokortikoidů (De Kloet et al. 2005) Reakce na stresor je závislá na rozpoznání podnětu, který je centrálním nervovým systémem vnímán jako hrozba pro udržení homeostázy. Následuje odezva v podobě obranných reakcí, které mají za úkol omezit vnímání stresoru. Odezvu řídí autonomní nervový systém a neuroendokrinní soustava (Bartolomé & Cockram 2016). Změny v chování jedince se projevují jako odezva změn probíhajících na molekulární úrovni (Koolhaas et al. 2006).

Chronický stres může zapříčinit obecné změny chování. Zejména, pokud je zvíře vystaveno opakovaně dlouhodobé stresové situaci, se kterou není schopno si samo poradit. Pes může reagovat pasivně depresivním chováním (je letargický), nebo aktivně depresivním chováním, které může přejít v chování stereotypní. Příkladem může být honění ocasu, točení se dokola nebo slintání (Mills et al. 2014).

Stresová reakce má vždy určitou posloupnost reakcí, které jsou součástí tzv. obecného adaptačního syndromu (GAS – general adaptation syndrome). Obecný adaptační syndrom je označením nespecifické fyziologické a behaviorální odpovědi na stresový podnět, která má za cíl urychleně obnovit homeostázu organismu. GAS probíhá ve třech fázích: poplachové, adaptační a fázi vyčerpání (Selye 1998). Průběh jednotlivých fází je naznačen na obrázku č. 1. Reakce na stresový podnět bezprostředně vyvolává fázi poplachovou, kde nejdůležitější roli hraje zvýšené uvolnění katecholaminů (adrenalinu a noradrenalinu). Pro tuto fázi je typická reakce „útok nebo útek“, není ovladatelná vůlí a je spojena například s prudkým zvýšením tepové frekvence a krevního tlaku. Pokud během této fáze nedojde k navození homeostázy vnitřního prostředí organismu, nastupuje druhá, adaptační fáze. Při adaptační fázi tělo aktivuje další mechanismy podílející se na odbourávání stresu, významně se uplatňují především účinky zvýšené sekrece glukokortikoidů (Kittnar et al. 2010; Roth 2021). Pokud je působení stresoru příliš dlouhé a tělo již vyčerpalo potenciál adaptačních mechanismů, nastupuje poslední fáze – fáze vyčerpání (Roth 2021). Při chronickém stresu, kdy je organismus často vystaven fázi vyčerpání může docházet k rozvoji mnoha onemocnění, například diabetes, hypertenze, nebo poruchy imunitního mechanismu (Kittnar et al. 2010). Často dochází i k vyčerpání organismu (Roth 2021).





Obrázek č. 1: Fáze adaptačního syndromu. Převzato a upraveno od Maďa & Fontana [2013]

U živočichů se vyvinul soubor behaviorálních a fyziologických strategií, kterými se vyrovnávají se stresem. Působení stresoru aktivuje u savců dvě osy: sympato-adreno-medulární (SAM) a hypotalamo-hyofyzární (HPA) (Kyrou & Tsigos 2009; Kittnar et al. 2010). Obě osy začínají v hypotalamu a jsou formovány limbickým systémem (Reeder & Kramer 2005). SAM stimuluje sympatický nervový systém, což má za následek uvolňování katecholaminů, aktivace osy HPA vede k vylučování glukokortikoidů (Sheriff et al. 2011).

### 3.2.2.1 Osa sympato-adreno-medulární (SAM)

Sympato-adreno-medulární osa je řízena hlavně autonomním nervovým systémem, konkrétně sympatikem. Stimuluje uvolňování katecholaminů z dřevě nadledvin a sympatických nervových zakončení, a to konkrétně adrenalinu a noradrenalinu. Je to velmi rychlý proces a katecholaminy se vylučují během několika sekund až minut (Kittnar et al. 2010). Odpověď začíná v hypotalamu, ze kterého se uvolní kortikotropin, který aktivuje sympatický nervový systém. Ten působí na dřevě nadledvin, čímž stimuluje produkci katecholaminů (Reeder & Kramer 2005). Osa SAM odpovídá za reakci „útok nebo útek“, což je okamžitá reakce na stresor (Hekman et al. 2014). Sympatikus spouští vyplavování noradrenalinu a adrenalinu. Adrenalin zesiluje stahy srdce a zvyšuje tepovou frekvenci, dochází k vazodilataci cév mozku a k výraznému prokrvení kosterní svaloviny. Noradrenalin způsobuje vazokonstrikci cév v určitých orgánových soustavách, čímž ovlivňuje tkáňový metabolismus těchto soustav (Kittnar et al. 2010).

### 3.2.2.2 Osa hypotalamo-hypofyzární (HPA)

Osa HPA je fyziologická reakce na stres řízena neuroendokrinním systémem (Heimbürge et al. 2019). v porovnání s osou SAM je reakce HPA pomalejší v řádu minut, hodin až dnů (Hekman et al. 2014). Hypotalamus zpracovává periferní vjemy, ať už fyzické, nebo psychické a spouští sekreci vazopresinu a kortikoliberinu (CRH). Oba hormony aktivují buňky předního laloku hypofýzy, buňky zahájí exocytózu adrenokortikotropního hormonu. Ten se postupně dostává do kůry nadledvin, kde se naváže na receptor, čímž iniciuje sekreci kortizolu (Miller & O'callaghan 2002). Důležitým mechanismem, který doprovází tento proces je zpětnovazebná inhibice sekrece při zvyšování hladiny glukokortikoidů, tato negativní zpětná vazba reguluje normální cirkadiální rytmus uvolňování glukokortikoidů. Také hipokampus inhibuje osu HPA (Sheriff et al. 2011). Vystavení stresorům je běžně spojeno se zvýšenou aktivitou osy HPA, a proto je odpověď kortizolu obecně považována za indikátor stresu (Heimbürge et al. 2019).

### 3.2.3 Vliv stresu na zdraví jedince

Existuje dostatek důkazů z laboratorních, klinických a epidemiologických studií, které potvrzují, že akutní a chronický psychogenní stres má negativní důsledky na zdravotní stav lidí i zvířat. Přispívá ke zvýšené náchylnosti k onemocněním nebo úmrtnosti pacientů, zvyšuje náchylnost k infekcím a zhoršuje protilátkovou odpověď imunitního systému na infekci. Dále může mít stres vliv na zhoršení průběhu hojení ran a vliv na vznik žaludečních vředů. Chronický stres spojený s úzkostnými poruchami se u psů podílí na zkrácení délky jejich života. Počáteční stresová reakce je často imunoaktivní a protizánětlivá. Akutní stres zvyšuje reaktivitu T-lymfocytů a zvyšuje produkci glukokortikoidů. To může mít za následek tzv. stresový leukogram, který se projevuje neutrofilii, monocytózou, lymfopénií a eozinopénií (Hekman et al. 2014)

## 3.3 Stresové hormony

### 3.3.1 Hormony kůry nadledvin

Nadledviny jsou párové orgány s vnitřní sekrecí. Mají dvě odlišné části – kůru a dřev (Roth 2021).

Kůra se nachází na vnější straně nadledvin a je tvořena z 80-90 % žlázami. Naopak dřev je vnitřní částí nadledvin. Kůra nadledvin syntetizuje a vylučuje steroidní hormony. Je složena ze tří vrstev – *zona glomerulosa*, *zona fasciculata* a *zona reticularis*. *Zona glomerulosa* tvoří asi 25 % kůry nadledvin. Buňky této vrstvy produkují mineralokortikoid aldosteron. *Zona fasciculata* se nachází pod *zonou glomerulosou* a tvoří 60 % kůry nadledvin. Její buňky produkují glukokortikoidy. *Zona reticularis* je nejmenší, tvoří 15 % kůry a také uvolňuje glukokortikoidy. Zároveň všechny vrstvy sekretují steroidní hormony a obsahují tukové kapénky, které slouží jako zdroj cholesterolu. Ten je prekurzorem steroidních hormonů. Hormony kůry nadledvin jsou po syntéze vylučovány do krve, neboť nemohou být ukládány v buňkách. Dělí se na glukokortikoidy, mineralokortikoidy a androgeny (Svoboda 2001). Poškození nadledvin, které vede k neschopnosti produkovat hormony kůry může vést k selhání organismu (Roth 2021).

#### 3.3.1.1 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou hormony kůry nadledvin. Patří mezi ně kortizol, kortikosteron a kortizon (Reynolds et al. 1999). Převládající glukokortikoidy jsou u různých druhů zvířat odlišné. U myši, potkanů, králíků, ryb, obojživelníků, plazů a ptáků převládá kortikosteron. Naopak u primátů, prasat, koček, krav, psů a některých hlodavců převládá kortizol. Glukokortikoidy napomáhají glukoneogenezi a zvyšují rezistenci buněk vůči inzulínu (Kittnar et al. 2010). Dále působí inhibičně na vstřebávání vápníku ve střevech a fosforu v ledvinách (Svoboda 2001), zpomalují růst lymfocytů, rozklad erytrocytů a zrychlují destrukci eozinofilů (Spies et al. 2011). Mají také protizánětlivý účinek. Glukokortikoidy jsou velice významné pro metabolickou i imunitní adaptaci na stres. Dále působí na ledviny, kardiovaskulární systém, centrální nervový systém, imunitu a růst (Gjerstad et al. 2018). Zvýšená koncentrace glukokortikoidů může mít závažný vliv na životaschopnost organismu (Sheriff et al. 2011). Jejich sekrece je řízena hypofýzou (Roth 2021).

Syntéza kortizolu probíhá v kůře nadledvin a má účinek na metabolismus cukrů (Roth 2021). Jeho funkce spočívá v zabezpečení dostatku živin pro organismus a získání energie po vyčerpání jaterních zásob glykogenu (Greenstein & Wood 2011). Stejně jako u ostatních steroidních hormonů je jeho prekurzorem cholesterol (Wallace et al. 2009). Jedná se o hlavní stresový hormon, který udržuje organismus v homeostáze. Kortizol byl historicky používán jako biomarker stresu (Mills et al. 2014). Kortizol volně přechází přes plazmatickou membránu do krevního řečiště, neukládá se do zásob, ale syntetizuje se podle potřeby organismu (Esposito & Bianchi 2012). Produkce kortizolu je regulována hypotalamo-hypofyzární osou kůry nadledvin (Heimbürge et al. 2019).

