

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Diurnální změny hladiny salivárního kortizolu psa**

**Kateřina Šichová**

**Zájmové chovy zvířat**

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

© 2020/ 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci: „Diurnální změny hladiny salivárního kortizolu psa“ 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 26. 4. 2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D.za odborné a organizační vedení a velkou ochotu při zpracovávání této práce.

V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat své rodině a partnerovi za podporu a trpělivost.

# Diurnální změny hladiny salivárního kortizolu psa

## Souhrn

Pojem welfare zvířat je v současné době často spojován se stresem. Stres přímo souvisí se zvýšením hladiny některých hormonů, u psů pak především s nárůstem hladiny hormonu kůry nadledvin, kortizolu. Kortizol lze stanovit invazivní metodou z krve, stále více však stoupá zájem po možnostech měření jeho koncentrace neinvazivním způsobem, který může představovat sledování hladiny kortizolu ve slinách. U řady hormonů bylo popsáno kolísání jejich hladiny v průběhu dne, tzv. cirkadiální rytmus. Literární údaje týkající se změn hladin kortizolu ve slinách psů jsou nejednoznačné. Tato diplomová práce si kladla za cíl zjistit, jak se hladina kortizolu mění ve slinách psa v průběhu dne.

K získání dat byly použity salivární vzorky od 7 psů a 6 fen různých plemen a velikostí. Všechna zvířata byla ve věku od 3 do 8 let, zdravá a nebyla kastrována. Vzorky byly odebírány každé dvě hodiny po dobu dvou dnů, přičemž psi na proces odběru slin byli 5 dnů předem uvykáni. Hladiny slinného kortizolu pak byly stanoveny pomocí imunologické metody ELISA.

Měření hladiny salivárního kortizolu testovaných psů jednoznačně prokázalo střídání hladiny kortizolu v průběhu dne. K významnému nárůstu hladiny kortizolu docházelo mezi šestou a osmou hodinnou ránní, do poledních hodin křivka kortizolu klesala. Tento trend byl popsán také u člověka a je označován jako „awakening effect“. Dále bylo hodnoceno, zda se mění hladina kortizolu v závislosti na pohlaví testovaných zvířat. Rozdíl v naměřené koncentraci kortizolu ve slinách sledovaných psů a fen nebyl statisticky významný. V pracích, kde bude studován vliv stresu na koncentraci hormonu kortizolu je třeba cirkadiální střídání tohoto hormonu zohlednit, jinak může dojít k nepřesné a zavádějící interpretaci výsledků. Za splnění této podmínky lze kortizol použít jako možný fyziologický marker stresu, je však vhodné jej doplnit dalšími stresovými markery a sledováním změn v chování zvířat v experimentu.

**Klíčová slova:** Pes, fyzická zátěž, sliny, kortizol, stanovení

# Diurnal changes in dog salivary cortisol levels

## Summary

The concept of animal welfare is currently often associated with stress. Stress is directly related to an increase in the level of some hormones, and in dogs mainly to an increase in the level of the adrenal cortex cortisol hormone. Cortisol can be determined by the invasive method from the blood, but there is a growing interest in the possibility of measuring its concentration in a non-invasive way, which can be monitoring the level of cortisol in saliva. For a number of hormones, fluctuations in their levels during the day, the so-called circadian rhythm, have been described. Literature data on changes in cortisol levels in the saliva of dogs are inconclusive. This diploma thesis aimed to find out how the level of cortisol changes in the saliva of the dog during the day. Salivary samples from 7 males and 6 females of different breeds were used to obtain data

and size. All animals were 3 to 8 years old, healthy and not neutered. Samples were taken after two hours for two days, with dogs on the sampling processg get used to 5 days in advance. Salivary cortisol levels were then determined by immunological ELISA.

Measurement of the salivary cortisol level of the tested dogs clearly showed alternation of cortisol levels during the day. There is a significant increase in cortisol levels between six and eight o'clock in the morning, and by noon the cortisol curve decreases. This trend has also been described in humans and is referred to as the "awakening effect". It was further evaluated whether cortisol levels change depending on the sex of the test animals. The difference in the measured concentration of cortisol in the saliva of the observed dogs and bitches was not statistically significant.

In works where the effect of stress on the concentration of the hormone cortisol will be studied, the circadian alternation of this hormone must be taken into account, otherwise inaccurate and misleading interpretation of the results may occur. If this condition is met, cortisol can be used as a possible physiological marker of stress and it is appropriate to supplement it with other stress markers, such as changes in the behavior of the monitored animals.

**Keywords:** Dog, physical load, spit, cortisol, determination

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Vědecké hypotézy .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Stres.....</b>	<b>3</b>
3.1.1	Obecný adaptační syndrom (GAS).....	4
3.1.2	Stresová osa sympato-adreno-medulární (SAM) .....	5
3.1.3	Stresová osa hypotalamo-hypofyzární (HPA).....	5
<b>3.2</b>	<b>Nadledviny.....</b>	<b>7</b>
3.2.1	Hormony kůry nadledvin .....	7
1.	Glukokortikoidy .....	8
Hormon kortizol.....		9
Biosyntéza kortizolu.....		10
Sekrece kortizolu.....		12
Účinky kortizolu.....		14
2.	Mineralokortikoidy.....	15
3.	Androgeny .....	16
3.2.2	Dřeň nadledvin .....	16
<b>3.3</b>	<b>Laboratorní diagnostika hladiny kortizolu.....</b>	<b>17</b>
3.3.1	Stanovení salivárního kortizolu.....	18
<b>3.4</b>	<b>Sliny.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Sekrece slin.....</b>	<b>19</b>
3.5.1	Složení slinpsa.....	21
3.5.2	Tvorba slin.....	22
3.5.3	Nervové řízení sekrece slin .....	22
<b>3.6</b>	<b>Diurnální rytmus kortizolu.....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál .....</b>	<b>24</b>
4.1.1	Zvířata .....	24
4.1.2	Technické zařízení.....	24
<b>4.2</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>26</b>
4.2.1	Sběr materiálu .....	26
4.2.2	Měření dat .....	26
4.2.3	Statistické zpracování dat.....	28
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>29</b>

<b>5.1</b>	<b>Popis dat .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>Hypotéza 1: Hladina salivární koncentrace hormonu kortizolu se u psa liší v průběhu dne .....</b>	<b>29</b>
<b>5.3</b>	<b>Hypotéza 2: Hladina salivárního kortizolu u psů a fen se liší .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>37</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>46</b>

# 1 Úvod

V současnosti je pojem welfare zvířat často spojován se stresem. Stres přímo souvisí se zvýšením hladiny některých hormonů, u psů pak především s nárůstem hladiny hormonu kůry nadledvin, kortizolu. Kortizol lze stanovit invazivní metodou z krve, stále více však stoupá zájem po možnostech měření jeho koncentrace neinvazivním způsobem, který představuje stanovení hladiny kortizolu ve slinách. U řady hormonů bylo popsáno kolísání jejich hladiny v průběhu dne, tzv. cirkadiální rytmus. Literární údaje týkající se změn hladin kortizolu ve slinách psů jsou nejednoznačné. Tato diplomová práce si proto kladla za cíl zjistit, jak se hladina kortizolu mění ve slinách psa v průběhu dne.



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

### **2.1 Cíl práce**

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda v průběhu dne dochází u psů ke změnám v koncentraci hladiny kortizolu ve slinách.

### **2.2 Vědecké hypotézy**

#### **Hypotéza 1:**

V průběhu dne se mění koncentrace kortizolu ve slinách psa.

#### **Hypotéza 2:**

Hladina salivárního kortizolu ve slinách psů a fen se liší.

## 3 Literární řešerše

### 3.1 Stres

Definicí stresu je mnoho. Obecně je stres stav, kdy dochází k narušení homeostázy v důsledku vnitřních nebo vnějších nepříznivých sil, kterým se říká stresory. Jako odpověď na tyto stresory mobilizuje organismus velmi složité spektrum fyziologických a behaviorálních odpovědí. Tyto odpovědi mají za cíl tuto rovnováhu opět obnovit (Reeder et Kramer, 2005).

Jedná – li se o odpověď, která motivuje jedince k vyšším výkonům, nazýváme ji eustres (Kittnar et al., 2010). Eustresy zahrnují situace sice zatěžující a stresové, ale paralelně i příjemné. Eustresem nazýváme stav, kdy vlivem zvýšení hladiny glukagonu v krvi nastává zároveň zvýšení glykémie. S tímto se současně zvyšuje i krevní tlak a tepová frekvence. Krev zvyšuje svůj průtok vitálními orgány a vzhledem k periferní rezistenci vůči inzulinu, kterou zajišťují glukokortikoidy, je velké množství glukózy rezervováno pro mozek (Kittnar et al., 2010).

Distres je naopak vnímán jako negativní, špatný stres, který pomalu jedince ničí (Lazarus, 1974).

Stresory mohou být vnitřní, například nedostatek kyslíku ve tkáních a hypoglykémie, nebo vnější, které se týkají teploty, cvičení či zranění. Další stresory mohou být psychické povahy, ty zahrnují podněty, které ovlivňují emoce, vyvolávají zlost, úzkost nebo strach (Reeder et Kramer, 2005). Existují dvě fyziologické reakce, díky kterým je organismus schopen se adaptovat: hypotalamus-hypofýza-kůra nadledvin (HPA) a sympato-adreno-medulární osa (SAM) (Kyrou et Tsigos, 2009).

Odezva na podnět je započata ve chvíli, kdy je stresový faktor vnímán jako takový zvířecím mozkiem. Obě tyto osy vycházejí z hypotalamu a jsou modulovány limbickými vstupy (Reeder et Kramer, 2005).

### 3.1.1 Obecný adaptační syndrom (GAS)

Reakce organismu na jednotlivé stresory je specifická, avšak při každé stresové reakci můžeme v organismu zaznamenat obecné posloupnosti a zákonitosti. Tato stresová reakce se nazývá obecný adaptační syndrom (GAS) (General Adaptive Syndrom) (Fontana et Maďa, 2014).

GAS je soubor dlouhodobých i krátkodobých reakcí na stres a jeho cílem je obnovit homeostázu (stálé vnitřní prostředí). (Kittnar et al., 2010). Někteří tento model neuznávají, jelikož nezohledňuje všechny procesy, které souvisejí se stresem, avšak lepší a přesnější nikdo neformuloval (Buckner et al., 2017).

GAS se dělí do tří fází: poplachová, adaptační a fáze vyčerpání.

Bezprostředně po reakci na stresor nastává fáze poplachová. Tato fáze je charakteristická aktivací osy SAM (sympato-adreno-medulární), z čímkž je spojené vyplavení katecholaminu – adrenalin a noradrenalin (Kittnar et al. 2010). Katecholaminy jsou tvořeny v adrenergních postgangliových neuronech sympatiku (noradrenalin) a ve dřeni nadledvin (Fontana et Maďa, 2014). Fáze poplachová se vyznačuje zvýšením krevního tlaku a dalšími mechanismy, které jsou typické pro reakci „boj nebo útěk“. Mimo přípravy těla pro svalovou práci je také aktivována osa HPA (hypotalamus-hypofýza-nadledviny) a systém POMC (prekurzor ACTH) (Trojan, 2003). Po působení stresoru se organismus vrací zpět k normální úrovni aktivity. Pokud působí nepřítliš intenzivně déle, nastává fáze adaptace (Bernášková et Polách, 2016).

V adaptační fázi dochází k další aktivaci systému HPA a POMC). Hladina kortizolu se nadále zvyšuje a kortizol za pomoci lipolytického a glukoneogenetického účinku zajišťuje další substrát pro energetické reakce. Tato fáze je typická odolností organismu proti stresu (Trojan, 2003). Tělo buď aktivuje mechanismy napomáhající pro odbourání stresu nebo se snaží minimalizovat jeho škodlivost. Reakce mají za účel zachovat objem tělesných tekutin a zároveň udržet rezervu energie pro vitální orgány (Fontana et Maďa, 2014). Při ještě větším nárůstu hladiny kortizolu by došlo k jeho proteokatabolickému a imunosupresivnímu účinku, či v nejhorším případě k demineralizaci kostí (Trojan, 2003).

Pokud stres trvá příliš dlouho, či je příliš silný, nastává fáze vyčerpání. Tato fáze může nastat i v případě, jeli sekrece kortizolu narušena (například poškozením kůry nadledvin) (Trojan, 2003). Tato fáze, kdy jsou stres a s ním spojené adaptační mechanismy brány jako škodlivé, se označuje distres (Fontana et Maďa, 2014).

### 3.1.2 **Stresová osa sympato-adreno-medulární (SAM)**

Stresová osa SAM odpovídá na stresor téměř okamžitě. Odpověď pochází z posteriorního hypotalamu, kde je aktivován sympatický nervový systém, který posléze působí na dřeň nadledvin. Tento systém vede k uvolňování noradrenalinu ze spinálních ganglií a také k uvolňování katecholaminů z dřeň nadledvin (drenalin, noradrenalin a dopamin) (Reeder et Kramer, 2005).

