

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV TRANSPORTA IN NASTANITVE PSOV NA
VETERINARSKI KLINIKI NA STRESNI ODZIV,
OVREDNOTEN S KONCENTRACIJO KORTIZOLA V
SLINI**

**THE IMPACT OF TRANSPORT AND
ACCOMMODATION OF DOGS AT A VETERINARY
CLINIC ON STRESS RESPONSE, EVALUATED BY
SALIVARY CORTISOL CONCENTRATION**

Taja Kekec

Ljubljana, 2024

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV TRANSPORTA IN NASTANITVE PSOV NA
VETERINARSKI KLINIKI NA STRESNI ODZIV,
OVREDNOTEN S KONCENTRACIJO KORTIZOLA V
SLINI**

**THE IMPACT OF TRANSPORT AND
ACCOMMODATION OF DOGS AT A VETERINARY
CLINIC ON STRESS RESPONSE, EVALUATED BY
SALIVARY CORTISOL CONCENTRATION**

Taja Kekec

Delo je pripravljeno v skladu z Navodili za samostojno
raziskovalno delo pod mentorstvom izr. prof. dr. Alenke Seliškar,
dr. vet. med., spec. med. psov in mačk in asist. dr. Matica Pavlice,
dr. vet. med.

Ljubljana, 2024

IZVLEČEK

Ključne besede: psi; transport; nastanitev; stresni odziv; kortizol; slina; neinvazivno zbiranje vzorcev

Kortizol je hormon, ki se sprošča kot odziv na stres. Izoliramo ga lahko iz različnih telesnih tekočin, vendar je slina najprimernejša za neinvazivno in hitro zbiranje vzorcev.

Cilj naše raziskave je bil ugotoviti, ali transport do klinike in enourna nastanitev na kliniki vplivata na koncentracijo kortizola v slini psov. Naša hipoteza je bila, da bosta transport in nastanitev povzročila povišane vrednosti kortizola v primerjavi z bazalnimi vrednostmi, ki so bile merjene doma. V raziskavi je sodelovalo deset psov srednje velikosti različne starosti in spola. Vzorce sline smo odvzeli trikrat: doma (bazalna vrednost), takoj po transportu do klinike in po enourni nastanitvi na kliniki.

Zbiranje sline je potekalo s pomočjo sintetičnih zvitkov Salivette, ki smo jih pomočili v ingver v prahu za spodbujanje žvečenja in slinjenja.

Med vrednostmi prvega, drugega in tretjega odvzema vzorcev ni bilo statistično značilnih razlik ($p = 0,12$; Friedmanov test). Trend povečanja koncentracije kortizola je bil opazen med prvim in tretjim odvzemom, kar je nakazovalo potencialen vpliv enourne nastanitve na kliniki na stresni odziv psov, vendar zaradi visoke razpršenosti rezultatov pri tretjem odvzemu teh razlik ni mogoče z gotovostjo potrditi.

Z raziskavo nismo potrdili hipoteze, da transport in nastanitev na kliniki značilno povečata vrednosti kortizola v slini psov. Možne razlaga za to vključujejo variabilnost stresnega odziva med posameznimi psi, majhno število psov in morebitne metodološke omejitve, kot so subjektivna ocena stresa in težavnost zbiranja vzorcev.

Kljub temu naša študija prispeva k razumevanju metodologije merjenja kortizola v slini kot indikatorja stresa pri psih in opozarja na potrebo po nadaljnjih raziskavah na večjem številu psov in s standardiziranimi postopki za bolj zanesljive rezultate.

ABSTRACT

Key words: dogs; transportation; accommodation; stress response; cortisol; saliva; non-invasive sampling

Cortisol is a hormone that is released in response to stress. It can be isolated from various body fluids, but saliva is best suited for non-invasive and rapid sampling.