Hlavní funkcí kortizolu je navýšení hladiny glukózy v těle a potlačení většiny anabolických procesů pomocí negativní zpětné vazby (Trojan 2003). Kortizol zvyšuje

glukoneogenezi, tedy tvorbu glukózy z necukerných zdrojů a syntézu řady enzymů, které se podílí na jaterní glukoneogenezi (Greenstein & Wood 2011). Nadměrná produkce kortizolu může u psa způsobit Cushingův syndrom, který se projevuje alopecií (ztráta ochlupení), polydipsií (nadměrná žízeň), polyurie (nadměrný výdej moči). Naopak snížená produkce kortizolu může mít za následek Addisonovu chorobu, která vede k selhání činnosti nadledvin (Castillo et al. 2009).

Hladina kortizolu je řízena složitou zpětnou vazbou. Vysoká hladina kortizolu inhibuje sekreci adrenokortikotropního hormonu (Gjerstad et al. 2018). Zároveň bylo zjištěno, že progesteron moduluje inhibiční účinek estrogenů na glukokortikoidy (Hellhammer et al. 2009). Kortizol je propojen i s imunitním systémem. Při akutním stresu kortizol zvyšuje nespecifickou imunitu. Naopak při dlouhodobém stresu snižuje odolnost proti infekcím tím, že snižuje počet lymfocytů a eozinofilních leukocytů (Esposito & Bianchi 2012).

U psů se v krevní plazmě kortizol nachází buď jako volný kortizol (přibližně 10 %), zbytek kortizolu je vázaný na specifický protein Corticoid Binding Globulin nebo na  $\alpha$ -glykoprotein a albumin (Kittnar et al. 2010).

### 3.3.2 Hormony dřene nadledvin

Dřeň nadledvin je vnitřní část žlázy, která tvoří zhruba 10 % jejího objemu. Produkuje katecholaminy, mezi které patří adrenalin, noradrenalin a dopamin. Podílí se hlavně na aktivaci sympato-adreno-medulární osy (Trojan 2003). 75 – 80 % buněk produkuje adrenalin a zbytek noradrenalin (Svoboda 2001). Katecholaminy nejsou produkovány pouze dřeni nadledvin, ale i nervovými zakončeními v jiných částech těla. To znamená, že poškození dřene nadledvin, spojené s neschopností produkce těchto hormonů, není smrtelné. (Roth 2021). Hormony kůry a dřene nadledvin se vzájemně ovlivňují. Glukokortikoidy z kůry nadledvin zvyšují syntézu katecholaminů zvýšením exprese PNMT (Phenylethanolamin N-methyltransferázy), enzymu katalyzujícího syntézu katecholaminů. Dále katecholaminy zvyšují produkci steroidních hormonů včetně kortizolu a aldosteronu. Dalšími mediátory ze dřene nadledvin, které mohou ovlivnit produkci glukokortikoidů je angiotenzin a apelin. Apelin je neurohormon, který působí v různých orgánech včetně neuronů hypotalamu, přední hypofýzy a nadledvin (Kanczkowski & Sue 2016).

#### 3.3.2.1 Adrenalin a noradrenalin

Noradrenalin je hormon, který vzniká jako mediátor v sympatiku. Malé množství se tvoří i v dřeni nadledvin. Má hlavně vazokonstrikční účinky v kůži, v ledvinách i gastrointestinálním traktu.

Stresový hormon adrenalin je tvořen v dřeni nadledvin. Je uvolňován ihned po aktivaci sympatických drah. Jeho vylučování je udržováno vysokou hladinou kortizolu. Působení adrenalinu je nejrychlejší ze všech stresových hormonů (Svoboda 2001). Adrenalin má dva hlavní účinky: působí na hypofýzu, čímž zvyšuje sekreci ACTH a působí na většinu tělesných tkání tím, že zvyšuje jejich aktivitu. Zároveň zvyšuje srdeční frekvenci, dechovou frekvenci, krevní tlak a zvyšuje hladinu cukru v krvi. Všechny tyto změny připravují organismus na boj nebo útek (Roth 2021).

### **3.4 Laboratorní možnosti stanovení hladiny kortizolu a dalších markerů stresu**

Měření hladiny kortizolu se používá při sledování fyziologických reakcí na stres při akutním i dlouhodobém stresu (Heimbürge et al. 2019). Bylo prokázáno, že koncentrace kortizolu v plazmě, slinách nebo moči se u psů významně zvyšují 15-30 minut po nástupu stresoru, což svědčí o zvýšené aktivitě HPA osy (Hekman et al. 2014). Kortizol se tedy používá jako ukazatel činnosti osy hypotalamo-hypofyzární (Heimbürge et al. 2019). v organismu jsou glukokortikoidy rozsáhle metabolizovány a následně vylučovány s různými tělními tekutinami či exkrementy. U savců se hladina kortizolu stanovuje zejména krve, slin, výkalů, moči, mléka či srsti. Pro získání vzorků je vhodné používat neinvazivní metody. Ve vzorcích se mohou objevovat mezidruhové rozdíly, například v časovém průběhu vylučování kortizolu, nebo v typu vzniklých metabolitů (Sheriff et al. 2011). Kortizol je nejspíš nejčastěji používaným ukazatelem stresu u různých hospodářských zvířat (krav, prasat, koní a ovcí).

Kromě diagnostiky stresu pomocí sledování hladiny kortizolu se mohou využívat i jiné metody. Bylo prokázáno, že při akutním stresu se zvyšuje teplota zvířat. Díky tomu se dá stres zjišťovat i pomocí technologie IRT (infračervená termografie). Teplota zvířat se po skončení působení stresoru rychle vrací na normální hodnotu. Ačkoli je tato metoda neinvazivní, pokusy odhalily, že namíření kamery proti psovi, mu může být velice nepříjemné. Psi používali konejšivé signály, jako je odvrácení pohledu, otočení hlavy, či olizování se (Travain et al. 2015). V poslední době je další možností neinvazivní metody měření míry stresu stanovení hladiny slinného imunoglobulinu A (IgA). IgA má největší zastoupení v kategorii protilátek přítomných na sliznicích. Koncentrace tohoto imunoglobulinu se mění v závislosti na působení stresového podnětu. Bylo zjištěno, že hladina IgA u dospělých psů klesá při dlouhodobém stresu. Na rozdíl od dospělých psů se hladina IgA u štěňat během stresové situace zvyšuje (Svobodová et al. 2014).

#### **3.4.1 Salivární vzorky**

Sliny obsahují širokou škálu složek, jako jsou peptidy, nukleové kyseliny, enzymy a hormony. Bylo zjištěno, že slinná alfa-amyláza a kortizol jsou biomarkery související se stresem (Kang et al. 2022). Vzorky ze slin jsou vhodnou volbou pro zjištění míry stresu u zvířat, jelikož odráží koncentraci volných glukokortikoidů v krvi (Oyama et al. 2014). Bylo prokázáno, že slinný kortizol je užitečným neinvazivním markerem akutního i chronického stresu (Svobodová et al. 2014). Sliny obsahují pouze volný kortizol a zhruba 7 – 12 % kortizolu z krevního řečiště se nachází ve slinách (Sheriff et al. 2011). Asi 30 % volného kortizolu ve slinách je enzymaticky přeměněno na kortizon, což vede k nižším hladinám naměřeného volného salivárního kortizolu, oproti hodnotám kortizolu v plazmě (Hellhammer et al. 2009). Mezi slinnými a volnými glukokortikoidy v krvi existuje silná pozitivní korelace. U zdravých psů je korelační koeficient 0,94, což značí, že znak je z velké části ovlivněn geny (Sheriff et al. 2011).

Pro měření koncentrace glukokortikoidů ze slin se používají různé metody, jako například radioimunotest (RIA) nebo enzymový imunotest (ELISA). Tyto metody jsou velice citlivé a založené na principu kompetence mezi antigenem a značenou formou stejného antigenu.

Antigeny mohou být označené enzymy (ELISA), nebo radioizotopy (RIA). Antigen je v tomto případě kortizol. Nevýhodou RIA jsou vyšší pořizovací náklady a také problematická likvidace použitých radioaktivních látek. Další možnou metodou je fluoroimunoanalýza, která ke značení používá fluorescenční látku a chemiluminiscenci. Chemiluminiscenční metoda je optická metoda, založená na emisi světla při chemické reakci (Koivunen & Krogsrud 2006). Nejvyšší hladina glukokortikoidů ve slinách je většinou po 20 – 30 minutách od působení stresového podnětu (Sheriff et al. 2011). Hladina salivárního kortizolu se výrazně neliší mezi jednotlivými plemeny, barvami ani velikostmi psa (Cobb et al. 2016).

Při odběru slin je možné slinění stimulovat pomocí kyseliny octové či citrónové, chloridu sodného nebo sacharózy (Kobelt et al. 2003). Stimulantem může být i potrava či vůně. U psů díky vysoké pufrovací kapacitě v ústní dutině, kyselina citrónová hladinu slinného kortizolu neovlivňuje, naopak tomu může být u lidí (Dreschel & Granger 2009). Nejčastěji se odběr provádí pomocí bavlněného materiálu, který má absorpční schopnost. Je možné použít i filtrační papír (Oyama et al. 2014). Sliny mohou být u psa odebírány z jazyka, dásní, tvrdého patra či tváří (Kobelt et al. 2003). Doporučuje se sliny odebírat ve více dnech, pokud je to možné. Kromě toho by se vzorky měly odebrat ve stejnou denní dobu. Hladina kortizolu totiž může být ovlivněna denní dobou, spánkovým režimem, potravou nebo fyzickou aktivitou (Hekman et al. 2014). Existuje vysoká korelace mezi hladinami kortizolu ve slinách a hladinami nevázaného volného kortizolu v plazmě a séru. Tato korelace zůstává vysoká během cirkadiánního cyklu a také při různých teplotách (Hellhammer et al. 2009). Glukokortikoidy jsou ve slinách velmi stabilní, proto je možné vzorky skladovat i při pokojové teplotě.