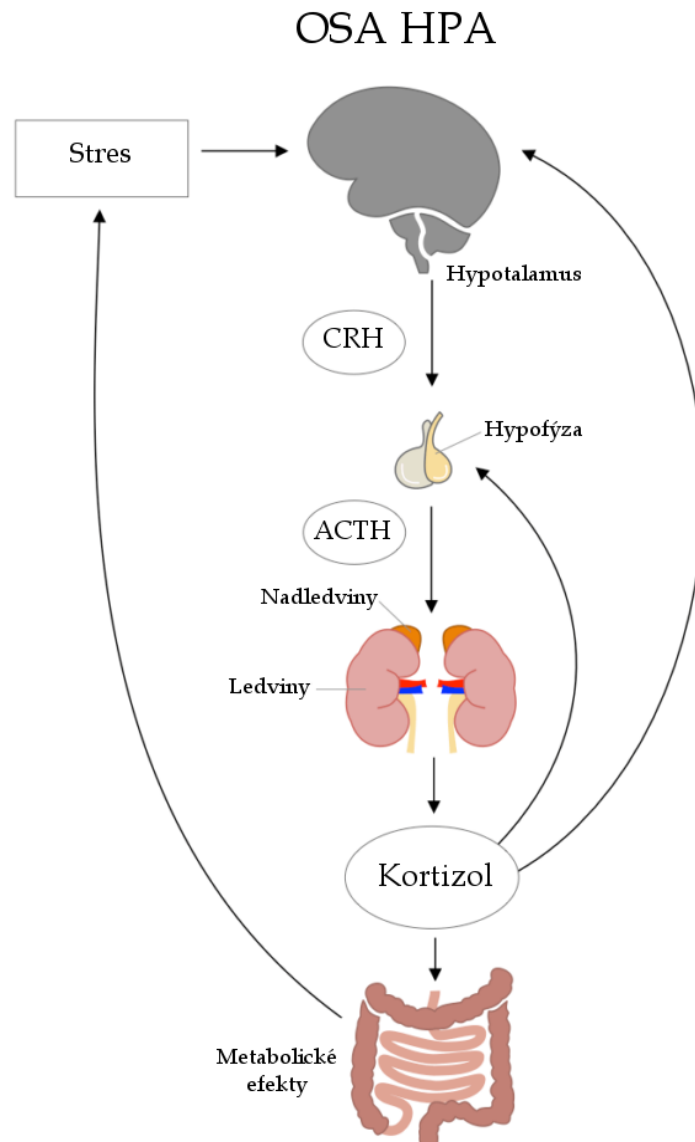
Po vyplavení andrenalinu a noradrenalinu dochází ke zvýšení srdečního výdeje, krevního tlaku a v neposlední řadě ke srážlivosti krve. Tento proces vede také k roztažení cév v mozku a svalovině, a naopak ke stažení cév v kůži, gastrointestinálním traktu, slezině, pankreatu a játrech. Hormony také stimulují glykogenolýzu v játrech a kosterních svalech, a díky tomu poskytují energii buňkám centrální nervové soustavy, svalům a srdci. Také mají schopnost zvyšovat resorpci glukózy ve střevech, inhibovat sekreci inzulínu a stimulovat lipofýzu. V tomto stavu se také zvyšuje bdělost a zlepšují se kognitivní funkce. Všechny tyto kroky organismus postupně připravují na blížící se zátěžovou situaci a pomáhají tak překonat působení stresoru. Orgán, který je inervovaný prostřednictvím sympatického nervového systému je inervován také parasympatickým nervovým systémem. Právě aktivace parasympatického nervového systému napomáhá k regulaci stresové osy SAM, naopak osa SAM reguluje aktivaci parasympatického nervového systému. Aktivace slouží také k dosažení dynamické rovnováhy mezi systémy opozičními i doplňkovými (Reeder et Kramer, 2005).

### 3.1.3 **Stresová osa hypotalamo-hypofyzární (HPA)**

Osa hypotalamus – hypofýza – nadledviny je soubor sekretorických tkání, které se ve stresových situacích vzájemně po sobě aktivují. V závislosti na tomto procesu začne výlev kortizolu do krve. Tento děj se nazývá descendentní aktivace. Informace přenášená mezi jednotlivými úseky je především na hormonální úrovni (Engelmann, 2004).

Hypotalamus má za úkol zpracovávání periferních vjemů. Vjemy mohou být fyzické (zranění, nedostatek kyslíku nebo nadměrná námaha), psychické (úlek, pohled na něco nepříjemného, nervozita) (Mattsson, 2009). Na stimul hypotalamus reaguje exocytózou: CRH a arginin – vasopresinem (AVP) z neurosekrečních buněk. Oba hormony mají za úkol aktivaci sekrečních buněk předního laloku hypofýzy, které zahájí exocytózu ACTH, což je proces, při

kterém buňky uvolňují větší molekuly či struktury do svého blízkého okolí. Ten následně prochází stěnou kapilár, odkud je krevním oběhem přenášen až k cílovému orgánu, kůře nadledvin. Zde se naváže na kompetentní receptor a spustí syntézu a sekreci kortizolu. Celá tato činnost je řízena mnoha různými mechanismy. Mezi nejdůležitější patří zpětnovazební inhibice vlastními produkty, především samotným kortizolem (viz Obrázek č. 1) (Engelmann, 2004).



**Obrázek č. 1:** Osa HPA

(dostupné z:<https://www.sallypattison.com.au/adrenal-fatigue-2/>)

K uvolnění CRH z hypotalamu dochází na základě senzorických informací nebo předchází aktivace osy SAM. Hypotalamus také spouští sekreci ACTH v adenohipofýze. Krevním řečištěm ACTH také ovlivňuje produkci dalších hormonů. Ovlivňuje zvyšování vyplavování glukokortikoidů (kortizolu) v kůře nadledvin. Glukokortikoidy zajišťují hlavní adaptační efekt, zejména zpomalení trávení, útlum imunitních reakcí a mobilizaci energie (Engelmann, 2004).

## 3.2 Nadledviny

Nadledviny (lat. *glandulae adrenales s. suprarenales*), jsou malé párové orgány s vnitřní sekrecí. Nachází se kraniomediálně (na horních pólech) od ledvin v retroperitoneálním tuku (Trojan, 2003). Levá část nadledvin leží na úrovni druhého bederního obratle a pravá část leží na úrovni třináctého hrudního obratle. U psů se hmotnost žlázy pohybuje od 1 do 2 gramů. Nadledviny se dělí na dvě části, jejichž vývoj probíhal odlišně – na kůru a dřeň. Kůra nadledvin je lokalizována zevně a tvoří 80-90 % žlázy. Je mezodermálního původu a na řezu má žlutou barvu. Dřeň je menší částí nadledvin, původem je z neuroektodermu neutrální lišty, a na řezu je tmavě hnědá (Svoboda, 2001).

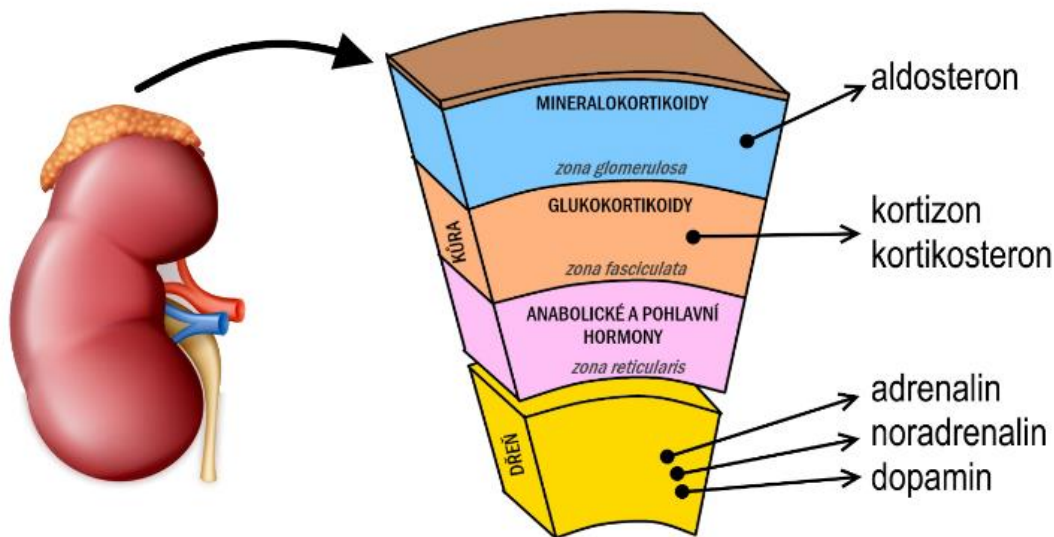
Nadledviny syntézou sekrecí řady hormonů zasahují do mnoha základních životních procesů (Wallace, 2009). Skládají ze dvou funkčních částí. Z vnější části neboli kůry nadledvin a vnitřní části, dřene nadledvin. Tyto části se embryologicky, funkčně i anatomicky liší (Reece, 2009).

Kůra nadledvin prezentuje značně významnou, životně důležitou endokrinní žlázu a je tvořena třemi zónami. Každá ze zón je charakteristická specifickou sekrecí hormonů. Povrchová zóna *glomerulosa* (klubíčková) produkuje hormony mineralokortikoidy, zóna *fasciculata* (sloupcová) a zóna *reticularis* (síťovitá) tvoří androgeny a glukokortikoidy (viz Obrázek č. 2) (Reece, 2009).

### 3.2.1 Hormony kůry nadledvin

Hormony kůry nadledvin se řadí mezi steroidy. Tyto hormony i se svými prekurzory nemohou být uloženy v buňkách a jsou tedy ihned po syntéze vylučovány do krve. Mineralokortikoidy a glukokortikoidy jsou produkovány v nadledvině, kdežto androgeny

se v nadledvině, tukové tkáni, pohlavních žlázách a dalších tkáních pouze transformují na estrogeny (Svoboda. 2001).



**Obrázek č. 2:** hormony kůry nadledvin  
(dostupné z: [https://cit.vfu.cz/klinpat\\_atlas/nadled.html](https://cit.vfu.cz/klinpat_atlas/nadled.html))

## 1. Glukokortikoidy

Nejvýznamnějšími hormony, které se řadí mezi glukokortikoidy jsou kortizol a kortikosteron. Dále do této skupiny patří kortizon a 11 – dehydrokortikosteron. V jaké koncentraci glukokortikoidy cirkulují je u jednotlivých druhů zvířat značně odlišné, především díky rozdílům v citlivosti tkání a negativní zpětné vazbě (Reynolds et al., 1999; Romero et al., 2008).

Glukokortikoidy jsou velice významné pro cirkulační, metabolickou, krevní i imunitní adaptaci na fyzický či emoční stres. Jejich samotná sekrece je řízena hypofýzou a nejdůležitějším podnětem či spouštěčem je stres (Silbernagl, 2012).

U některých hlodavců – myši, potkanů a králíků, u ptáků, obojživelníků a ryb je dominantním glukokortikoidem kortikosteron. Kortizol pak převládá u prasat, koček, primátů, krav, psů a u hlodavců, zejména u křečků a morčat. Vztah mezi hormony se může měnit v průběhu různých fází života zvířete, působí – li u něj oba hormony (Reynolds et al., 1999; Romero et al., 2008).

U psů se vyskytuje kortizol a kortikosteron ve stejném poměru.

Všechny glukokortikoidy, včetně kortizolu, hrají velkou roli v některých fyziologických pochodech. Ovlivňují například tvorbu glukózy, zvyšuje glukoneogenezi v játrech, mají vliv také na imunitní systém, nervový systém, snižují rezistenci vůči infekci a v neposlední řadě se vyskytují i u zánětlivých procesů (Mourek, 2005).

### **Hormon kortizol**

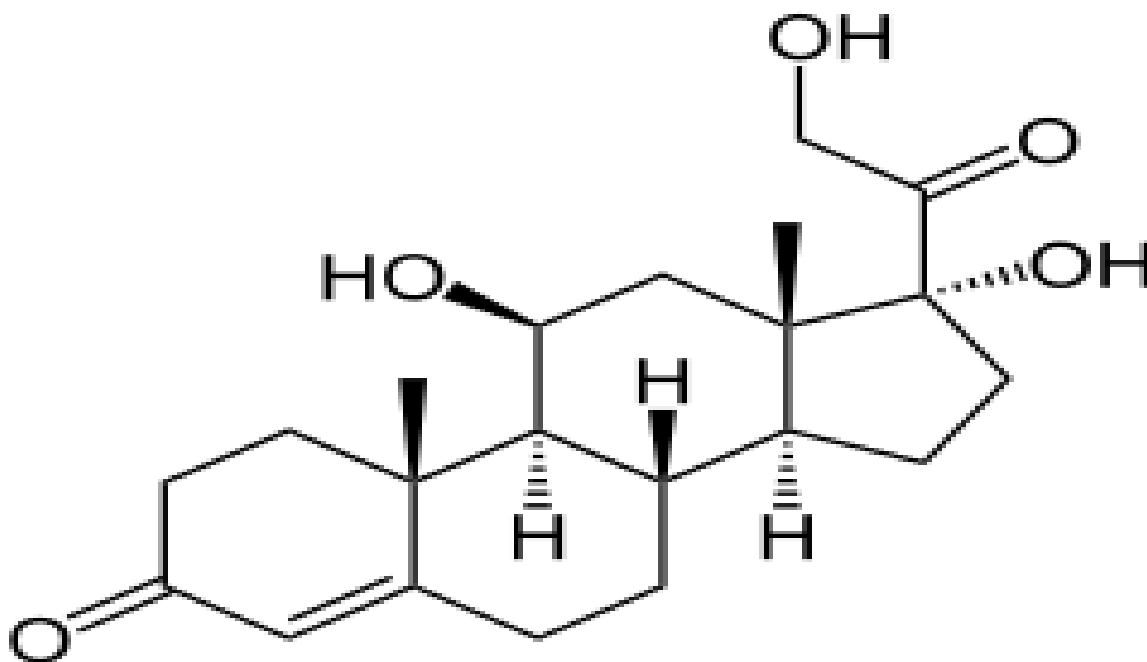
Kortizol je hormon steroidní povahy, který reprezentuje skupinu glukokortikoidů. Jeho syntéza probíhá v kůře nadledvin. Všechny hormony kůry nadledvin, včetně kortizolu jsou derivátem cholesterolu, který je trvalou součástí buněčných membrán (Mourek, 2005).

Základní strukturou tvořící kortizol je cyklopentanoperhydrofenantrenové jádro. Podle struktury se kortizol (viz Obrázek č. 3) řadí mezi C21 adrenokortikální steroidy a vzniká hydroxylací progesteronu (Trojan, 2003).

Hlavním úkolem kortizolu je zabezpečit pro organismus dostatečné množství živin a zajistit energii po vyčerpání jaterních zásob glykogenu. (Greenstein et Wood, 2011; Bernášková et Polách, 2016).