The aim of our study was to determine whether transportation to the clinic and a one-hour stay in the clinic affect salivary cortisol concentrations in dogs. Our hypothesis was that transportation and hospitalisation would lead to increased cortisol levels compared to baseline values measured at home. Ten medium-sized dogs of different age and sex were included in the study. Saliva samples were collected three times: at home (as baseline), immediately after transportation to the clinic and after a one-hour stay at the clinic. Saliva was collected using synthetic Salivette rolls dipped in ginger powder to stimulate chewing and salivation.

There were no significant differences between the values of the first, second and third sampling ($p = 0.12$; Friedman test). There was a trend towards an increase in cortisol levels between the first and third sampling, indicating a possible influence of the one-hour stay in the clinic on the dogs' stress response. However, due to the high variability of the results at the third sampling, these differences cannot be confirmed with certainty.

Our study did not confirm the hypothesis that transportation and hospitalization significantly increase cortisol levels in the dogs' saliva. Possible explanations for this are the variability of the stress response among individual dogs, the small number of dogs and possible methodological limitations such as subjective assessment of stress and difficulties in sample collection.

Nevertheless, our study contributes to the understanding of the methodology of salivary cortisol measurement as a stress indicator in dogs and underlines the need for further studies with a larger number of dogs and standardized procedures for more reliable results.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	8
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	8
1.2	PREGLED LITERATURE	9
1.2.1	Poti stresnega odziva	9
1.2.2	Kortizol kot marker stresa	9
1.2.3	Transport in kortizol	10
1.2.4	Vzorčenje kortizola v slini.....	11
2	NAMEN DELA IN HIPOTEZE	13
2.1	CILJI RAZISKAVE.....	13
2.2	DELOVNE HIPOTEZE	13
3	MATERIALI IN METODE	14
3.1	ETIČNA OPOMBA.....	14
3.2	ŽIVALI	14
3.3	ZBIRANJE SLINE	14
3.3.1	Odvzem 1.....	15
3.3.2	Odvzem 2.....	15
3.3.3	Odvzem 3.....	16
3.4	OCENJEVANJE ODVZEMA VZORCEV	16
3.5	SHRANJEVANJE VZORCEV	17
3.6	EKSTRAKCIJA IN MERJENJE KORTIZOLA	17
4	REZULTATI	18
4.1	KONCENTRACIJA KORTIZOLA.....	18
4.2	TEŽAVNOST ODVZEMA IN VZNEMIRJENOST PSOV	19
5	RAZPRAVA	21

6	SKLEPI	24
7	ZAHVALE	25
8	LITERATURA	26

KAZALO SLIK

Slika 1: Salivette Sarstedt	14
Slika 2: Razstavljen komplet epruvete Salivette s sintetičnim zvitkom	15
Slika 3: Primer vprašalnika za lastnike za oceno odvzema	16
Slika 4: Primer vprašalnika za ocenjevanje odvzema vzorcev	17
Slika 5: Koncentracija kortizola pri vseh treh odvzemih	18
Slika 6: Ocena težavnosti odvzema, vznemirjenja psov in koncentracija kortizola v slini (ng/ml) pri 1. odvzemu.	19
Slika 7: Ocena težavnosti odvzema, vznemirjenja psov in koncentracija kortizola v slini (ng/ml) pri 2. odvzemu.	20
Slika 8: Ocena težavnosti odvzema, vznemirjenja psov in koncentracija kortizola v slini (ng/ml) pri 3. odvzemu.	20

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

SAM	simpatično adreno medularna pot; angl. sympathetic-adreno-medullar axis
HPA	os hipotalamus-hipofiza-adrenalna žleza; angl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis
CRH	kortikotropin sproščujoč hormon oz. kortikoliberin; angl. corticotropin-releasing hormone
CRH-R1	kortikotropin sproščujoč hormon receptor 1; angl. corticotropin-releasing hormone receptor 1
CRH-R2	kortikotropin sproščujoč hormon receptor 2; angl. corticotropin-releasing hormone receptor 2
ACTH	adrenokortikotropni hormon; angl. adrenocorticotropic hormone
EIA	encimsko imunološka analiza; angl. enzyme immunoassay