Hladina slinné alfa-amylázy se u psů zvyšuje při stresu spojeným s onemocněním. Bylo zjištěno, že mezi slinnou alfa-amylázou a skórem bolesti existuje korelace. Stres a bolest jsou odlišné, ale překrývající se jevy, které spolu souvisí. Proto lze použít stanovení hladiny alfa-amylázy jako ukazatel pro hodnocení intenzity bolesti a zároveň pro hodnocení subjektivního vnímání stresu. Ve výsledku je tedy alfa-amyláza účinným nástrojem pro měření stresu spojeného s bolestí (Kang et al. 2022).

### **3.4.2 Vzorky krve**

Další možností měření hladiny kortizolu je odebrání vzorku krve. Tuto metodu lze využít u všech obratlovců. Na hladinu glukokortikoidů v krvi mají vliv akutní i chronické stresory společně s cirkadiánním i sezónním cyklem (Sheriff et al. 2011). Zjišťování koncentrace glukokortikoidů z krve je invazivní metoda, která se však stále hojně využívá. Nevýhodou je, že během několika minut může dojít k rychlému navýšení koncentrace glukokortikoidů, kvůli stresu, způsobeným samotným odběrem vzorku (Sapolsky et al. 2000). Krev je obvykle odebírána ze žíly a místo odběru se liší v závislosti na druhu zvířete, kterému je krev odebírána. Hladiny glukokortikoidů z krevního séra i plazmy jsou stejné (Sheriff et al. 2011).

### **3.4.3 Vzorky srsti**

Koncentrace kortizolu ze srsti (hair cortisol concentration – HCC) je považována za retrospektivní marker integrované sekrece kortizolu v průběhu delšího časového období. Tato metoda se stále častěji využívá ve výzkumu stresu u zvířat. Výhodou měření kortizolu z chlupů je snadný a minimálně invazivní odběr vzorku. Bylo zjištěno, že široká škála stresorů

a patologických stavů mění koncentraci kortizolu v srsti, proto HCC poskytuje spolehlivý obraz dlouhodobé sekrece kortizolu. Naměřená hladina kortizolu v krvi a slinách nebo exkrementech představuje pouze retrospektivní časový úsek od minut až po dva dny (Heimbürge et al. 2019). Cirimele et al. (2000) s využitím nového přístupu analyzovali deset různých kortikoidů v lidských vlasech. Koren et al. (2002) na základě výzkumu srsti damana skalního vyhodnotili kortizol z chlupů jako vhodný ukazatel pro hodnocení chronického stresu. Hladina HCC se může lišit dle věku nebo barvy srsti (Heimbürge et al. 2019). To potvrzuje studie, při které byla u psů se zbarvením černé s pálením pozorována v černých chlupcích nižší hladina kortizolu než ve světlých (Bennett & Hayssen 2010).

## 4 Materiál a metody

Tato práce vznikla ve spolupráci s Mgr. Barborou Šulcovou z Dogguru v Turnově. Pro realizaci experimentu byli vybráni psi, kteří opakovaně podstupovali fyzioterapeutické ošetření v rámci řešení konkrétních zdravotních problémů nebo jako prevenci. Těmto psům byl odebírán vzorek slin, a to vždy před začátkem fyzioterapie, tedy při příchodu do ordinace a ihned po ukončení samotného ošetření. Pomocí ELISA kitů Salivary Cortisol byla z těchto vzorků v laboratoři České zemědělské univerzity stanovena hladina kortizolu. Získaná data byla statisticky zpracována programem STATISTICA.

Vzorky slin byly odebrány psům, kteří zařízení Dogguru pravidelně navštěvují. Celkem bylo testováno 6 psů ve věkovém rozmezí od 1 roku do 10 let. Konkrétně testovaní psi byli zástupci plemen border kolie, maďarský ohař, jorkšířský teriér, novofundlanský pes, americký stafordšířský teriér a kříženec. Váha psů se pohybovala v rozmezí od 3 – 53 kg, pro usnadnění statistického šetření byli psi rozdělení do tří skupin – malý (3 – 15 kg), střední (15 – 25 kg), velký (nad 25 kg). Seznam jedinců, kteří podstoupili testování je zaznamenán v následující tabulce č. 1. Hladina kortizolu odebraného při příchodu do ordinace je značena písmenem A, hladina kortizolu odebraného po ošetření je značena písmenem B. Hladiny kortizolu jsou uvedeny v ng/ml.

Tabulka č.1: Seznam testovaných psů

Pes č.	Pohlaví	Velikost	Věk (roky)	1 měření		Doba ošetření	2. měření		doba ošetření	3. měření		doba ošetření
				A	B		A	B		A	B	
1	fena	malý	3	4,30	4,7	dopoledne	2,3	4	dopoledne	3,8	3,6	dopoledne
2	pes	malý	10	0,9	1,2	večer	1,5	1,3	večer	0,6	0,8	večer
3	fena	velký	1	3,5	3,7	dopoledne	4,1	3,9	dopoledne	3,2	3,1	dopoledne
4	pes	velký	7	4,7	4,9	večer	3,8	3,6	večer	3,2	3,8	večer
5	fena	střední	8	3,7	4,1	odpoledne	0,9	3,3	dopoledne	1,7	1,9	večer
6	pes	střední	10	2,6	2,9	odpoledne	1,9	1,6	odpoledne	3,2	3,9	odpoledne

### 4.1 Odběr a zpracování dat

K odběru slin byla použita sada Salivette Cortisol, která obsahuje dvě plastové zkumavky vložené v sobě. Vnitřní zkumavka obsahuje tampón a zároveň má na dně otvor. Tato sada se hojně využívá k odběru slin jak u zvířat, tak i u lidí. Vzorky slin ke stanovení slinného kortizolu byly zpracovány pomocí kitu Salivary Cortisol ELISA SLV-2930 od firmy DRG a vyhodnoceny za pomoci mikrodestičkového spektrofotometru VersaMax Tunable Microplate Reader.

Sliny byli odebírány fyzioterapeutem při příchodu do ordinace a po dokončení terapie. Na odběr byl použit set Salivette Cortisol. Tampón, který sada obsahuje se vložil psovi do dutiny ústní a poté zpět do vnitřní zkumavky. Následně za pomoci centrifugace se otvorem



na dně vnitřní zkumavky dostali sliny do zkumavky vnější. Po odběru byly vzorky uchovávány v  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Obrázek č. 2 Set k odběru slin Salivette Cortisol

Pro zpracování vzorků byla využita metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Při této práci byl využit kit Salivary Cortisol ELISA SLV-2930. Metoda ELISA je biochemický test založený na vázání protilátky na antigen určitých molekul. Často se využívá k detekci různých nemocí, hormonů, léků nebo proteinů. Díky vysoké specificitě lze test využít i ke stanovení látek s velmi nízkou koncentrací.

Balení kitu obsahuje mikrotitrační destičku, která obsahuje protilátku proti kortizolu v jednotlivých jamkách, roztoky standardů s různými koncentracemi (0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1,5 ng/ml, 4 ng/ml, 10 ng/ml a 30 ng/ml), kontrolní roztok (0 ng/ml), enzymatický konjugát, promývací roztok a roztok zastavující reakci.

#### Jednotlivé kroky analýzy

1. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno v dubletu nejprve 100  $\mu\text{l}$  roztoku standardů, kontroly a testovaných vzorků slin vzorku
2. Poté bylo do každé jamky napipetováno 200  $\mu\text{l}$  enzymatického konjugátu a vše bylo důkladně promícháno
3. Následovala inkubace po dobu 60 minut při pokojové teplotě
4. Po inkubaci byl obsah jamek vylit a jamky byly pětkrát propláchnuty pomocí 400  $\mu\text{l}$  promývacího roztoku Wash Solution
5. Důkladně se odstranily zbytky tekutiny v jamkách
6. Poté bylo do každé jamky napipetováno 200  $\mu\text{l}$  Substrate Solution
7. Roztok byl inkubován 30 minut při pokojové teplotě
8. Následně bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu\text{l}$  Stop Solution, který zastavuje enzymatickou reakci

9. Do 10 minut po přidání Stop Solution následovalo odečtení výsledků absorpce při 450 ± 10 nm pomocí mikrodestičkového spektrofotometru VersaMax Tunable Microplate Reader

Získaná data byla zpracována pomocí statistického programu STATISTICA 12. Pro stanovení statisticky významného rozdílu byla použita jednofaktorová ANOVA. Hladina statistické významnosti  $\alpha$  byla stanovena na 0,05. Pokud hladina  $p$  vyšla menší než hladina  $\alpha$ ,  $H_0$  byla zamítnuta, tudíž existuje statisticky významný rozdíl mezi hladinami kortizolu z 1., 2., a 3. ošetření. Pokud hladina  $p$  vyšla větší než hladina  $\alpha$ ,  $H_0$  nelze zamítnout, neexistuje statisticky významný rozdíl mezi hladinami kortizolu z 1., 2., a 3. ošetření.

Dále byly zjišťovány rozdíly hladin kortizolu v závislosti na kategoriálních proměnných, jako jsou pohlaví, věk, váha a denní doba, kdy byla fyzioterapie prováděna.

## 5 Výsledky

**Experiment 1:** Vliv opakované fyzioterapie u psů se zdravotními problémy na hladinu jejich stresových hormonů

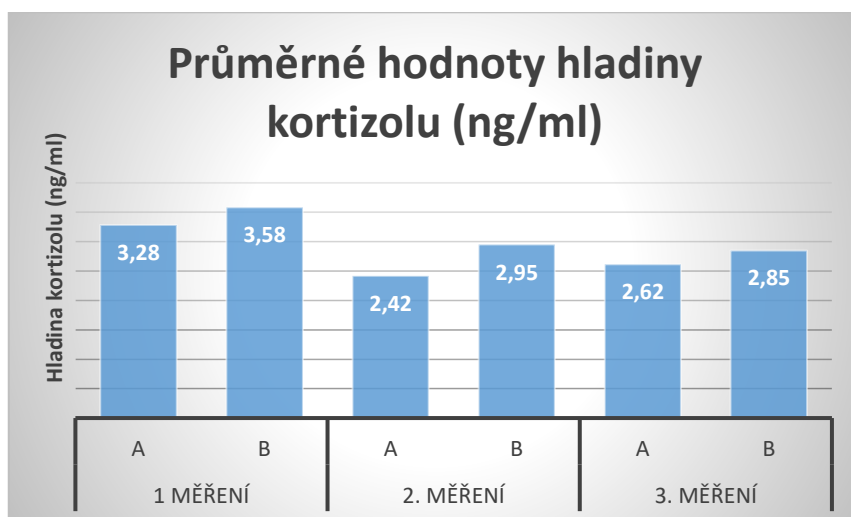
$H_0$ : Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi hladinami kortizolu z 1., 2., a 3. ošetření

U všech následujících grafů platí, že hladina kortizolu odebraného před ošetřením je značena písmenem A, hladina kortizolu odebraného po ošetření je značena písmenem B.