Pro většinu savců je kortizol hlavní stresový hormon, jehož úkolem je udržení v organismu homeostázu při stresu psychickém či fyzickém. Jeho hladina je řízena komplikovanou zpětnou vazbou, která spočívá v tom, že hormon působí zpětně a inhibuje tak sekreci ACTH (Gjerstad et al., 2018).





**Obrázek č. 3:** Molekula kortizolu (Ganong 2005)

Sekrece kortizolu je regulována pomocí adenohipofyzárního adrenokortikotropního hormonu, který se uvolňuje v závislosti na množství uvolněného kortikotropinu (CRH), HPA osy.

#### Biosyntéza kortizolu

Metabolickou výchozí látkou všech adrenokortikálních steroidních hormonů je cholesterol (Wallace et al. 2009), který je trvalou součástí buněčných membrán (Mourek 2005). Je tedy prekurzorem steroidních hormonů. Steroidní hormony jsou tvořeny ve všech vrstvách kůry, a proto obsahují četné tukové kapénky, jenž slouží jako zásobárny pro cholesterol. Jediný rozdíl v jednotlivých vrstvách je pouze v jejich enzymatické výbavě, která je spojená s tvorbou rozdílných hormonů (Boron et Boulpaep, 2017). Dalším zdrojem cholesterolu pro buňky jsou plazmatické lipoproteiny (HDL, LDL). Kortizol (i další drobné molekuly steroidních hormonů) volněpřechází přes plazmatickou membránu přímo do krevního řečiště, buňky nadledvin tedy nepotřebují zásobní váčky. Sám kortizol se syntetizuje pouze dle poptávky organismu, a ne do zásoby (Esposito et Bianchi, 2012).

Cholesterol tvoří hlavní část plazmatických živočišných membrán, tedy přibližně 30 až 40 % plazmatických membrán lipidů (Nelson et Cox, 2008). Řadí se mezi lipidové látky,

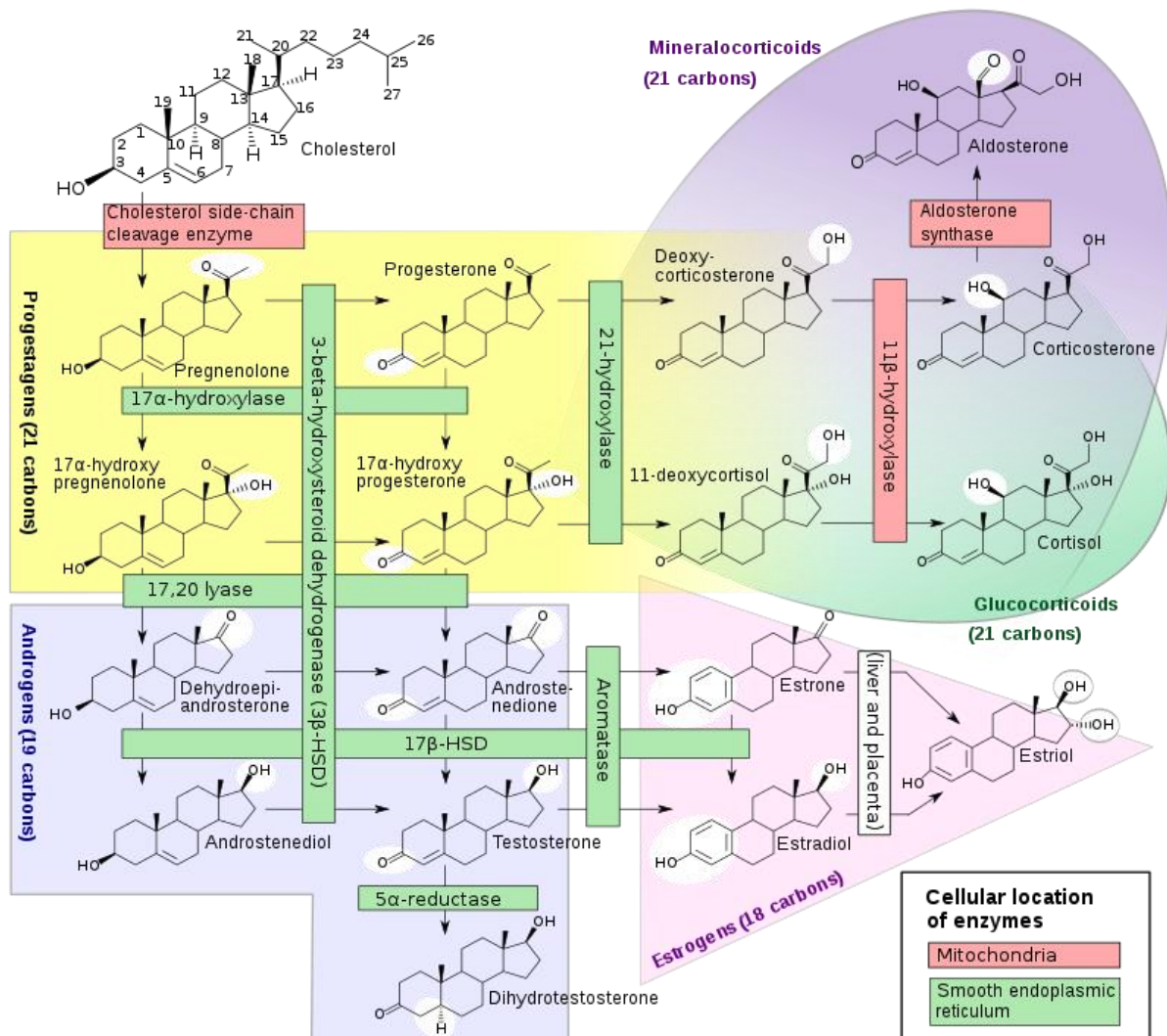
kteřá se odvozuje od triacylglycerolů (Reece, 2009). Jeho menší část je tvořena z acetátu, ale většina je vychytávána z lipoproteinových částic v krvi, protože se v kůře nadledvin nachází velké množství receptorů (Wallace et al., 2009).

První krok potřebný pro zahájení syntézy steroidních hormonů je transport intracelulárního cholesterolu z vnější do vnitřní mitochondriální membrány. Buňky nadledvin jsou vybavené hladkým endoplazmatickým retikulem, který se prolíná se s četnými mitochondriemi a nepřítomností zásobních váček. Celý tento přenos je řízen nosičovým proteinem. Vše začíná vytvořením progesteronu v mitochondriích, který je základní látkou při vzniku kortizolu. V důsledku vytváření steroidních hormonů se cyklopentanoperhydrofenantrenové jádro cholesterolu proti celkovému počtu uhlíků nemění (Ganong, 2005).

Po odštěpení šestiuhlíkové postranního řetězce a za oxidace na dvacátém uhlíku se z cholesterolu stává pregnenolon. Celou tuto reakci katalyzuje cholesteroldezmoláza, enzym z rodiny cytochromů, konkrétněji enzym P450<sub>scc</sub> (side-chain cleavage = štěpení postranního řetězce), což je enzym se skupiny cytochromů, odštěpující postranní řetězec cholesterolu za vzniku pregnenolonu (Wallace et al., 2009).

Pregnenolon je dehydrogenován (odštěpení vodíku z organické látky) na progesteron v endoplazmatickém retikulu (ER), současně probíhá katalýza 3 $\beta$  – hydroxysteroiddehydrogenázy. Tento enzym se zapojuje i do přeměny 17 $\alpha$  – hydroxypregnenolonu na 17 $\alpha$  – hydroxyprogesteron. Oba tyto hormony vznikají z progesteronu při současné katalýze 17 $\alpha$  – hydroxylázy čili P450<sub>c17</sub>. Striktně řízené hydroxylace progesteronu dávají vznik kortizolu.

Vlivem 21 $\beta$  hydroxylázy, P450<sub>c21</sub> se do určitých poloh progesteronu postupně přidává OH – skupina. Nejdříve nastává hydroxylace progesteronu na 17 $\alpha$  hydroxyprogesteron a posléze hydroxylace na 11 – deoxykortiol. Což je hormon, který cestuje zpět do mitochondrií, kde dochází k jeho hydroxylaci na jedenáctém uhlíku a následně vzniká výsledný produkt neboli kortizol (celý tento proces je znázorněn na Obrázku č. 4) (Ledvina et al., 2009).



**Obrázek č. 4:** Biosynzéta kortizolu

Obrázek znázorňuje lokalizaci jednotlivých kroků biosyntézy – mitochondrium (mitochondrie), endoplasmic reticulum (endoplasmatické retikulum). Steroidní hormony jsou syntetizovány enzymově katalyzovanými reakcemi z cholesterolu. (Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Synt%C3%A9za\\_steroidn%C3%BDch\\_horm%C3%B3nov#/media/File:Steroidogenesis.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/Synt%C3%A9za_steroidn%C3%BDch_horm%C3%B3nov#/media/File:Steroidogenesis.svg))

### Sekrece kortizolu

Jak bylo psáno výše, kortizol vzniká v sekrečních buňkách v kůře nadledvin v zona fascicularis. Produkce kortizolu je regulována hypotalamo – hypofyzární osou kůry nadledvin, která má pozitivní odezvu na fyziologické i psychické stresové podněty. Z hypotalamu řídí endokrinní činnost kůry nadledvin nejdříve kortikoliberin, který reguluje

sekreci ACTH z předního laloku hypofýzy. Hypotalamus uvolňuje kortikoliberin (CRH), což je hormon stimulující syntézu a sekreci hormonu ACTH z hypofýzy, a arginin – vasopresin. Tyto dva hormony reagují na stresové podněty spuštěním syntézy pro – hormonu proopiomelanokortinu (POMC) v kortikotropních buňkách přední hypofýzy. Z POMC je posléze tvořen ACTH, který se dále uvolňuje do krevního oběhu (Talabér et al., 2005).

Přímo u psů cirkuluje v krevní plazmě volně přibližně 10 % kortizolu. Zbylý kortizol se ze 75 % váže na specifický protein Cortisol Binding Globulin (CBG, transkortin) a z 15 % na  $\alpha$ 1 kyselý glykoprotein nebo albumin. Po navázání na globulin se lipofilní charakter kortizolu mění na hydrofilní, což způsobuje nepropustnost buněčné membrány. Touto změnou globuliny mění dostupnost kortizolu pro cílové buňky (Kittnar et al., 2010).

Důležitým ukazatelem je také vaznost krevní plazmy, která u psa činí 270 mmol/l, přičemž mezi volným a vazným kortizolem se nachází rovnovážný stav a biologickou aktivitu má pouze volný hormon. Takto navázaný kortizol plní zásobní funkci, jelikož ho vazba chrání před metabolizací v játrech (Trojan, 2003).

Syntéza transkortinu probíhá v játrech a jeho vazba s kortizolem spočívá na vysoké komplementaritě povrchů obou molekul díky vodíkovým můstkům (Klieber et al., 2007). Obvykle je navázání steroidů na CGB vratné, díky čemuž je kontrolován podíl biologicky aktivního kortizolu v krevním řečišti. Avšak schopnost slučovat se s CBG není závislá na tom, jeli jedinec vystaven stresové situaci (Kittnar et al., 2010).

Dojde-li ke vstupu kortizolu do cílové buňky, naváže se na glukokortikoidní receptor. V této podobě je přemístěn do jádra, kde dojde na navázání na specifické prvky a dále působí jako transkripční faktor. Tento proces má za následek syntézu RNA a proteinů. V cílových tkáních vyvolávají proteiny buď inhibiční nebo stimulační reakce (Gjerstad et al., 2018).

V tkáni se nachází dva typy receptorů: glukokortikoidní a mineralokortikoidní, které se liší svou afinitou. Glukokortikoidní receptory mohou vázat pouze glukokortikoidy, zatímco mineralokortikoidní vážou jak glukokortikoidy, tak aldosteron. Tyto receptory jsou ve tkáních rozloženy nerovnoměrně, což má za následek vyvolání odlišných odpovědí na stejný podnět na různých místech. Schopnost přeměňovat inaktivní formu kortizolu na aktivní a naopak má enzym 11 $\beta$ -HSD. Tento regulační faktor má dvě formy, jedna se chová jako reduktáza a druhá jako dehydrogenáza (Kittnar et al., 2010).

Kortizol je schopen sám regulovat vlastní hladinu v krvi pomocí negativní zpětné vazby. Má schopnost inhibovat vlastní syntézu, a tak udržet hladinu ve stanovených mezích.

Méně výrazná zpětná vazba se nachází v hypotalamu, ale i tady kortizol inhibuje za pomoci interakce transkripce genu pro CRH (Trojan, 2003). Tento účinek se projevuje i na druhém hormonu, jímž je antidiuretický hormon (ADH, vazpresin), avšak kortizol zde působí rozdílnou dobu. Jeli stres chronický, je zpomalení procesů výraznější u CRH, kdežto u nárazového zvýšení stresu je inhibice u ADH (Watts, 2005).

K velmi významné negativní zpětné vazbě dochází v adenohypofýze. Kortizol zde snižuje receptory pro CRH na membráně kortikotrofních buněk, dále inhibuje transkripce genu pro prekurzor ACTH (POMC) a nakonec na posttranslační úrovni blokuje výlev exocytálních váčků s ACTH. Tímto procesem dojde k celkovému snížení produkce ACTH a tím i ke snížení produkce kortizolu v nadledvinách. (Gjerstad et al., 2018).

Nadměrná produkce kortizolu může u psů způsobit Cushingův syndrom, který se projevuje nejčastěji alopecií, polyurií polydipsií a jinými kožními změnami. Kdežto snížená produkce má za následek Addisonovu chorobu (Castillo et al., 2009).

### Účinky kortizolu

Účinky kortizolu je možné rozdělit do tří kategorií: proteokatabolické účinky, intermediární a protizánětlivé účinky. Jeho nejvýznamnější funkcí je zvýšení hladiny glukózy v těle a inhibice mnoha anabolických procesů (Trojan, 2003).