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Odnos stres, zdravje in dobrobit psov je pomembno področje znanstvenega raziskovanja pri delovnih in družnih psih. Študije, ki temeljijo na anketah so pokazale, da so se povečale težave v obnašanju psov, še posebej sta v porastu strah in anksioznost (Dinwoodie in sod., 2019; Kurachi in sod., 2017; Salonen in sod., 2020, Tiira in sod., 2016). Kar 78,5% psov je med veterinarskim pregledom izkazovalo strah. Obvladovanje stresa med pregledom je pomembno, saj stres dokazano lahko vpliva na vrednosti fizioloških parametrov (srčni utrip, telesna temperatura, dihanje, koncentracija glukoze, krvni pritisk), kar lahko vodi v napačne diagnoze (Csoltova in sod., 2017).

V preteklosti so zato že poskušali meriti in ocenjevati količino stresa, ki jo psi in tudi ostale živali doživijo ob določenih stresorjih (veterinarski obisk, okolje, glasni zvoki, transport, idr.) preko stresnega odziva. Vendar je ocenjevanje stopnje nervoznosti in stresnega odziva posameznika zaradi nestandardiziranosti postopkov težko (Kooriyama in Ogata, 2021). Pomembno je tudi, da si zapomnimo, da je stres zelo subjektiven pojem.

Kortizol lahko izoliramo iz krvne plazme, blata, urina, dlake in sline psov. Čeprav vrednosti glukokortikoidov v dlakah in blatu prikazujejo dlje časa trajajoče stresne pogoje, nam isti hormoni v plazmi in slini prikazujejo akutno stanje organizma. Krvni markerji prikazujejo direktne fiziološke spremembe, vendar je zbiranje krvi invaziven proces, ki zahteva usposobljenega jemalca krvi in dodatno vznemiri žival (Chmelíková in sod., 2020).

V primerjavi z odvzemom krvi predstavlja odvzem sline, kadar pes sede na ukaz za nagrado (hrano), najmanj stresno tehniko, ki je enostavna in lahko vzdržuje poenotene časovne intervale. To je zaželeno predvsem pri študijah vedenja psov ob akutnem stresu.

V naši raziskavi želimo z določanjem kortizola v slini preučiti vpliv transporta do klinike in nastanitve na veterinarski kliniki na stresni odziv psov.

1.2 PREGLED LITERATURE

1.2.1 Poti stresnega odziva

Poznamo dve različni poti stresnega odziva – simpatično-adreno medularna pot (SAM) in os hipotalamus-hipofiza-adrenalna žleza (HPA). Pri obeh poteh je ključnega pomena nadledvična žleza, ki proizvaja dva različna tipa hormonov – kateholamine in glukokortikoide.

SAM pot je odgovorna za najhitrejši odziv na stresor, tako da aktivira simpatični in parasimpatični živčni sistem. Iz sredice nadledvične žleze se poveča izločanje noradrenalina in adrenalina ter noradrenalina iz simpatičnih živcev, kar povzroči povišane vrednosti noradrenalina v možganih. Preko vezave teh hormonov na specifično-vezane-G-protein receptorje se aktivira znotrajcelični odziv. To se kaže v krčenju gladkih in srčnih mišičnih celic in s tem v vazokonstrikciji, povišanem krvnem pritisku, srčnem utripu in udarnem volumnu, poviša se koncentracija glukoze v krvi in poraba kisika. Poleg tega SAM povzroči okrepljeno kognicijo, budnost in osredotočeno pozornost. Te fiziološke spremembe predstavljajo reakcijo »borba-pobeg«.