Hladiny kortizolu jsou uvedeny v ng/ml.

K provedení statistických výpočtů byla použita jednofaktorová ANOVA. Výstupy z programu Statistica jsou k nahlédnutí jako samostatné přílohy této diplomové práce.

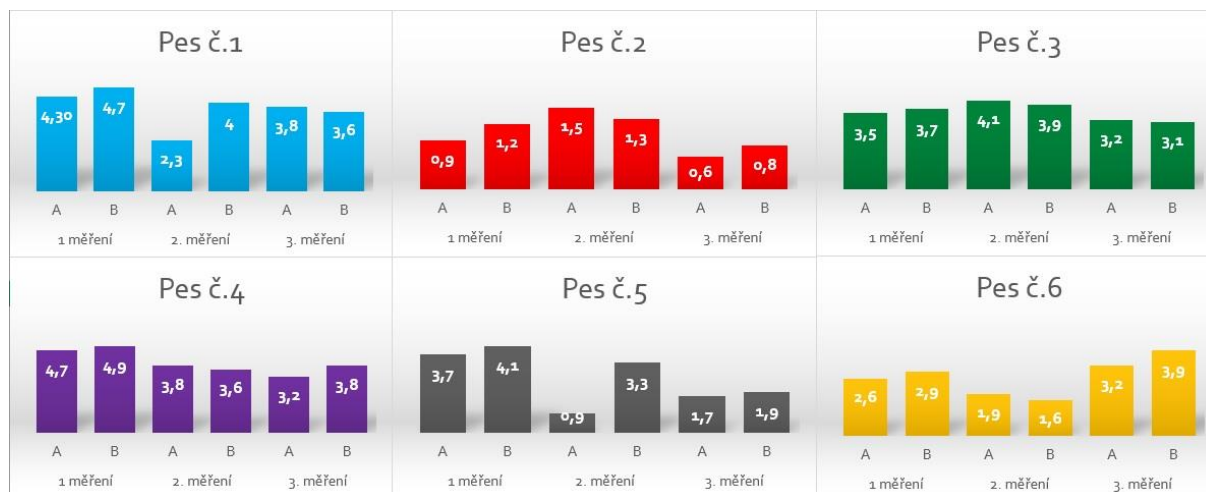
Při porovnání hladin kortizolu před fyzioterapií u třech po sobě jdoucích ošetření nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hladinami kortizolu a jednotlivými ošetřeními. Stejně tomu bylo i při porovnávání hladin kortizolu po fyzioterapii u všech třech ošetření.



Graf č. 1 Průměrné hodnoty hladiny kortizolu (ng/ml).

Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými ošetřeními testovaných jedinců.

Z aritmeticky průměrných hodnot salivárního kortizolu odebraného 6 testovaným psům, během třech po sobě jdoucích ošetřeních lze vyčíst, že oproti prvnímu ošetření je ve druhém a třetím stanovená nižší hladina kortizolu. Nicméně hladina po ošetření je u všech 3 měření vyšší než hladina kortizolu měřená před fyzioterapií. Při třetím ošetření byl patrný průměrně nejvyšší nárůst této hladiny. Přesto nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými ošetřeními.

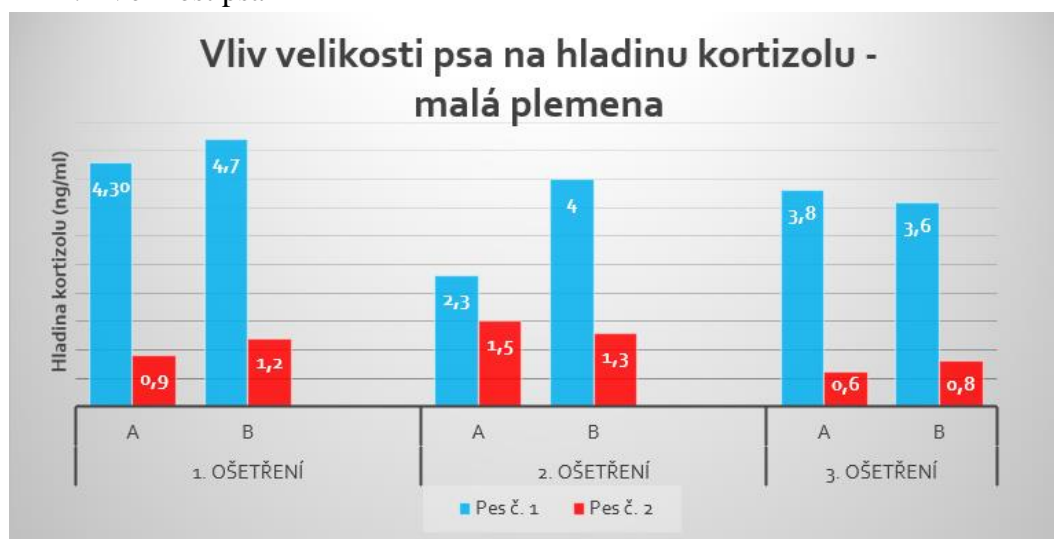


Graf č. 2 Hladiny kortizolu získané od všech testovaných psů z 1., 2. a 3. ošetření.

Z grafu lze vyčíst, že změny v hladině kortizolu jako odpověď na fyzioterapeutické ošetření jsou u testovaných zvířat velice individuální a mohou se diametrálně lišit při porovnání testovaných jedinců s průměrnými hodnotami prezentovanými v grafu č.1. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými psy.

**Experiment 2:** Vliv velikosti (hmotnosti), pohlaví, denní doby, při které byla prováděna fyzioterapie na hladinu kortizolu testovaných psů

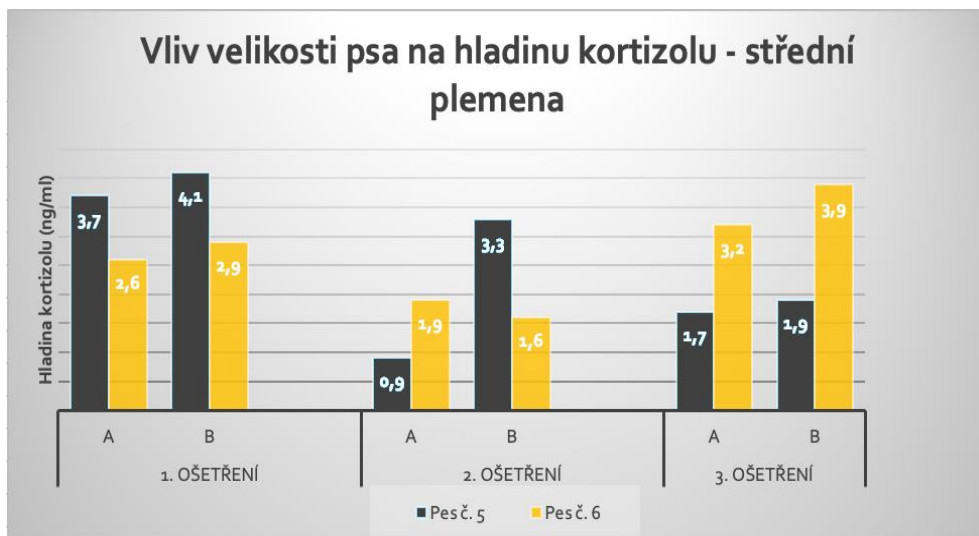
### 1. Velikost psa



Graf č. 3 Vliv velikosti psa na hladinu kortizolu – malá plemena.

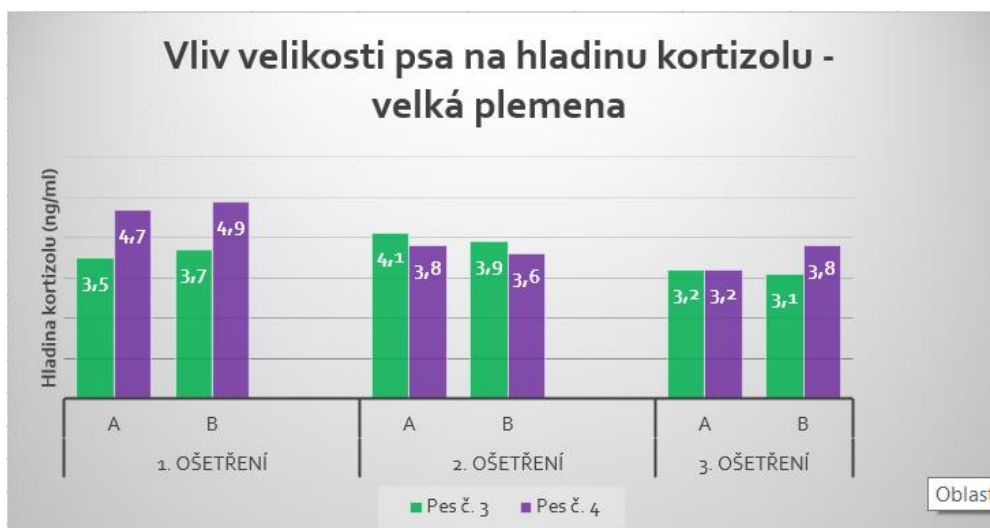
Výše uvedený graf popisuje vliv velikosti psa na hladinu kortizolu v rámci jednotlivých ošetření. V rámci experimentu byly zkoumány výsledky malých plemen psů a graf tak zobrazuje data psů, jejichž hmotnost se pohybovala v rozmezí 3 – 15 kg. V grafu lze velmi zřetelně vidět, že hladina kortizolu je i v rámci jedné skupiny velice individuální. Důvodem

může být i poměrně velký váhový rozdíl mezi těmito dvěma psy, protože pes č. 1 v době měření vážil 13 kg, přičemž pes č. 2 pouze 3 kg. V grafu lze vidět, že hodnoty jsou velmi odlišné.



Graf č. Vliv velikosti psa na hladinu kortizolu – střední plemena.