Hlavním úkolem kortizolu je bezesporu komplexní regulace energetického metabolismu, která vede ke zvýšení hladiny glukózy v krvi, která je hlavním zdrojem energie pro mozek a svaly. Tento metabolismus glukózy v těle zvyšuje i glukoneogenezi v játrech, zvyšuje účinek dalších glukoneogenetických hormonů, a nakonec zvyšuje syntézu mnoha enzymů. Zároveň dochází k zvyšování krevního tlaku a tepové frekvence, což má za následek zlepšení průtoku krve v potřebných orgánech a celková energie je účinněji dopravována k cílovým tkáním. Vzhledem k lepšímu průtoku krve mozkiem jsou zlepšovány kognitivní funkce. Tyto všechny reakce jsou většinou přechodné a jejich cílem je maximalizace šance na přežití každého jednotlivce (Kyrrou et Tsigos, 2009; Skarlandtová et al., 2010).

Na stranu druhou snižuje vychytávání glukózy ve svalech, což má za úkol šetřit glukózu pro mozek, poněvadž svaly mají zásoby energie vlastní. Kortizol má takzvaný hyperglykemický účinek, což znamená, že zvyšuje hladinu krevního cukru, jenž šetří pro mozek. Tento proces je obzvláště důležitý při stresových reakcích typu „fight or flight“ (Trojan, 2003; Sigmund et al., 2014).

Dalším procesem, který reguluje kortizol je mobilizace tukových zásob. Kortizol působí lipolyticky (katabolický účinek hormonu) na tukovou tkáň a tím uvolňuje mastné kyseliny a glycerol pro další zužitkování (Newton, 2000).

Kortizol také působí jako protizánětlivý hormon, což je hojně využíváno například při léčbě specifických zánětů, u nichž potlačuje zánětlivé projevy. Dalším využitím je při alergických reakcích. Vyvolává také apoptózu T – lymfocytů a zabraňuje jejich další proliferaci. Dále inhibuje mnoho procesů syntézy, mezi, než patří krvetvorba, tvorba kostní hmoty nebo syntéza kolagenních vláken, to vše zejména za účelem úspory energie. Receptory glukokortikoidů se také vyskytují v centrálním nervovém systému, ve kterém se kortizol podílí na tvorbě paměťových stop. Velice důležitá úloha kortizolu je i v prenatálním období, především ve vývoji plic a mozku (Newton, 2000).

Přidlouhodobém stresu kortizol snižuje rezistenci proti infekcím a na druhou stranu pro akutním stresu v imunitním systému zvyšuje nespecifickou imunitu. Jeho účinky u katabolismu bílkovin brání tvorbě protilátek a dělení buněk. Tímto přirozeně degeneruje tkáň, snižuje počet eozinofilních leukocytů a lymfocytů (Bernášková et Polách, 2016).

Stejně množství mechanismů může být na druhou stranu i narušeno, působí-li kortizol za patologických podmínek v nadbytku nebo vůbec. Může se vyskytnout zvýšené riziko imunitních, kognitivních, metabolických, emocionálních či kardiovaskulárních poruch (Esposito et Bianchi, 2012).

Běžná hladina kortizolu u psa před stimulačního ACTH testu je v rozmezí 5–50 ng/ml, po použití ACTH testu se vyskytují hladiny v rozmezí 54 – 170 ng/ml (Sieber-Ruckstuhl et al., 2008; Kosková et Agudelo, 2019). Tyto hodnoty se však u některých autorů liší, ti pak referenční hodnoty pro bazální koncentraci kortizolu v séru uvádějí o něco vyšší, mezi 10 – 187 ng/ml (Bovens et al., 2014).

Jak bylo psáno výše, metabolismus kortizolu probíhá hlavně v játrech. Přičemž všechny metabolity glukokortikoidů jsou hydrofilní a vylučovány mohou být z těla v podobě moči či žluči (trusu) (Kittnar et al., 2010)

## **2. Mineralokortikoidy**

Mineralokortikoidy jsou produkovány v *zona glomerulosa s. arcuata*. Hlavním představitelem je aldosteron, který reguluje koncentraci draslíku a sodíku v krvi.

Njedůležitějším místem jeho působení jsou ledviny, slinné a potní žlázy. Aldosteron podporuje resorpci sodných kationtů a exkreci kationtů draselných. Jeho další úlohou je regulace objemu extracelulární tekutiny, což je tekutina mimo buňky (Dylevský, 2000; Novotný, 2010)

Hlavní regulátore sekrece je angiotenzin II, ovšem vliv má také ACTH, proto se sekrece aldosteronu zvyšuje i při stresu (Trojan, 2003)

### **3. Androgeny**

Androgeny jsou produkovány v *zona reticularis* a v *zona fasciculata*. Androgeny patří mezi mužské pohlavní hormony. Androgeny jsou syntetizovány především ve varlatech, pouze velmi malé procento připadá na kůru nadledvin. Stejně jako u syntézy glukokortikoidů a mineralokortikoidů, i tady je prekurzorem pregnenolon vznikající z cholesterolu. Mají proteoanabolické účinky a jejich sekrece je regulována ACTH (Svoboda, 2001)

#### **3.2.2 Dřeň nadledvin**

Ve dřeni nadledvin se nacházejí buňky polyedrického tvaru s granulovanou cytoplasmou. Kromě těchto buněk se v ní vyskytují četné sinusoidy, nervová vlákna a sympatická ganglia.

Dřeň nadledvin produkuje hormony z rodiny katecholaminů: adrenalin (epinefrin) a noradrenalin (norepinefrin) a dopamin. Tyto hormony se účastní spolu s kortizolem stresové reakce organismu (Junqueira, 2005).

Produkce katecholaminů není vůbec rovnoměrná, 75–80 % buněk produkuje adrenalin a jen 20-25 % produkuje noradrenalin (Svoboda, 2001).

Sekrece katecholaminů je ovlivněna cirkadiálním rytmem a z ledvin je 10x pomalejší než u nervových zakončení. Biologický poločas rozpadu je od 20 sekund do 10 minut a jejich vychytávání zajišťují zakončení sympatiku a chromafinní buňky dřene a jiných orgánů. Mimo to dochází k degradaci enzymy v játrech (Trojan, 2003).

Noradrenalin patří mezi stresové hormony, který je tvořen především jako mediátor v sympatiku, nepatrné množství může být ovšem produkován i v dřeni nadledvin. Vyplavení adrenalinu a noradrenalinu vede k zvýšení srdečního výdeje, krevního tlaku a srážlivosti krve. Díky zvýšené ventilaci noradrenalin zesiluje dodávky kyslíku do organismu (Bernášková et Polách, 2016).

Adrenalin vzniká pouze v dřeni nadledvin a je vyplavován rychle po aktivaci sympatických drah a jeho další sekreci určuje zvýšená hladina kortizolu. Adrenalin se řadí mezi hormony, které působí velice rychle, a to je důvod, proč jeho metabolické účinky zvyšují glykémii. Dále má schopnost štěpení glykogenu v játrech a tím způsobuje rychlou a krátkodobou hyperglykémii. Následkem toho je také snížena citlivost periferních tkání pro inzulín, protože svaly mají vlastní zásobu glykogenu. Tělo tak šetří veškerou dostupnou energii pro mozek, kde jsou glukózové transportéry zcela nezávislé na inzulínu (Bernášková et Polách, 2016).

### **3.3 Laboratorní diagnostika hladiny kortizolu**

Ke zjišťování hladiny kortizolu se v diagnostice používají různé laboratorní metody a různé biologické materiály. Kortizol se stanovuje v séru, heparinizované plazmě, moči a slinách. V krvi se kortizol vyskytuje v biologicky neaktivní formě, vázaný na transkortin z 92 %. Volně, ve formě biologicky aktivní je kortizol přítomný pouze v 8 % (Ledvina et al, 2009).

U zvířat je získávání vzorků velmi komplikované, proto je dobré použít málo invazivní způsoby. I přes to, že se vyžaduje manipulace se zvířaty, sběr slin je tolerován většinou psů a technicky je snadno proveditelný (Dreschel et Granger, 2009) U savců se jedná o odebrání zejména slin, výkalů, moči, mléka a srsti. Při sběru vzorků se vyskytují značné mezidruhové rozdíly, které se týkají cesty a časového průběhu vylučování, či rozdíly uvnitř pohlaví (Sheriff et al., 2011; Cook, 2012).

Koncentrace glukokortikoidů ze slin je měřena zejména dvěma metodami: radioimunotest (RIA) a enzymový imunotest (EIA). Tyto metody fungují na principu separace komplexu antigen a protilátka. Metoda RIA byla vyvinuta pro měření a detekci molekul, které jsou přítomny pouze v malém množství. Obava z radioaktivity a z celkové bezpečnosti vedla k nahrazení radiotopu (používaným při testech RIA) enzymem, a tedy k vytvoření moderní enzymové imunoanalýzy EIA a ELISA. Tyto metody jsou hojně využívány dodnes.

ELISA a EIA jsou založené na podobném principu, který používá základní imunologický koncept, který spočívá ve vazbě antigenu na specifickou protilátku. Díky tomuto konceptu lze detekovat velmi malé množství antigenu (proteinů, peptidů, hormonu a protilátek ve vzorku tekutiny). Antigen v tekuté formě je znehybněn v jamkách



na mikrotitrační destičce, dále se navazuje na specifickou protilátku, kterou je možno posléze detekovat sekundární protilátkou spojenou s enzymem. Substrát v návaznosti na tom poskytne viditelnou změnu barvy nebo fluorescenci, což značí přítomnost antigenu (v našem případě kortizolu). Kvantitativní nebo kvalitativní měření je vyhodnocováno na základě kalorimetrického měření. Vyšší citlivost je specifická pro fluorogenní substráty, které mohou přesně měřit hladiny koncentrací antigenu ve vzorku (Gan et Patel, 2013).

Další používaná metoda je fluoroimunoanalýza. Sem se mohou zařadit metody, které ke značení používají fluorescenční látku, například fluorescein. Často používaná metoda je také chemiluminiscence. Tato metoda je založena na emisi světla, jež nastává v okamžiku přechodu substrátu z excitovaného do základního energetického stavu (Koivunen et al., 2006).

Akutní stres zvířat se také může zjišťovat použitím technologie IRT (infračervená termografie), jelikož při akutní stresové situaci bylo zjištěno zvýšení teploty zvířat, která se po ukončení působení stresoru rychle vrátila do normálního stavu. Tato metoda ovšem nepůsobila na psy komfortně a zvířata vykazovala známky chování, jako například otočení hlavy, odvrácení pohledu či úplné vyhýbání se kontaktu (Travin et al., 2015)

### 3.3.1 Stanovení salivárního kortizolu

Tato práce je zaměřená na posuzování aktuální hladiny kortizolu ve slinách psů. Odběr slin lze zařadit mezi neinvazivní a snadný způsob získávání vzorků (Kobelt et al., 2003). Značnou výhodou plazmatického kortizolu je poměrně rychlý nástup (3 minuty od zahájení manipulace) naopak hladina kortizolu ve slinách a krvi se zvyšuje postupně a svého vrcholu dosahuje 10 – 30 minut po ukončení zátěže (Foley et Kirschbaum, 2010). I přes to se jedná o nejlepší alternativu právě k hladinám v plazmě, jelikož odráží koncentraci volných glukokortikoidů v krvi. Ve slinách jsou obsaženy pouze volné glukokortikoidy, zbytek je vázaný na proteiny a ty pasivní difúzí neprojdou přes membránu z krve do slin (Oyama et al., 2014).

Koncentrace kortizolu ve slinách může být ovlivněna mnoha faktory, například nemocí, podáváním léků, příslušně modulátory či receptory (Hellhammer et al., 2009). Avšak významné rozdíly mezi jednotlivými plemeny, barvami, hmotnostmi či funkcí psa nebyly prokázány (Cobb et al., 2016).

Na samotný odběr by pes měl být navyklý, toho lze nejlépe dosáhnout, když se na to bude pes připravovat alespoň týden před experimentem (Sherman et al., 2015). Při odběru

si lze pomoci nějakým stimulantem jako je jídlo (ať už jeho vůně nebo hmotná podoba) či kyselinu octovou nebo citrónovou (Kobelt et al., 2003; Damián et al., 2018). Před samotným odběrem je doporučeno, aby pes minimálně 20 minut nejedl a nepil (Colussi et al., 2018). Odběr je prováděn pomocí bavlněného absorpčního materiálu, filtračního papíru, polypropylenové gázy nebo hydrocelulózy houby (Parra et al., 2005; Oyama et al., 2014). Sliny jsou odebírány z jazyka, dásně, tvrdého patra či lícních vaků (Kobelt et al., 2003; Ley et al., 2007) a objem slin by měl být minimálně 25 ml. Vždy je vhodné odebrat více vzorků, kdyby náhodou byl vzorek kontaminován (Lensen et al., 2015). Materiál lze skladovat při pokojové teplotě i několik dní či (Garde et Hansen, 2009).

### **3.4 Sliny**

Sliny jsou z fyziologického hlediska velice důležité. Vznik slin začíná v drobných žlázách sliznice dutiny ústní pod jazykem nebo ve velkých slinných žlázách, které ústí do ústního prostoru speciálními vývody (Jánský et Novotný, 1981).

Sliny jsou bezbarvá, čirá či lehce zakalená, částečně vazká a pěnicí tekutiny. Skládají se z glykoproteinů a iontů, které ovlivňují vlastnosti slin a díky nimž mohou vykonávat mnoho rozmanitých funkcí (Carpenter, 2013).

Celkové složení slin závisí na velikosti sekrece. Při zvýšení vylikosti sekrece stoupá koncentrace důležitých iontů, především  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  – a zvyšuje se tak osmotická hodnota slin (Jánský et Novotný, 1981).

### **3.5 Sekrece slin**

Sliny se tvoří nepřetržitě a tento proces je často stimulován chutí nebo žvýkáním (Carpenter, 2013).

Sekrece slin je buď vyvolaná, nebo bazální. Bazální neboli stálá sekrece je výsledkem nízké úrovně autonomní stimulace vyššími centry (Trojan, 2003).