Preko HPA osi se poviša raven glukokortikoidov v krvi. Iz hipotalamusa se z aktivacijo osi, ki jo sproži stresor, sprosti kortikotropin-sproščujoč hormon (CRH), ki deluje na 2 receptorja – CRH-R1 in CRH-R2. CRH-R1 je glavni receptor za sprostitvev adrenokortikotropnega hormona (ACTH) iz adenohipofize v krvni obtok. ACTH stimulira skorjo nadledvične žleze, da izloča glukokortikoidne hormone, kot je kortizol v kri. Kortizol aktivira katabolne procese povezane z mobilizacijo energijskih rezerv, stimulira glukoneogenezo, proteolizo in lipolizo ter začasno zavre imunski odziv. Izločanje glukokortikoidov nadzoruje negativno povratna zveza paraventricularnega jedra v hipotalamusu. Skupna koncentracija glukokortikoidov se med živalskimi vrstami spreminja zaradi vrstno specifičnih razlik v občutljivosti tkiv in negativno povratne zanke (Chmelíková in sod., 2020).

1.2.2 Kortizol kot marker stresa

Pri psih je koncentracija kortizola v slini v dobri korelaciji s koncentracijo kortizola v krvni plazmi. Sesalci imajo večino kortizola v plazmi vezanega na proteine, predvsem na globulin transkortin, ki veže kortizol. Koncentracija kortizola v slini pri zdravih psih je posledica pasivne difuzije prostega kortizola preko alveolarnih celic lumna slinskih žlez. Povezava med

kortizolom v plazmi in slini je lahko spremenjena zaradi bolezni in zdravil, ki povzročijo spremembe v vezavi kortizola na proteine. Koncentracija kortizola v slini naj bi predstavljala 7 – 12% plazemskega kortizola, kar predstavlja koncentracijo na proteine nevezanega kortizola v plazmi (Beerda in sod., 1996; Vincent in Michell, 1992).

Merjenje koncentracije kortizola je med vsemi možnostmi ocenjevanja stresnega odziva največkrat omenjena metoda v literaturi. Ker HPA os reagira počasneje kot avtonomni živčni sistem, je pri načrtovanju raziskave potrebno paziti, saj lahko intenzivnost stresorja in čas zbiranja vzorcev vplivata na rezultate. Tako je kortizol v slini dosegel višek med 16. in 20. minuto po določenem dražljaju in se vrnil na bazalno vrednost v času ene ure (Beerda in sod., 1998). Ko so merili kortizol v krvi (Engeland in sod., 1990), je ta bil najvišji 7 – 15 minut po zvočnem dražljaju in se ni povrnil na bazalno vrednost po 30 minutah. Zaradi kompleksnosti stresnega odziva je priporočeno ocenjevanje z različnimi sistemi (Hekman in sod., 2014; Martínez-Mir'ó in sod., 2016).

Na vrednosti kortizola lahko vpliva veliko zunanjih faktorjev. Pomemben je cirkadiani ritem, saj so vrednosti najvišje zjutraj in se čez dan postopoma znižujejo, kar je sinhronizirano z urami svetlobe in se kaže v značilnostih spanca posamezne vrste. Nekateri avtorji navajajo, da se kortizol hitro zviša 45 minut po zbujanju, medtem ko drugi navajajo, da cirkadianega ritma kortizola ni in posledično prihaja do nestrinjanj glede optimalnega časa za odvzem vzorcev. Da lahko primerjamo rezultate raziskav, je pomembno imeti točne časovnice odvzemov. Kadar merimo koncentracijo kortizola, je pomembno upoštevati individualne razlike pri interpretaciji meritev. Intaktne psice imajo višje vrednosti kortizola kot sterilizirane in višje kot intaktne ter kastrirane psi. Psice lahko pokažejo HPA hiperreaktivnost na stresor, zato je spol psa in podatke o intaktnosti ali odsotnosti te potrebno upoštevati pri planiranju in izvedbi raziskave. Mladiči mlajši od 6 mesecev imajo nižjo koncentracijo kortizola kot psi starejši od 6 mesecev (Chmelíková in sod., 2020).