Mezi středně velká plemena byli zařazeni psi o hmotnosti 15 – 25 kg. v tomto grafu je velmi zřetelné, že v rámci druhého ošetření se pes č. 5 pravděpodobně necítil příliš komfortně, protože hodnoty naměřené po ošetření byly výrazně zvýšené, oproti odběru před ošetřením. Stejně jako u malých psů jde vidět velká rozdílnost mezi jednotlivými psy.



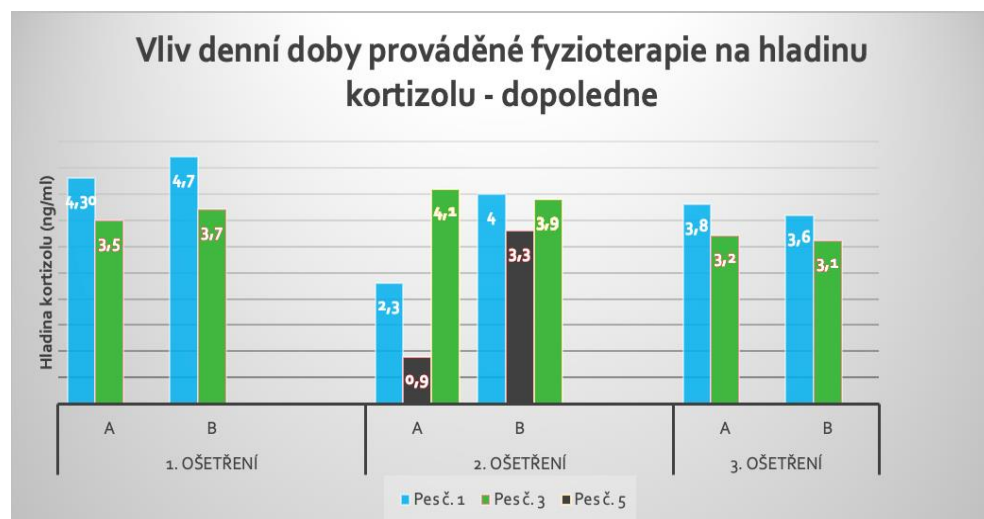
Graf č. 5 Vliv velikosti psa na hladinu kortizolu – velká plemena.

Mezi velká plemena byli zařazeni psi o hmotnosti nad 25 kg. Zde můžeme vidět, že hodnoty naměřené u velkých plemen se vyznačují nejmenší kolísavostí naměřených hodnot v jednotlivých ošetřeních. Výsledky měření psa č. 3 se lišily maximálně o 0,2 ng/ml. Podobné výsledky byly získány i u psa č.4, kde však naměřená hodnota kortizolu po posledním ošetření byla zvýšena o 0,6 ng/ml, což byl největší naměřený rozdíl v hodnotách zobrazených v tomto grafu.

Ačkoli pes č. 2 ze skupiny malých plemen má nejnižší hodnoty kortizolu, vzhledem k malému počtu testovaných psů z tohoto faktu nelze dělat závěry. Důležitým zjištěním však je, že hmotnost nemá přímý vliv na hladinu kortizolu v tom smyslu, že by se výrazně snižovala naměřená hladina kortizolu po ošetření.

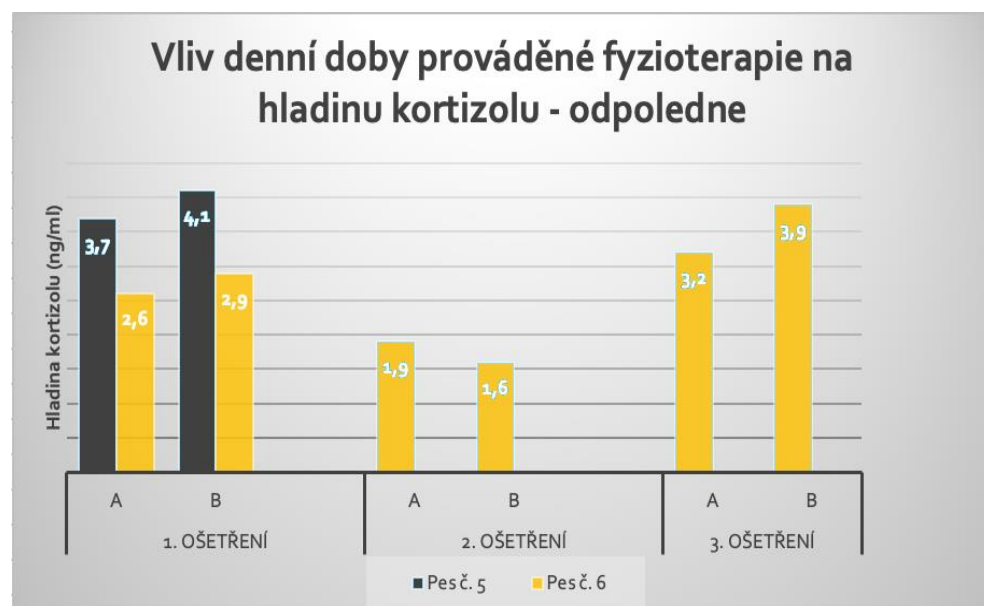
Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hladinami kortizolu u odlišně velkých psů.

## 2. Denní doba



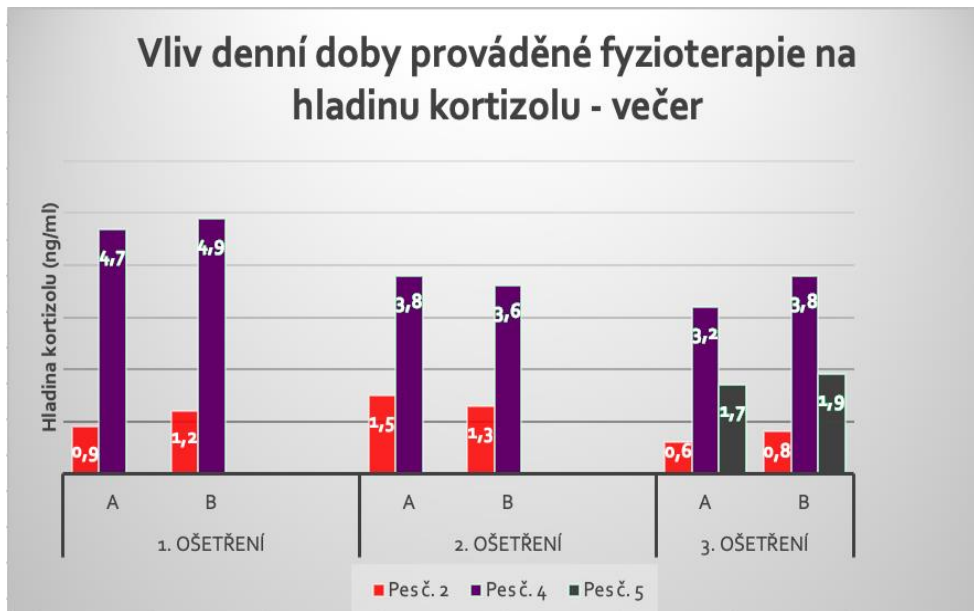
Graf č. 6 Vliv denní doby prováděné fyzioterapie na hladinu kortizolu – dopoledne.

Dopoledne bylo konkrétně určeno v časovém rozsahu 6 – 12 h. V tomto grafu je zajímavé, že psi č. 1 a 5 měli v návaznosti na druhé ošetření znatelně vyšší hodnotu kortizolu, než před ošetřením. Oproti tomu pes č. 3 jako jediný měl po druhém ošetření nižší naměřenou hodnotu kortizolu. U třetího ošetření se u psů 1 a 3 hodnoty kortizolu snížily po terapii.



Graf č. 7 Vliv denní doby prováděné fyzioterapie na hladinu kortizolu – odpoledne

Odpoledne je pro tuto práci určeno 12 – 17 h. Zde máme kompletní výsledky u psa č. 6, který na druhé ošetření reagoval lépe, než na první, což potvrzují i naměřené hodnoty před a po ošetření. Na třetí ošetření však reagoval mnohem hůře než na ošetření předchozí. v rámci třetího ošetření se hodnota zvedla o 0,6 ng/ml.

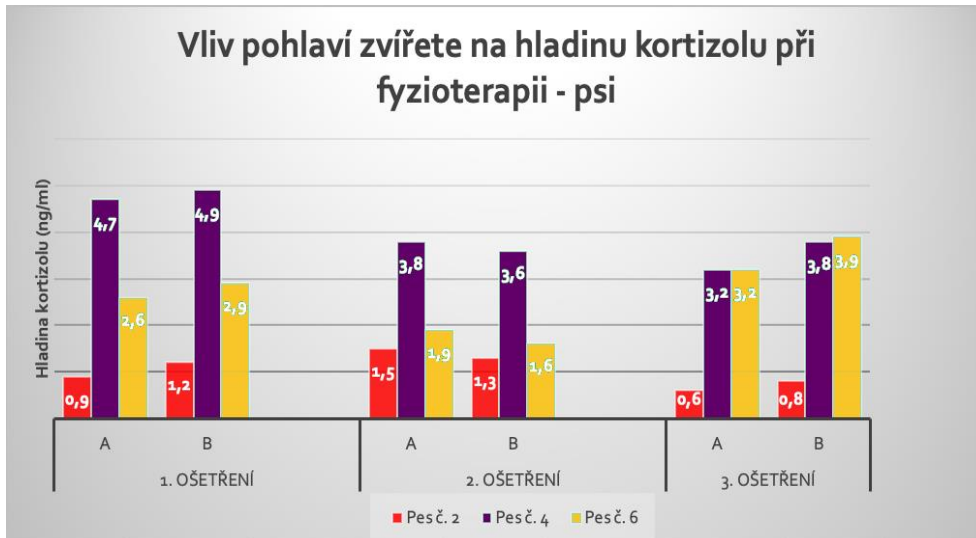


Graf č. 8 Vliv denní doby prováděné fyzioterapie na hladinu kortizolu – večer.

Večer byl stanoven 17 – 22h. Z výsledků grafu vidíme, že ani očekávání nižších naměřených hodnot před a po ošetření ve večerních hodinách nebylo potvrzeno.