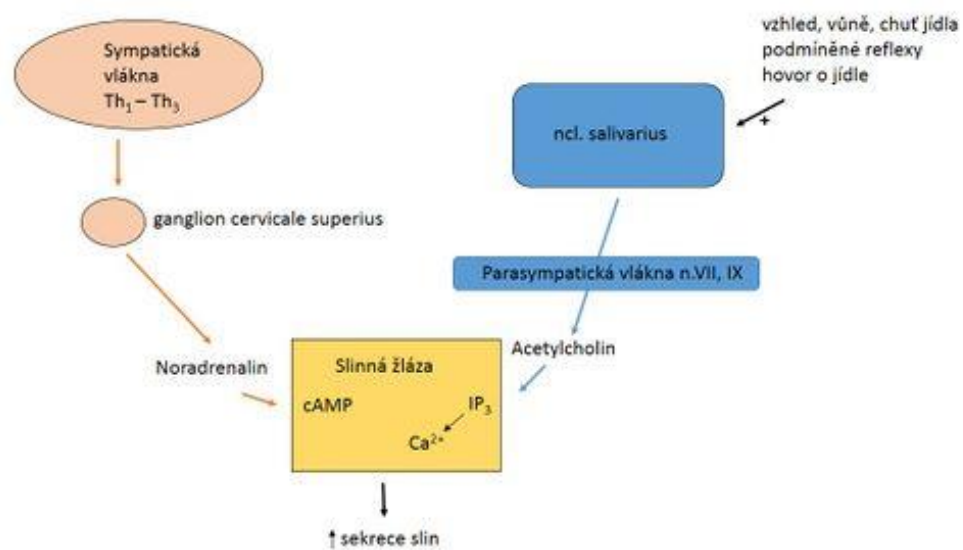
Objem vylučovaných slin je u zvířat různý (Reece, 2011). U bazální sekrece je to 0,5 ml/minutu, u vyvolané sekrece to může být výrazně vyšší, až 4–7 ml/minutu. Ve spánku se sekrece slin může zpomalit až na 0,1 ml slin za minutu. Zvýšení slinění zásadně ovlivňuje vyvolávající podnět (fyzické či psychické povahy) či hydratace organismu (Trojan, 2003).

Přistresových situacích vyšší nervová centra omezují sekreci slinných žláz, což má za následek sucho v ústech. Tvorba a produkce slin také klesá při vysychání úst a hltanu, což je spojené s pocitem žízně, tedy dyhydratací (Carpenter, 2013).

Největší část objemu sekrece slin je zajišťována pomocí velkých, párových žláz. Změny této sekrece jsou pak řízeny převážně reflexně (Trojan, 2003).

Všechny slinné žlázy jsou inervovány parasympatickým a sympatickým nervovým systémem a jejich celková činnost je řízena nervově podmíněnými a nepodmíněnými reflexy (což znázorňuje Obrázek č. 5) (Jánský et Novotný, 1981).

Parasympatická inervace do slinných žláz je zajištěna pomocí pregangliových parasympatických neuronů obličejových a glosfaryngleálních nervů. Postgangliové axony probíhají částí mandibulární větve trojklanného nervu, aby dosáhly slinných žláz. Denervace slinných žláz ovlivňuje kompletní funkci žláz, což má za následek snížení objemu a složení produkovaných slin (Kent et. al 2019).



**Obrázek č. 5:** regulace sekrece slin (dospupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/%C5%98%C3%ADzen%C3%AD\\_sekrece\\_slin#/media/File:Regulace-sekrece.jpg](https://www.wikiskripta.eu/w/%C5%98%C3%ADzen%C3%AD_sekrece_slin#/media/File:Regulace-sekrece.jpg)).

### 3.5.1 Složení slin psa

U psů sliny slouží především ke zvlhčování soust. Produkce slin nastává ve chvíli, kdy pes spatří potravu nebo se dá vyvolat vytvořeným podmíněným reflexem (Hegewald et Kawich, 1996).

Množství slin, které pes vyloučí za den se pohybuje od 0,1 do 0,15 l, pH slin je mezi 7,34 – 7,8 a osmolalita je podobná jako v krevní plazmě (Hegewald et Kawich, 1996).

Sliny jsou z 99 % tvořeny vodou, dále z organických (mucin,  $\alpha$  amyláza, lysozym, imunoglobulin A) a anorganických (sodnými, draselnými, vápenatými a chloridovými, jodovými ionty, hydrogenuhličitany, fosfáty) látek (Trojan, 1994).

Pes krmený masem, vylučuje sliny spíše hlenovité. Pes, krmený suchým krmivem má sliny řidké a vodnaté. Tento proces souvisí se sympatikem, který reguluje produkci malého množství vazkých slin (Hegewald et Kawich, 1996).

Ze slinných žláz jsou uvolňovány sekreční granula, nazývající se zymogeny. Tato granula jsou zdrojem právě slinných enzymů (Ganog, 2005).

Sekreční granula s enzymy putují z acinárních buněk slinných žláz až do vývodů. Zymogeny vytváří dva hlavní trávicí enzymy. Jedním je výše zmíněná  $\alpha$  amyláza, což je jeden z nejhojněji se vyskytujících proteinů slin. Alfa – amyláza způsobuje trávení cukrů v ústní dutině, avšak ve slinách psa se nevyskytuje (Carpenter, 2013).

Další enzym, který zymogen produkuje je jazyková lipáza, která štěpí až 30 % triacylglycerolů na mastné kyseliny (Kittnar, 2011).

Glykoprotein mucin zajišťuje kluzký charakter pro potravu a chrání ústní sliznici před mechanickým poškozením. Velice významnou funkci ve slinách mají imunoglobuliny A, které jsou hlavními protilátkami ve slinách. Další látky s ochranným účinkem jsou laktoferin, lysozym a proteiny obsahující prolin (Trojan, 2003).

Existují dva mechanismy zajišťující zvýšení tvorby slin při zvyšování sekrece:

- a) Mechanismus sekreční: je unavitelný. Podnět musí působit déle než 20–40 minut. Postupně vede ke snížení obsahu bílkovin, fosforu a nakonec draslíku. Celkové konečné složení slin se blíží ke složení krevní plazmy.
- b) Mechanismus filtrační: není unavitelný. Využívá zvýšeného prokrvení žláz (Trojan, 2003)

### 3.5.2 Tvorba slin

Slina, která je vylučována do dutiny ústní se nazývá slinou sekundární. Primární slina se tvoří ve slinných žlázách v acinárních buňkách, vývody je postupně upravována a vylučována do dutiny ústní právě jako sekundární slina. Slina vylučována acinárnímí buňkami má izotonickou povahu (roztok, jehož osmotický tlak je stejný jako osmotický tlak jiného (porovnávaného) roztoku, v tomto případě krevní plasmy). (Ganog, 2005).

Jelikož jsou tight junction (těsná buněčná spojení nacházející se v epitelových buňkách) jen velice málo propustná pro vodu, jsou sekundární sliny hypotonické (jako hypotonický se označuje roztok, jehož osmotický tlak je nižší než osmotický tlak jiného (porovnávaného) roztoku. Co se fyziologie, a právě i slin týče, za hypotonické se zpravidla označují roztoky, jejichž osmotický tlak je nižší než osmotický tlak plasmy) (Kittnar, 2011).

Za normálních podmínek jsou sliny v ústní dutině, alkalické a hypotonické, velice bohaté na  $K^+$  a naopak poměrně chudé na  $Na^+$  a  $Cl^-$ . Při zvýšené rychlosti toku slin nedochází nějak významně ve vývodech ke změně jejich složení (Ganog, 2005).

### 3.5.3 Nervové řízení sekrece slin

Sekreci slin řídí nervový systém (Trojan, 2003). Centrum salivace se nachází v prodloužené míše (Ganog, 2005).

Slinné žlázy jsou inervovány sympatickým a parasympatickým nervovým systémem a činnost těchto žláz je řízena čistě nervově nepodmíněnými a podmíněnými reflexy (Jánský et Novotný, 1981).

Reflexní sekreci slin vyvolává podnět v ústech. Podmíněné reflexy salivace lze tedy lehce vyvolat smyslovými vjemy (Trojan, 2003).

Díky parasympatiku dokází k silné sekreci slin, ty mají vodnatý charakter a poměrně nízký obsah organických látek (Ganog, 2005). Paralelně dochází k vazodilataci (rozšíření cév) ve žlázách, která je závislá na místním uvolňování vazoaktivního intestinálního peptidu. Pokud by byl parasympatikus poškozen, mohlo by to vést ke zmenšení slinných žláz (Trojan 2003).

Naopak stimulace sympatiku vyvolává vazokonstrikci (stažení cév) slinných žláz a tím sekreci menšího množství slin, které jsou naopak na organické látky bohatší. Na rozdíl

od parasympatiku, při porušení sympatického nervu nedochází k žádným významnějším změnám (Trojan, 2003).

### 3.6 Diurnální rytmus kortizolu

Cirkadiánní rytmus neboli vylučování kortizolu v rytmu celý den je prokázáno již dlouho. Mnoho výzkumů bylo prováděno u lidí a opic, u nichž byly nejvyšší hodnoty naměřeny ráno (8.00) a nižší hodnoty v noci (od 20.00) (Ader et Friedman 1968, Orth et Kovacs, 1998). Tento rytmus je tedy synchronizován denní dobou, světlem a spánkem. Zda psi vykazují stejný výrazný rytmus je stále předmětem mnoha diskuzí. (Czeisler et al., 1991, Dallman et al., 1978).

První studie byly prováděny již v roce 1962. Vědci Egdahl a Ferin, kteří studovali variace kortizolu po různých chirurgických zákrocích, jak v hypotalamu, tak v hypofýze. Jejich výsledky byly ovšem zpochybněny, jelikož chirurgické zákroky způsobily nekrózu obou laloků hypofýzy.

Castillo et al. ve svém výzkumu potvrdili rozdílnost hladiny kortizolu u psů, přestože je menší, než u lidí nebo potkanů. Tyto rozdíly byly vázány především na aktivitu nebo odpočinek psů během provádění výzkumu. Během odpočinku se hodnoty snižovaly a naopak když byli psi aktivní, hladina kortizolu vzrostla. Hladina kortizolu v 8.00 byla dle vědců zvýšená vlivem aktivity a vzrušení a její pokles v 10.00 a 12.00 byl získán u klidných a uvolněných psů poté, co prozkoumali své prostředí. Ke stejnému závěru došli i vědci Kempanien a Sartin (1984) a Orth et al. (1988), kteří tvrdí, že záleží na konkrétním okamžiku, ve kterém se hladina kortizolu mění. U každého zvířete pozorovali individuální změnu hladiny kortizolu závislou na vnějších podnětech.

Ader a Friedman vysvětlovali skutečnost kolísání hladiny kortizol tím, že osa hypotalamus – hypofýza – nadledvina (HPA) vykazuje dva různé typy aktivace. První přímo závisí na suprachiasmatickém jádru (SCH), nezbytné pro udržení energetické rovnováhy odpovědné za cirkadiánní rytmus hormonů. Další aktivace závisí na stresu z přijatých podnětů (Dallman et al. 1978). Dále byl prokázán pokles kortizolu během odpočinku.

Dle výzkumů je zřejmé, že informace o střídání hladiny kortizolu jsou různorodé a je třeba se zaměřit na detailní popis hladiny kortizolu ze slin psů během dnem, což má za cíl má práce.

## **4 Metodika**

V definovaných časových periodách byla měřena hladina salivárního hormonu kortizolu psů. Koncentrace kortizolu ve vzorcích slin psů byla stanovena za využití komerčního kitu a spektrofotometrické metody.

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Zvířata**

Hodnoty slinného kortizolu byly stanoveny u 7 psů a 6 fen. Psi i feny byli ve věku od 3 do 8 a nebyli kastrováni. Jednalo se, jak o velká plemena jako je holandský ovčák, zlatý retrívr, německý ovčák malinois, tak i o plemena malá, mezi ně patřili sheltie a papillon. Vzorky byly odebírány po dvou hodinách, dva různé dny.

Data byla získávána pouze od zdravých jedinců, kteří netrpěli paradontózou či jakýmkoliv jiným onemocněním, které způsobuje krvácení v dutině ústní. Psi nesměli být agresivní k cizím osobám, zvláště vůči těm, kteří prováděli samotný odběr slin. Na samotný odběr byla zvířata 5 dní před experimentem přivykána.

#### **4.1.2 Technické zařízení**

Materiál byl odebírán do zkumavek k tomu určených Sarstedt Salivette® Cortisol. Koncentrace kortizolu ve vzorcích odebraných slin se stanovovala použitím komerčního kitu Salivary Cortisol ELISA SLV – 2930 od společnosti DRG Instrument GmbH. Konečná koncentrace kortizolu byla stanovena za pomoci spektrofotometru BioTek™ Elx800™, zobrazeného na Obrázku č. 8.



**Obrázek č. 6:** Komerční kit, Salivary Cortisol ELISA SLV-2930

Pomocí tohoto kitu byla měřena koncentrace kortizolu ve slinách psů.

Dostupné z: [https://store.drg-international.com/images/ELISAKit\\_Large\\_New.jpg](https://store.drg-international.com/images/ELISAKit_Large_New.jpg)



**Obrázek č. 7:** Odběrová zkumavka Salivette® Cortisol.

Do této zkumavky (viz Obrázek č. 7) byly odebírány vzorky slin. Součástí sady jsou dvě zkumavky vyložené do sebe. Ve vnitřní zkumavce se nachází tampón, do kterého se vsakují sliny. Na dně vnitřní zkumavky se nachází otvor a tím během centrifugace pronikají sliny dovnějšší zkumavky. Z vnější zkumavky jsou odebrány a podstupují další rozbor.