1.2.3 Transport in kortizol

Transport psom povzroči stres, kar se kaže s povišanjem koncentracije kortizola, višjim srčnim utripom in s spremenjenim razmerjem med nevtrofilnimi granulociti in limfociti. Povečanje kortizola v slini je bolj izrazito kot v plazmi, saj kortizol v slini predstavlja prosti in biološko aktiven kortizol, medtem ko je v krvi večinoma vezan na proteine in je neaktiven. To nam pove, da transport zviša celotno koncentracijo kortizola v krvi in inducira sproščanje kortizola s

proteinov in tako poviša delež prostega kortizola. Povišanje kortizola je pri psih vztrajalo vse do konca transporta in se vrnilo na bazalne vrednosti šele po koncu transporta. V primerjavi s prvo uro prevoza so bile koncentracije višje v drugi uri, kar nakazuje na neprekinjeno adrenokortikalno stimulacijo med transportom. Transport ni v naravnem okolju nobene živali, zato ni presenetljivo, da pri psih pride do stresnega odziva tako kot so to v preteklosti že potrdili pri konjih, ovcah, govedu in prašičih. Razlika je, da so rejne živali pri teh poskusih stale in morale paziti na vzdrževanje ravnotežja, medtem ko so psi sedeli ali ležali, kar je za pse predstavlja manjši izziv kot za farmske živali in s tem potencialno manjši stres (Herbel in sod., 2020).

Stresni odziv na transport ni odvisen samo od trajanja, temveč tudi od vrste terena po katerem se živali transportira. Ishizaki in Kariya (2010) sta v študiji prevoza zdravega goveda po različnih terenih ugotovila, da se je v skupini, ki je potovala po gorskem terenu, kortizol takoj povišal in bil na koncu transporta močno povišan v primerjavi z govedom, ki sploh ni potovalo (ta skupina je služila kot kontrolna skupina). V primerjavi s skupino, ki je potovala po manj goratem terenu, je bil plazemski kortizol prav tako višji, kar nakazuje, da je tudi tip transporta dejavnik pri koncentraciji kortizola. Ugotovili so namreč, da je pri skupini, ki je potovala po goratem področju prišlo do večkratne izgube ravnotežja zaradi zaviranja in zavijanja kot pri skupini, ki je potovala po ne-goratem terenu.

1.2.4 Vzorčenje kortizola v slini

Ostanki hrane živalskega izvora lahko navzkrižno reagirajo s protitelesi uporabljenimi v testih, zato se po navajanju nekaterih avtorjev (Colussi in sod., 2018) odsvetuje hranjenje in pitje vode 20 minut pred vsakim odvzemom. V večini raziskav so zbirali vzorce 30 – 120 sekund. Proces zbiranja naj ne bi imel vpliva na vrednosti kortizola, če se zaključi prej kot v 4 minutah (Kobelt in sod., 2003). Pogosti materiali, ki se jih pri zbiranju uporabi, so bombažni pripravki različnih oblik – kroglice, vatenke, vrvi. Alternativno se lahko uporabijo tudi hidrocelulozne gobice za oči, polipropilenske gaze ali filtrirni papir (Oyama in sod., 2014).

Izbira materiala lahko vpliva na izkupiček sline, saj bombažni material obdrži 52,4 – 57% sline, poliester pa omogoči vračilo 94,7 – 96,9% sline po centrifugiranju. Pri vseh odvzemih je priporočljivo uporabiti isto metodo, saj lahko način vzorčenja vpliva na rezultate. Pri študijah na ljudeh so poročali, da lahko bombažni materiali vplivajo na rezultate zaradi bombažnih vlaken ali zadržanja vode in s tem spremenjene koncentracije sline. Razlike med posamezniki

lahko vplivajo na volumen vzorca, ki ga pridobimo in čeprav naj bi bil minimalen volumen potreben za analizo 25 µl po novejših raziskavah, je ta količina lahko nedosegljiva pri manjših psih. Tako se zmanjša število možnih testov in možnost za dvojne vzorce, kar privede do manj natančnih rezultatov. Jemanje več vzorcev hkrati je boljše in bolj varno v primeru, če je kakšen vzorec kontaminiran.