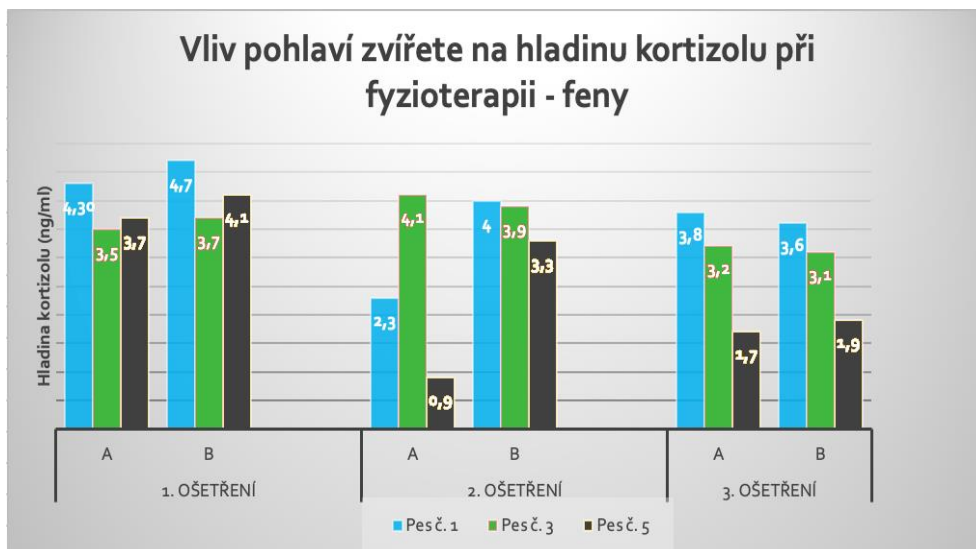
Výsledky naměřených hodnot v těchto experimentech vyvrátily, že by denní doba, ve kterou psi podstoupí ošetření, měla výrazný vliv na naměřené hodnoty. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hladinami kortizolu odebíranými v různou denní dobu. Pes č. 5, který podstoupil ošetření ve všech časových intervalech jednoznačně nejlépe reagoval na ošetření ve večerních hodinách, kdy mu byly naměřeny výrazně nižší hodnoty. Ačkoli měl hodnotu kortizolu před ošetřením nejnižší v odpoledních hodinách, hladina naměřená po terapii je nejnižší právě v hodinách večerních. Zároveň i pes č. 2, který podstoupil všechna ošetření ve večerních hodinách měl oproti ostatním psům výrazně nižší hodnoty hladiny kortizolu.

### 3. Pohlaví zvířete



Graf č. 9 Vliv pohlaví zvířete na hladinu kortizolu při fyzioterapii – psi

S ohledem na to, že předchozí grafy a zjištěné výsledky jednoznačně vyvrátily, že na hladiny kortizolu naměřené před a po ošetření nemá vliv ani velikost psa a ani denní doba, tak zde můžeme konstatovat, že průměrné hodnoty naměřené u psů byly nižší než u fen. Avšak toto zjištění nijak nepotvrzuje, že by psi na jednotlivá ošetření reagovali lépe, neboť ani zde nedošlo vlivem opakující se léčby k výraznému snížení naměřených výsledných hodnot po absolvování všech ošetření.



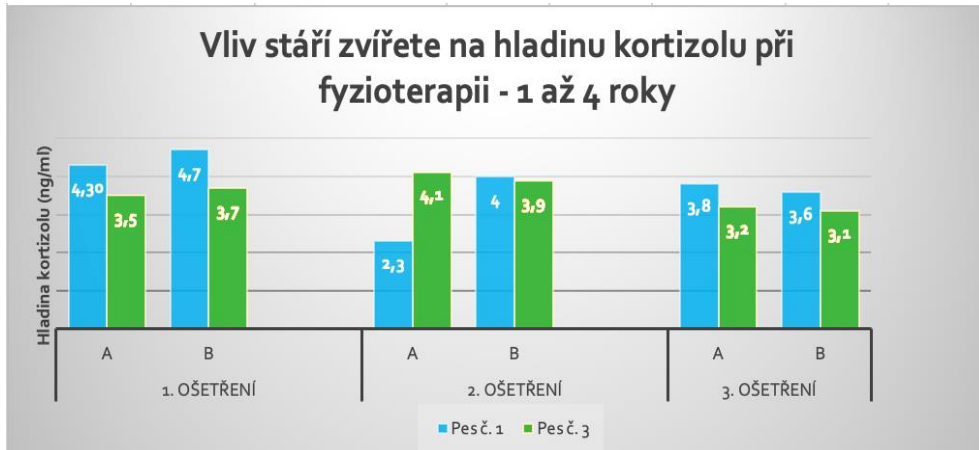
Graf č. 10 Vliv pohlaví zvířete na hladinu kortizolu při fyzioterapii – feny.

Feny měly v průměru vyšší naměřené hodnoty před a po ošetření než psi, ale ani zde se nepotvrdilo, že by u fen došlo k výraznému snížení naměřených hodnot kortizolu s postupující a opakující se léčbou.

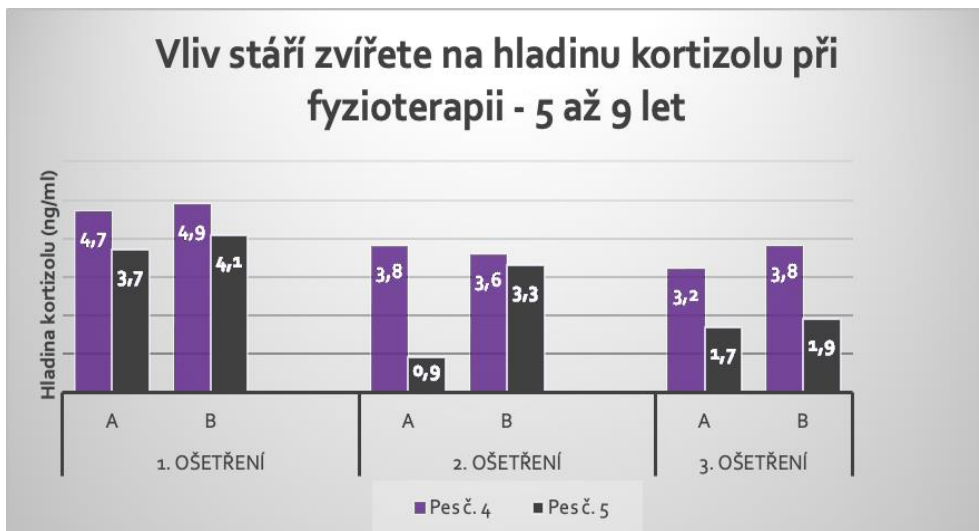
Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hladinami kortizolu v závislosti na pohlaví zvířete.



#### 4. Stáří zvířete



Graf č. 11 Vliv stáří zvířete na hladinu kortizolu při fyzioterapii – 1 až 4 roky.



Graf č. 12 Vliv stáří zvířete na hladinu kortizolu při fyzioterapii – 5 až 9 let.

Hodnoty kortizolu naměřené u psů ve věkovém rozmezí 5 – 9 let byly podobné předchozí věkové kategorii. Patrný rozdíl v naměřených hodnotách lze spatřit zejména u třetího ošetření psa č. 5, kde jsou výsledné hodnoty poměrně nízké a velmi blízko k sobě.



Graf č. 13 Vliv stáří zvířete na hladinu kortizolu při fyzioterapii – 10 a více let.

U psů starších 10 let bylo patrné, že průměrné naměřené hodnoty byly nižší než u předchozích dvou kategorií. Poměrně překvapivé byly výsledné hodnoty třetího ošetření u psa č. 6, který se v prvních dvou ošetřeních vyznačoval nižšími hodnotami, kdežto u třetího ošetření mu byly naměřeny hodnoty nejvyšší.

Výsledné naměřené hodnoty hladiny kortizolu, kdy jako kritérium byl použit věk psů reflektují, že ani zde se nepotvrdila přímá souvislost.

Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hladinami kortizolu u různě starých psů.

## 6 Diskuze

Hypotézu, že psi, u kterých je opakovaně prováděna fyzioterapie v rámci řešení jejich zdravotních problémů, budou mít v průběhu času nižší stresovou odezvu na samotnou fyzioterapii, která se projeví i nižší hladinou uvolněných stresových hormonů, se nepodařilo potvrdit. Důvodem však může být malé množství vzorků. Bohužel ne všechny vzorky, které se pro studii podařilo odebrat, mohly být použity k samotnému stanovení hladin kortizolu. Některé vzorky byly znehodnoceny zbytky pamlsků, které byly psům podávány během fyzioterapie, jiné vzorky obsahovaly velmi malé množství slin, které pro stanovení nebylo možné použít. Někteří psi se během testovaného období dostavili na ošetření pouze jednou nebo dvakrát, tudíž nemohli být zařazeni do výzkumu. Z 15 psů, kteří podstoupili odběry slin pro tuto studii, mohlo být použito pouze 6 kompletních vzorků slin od psů, kterým byly odebrány použitelné vzorky ze všech 3 ošetření. To je velice malý vzorek k tvoření definitivních závěrů.

Z výsledků uvedených v předešlé kapitole vychází, že neexistují statisticky významné rozdíly mezi prvním, druhým a třetím ošetřením, ani mezi jednotlivými testovanými zvířaty. Ze získaných výsledků lze ovšem vyvodit, že hladina salivárního kortizolu je u jednotlivých zvířat velice individuální a stejně tak individuální je změna hladiny kortizolu jako odezva na fyzioterapeutické ošetření. U psů č. 1 a 5 se při jednom z ošetření hladina enormně zvýšila. Mohlo by být vhodné a zajímavé zjistit, co tuto výchylku způsobilo. Jelikož se vzorky odebíraly těsně před terapií, může být hladina A ovlivněna již samotným příchodem do ordinace.