Dostupné: <https://www.pro-zdravi-az.cz/doplnekovy-material-pro-navazujici-testy/354-zkumavka-salivette-.html>





**Obrázek č.8:** Čtečka mikrotitračních destiček BioTek<sup>TM</sup> ELx800<sup>TM</sup>  
Dostupné z: <http://perlenfeen.de/16/biotek-elx800>

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Sběr materiálu

Hladina salivárního kortizolu byla zjišťována ze slin psů. Sliny byly odebírány 12krát za den, vždy s douhodinovým rozestupem, tedy ve 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00, 20.00, 22.00 a 24.00. Vzorky slin byly odebírány pomocí speciálních odběrových zkumavek Sarstedt Salivette<sup>®</sup> Cortisol, které obsahovaly další vnitřní zkumavku s tampónem. Právě tyto tampóny byly psům vkládány do lícních vaků a ponechány tam nezbytně nutnou dobu k dostatečnému nasátí slin. Každá zkumavka byla po odebrání vzorku označena jménem psa, dobou odběru a zamražena na -17 °C.

### 4.2.2 Měření dat

Hladiny kortizolu byly stanoveny pomocí metody ELISA (enzyme – linked – immunosorbent assay). Koncentrace kortizolu ve vzorcích byla stanovena za použití komerčního kitu Salivary Cortisol ELISA SLV-2930.

Metoda ELISA je biochemický test, který používá protilátky a změnu barvy, která je způsobená enzymem pro detekci přítomnosti antigenu. V tomto konkrétním případě

kortizolu. Samotný princim spočívá ve vazbě protilátky proti hormonu, čímž vznikne námi požadovaný barevný produkt. Mikrotitrační jamky jsou potaženy protilátkou antigenního místa kortizolu. Vnitřní kortizol závodí s konjugátem kortizol – křenovou peroxidázou o vazbu na protilátku. Po samotné inkubaci jsou jamky promývány a nevázaný konjugát je tím odstraněn. Lze říct, že právě množství tohoto nevázaného peroxidázového konjugátu je nepřímě úměrné koncentraci kortizolu ve vzorku. Intenzita vyvinuté barvy po přidání roztoku substrátu je nepřímě úměrná koncentraci kortizolu ve vzorku.

Tento výsledný barevný produkt je následně měřen ve spektrofotometru. Účelem spektrofotometru je měření absorbance vzorku neboli měření průchodnosti paprsků skrze vzorek. Tmavší vzorky se vyznačují menší průchodností světla, což svědčí o vyšší koncentraci kortizolu ve vzorku.

Balení kitu SLV - 2930, které bylo k tomuto experimentu využito, obsahuje mikrotitrační jamky s protilátkou proti kortizolu, roztoky s rozličnými koncentracemi, kontrolní roztok, enzymatický ejakulát (což je směs kortizolu s křenovou peroxidázou), substrátový roztok, promývací roztok a zastavovací roztok.

Mezi další potřebná vybavení patří čtečka mikrotitračních destiček, absorpční papír, destilovaná voda, kalibrovaná pipeta a časovač. Samotné sliny musí projít před testem určitými fázemi. mezi něž patří zmrazení, následné rozmrazení, promíchání a odstředování po dobu 15 minut (při 3000 x g). Tímto procesem vznikne bezbarvý supernatant připravený na pipetování. Jeli vzorek příliš hustý, může být v případě potřeby naředěn. Test se provádí při pokojové teplotě, kterou musí mít všechna činidla i proužky.

Samotná imunologická reakce by neměla být přerušována a je důležité, aby pro každý vzorek byla použita nová pipeta, aby se zabránilo kontaminaci.

Enzymo – imunofický test byl proveden přesně podle návodu přiloženému k balení. Mikrotitrační destičky byly situovány do držáku. Do každé jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l vzorku a všech typů standardního roztoku (0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1,5 ng/ml, 4 ng/ml, 10 ng/ml a 30 ng/ml) a kontrolního roztoku (0 ng/ml).

Následně se do každé jamky přidalo 200  $\mu$ l enzymového konjugátu. Všechny vzorky byly pořádně promíchávány po dobu minimálně deseti sekund a poté inkubovány při pokojové teplotě dalších šedesát minut. Během inkubace se doporučuje použití třepačky (300 otáček za minutu).

Po tomto procesu byl obsah jamek vytřepán a propláchnut promývacím roztokem (tento roztok musí být ředěn kvůli jeho vysoké koncentraci destilovanou vodou -> 30 ml promývacího roztoku + 1170 ml destilované vody). Aby se zabránilo zkreslení testu nesmí v jamkách zůstat žádný zbytkový materiál, k čemuž slouží savý papír.

Táke bylo do každé jamky přidáno 200  $\mu$ l substrátového roztoku. Aby mohla proběhnout enzymatická reakce je zapotřebí třicetiminutová inkubace, která byla zakončena přidáním 100  $\mu$ l zastavovacího roztoku do každé jamky.

Vše je zakončeno čtečkou mikrotitračních destiček, která stanoví absorbanci každé jamky (při 450  $\pm$  10 nm). Dle návodu je vhodné jamky odčítat alespoň deset minut po přidání roztoku, který celý proces zastavuje (zastavovací roztok).

Z každé použité sady standardů, kontrol a vzorků byly vypočítány průměrné hodnoty a vytvořeny standardní křivky. Vynesením střední absorbance každého standardu proti jeho koncentraci s hodnotou absorbance na vertikální ose (y) a koncentrací na horizontální ose (x). Jelikož byla použita střední hodnota absorbance pro každý vzorek byla stanovena odpovídající koncentrace ze standardní křivky.

#### 4.2.3 Statistické zpracování dat

Data byla zpracována pomocí statistického programu STATISTICA 9.4.

Pro popisnou charakteristiku byl použit medián, průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient a minimálními i maximálními hodnoty.

Vliv denní doby na hladinu kortizolu psa byl zjišťován pomocí smíšeného lineárního modelu procedurou Proc Mixed.

Dále byly zjišťovány rozdíly mezi vlivem kategoriálních proměnných (pohlaví) na hladiny kortizolu.

## 5 Výsledky

### 5.1 Popis dat

Tabulka č. 1 uvádí psy a feny, kterým byla měřena ve dvouhodinovém intervalu hladina salivárního kortizolu. V tabulce jsou shrnuty údaje o plemeni, velikosti a pohlaví.

**Tabulka č. 1:** Informace o zvířatech využívaných v experimentu

<i>Jméno</i>	<i>Plemeno</i>	<i>Velikost</i>	<i>Pohlaví</i>
Kventy	Sheltie	Malý	Pes
Trust	Sheltie	Malý	Pes
Corso	Holandský ovčák	Velký	Pes
Jimmy	Zlatý retrívr	Velký	Pes
Hart	Německý ovčák	Velký	Pes
Ace	Belgický ovčák – malinois	Velký	Pes
Merit	Erdelteriér	Velký	Pes
Eiko	Papilon	Malý	Fena
Suri	Borderkolie	Střední	Fena
Amča	Labradorský retrívr	Velký	Fena
Megi	Labradorský retrívr	Velký	Fena
Karkulka	Německý boxer	Velký	Fena

### 5.2 Hypotéza 1: Hladina salivární koncentrace hormonu kortizolu se u psa liší v průběhu dne

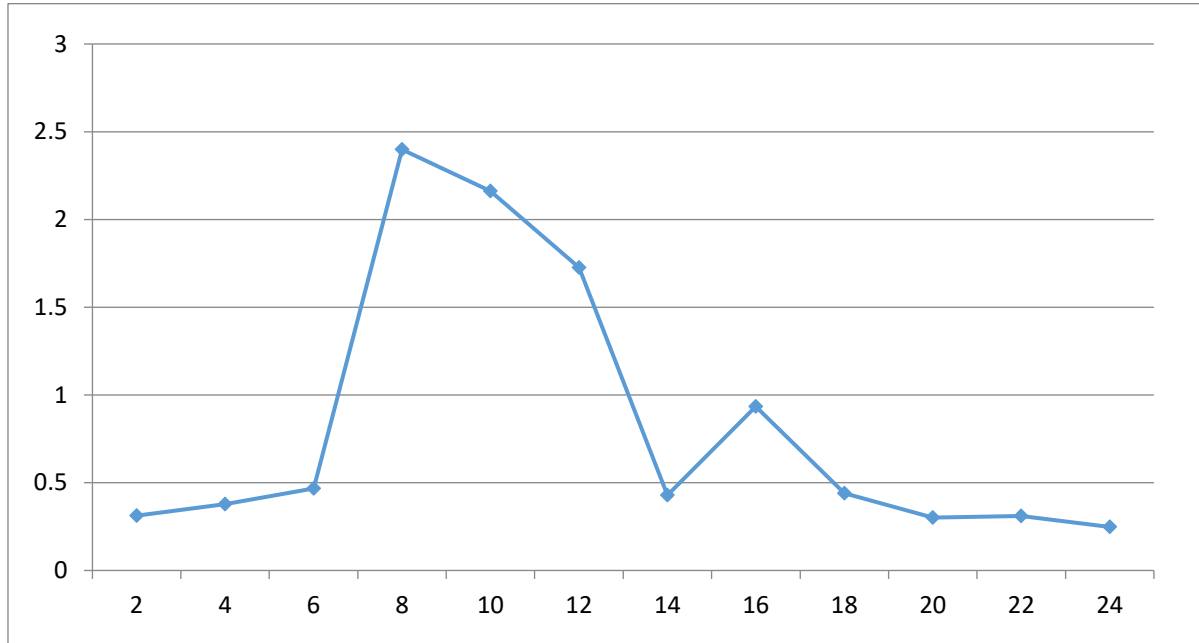
**Tabulka č. 2:** Popisné statistické parametry pro hladinu slinného kortizolu psa

	<b>N</b>	<b>Medián</b>	<b>Průměr</b>	<b>Směrodatná odchylka</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Variační koeficient</b>
<b>Celkově</b>	13	0,42	0,84	0,78	0,18	3,59	0,60

Z celkových (psi i feny dohromady) naměřených dat, zaznamenaných v Tabulce č. 2, je patrné, že průměrná hodnota hladiny salivárního kortizolu u psa je během dne 0,84 ng/ml.

Směrodatná odchylka (0,78 ng/ml) znázorňuje velké odlišnosti naměřených hodnot, což je způsobené výkyvem hladiny kortizolu v 8.00, což dokládá také hodnota variačního koeficientu.

**Graf č. 1:** Průměrná hladina kortizolu psů



Grafu č. 1 ukazuje cirkadiální střídání hladin hormonu kortizolu psa. Ráno po probuzení (8.00 hodin), kdy jsou jeho hodnoty nejvyšší. Po 8.00 hodině ranní hodnoty pomalu klesají, s opětovným výkyvem kolem 16.00 hodiny, nárůst však není statisticky významný.

Hypotéza 1: „Hladina salivární koncentrace hormonu kortizolu psa se liší v průběhu dne“ byla statistickou analýzou potvrzena.

### 5.3 Hypotéza 2: Hladina salivárního kortizoluu psů a fen se liší

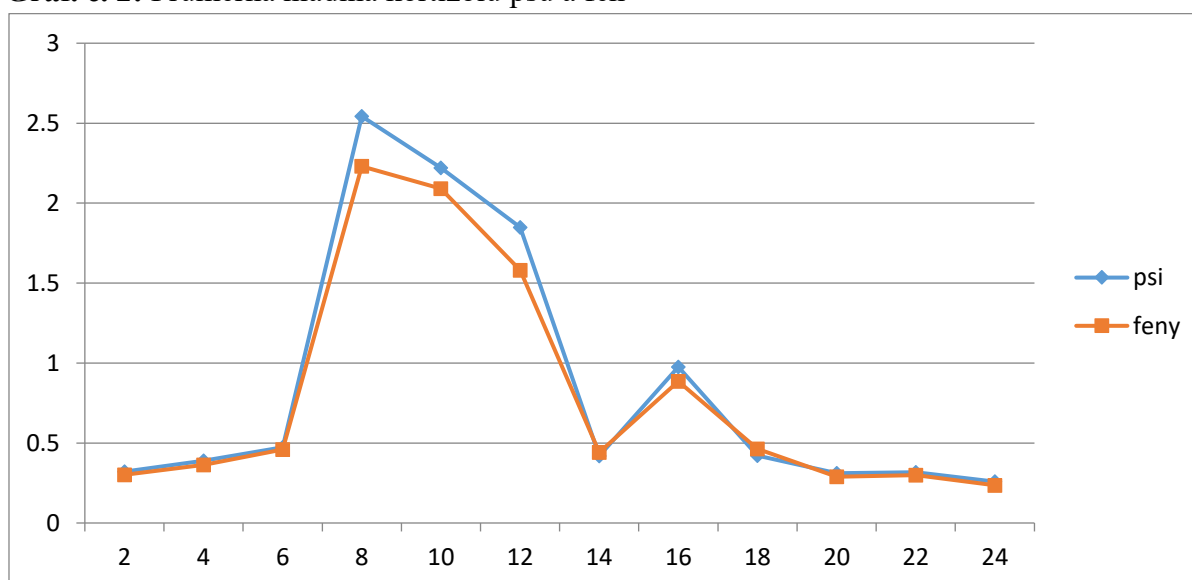
K potvrzení, nebo naopak vyvrácení této hypotézy byly použity statistické parametry pro hladinu slinného kortizolu psů a fen znázorněné v Tabulce č. 3.

**Tabulka č.3:** Popisné statistické parametry pro hladinu slinného kortizolu psů a fen

	N	Medián	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum	Variační koeficient
<b>Psi</b>	7,00	0,42	0,88	0,82	0,20	3,59	0,67
<b>Feny</b>	6,00	0,44	0,80	0,72	0,18	2,99	0,52

Názorné zobrazení průběhu průměrné hladiny kortizolu u psů a fen během sledovaného časového vývoje je znázorněno v Grafu č. 2.

**Graf. č. 2:** Průměrná hladina kortizolu psů a fen



Z Grafu č. 2 je možno vyčíst, že u psů i fen dochází kolem 8.00 hodin ráno v koncentraci hormonu kortizolu k awakening efektu (Tabulka 4). V tomto období je hladina kortizolu statisticky významně odlišná od průměru ve zbytku dne. Další výkyv hormonu je možné pozorovat u obou pohlaví kolem 16.00 hodiny odpoledne, nárůst však nebyl hodnocen jako statisticky významný. Statistická analýza prokázala, že hodnoty hladiny kortizolu u psů a fen se během dne statisticky neliší (Tabulka 4).