Pri psih tipično vzorčenje poteka z dentalno vrvjo, ki se jo da psu v usta in po vzorčenju nato iz nje iztisne slina ali se jo centrifugira. Obstaja več možnosti časovnega razpona centrifugiranja (10 – 20 minut) in hitrosti centrifugiranja (3000 – 3500 rpm (revolutions per minute); 1300 – 3000 g (relativna centrifugalna sila)). Da se lahko rezultati primerjajo, mora biti centrifugiranje standardizirano in vedno enako nastavljeno. Če se ne opravi analize takoj po ekstrakciji, je vzorce boljše zamrzniti, saj to prepreči spremembe v sestavi vzorca. Večina študij na pasjih vzorcih slin priporoča shranjevanje vzorcev do uporabe na -80 °C (Chmelíková in sod., 2020).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

2.1 CILJI RAZISKAVE

Z nalogo smo želeli ugotoviti, kakšen vpliv na stresni odziv imata transport in enourna nastanitev zdravih psov na kliniki. Kortizol smo merili v slini, ker je vzorčenje manj invazivno v primerjavi z odvzemi krvi ter zato, ker kortizol v slini predstavlja prosti in biološko aktiven kortizol. Vzorce za določanje koncentracije kortizola smo odvzeli trikrat – na domu, ob prihodu na kliniko in po enourni nastanitvi na kliniki.

2.2 DELOVNI HIPOTEZI

H1: Koncentracija kortizola v slini bo po transportu do klinike višja kot koncentracija kortizola izmerjena v domačem okolju pred transportom.

H2: Koncentracija kortizola po enourni nastanitvi na kliniki bo višja kakor bazalna vrednost pred transportom psov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ETIČNA OPOMBA

Lastniki so bili pred soglasjem za sodelovanje njihovega psa v raziskavi seznanjeni z vsemi postopki (vožnja v avtomobilu, nastanitev na kliniki in odvzemi vzorcev).

3.2 ŽIVALI

V raziskavo smo vključili 5 psov in 5 psic (od tega so bili 3 samci in 2 samice intaktni) različnih pasem, starih od enega do 10 let. Vsi psi so bili ob vseh treh odvzemih tešči.

3.3 ZBIRANJE SLINE

Za lažje in hitrejše zbiranje sline, smo tako na domu kot na kliniki, uporabili epruvete s sintetičnimi zvitki Salivette Cortisol (Sarstedt, Nemčija), ki smo jih prijeli s peanom in potopili v komercialno dobavljiv ingver v prahu. Pri vseh odvzemih smo uporabili dve ali tri epruvete, odvisno od količine sline.



Slika 1: Salivette Sarstedt, ki smo jih uporabili za odvzem vzorcev sline



Slika 2: Razstavljen komplet epruvete Salivette s sintetičnim zvitkom (bel del na sliki), ki smo ga prijeli s peanom in pomočili v ingver v prahu

3.3.1 Odvzem 1

Prvo zbiranje slin med 7:00 in 7:40 je potekalo na domu lastnikov brez prisotnosti raziskovalca. Lastnikom je bilo razloženo, da morajo s pomočjo peana prijeti sintetični zvitek Salivette in ga do tretjine pomočiti v ingver v prahu. Nato so s peanom zvitek pomočen v ingver namestili psom v gobec. Svetovali smo jim tudi, da če je to mogoče, naj psi zvitek nekaj časa žvečijo. Postopek je trajal približno 2 minuti. Pri tem so lastniki subjektivno ocenili, kako vznemirjeni so bili psi, kakšna je bila težavnost odvzema in intenzivnost žvečenja psov.