Je třeba uvést, že hladina salivárního kortizolu jako reakce na stresový podnět může být ovlivněna širokou škálou proměnných (Hellhammer et al. 2009). Je třeba zdůraznit, že největším problémem při měření hladiny stresových hormonů jsou rozdíly v reakci na stres mezi zvířaty. To i v případě, že jedinci čelí stejnému stresoru. Každá centrální nervová soustava jedince používá různou kombinaci stresových reakcí k tomu, aby se vyrovnala se stresem. Kombinaci těchto reakcí může ovlivnit zkušenost, věk, sociální vztahy a interakce mezi člověkem a zvířetem (Mench & Moberg 2000). Proto se experiment č. 2 zaměřil na sledování rozdílu hladin kortizolu v závislosti na hmotnosti, pohlaví, věku a denní doby, při které byla prováděna fyzioterapie. Bornstein et al. (2008) uvádí, že stárnutí, záněty a zlomeniny mohou mít vliv na hladinu stresových hormonů. Co se týče cirkadiálního rytmu jsou studie názorově rozdílné, některé potvrzují jeho vliv na míru stresu (Beerda et al. 1997), jiné ale toto tvrzení vyvrací (Koyama et al. 2003). Beerda et al. (1997) popsal, že hladina kortizolu je nejvyšší v ranních hodinách a postupně během dne klesá, večer by tedy měla být hladina kortizolu nejnižší, což naznačují i výsledky hladin kortizolu psa č. 5, který se jako jediný účastnil fyzioterapií ve všech denních dobách. Zároveň některé studie naznačují, že odměny, například ve formě potravy, mohou tlumit uvolňování glukokortikoidů v nadledvinách. Proto Colussi et al. (2018) doporučuje, že by psi 20 minut před experimentem neměli jíst a pít. Majitelů psů, kteří se účastnili experimentu pro tuto diplomovou práci uvedli, že při samotném ošetření odměny používali. Také pohlaví jedince může mít vliv na hladinu kortizolu, neboť pohlavní steroidy zvyšují hladiny transkortinu, také známého jako globulin vázající kortikosteroidy, což může mít za následek širší variabilitu hladin kortizolu u samic (Hellhammer et al. 2009). Většina majitelů uvedla, že při samotném ošetření odměny používali. Naopak plemeno, barva

ani velikostmi psa by dle Cobb et al. (2016) neměli mít na hladinu kortizolu vliv. Což se nám v našem výzkumu potvrdilo.

Experiment č. 2 v této studii nepotvrdil vztah mezi jednotlivými proměnnými na hladinu salivárního kortizolu. Důvodem však může být malé množství vzorků.

Z grafů lze vyčíst, že již před fyzioterapií je hladina kortizolu u některých jedinců poměrně vysoká. Po fyzioterapii se hladina výrazně nesnížila, ale naopak se ve většině případů dokonce zvýšila. Tato skutečnost může být ovlivněna například tím, že pes při fyzioterapii prožívá nepříjemné zážitky spojené s koupelí, nebo polohováním do nepřírodných nebo až bolestivých poloh. Zároveň může mít na hladinu kortizolu vliv zdravotní indikace, neboť některá ortopedická a neurologická onemocnění mohou být velice bolestivá.

K hodnocení míry stresu by se daly použít i jiné markery jako například slinný imunoglobulin A (Svobodová et al. 2014) nebo alfa-amyláza, která je účinným markerem především u zkoumání stresu spojeného s bolestí (Kang et al. 2022).

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo sledováním změn hladin stresových hormonů (kortizolu) ověřit hypotézu, že psi, u kterých byla opakovaně prováděna fyzioterapie v rámci řešení jejich zdravotních problémů, budou mít v průběhu času nižší stresovou odezvu na samotnou fyzioterapii, která se projeví i nižší hladinou uvolněných stresových hormonů.

Fyzioterapie se v současnosti u psů stává standardní součástí terapie mnoha ortopedických i neurologických problémů. Díky možnosti využití velkého množství rozdílných fyzioterapeutických přístupů se ovšem pes často při samotném fyzioterapeutickém ošetření setkává se zcela novými a pro něj neznámými podněty, které u něho mohou vyvolat stresovou reakci. Těmito podněty může být například koupel ve vodě, manipulace a dotýkání se částí těla cizím člověkem, což je často spojené i s určitou bolestivostí, polohování do pozic, které nejsou pro psa zcela přirozené a nemusí být pro psa komfortní. Reakce na všechny tyto fyzioterapeutické přístupy jsou u psů samozřejmě velice individuální a mohou významně ovlivnit účinnost prováděné fyzioterapie.

Provedenými experimenty na testovaném souboru psů se stanovenou hypotézu nepodařilo potvrdit. Je možné, že velikost souboru sledovaných psů nebyla dostatečná, neboť kompletní soubor vzorků slin byl získán pouze od 6 jedinců. Také je možné, že očekávaného výsledku by bylo dosaženo častějším opakováním fyzioterapeutického ošetření, v tomto výzkumu byli hodnoceni psi pouze během 3 po sobě jdoucích ošetření. V této diplomové práci bylo ověřeno, že míra stresové reakce na fyzioterapeutické ošetření byla velice individuální a v tomto případě nebyla závislá na věku, velikosti, ani pohlaví psa, a dokonce ji neovlivňovala ani denní doba provedené fyzioterapie.

K doplnění výsledků a ověření stanovené hypotézy by bylo vhodné rozšířit soubor sledovaných psů i počet opakování jednotlivých fyzioterapeutických ošetření v rozsáhlejší studii, která by lépe reflektovala danou problematiku a lépe zhodnotila účinnost fyzioterapie v souvislosti s mírou stresové reakce, kterou u psa vyvolává.

## 8 Literatura

Bartolomé E, Cockram MS. 2016. Potential Effects of Stress on the Performance of Sport Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* **40**:84-93.

Beerda B, Schilder MBH, Hooff JARAM van., Vries HW de. 1997. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *applied animal behaviour science* **52**:307-319.

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

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

Calatayud M. 2019. a royal history of animal physiotherapy. available at <https://history.physio/a-brief-history-of-animal-physiotherapy/> (accessed December 29, 2021).

Canapp S, acciani D, Hulse D, Schulz K, Canapp D. 2009. Rehabilitation Therapy for Elbow Disorders in Dogs. *Veterinary surgery* **38**:301-307.

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

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

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

Colussi A, Stefanon B, Adorini C, Sandri M. 2018. Variations of salivary cortisol in dogs exposed to different cognitive and physical activities. *Italian Journal of Animal Science* **17**:1030-1037.

Cook NJ. 2012. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of animal Science* **92**:227-259.

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

- De Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt M. 2005. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **29**:271-281.
- Dreschel NA, Granger DA. 2009. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and Behavior* **55**:163-168.
- Esposito a, Bianchi V. 2012. *Cortisol: physiology, regulation and health implications*. Nova Science Publishers, New York.
- Gjerstad JK, Lightman SL, Spiga F. 2018. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* **21**:403-416.
- Greenstein B, Wood D. 2011. *The Endocrine System: at a Glance*. 3.rd edition. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Heimbürge S, Kanitz E, Otten W. 2019. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General and Comparative Endocrinology* **270**:10-17.
- Hekman JP, Karas aZ, Sharp CR. 2014. Psychogenic Stress in Hospitalized Dogs: Cross Species Comparisons, Implications for Health Care, and the Challenges of Evaluation: Cross Species Comparisons, Implications for Health Care, and the Challenges of Evaluation. *animals* **4**:331-347.
- Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. 2009. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* **34**:163-171.
- Hourdebaigt J-P. 2012. *Masáže psů. anahita*, [Praha].
- Hydbring-sandberg E, Höglund K, Svartberg K, Swenson L, Forkman B. 2004. Physiological reactions to fear provocation in dogs. *The Journal of endocrinology* **180**:439-48.
- Chauvet a, Laclair J, Elliott DA, German aJ. 2011. Incorporation of exercise, using an underwater treadmill, and active client education into a weight management program for obese dogs. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* **52**:491-6.
- Kanczkowski W, Sue M. 2016. adrenal Gland Microenvironment and Its Involvement in the Regulation of Stress-induced Hormone Secretion during Sepsis. *Frontiers in Endocrinology* **7**.
- Kang E-ha, Park S-hee, Oh Y-in, Seo K-won. 2022. assessment of salivary alpha-amylase and cortisol as a pain related stress biomarker in dogs pre-and post-operation. *BMC Veterinary Research* **18**:1-9.
- Kittnar, O., Frynta, D., Fraňková, M., Skarlandtová, H. 2010. Stress and stress hormones in mammals. *Československá fyziologie*. **59** (2). 32-36.

- Kobelt aJ, Hemsworth PH, Barnett JL, Butler KL. 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science* **75**:157-161.
- Koivunen ME, Krogsrud RL. 2006. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Laboratory Medicine* **37**:490-497.
- König v. Borstel U, Visser EK, Hall C. 2017. Indicators of stress in equitation. *applied animal Behaviour Science* **190**:43-56.
- Koolhaas JM, de Boer SF, Buwalda B. 2006. Stress and adaptation. *Current Directions in Psychological Science* **15**:109-112.
- Koren L, Mokady O, Karaskov T, Klein J, Koren G, Geffen E. 2002. a novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *animal Behaviour* **63**:403-406.
- Koyama T, Omata Y, Saito A. 2003. Changes in Salivary Cortisol Concentrations During a 24-Hour Period in Dogs. *Hormone and Metabolic Research* **35**:355-357.
- Kyrou I, Tsigos C. 2009. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology* **9**:787-793.
- Levine D, Millis DL, Mynatt T. 2001. Effects of 3.3-MHz ultrasound on caudal thigh muscle temperature in dogs. *Veterinary Surgery* **30**:170-174. available at <http://doi.wiley.com/10.1053/jvet.2001.21390>.
- Mahaseth PK, Raghul S. 2021. Veterinary physiotherapy—A literature review. *Int. J. Sci. Healthc. Res* **6**:288-294.
- McGowan, C. M., Goff, L., Stubbs, N. 2007. *animal physiotherapy: assesment, treatment and rehabilitation of animals*. Blackwell. ames, Iowa. 272 p.
- Mench JA, Moberg GP. 2000. *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare* / G. P. Moberg ; J. a. Mench.
- Miller DB, O'callaghan JP. 2002. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism: clinical and experimental* **51**:5-10.
- Millis D, Levine D. 2014. *Canine rehabilitation and physical therapy*. 2.nd edition. Philadelphia, PA, Elsevier.
- Mills D, Karagiannis C, Zulch H. 2014. Stress—Its Effects on Health and Behavior: a Guide for Practitioners. *Veterinary Clinics of North america: Small animal Practice* **44**:525-541.
- Möstl E, Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology* **23**:67-74.