**Tabulka č. 4:** Popisné statistické parametry pro hladinu slinného kortizolu pro psy a feny ve 4.00 a 8.00

	<b>N</b>	<b>Medián</b>	<b>Průměr</b>	<b>Směrodatná odchylka</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Variační koeficient</b>
<b>Psi 4.00</b>	7,00	0,39	0,39	0,04	0,31	0,46	0,0020
<b>Feny 4.00</b>	6,00	0,35	0,36	0,04	0,36	0,44	0,0018
<b>Psi 8.00</b>	7,00	2,42	2,54	0,41	2,06	3,59	0,170
<b>Feny 8.00</b>	6,00	2,08	2,23	0,29	1,99	2,99	0,084

Hypotéza číslo 2 tedy potvrzena nebyla. Hladina salivárního kortizolu u psů a fen se neliší.

## 6 Diskuze

Pojem welfare zvířat je v současné době často spojován se stresem. Stres přímo souvisí se zvýšením hladiny některých hormonů, u psů pak především s nárůstem hladiny hormonu kůry nadledvin - kortizolu (Stafleu et al., 1992). Kortizol lze stanovit invazivní metodou z krve, kdy je k odběru třeba proškolená osoba (Hennessy et al., 1998), stále více však stoupá zájem po možnostech měření jeho koncentrace neinvazivním způsobem, který může představovat sledování hladiny kortizolu ve výkalech (Accorsi et al., 2019; Palme 2019), moči (Beerda et al., 1996; Rooney et al., 2007), srsti (Bennet et al., 2010; Bryan et al., 2013) a slinách (Beerda et al., 1996; Dreschel et al., 2009). Pro měření akutního stresu jsou vhodné vzorky slin (Haverbeke et al., 2008; Sherman et al., 2015). Pokud je srovnán odběr krve z žíly pro stanovení kortizolu a odběr vzorku slin od individuálně připravenéhoho psa, který se dívá na odměnu, je druhá metoda mnohem jednodušší a pro psa méně stresující a může být využita pro studie zaměřené na sledování akutního stresu psů (Haverbeke et al., 2008; Sherman et al., 2015). U řady hormonů bylo popsáno kolísání jejich hladiny v průběhu dne, tzv. cirkadiální rytmus (Beerda et al., 1996). Literární údaje týkající se změn hladin kortizolu ve slinách psů jsou nejednoznačné. Tato diplomová práce si kladla za cíl zjistit, jak se hladina kortizolu mění ve slinách psa v průběhu dne.

Pro určení diurnálního střídání hladiny kortizolu bylo využito sledování koncentrace kortizolu ve slinách 7 psů a 6 fen, které byly měřeny v pravidelných dvouhodinových intervalech. Koncentrace salivárního kortizolu jsou v přímé korelaci s koncentracemi kortizolu v plazmě, a to jak u člověka (Kirschbaum et al., 1989), tak také psů (Beerda et al., 1996; Vincent et al., 1992). U většiny savců je plazmatický kortizol navázaný na proteiny, jedním z nejdůležitějších vazebných proteinů pro kortizol je cortisolbinding protein (Levine et al., 2007). U zdravých psů jsou koncentrace kortizolu ve slinách výsledkem pasivní difúze volného kortizolu z lalůčkových buněk středu slinné žlázy (Vincent et al., 1992). Nemoc a podání léků může ovivnit vazbu kortizolu na proteiny a může tak být narušena korelace mezi kortizolem v plazmě a kortizolem ve slinách (Dreschel et Granger, 2008). U psů tvoří koncentrace salivárního kortizolu přibližně 7-12 % z koncentrace kortizolu v plazmě (Beerda, 1996 et al.; Vincent et al., 1992). Měření salivárního kortizolu proto představuje možnou metodu hodnocení adrenokortikální funkce (Beerda et al., 1996). Odběr vzorků zahrnuje saturaci absorpčního materiálu slinami v tlamě psa s nebo bez použití stimulantu slinění jako je kyselina citronová, cukr nebo chlorid sodný nebo pamlsků jako je sýr, párek nebo



maso (Batt et al., 2008). V řadě studií se pes jen nechá pasivně pamlsků načichat (Glenk et al., 2013). Přítomnost pamlsků může zvýšit produkci slin (Lensen et al., 2015) a produkty z krmiva mohou však také interagovat s protilátkami v imunoeseji, kterou se stanovuje kortizol (Magnano et al., 1989; Shirtcliff et al., 2001). Colussi et al. (2018) doporučili, že by psi 20 minut před experimentem neměli jíst a pít. Z tohoto důvodu nebyly stimulanty slinění v našich experimentech použity a byl dodržen navrhovaný časový interval mezi krmením a napájením a odběrem vzorků. Kobelt et al (2003) uvádějí, že by sliny měly být odebrány co nejrychleji, ideálně v intervalu 4 minut. Tato časová perioda pro odběr vzorků byla v naší studii rovněž dodržena. Vzorky slin se mohou odebírat z různých míst v tlamě – tváře, jazyka, dásní, nebo tvrdého patra (Kobelt et al., 2003; Ley et al., 2007). V naší studii byl odběr slinných vzorků proveden z oblasti vnitřní strany tváře. Pro odběr vzorků slin existují různé materiály, nejčastěji se používá bavlna (Bergeron et al., 2002), ale jsou i materiály novější jako je filtrační papír (Parra et al., 200). V této studii byl použit klasický odběrový materiál, bavlna v odběrovém setu zkumavek Salivette. Zkumavka obsahuje ještě vnitřní zkumavku, ve které je odběrový tampón.

Výsledky studií zaměřené na sledování střídání hladin kortizolu v průběhu dne se liší. Některé studie potvrdily, že se ve slinách psů kortizol střídá v cirkadiálním rytmu s píkem v ranních hodinách, s postupným klesajícím efektem po poledni do večera (Beerda et al., 1996; Horvath et al., 2007; Rijnberk et al., 1968). U jiných druhů bylo potvrzeno, že cirkadiální rytmus je synchronizován se světelnými hodinami, které jsou umístěny v části mozku označované jako *nucleus suprachiasmaticus* (Czeisler et al., 1991). Podobně jako u člověka, někteří autoři popsali u psa, rychlé zvýšení hladiny hormonu kortizolu a označili jej jako „awakening“ nebo „response effect“ (Clow et al., 2010; Stalder et al., 2016). Nicméně další autoři se domnívají, že u psů k cirkadiálnímu ani diurnálnímu střídání hladiny kortizolu nedochází (Bergeron et al., 2002; Johnston et al., 1978; Koyama et al., 2003). Také existují data, která tvrdí, že psi, kteří nejsou v tréninkovém režimu vykazují cirkadiální frekvenci střídání kortizolu, zatímco u pracovních psů se tento trend nevyskytuje (Kolevska et al., 2003).

Tato diplomová práce jednoznačně potvrdila, že ke střídání hladiny kortizolu ve slinách psů v průběhu dne dochází. K největším změnám v koncentraci hormonu došlo kolem 8.00 hodiny ráno, kdy se koncentrace zvýšila z hodnoty 0,47 ng/ml na hodnotu 2,40 ng/ml. Awakening efekt neboli awakening response jsme na modelu slin psa potvrdili. Nejnižší

hodnoty kortizolu byly naměřeny v noci 0,25 ng/ml. Tento jev je zcela jistě ovlivňován celkovou aktivitou zvířete. Je zřejmé, že po probuzení je pes aktivnější a hladina kortizolu tedy stoupá, naopak během dne, a především během odpočívání a spánku hladina klesá.

Některé vědecké studie používají dynamikuměření kortizolu v čase, některé naopak používají pouze jedno měření kortizolu nebo absolutní hodnoty denního měření hormonů, díky čemuž není možné porovnat výsledky jednotlivých studií. Naše studie poukazuje na nezbytnost sledování hormonu kortizolu v čase a také sledování hodnot ve stejných časových intervalech, jinak může dojít ke špatné interpretaci výsledků.

Mezi diurnálním střídáním hladiny kortizolu psa a feny nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl. Průměrná hodnota hladiny slinného kortizolu psa byla 0,88 ng/ml a feny 0,80 ng/ml. Z těchto výsledků je zřejmé, že není nezbytně nutné odděleně analyzovat výsledky měření koncentrace kortizolu v závislosti na pohlaví.

Bylo potvrzeno, že salivární kortizol lze využít jako marker stresu u psů. Důležitou podmínkou je srovnávání koncentrace kortizolu ve stejném čase. Pro monitoring stresu lze využít i jiné markery, které charakterizují fyziologickou odpověď organismu na stresory prostřednictvím stresových os SAM a HPA. Jedním z nich může být také chromogranin A (CgA), který je produkován současně s katecholaminy během akutní fáze stresu, ale je více stabilní než například adrenalin nebo noradrenalin (Lensen et al., 2019; Ryan et al., 2019). Také hormony catestatin (CST) a vasostatin (VS) mohou být sledovány ve slinách psů a je o nich známo, že nejsou ovlivněny věkem, pohlavím, plemenem ani denní dobou (Srithunyarat et al., 2017). Dalším markerem může být slinný imunoglobulin A (sIgA), který se mění při akutním stresu (Svobodová et al., 2014; Ryan et al., 2019).

## **7 Závěr**

Cílem práce bylo zjistit, zda dochází k diurnálním změnám hladiny kortizolu u psů. První hypotéza byla potvrzena, z čehož vyplývá, že dochází k diurnálním změnám hladiny kortizolu u psů. Denní doba má vliv na zvyšování vylučování hormonu kortizolu. Druhá hypotéza potvrzena nebyla, hladina salivárního kortizolu u psů a fen se neliší. Ráno (8.00 hodin) došlo ke statisticky významnému zvýšení hladiny salivárního kortizolu a k jeho průběžnému návratu na původní hladinu do 12.00 hodin. Další menší výkyv hladiny kortizolu byl zaznamenán kolem 16.00 hodiny, tento nárůst nebyl hodnocen jako statisticky významný. Salivární kortizol lze využít jako marker stresu u psů. Důležitou podmínkou je srovnávání koncentrace kortizolu ve stejném čase. Pro monitoring stresu lze využít i jiné markery jako chromogranin A (CgA), hormony catestatin (CST) a vasostatin (VS), či slinný imunoglobulin A (sIgA).

## 8 Literatura

1. Accorsi PA, Carloni E, Valsecchi P, Viggiani R, Garnberoni M, Tarnanini C, Seren E. 2008. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen Comp Endocrinol.* **155**:398–402.
2. Ader R, Friedman SB. 1968. Plasma corticosterone response to environmental stimulation: effects of duration of stimulation and the 24-hour adrenocortical rhythm. *Neuroendocrinology* **3**:378–386.
3. Arlt W, Stewart PM. 2005. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism and action. *Endocrinology and Metabolism clinics of North America.* **34**:293–313.
4. Batt LS, Batt MS, Baguley JA, McGreevy PD. 2008. Factors associated with success in guide dog training. *J Vet Behav.* **3**:143–51.
5. Beerda B, Schilder MBH, Janssen N, Mol JA. 1996. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Horm Behav.* **30**:272–279.
6. Bennett A, Hayssen V. 2010. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domest Anim Endocrinol.* **39**:171–80.
7. Berger M, Kraeuter AK, Romanik D, et al. 2016. Cortisol awakening response in patients with psychosis: Systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* **68**:157-166.
8. Bergeron R, Scott SL, Emond JP, Mercier F, Cook NJ, Schaefer AL. 2002. Physiology and behavior of dogs during air transport. *Can J Vet Res.* **66**:211–6.
9. Bernášková K, Polách, J. 2016. Vegetativní nervový systém a jeho poruchy, krátkodobý a dlouhodobý stres. *Obecná patologická fyziologie. 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy. Praha.*
10. Boron W, Boulpaep E. 2017. *Medical physiology.* Elsevier. Philadelphia.
11. Bryan HM, Adams AG, Invik RM, Wynne-Edwards KE, Smits JEG. 2013. Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* **52**:189–96.
12. Buckner S, Mouser J, Dankel S, Jessee, M, Mattocks K, Loenneke J. 2017. The General Adaptation Syndrome: Potential misapplications to resistance exercise. *Journal of Science and Medicine in Sport.* **20**:2015-1017.

13. Carpenter GH. 2013. The secretion, components, and properties of saliva. *Annual review of food science and technology*. **4**:267–276.
14. Castillo V, Lalia J, Casal J, Casal G, Esarte M, Mira G, Rodriguez M, Marquez A 1986. Aminoglutetimide: alternativa terapéutica en caninos con Enfermedad de Cushing (hipófiso- dependiente). *Avances Medicina Veterinaria*. **11**:93–96.
15. Castillo VA, Blatter MFC, Gomez 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.
16. Clow A, Hucklebridge F, Stalder T, Evans P, Thorn L. 2010. The cortisol awakening response: more than a measure of HPA axis function. *Neurosci Biobehav Rev*. **35**:97–103.
17. Cobb M, Chinchilli V, Chinchilli V, Dreschel N. 2016. A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domestic Animal Endocrinology*. **57**:31-42.
18. Colussi A, Stefanon B, Adorini C, Sandri M. 2018. Variations of salivary cortisol in dogs exposed to different cognitive and physical activities. *Ital J Anim Sci*. **17**:1030–7.
19. Cook N. 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.
20. Czeisler CA, Chiasera AJ, Duffy JF, 1991. Research on sleep, circadian rhythms and aging: applications to manned spaceflight. *Experimental Gerontology*. **26**:217–232.
21. Dijckmans B, Tortosa – Martínez J, Caus N, et al., 2017. Does the diurnal cycle of cortisol explain the relationship between physical performance and cognitive function in older adults?. *European Review of Aging and Physical Activity*. **14**:1 – 10.
22. Dreschel NA, Granger DA. 2009. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and Behavior*. **55**:163-168.
23. Dylevský, Ivan, 2000. *Somatologie*. Olomouc: EPAVA.