- Owen, M. R. 2006. Rehabilitation therapies for musculoskeletal and spinal disease in small animal practice. *European Journal of Companion animal Practice*, **16**: 137-148.
- Oyama D, Hyodo M, Doi H, Kurachi T, Takata M, Koyama S, Satoh T, Watanabe G. 2014. Saliva collection by using filter paper for measuring cortisol levels in dogs. *Domestic animal Endocrinology* **46**:20-25.
- Prankel S. 2008. Hydrotherapy in practice. *In practice* **30**:272-277.
- Price H. 2014. Introduction to veterinary physiotherapy. *UK-Vet Companion animal* **19**:130-133.
- Reeder DAM, Kramer KM. 2005. STRESS IN FREE-RANGING MAMMALS: INTEGRATING PHYSIOLOGY, ECOLOGY, aND NATURAL HISTORY. *Journal of Mammalogy* **86**:225-235.
- Reynolds PD, Ruan Y, Smith DF, Scammell JG. 1999. Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **84**:663-9.
- Rivière S. 2007. Physiotherapy for cats and dogs applied to locomotor disorders of arthritic origin. *Veterinary Focus*. **17**(3). 32-36.
- Roth RR. 2021. General adaptation syndrome (GAS). *Salem Press Encyclopedia of Health*.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck aU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews* **21**:55-89.
- Selye H. 1998. a syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* **10**:230-1.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* **166**:869-887.
- Shumway R. 2007. Rehabilitation in the First 48 hours after Surgery. *Clinical Techniques in Small animal Practice* **22**:166-170.
- Spies CM, Strehl C, van der Goes MC, Bijlsma JWJ, Buttgerit F. 2011. Glucocorticoids. *Best Practice* **25**:891-900.
- Svoboda M. 2001. Nemoci psa a kočky II. díl. Noviko, Brno.
- Svobodová I, Chaloupková H, Končel R, Bartoš L, Hradecká L, Jebavý L. 2014. Cortisol and Secretary Immunoglobulin a Response to Stress in German Shepherd Dogs. *PLoS ONE* **9**:1-5.

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

Trojan S. 2003. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Grada, Praha.

Van Dyke JB. 2009. Canine rehabilitation: an inside look at a fast-growing market segment. *DVM: The Newsmagazine of Veterinary Medicine* **40**:14S.

Veenman P. 2006. animal physiotherapy. *Journal of Bodywork* **10**:317-327.

Wallace I, Cunningham S, Lindsay J. 2009. The diagnosis and investigation of adrenal insufficiency in adults. *annals of clinical biochemistry* **46**:351-67.

Wang, T. J., Belza, B., Elaine Thompson, F., Whitney, J. D., & Bennett, K. 2007. Effects of aquatic exercise on flexibility, strength and aerobic fitness in adults with osteoarthritis of the hip or knee. *Journal of advanced nursing*, **57**(2), 141-152.

Wetzel LM. 2009. Canine rehabilitation evolving to aid arthritic, post-op patients. *DVM: The Newsmagazine of Veterinary Medicine* **40**:1S.

Obr. č. 1: Maďa P, Fontana J. [2013]. Stres. available at <http://fb.lt.cz/skripta/xi-regulacni-mechanismy-1-endokrinni-regulace/9-stres/> (accessed February 25, 2022).

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACTH adrenokortikotropní hormonu

CRH kortikoliberin

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay (enzymový imunotest)

GAS general adaptation syndrome (obecný adaptační syndrom)

HCC hair cortisol concentration (kortizol ze srsti)

HPA hypotalamo-hypofyzární osa

IgA imunoglobinu a

PNMT Phenylethanolamin N-methyltransferázy (fenyletanolamin-N-metyl transferáza)

RIA radioimunotest

SAM sympato-adreno-medulární osa



## 10 Samostatné přílohy

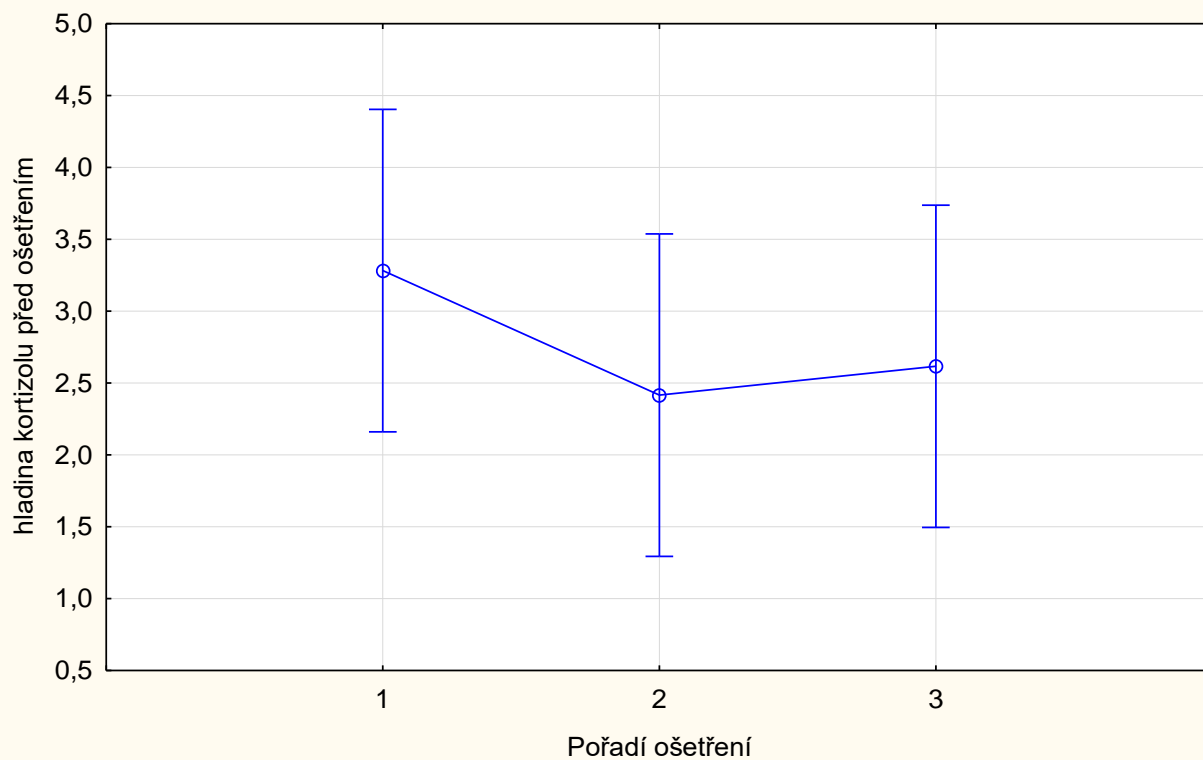
Tabulka č. 1 Jednofaktorová ANOVA pro porovnání hladin kortizolu před ošetřením v závislosti na opakované fyzioterapii

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro hladinu kortizolu před ošetřením Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	138,3339	1	138,3339	83,31694	0,000000
Pořadí ošetření	2,4711	2	1,2356	0,74416	0,491882
Chyba	24,9050	15	1,6603		

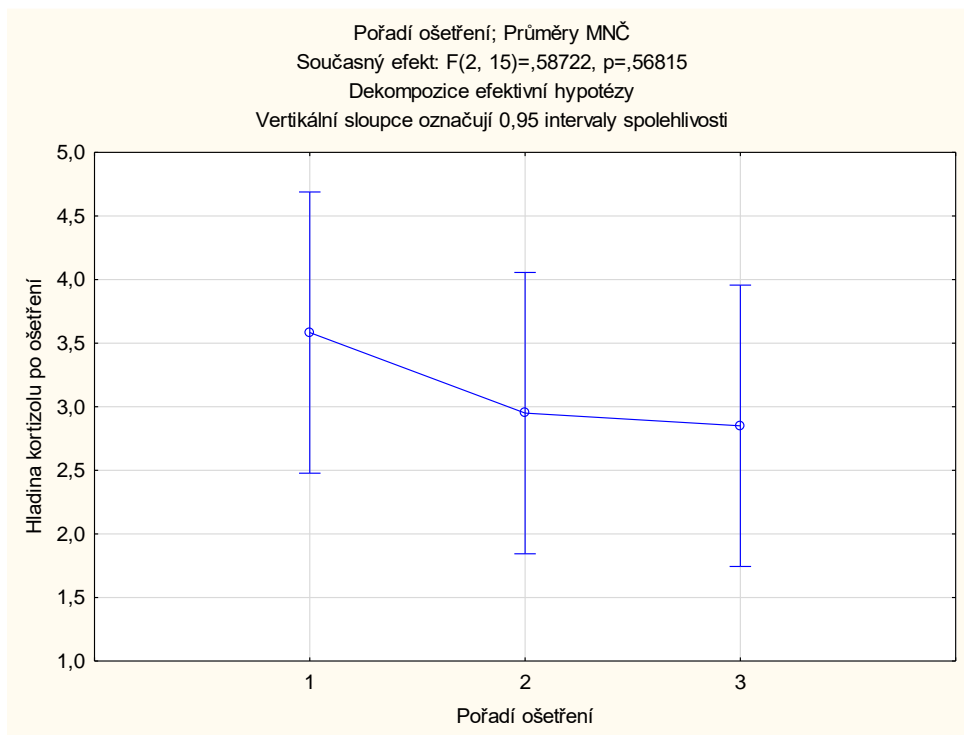
Tabulka č. 2 Jednofaktorová ANOVA pro porovnání hladin kortizolu po ošetření v závislosti na opakované fyzioterapii

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Hladinu kortizolu po ošetření Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	176,0939	1	176,0939	108,9765	0,000000
Pořadí ošetření	1,8978	2	0,9489	0,5872	0,568151
Chyba	24,2383	15	1,6159		

Pořadí ošetření; Průměry MNČ  
Současný efekt:  $F(2, 15)=,74416$ ,  $p=,49188$   
Dekompozice efektivní hypotézy  
Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti



Graf č. 1 Grafický výstup z jednofaktorové aNOVY pro porovnání hladin kortizolu před ošetřením v závislosti na opakované fyzioterapii



Graf č. 2 Grafický výstup z jednofaktorové ANOVY pro porovnání hladin kortizolu po ošetření v závislosti na opakované fyzioterapii