24. Edwards S, Evans P, Hucklebridge F, Clow A. 2001. Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology*. **26**:613–622.
25. Egdahl RH. 1962. Further studies on adrenal cortical function in dog with isolated pituitaries. *Endocrinology* **71**: 926–935.
26. Esposito A, Bianchi V. 2012. Cortisol: physiology, regulation and health implications. Nova Science Publishers. Human anatomy and physiology series. New York.
27. Ferin M, Antunes J, Zimmerman E, Dyrenfurth I, Frantz A, Robinson A, Carmel P. 1977. Endocrine function in female rhesus monkeys after hypothalamic disconnection. *Endocrinology* **101**:1611–1620
28. Fink G. 2019. Stress: physiology, biochemistry, and pathology. Academic Press. London. Handbook of stress.
29. Foley P, Kirschbaum, C. 2010. Human hypothalamus–pituitary–adrenal axis responses to acute psychosocial stress in laboratory settings. *Neuroscience And Biobehavioral Reviews* **35**:91-96.
30. Fontana J, Maďa P. 2014. Regulační mechanismy - Endokrinní regulace: Stres. Funkce buněk a lidského těla. 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy. Praha.
31. Gan SD, Patel KR. 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* **133**: 12.
32. Ganog WF. 2005. Přehled lékařské fyziologie. Galén, Praha.
33. Garde A, Hansen Å. 2009. Long-term stability of salivary cortisol. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **65**:433-436.
34. Giannetto C, Fazio F, Assenza A, Alberghina D, Panzera M, Piccione G. 2014. Parallelism of circadian rhythmicity of salivary and serum cortisol concentration in normal dogs. *Journal of Applied Biomedicine*. **12**:229-233.
35. Gjerstad J, Lightman S, Spiga F. 2018. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress*. **21**:403-416.
36. Glenk LM, Kothgassner OD, Stetina BU, Palme R, Kepplinger B, Baran H. 2013. Therapy dogs' salivary cortisol levels vary during animalassisted interventions. *Anim Welf*. **22**:369–378.

37. Glenk LM, Kothgassner OD, Stetina BU, Palme R, Kepplinger B, Baran H. 2014. Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: a pilot study. *J Vet Behav.* **9**:98–106.
38. Greenstein B, Wood D. 2011. *The Endocrine System: at a Glance.* 3. John Wiley & Sons, Incorporated. 145 s.
39. Haverbeke A, Diederich C, Depiereux E, Giffroy JM. 2008. Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiol Behav.* **93**:59–67.
40. Hegewald – Kawich, H. 1996. *Psí desatero.* Knížní klub, Praha.
41. Hellhammer D, Wüst S, Kudielka B. 2009. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology.* **34**:163-171.
42. Hennessy MB, Williams MT, Miller DD, Douglas CW, Voith VL. 1998. Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? *Appl Anim Behav Sci.* **61**:63–77.
43. Horváth Z, Igyártó B, Magyar A, Miklósi Á. 2007. Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. *Hormones and Behavior.* **52**:621-630.
44. Johnston SD, Mather EC. 1978. Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay - clinical absence of diurnal variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests. *Am J Vet Res.* **39**:1766–70.
45. Junqueira LC, Carneiro J. 2005 Adrenal glands. in Junqueira L.C., Carneiro J.: *Basic Histology: Text and atlas.* New York. McGraw-Hill Professional. 400-406.
46. Kent M, Song RB, Glass EN, De Lahunta A. 2019. A Salivation Abnormality with Trigeminal Nerve Dysfunction in Dogs. *Journal of Veterinary Dentistry.* **36**:8-16.
47. Kirschbaum C, Hellhammer DH. 1989. Salivary cortisol in psychobiological research - an overview. *Neuropsychobiology.* **22**:150–69.
48. Kittnar O, Frynta D, Fraňková M, Skarlandtová H. 2010. Stress and stress hormones in mammals. *Československá fyziologie.* **59**:32-36.
49. Kittnar O. 2011. *Lékařská fyziologie.* Praha, Grada Publishing a. s.

50. Klieber M, Underhill C, Hammond G, Muller Y. 2007. Corticosteroid-binding Globulin, a Structural Basis for Steroid Transport and Proteinase-triggered Release. *Journal of Biological Chemistry*. **282**:29594-29603.
51. Kobelt A, Hemsworth P, Barnett J, Butler K. 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science*. **75**:157-161.
52. Koivunen ME, Krogsrud RL. 2006. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine*. **37**:490-497.
53. Kolevska J, Brunclik V, Svoboda M. 2003. Circadian rhythm of cortisol secretion in dogs of different daily activities. *Acta Vet Brno*. **72**:599–605.
54. Kordač V. 1989 *Vnitřní lékařství III*. Avicenum, Praha.
55. Kosková B, Agudelo C. 2019. *Vybrané endokrinopatie psa a kočky*. VFU Brno, Fakulta veterinárního lékařství. Brno.
56. 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.
57. Kyrou I, Tsigos C. 2009. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology* **6**:787-793.
58. Lazarus RS. 1993. Coping theory and research: past, present, and future. *Psychosomatic Medicine*. **55**:234–247.
59. Ledvina M, Stoklasová A, Ceran J. 2009. *Biochemie pro studující medicíny II*. Praha, Karolinum.
60. Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. 2009. *Biochemie pro studující medicíny I*. Karolinum, Praha.
61. Lensen C, Moons C, Diederich C. 2015. Saliva sampling in dogs: How to select the most appropriate procedure for your study. *Journal of Veterinary Behavior*. **10**:504-512.
62. Lensen RCMM, Moons CPH, Diederich C. 2019. Physiological stress reactivity and recovery related to behavioral traits in dogs (*Canis familiaris*). *PLoS One*. **14**:22.
63. Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Lewis JG, Weller A. 2007. Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol Behav*. **90**:43–53.
64. Ley J, Coleman GJ, Holmes R, Hemsworth PH. 2007. Assessing fear of novel and startling stimuli in domestic dogs. *Appl Anim Behav Sci*. **104**:71–84.



65. Magnano CL, Diamond EJ, Gardner JM. 1989. Use of salivary cortisol measurements in young infants: a note of caution. *Child Dev.* **60**:1099–1101.
66. Mourek J. 2005. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing, a. s., Praha.
67. Nelson LD, Cox MM. 2008. *Principles of Biochemistry*. Freeman, USA.
68. Newton R. 2000. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax.* **55**:603-613.
69. Novotný I. 2010. *Biologie člověka*. Fortuna. Praha.
70. Orth D, Kovacs W. 1998. *The Adrenal Cortex*. Williams Textbooks of Endocrinology, second ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 569– 572.
71. 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
72. Palme R. **2019**. Non-invasive measurement of glucocorticoids: advances and problems. *Physiol Behav.* **199**:229–43.
73. Parra M, Väisänen V, Cerón J. 2005. Development of a time-resolved fluorometry based immunoassay for the determination of canine haptoglobin in various body fluids. *Veterinary Research.* **36**:117- 129.
74. Raekallie MR, Kuusela EK, Lehtinen ME, Tykkyloinen MK, Huttenen P, Westerholm FC. 2005. Effects of exercise-induced stress and dexamethasone on plasma hormone and glucose concentrations and sedation in dogs treated with dexmedetomidine. *American Journal of Veterinary Research.* **66**:260-265.
75. Reece WO. 2009. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada Publishing a. s., Praha.
76. Reeder DM, Kramer KM. 2005. Stress in Free-Ranging Mammals: Integrating Physiology, Ecology, and Natural History. *Journal of Mammalogy.* **86**:225–235.
77. Reynolds P, Ruan Y, Smith D, Scammell J. 1999. Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. *Journal of clinical endocrinology and Metabolism.* **84**:663-669.
78. Rijnberk A, Derkinderen PJ, Thijssen JH. 1968. Investigations on adrenocortical function of normal dogs. *J Endocrinol.* **41**:387–95.

79. Romero L, Meister C, Cyr N, Kenagy G, Wingfield J. 2008. Seasonal glucocorticoid responses to capture in wild free-living mammals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. **294**:614-622.
80. Rooney NJ, Gaines SA, Bradshaw JWS. 2007. Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*canis familiaris*) to kennelling: investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiol Behav*. **92**:847–54.
81. Ryan MG, Storey AE, Anderson RE, Walsh CJ, Walsh CJ. 2019. Physiological indicators of attachment in domestic dogs (*Canis familiaris*) and their owners in the strange situation test. *Front Behav Neurosci*. **13**:162.
82. Sheriff M, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. **166**:869-887.
83. Sherman BL, Gruen ME, Case BC, Foster ML, Fish RE, Lazarowski L, DePuy V, Dorman DC. 2015. A test for the evaluation of emotional reactivity in labrador retrievers used for explosives detection. *Journal of Veterinary Behavior*. **10**:94–102.
84. Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran M. 2001. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology*. **26**:165–73.
85. Sieber-Ruckstuhl N, Boretti F, Wenger M, Maser-Gluth C, Reusch C. 2008. Serum concentrations of cortisol and cortisone in healthy dogs and dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Veterinary Record*. **163**:477-481.
86. Sigmund M, Kvintová J, Šafář M. 2014. Vybrané kapitoly z manažerské psychologie. Univerzita Palackého v Olomouci.
87. Silbernagl S, Lang M. 2012. Atlas patofyziologie. Grada. Praha.
88. Skarlandtová H, Fraňková M, Frynta D, Kittnar O. 2010. Stres a stresové hormony u savců. *Československá Fyziologie*. **59**:32-36.
89. Srithunyarat T, Hagman R, Höglund OV, Olsson U, Stridsberg M, Jitpean S, Lagerstedt AS, Pettersson A. 2017. Catestatin and vasostatin concentrations in healthy dogs. *Acta Vet Scand*. **59**:74–80.
90. Stafleu FR, Rivas E, Rivas T, Vorstenbosch J, Heeger FR, Beynen AC. 1992. The use of analogous reasoning for assessing discomfort in laboratory animals. *Anim Welf*. **1**:77–84.

91. Stalder T, Kirschbaum C, Kudielka B, Adam E, Pruessner J, Wust S, Dockray S, Smyth N, Evans P, Hellhammer D, Miller R, Wetherell M, Lupien S, Clow A. 2016. Assessment of the cortisol awakening response: summary of the expert consensus guidelines. *Psychoneuroendocrinology*. **71**:44.
92. Steiss JE, Schaffer C, Ahmad HA, Voith VL. 2007. Evaluation of plasma cortisol levels and behavior in dogs wearing bark control collars. *Appl Anim Behav Sci*. **106**:96–106.
93. Stone AA, Schwartz J E, Smyth J, Kirschbaum C, Cohen S, Hellhammer D, Grossman S. 2001. Individual differences in the diurnal cycle of salivary free cortisol: a replication of flattened cycles for some individuals. *Psychoneuroendocrinology*. **26**:295–306.
94. Svoboda M. 2001. Nemoci psa a kočky 2. Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat. Brno.
95. Svobodova I, Chaloupkova H, Koncel R, Bartos L, Hradecka L, Jebavy L. 2014. Cortisol and secretory immunoglobulin a response to stress in German shepherd dogs. *PLoS One*. **9**:e90820.
96. Thun R, Eggenberger E, Zerobin K. 1990. 24-Hour Profiles of Plasma Cortisol and Testosterone in the Male Dog: Absence of Circadian Rhythmicity, Seasonal Influence and Hormonal Interrelationships. *Reproduction in domestic animals*. **25**:68-77.
97. Travain T, Colombo E, Heinzl E, Bellucci D, Prato Previde E., Valsecchi, P. 2015. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)—A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*. **10**:17-23.
98. Trojan S. 2003. Lékařská fyziologie. Grada Publishing a. s., Praha.
99. Vincent IC, Michell AR. 1992. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res Vet Sci*. **53**:342–5.
100. Vonderer I, Kooistra H, Rijnberk A. 1997. Intra- and Interindividual Variation in Urine Osmolality and Urine Specific Gravity in Healthy Pet Dogs of Various Ages. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **11**:30-35.
101. Wallace I, Cunningham S, Lindsay J. 2009. The diagnosis and investigation of adrenal insufficiency in adults. *Annals of clinical biochemistry*. **46**:351–367.

102. Watts A. 2005. Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: A complexity beyond negative feedback. *Frontiers in Neuroendocrinology*. **26**:109-130.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

<b>ACTH</b>	adrenokortikotropní hormon
<b>ADH</b>	antidiuretický hormon
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>AVP</b>	vasopresin
<b>CBG</b>	transkortin
<b>CgA</b>	chromogranin A
<b>CLA</b>	chemiluminiscenční testy
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava
<b>COX 2</b>	cyklooxygenáza 2
<b>CRH</b>	adrenokortikotropin stimulující hormon
<b>CST</b>	katestatin
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>ECT</b>	objem extracelulární tekutiny
<b>EIA</b>	enzymový imunotest
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum
<b>GAS</b>	všeobecný adaptační syndrom
<b>GHIH</b>	somatotropin inhibující hormon
<b>GHRH</b>	somatotropin atimulující hormon
<b>GIT</b>	gastro-intestinální trakt
<b>GnRH</b>	gonadotropiny stimulující hormon
<b>GR</b>	glukokortikoidní receptor
<b>HDL</b>	lipoprotein o vysoké hustotě
<b>HPA</b>	hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin
<b>HSD</b>	
<b>IH</b>	inhibující hormon
<b>IRT</b>	infračervená termografie
<b>IRT</b>	infračervená tomografi
<b>LDL</b>	lipoprotein o nízké hustotě
<b>PIH</b>	dopamin
<b>POMC</b>	proopiomelanokortin

**RF** retikulární formace  
**RH** releasing hormon  
**RIA** radioimunotest  
**RNA** ribonukleová kyselina  
**ROS** reaktivní formy kyslíku  
**SAA** slinná alfa-amyláza  
**SAM** sympato – adreno – medulární osa  
**SCC** side – chain cleavage  
**SCH** suprachiasmatické jádro  
**CST** catestatin  
**VS** vasostatin