3.3.2 Odvzem 2

Med 7:55 in 8:25, tik po transportu do klinike, je potekalo drugo zbiranje slin. Postopek je bil enak tistemu na domu, vendar slin niso več jemali lastniki sami, temveč raziskovalci na parkirišču pred kliniko. Psa smo med odvzemom slin posedli ali pa je stal in bil na povodcu, katerega je držal lastnik. Nato smo zvitek s pomočjo peana vzeli iz epruvete in ga potopili do tretjine v ingver v prahu. Zvitek smo nato dali psu v gobec med lično ploskev predmeljakov in sluznico ust. Pri tem smo poskušali zvitek na eni strani gobca obdržati vsaj pol minute. Nekateri psi so pustili držati zvitek v gobcu dlje časa (tudi do minute). Enak postopek smo nato ponovili

še na drugi strani gobca. Med samim postopkom smo se odločili za uporabo dodatnih zvitkov, odvisno od tega, kolikšno količino slin smo dobili s prvim zvitkom. Ko smo dobili dovolj (2 ali 3 odvisno od psa) zvitkov prepojenih s slino, smo postopek zaključili.

Odvzem je trajal v povprečju 2 do 3 minute (vendar se je pri nekaterih psih postopek lahko zavlekel za minuto dlje). Ocenili smo težavnost odvzema, vznemirjenost psa in intenzivnost žvečenja.

3.3.3 Odvzem 3

Psom smo po enourni nastanitvi v boks na kliniki odvzeli še zadnji vzorec med 8:55 in 9:40. Odvzem je bil poenoten s prvim in drugim, razlika je bila ta, da smo vzorčenje izvedli v hospitalu brez prisotnosti lastnika. Ponovno so bili ocenjeni enaki parametri kot pri prvem in drugem odvzemu.

3.4 OCENJEVANJE ODVZEMA VZORCEV

Ob vseh treh odvzemih smo imeli kratek vprašalnik, kjer so lastniki pri prvem vzorcu in mi pri drugem in tretjem subjektivno ocenili s kakšno težavo je bilo vzorec odvzeti in kako vznemirjeni so pri tem psi bili.

V vprašalniku smo posebej pripravili skalo za težavnost odvzema in posebej za vznemirjenost psa. Na skali (od 1 do 5) smo predpostavili, da številka 1 pomeni odvzem brez težav oz. minimalno vznemirjenost in številka 5 skoraj nemogoč odvzem oz. hudo vznemirjenje. Tako je podatek o težavnosti odvzema in vznemirjenosti psa ob vsakem odvzemu predstavljal subjektivno oceno osebe, ki je vzorčila.

<p>2. PODATKI o jemanju slin doma (prvi vzorec)</p> <p>Zabeležite ob kateri uri jemljete vzorec sami doma _____</p> <p>Prosim, da ocenite od 1 do 5 naslednje dogodke med odvzemu vzorca (1=najmanj in 5=najbolj) in obkrožite po vaši presoji:</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Težavnost odvzema vzorca</i> 1 2 3 4 5• <i>Kako vznemirjen je bil pes</i> 1 2 3 4 5
--

Slika 3: Vprašalnik za lastnika za oceno težavnosti odvzema vzorca slin in vznemirjenosti psa

<p>Vzorec po transportu in ob prihodu na kliniko (drugi in tretji vzorec)</p> <p>Ura vzorčenja _____</p> <p>Ocena naslednjih dogodkov med jemanjem sline (1=najmanj in 5=najbolj)</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Težavnost odvzema vzorca</i> 1 2 3 4 5• <i>Kako vznemirjen je bil pes</i> 1 2 3 4 5
--

Slika 4: Vprašalnik za raziskovalca za oceno težavnosti odvzema vzorca sline in vznemirjenosti psa

3.5 SHRANJEVANJE VZORCEV

Salivette smo takoj po odvzemu centrifugirali 20 minut pri 3260 x g in vzorce nato shranili v zamrzovalniku pri -70 °C do analize.

3.6 EKSTRAKCIJA IN MERJENJE KORTIZOLA

Vzorce smo odtalili pri sobni temperaturi, centrifugirali pri 3000 x g 10 – 15 minut in prenesli supernatant v novo epruveto. Za merjenje kortizola smo uporabili protokol encimske imuloške analize (EIA) s pomočjo kompleta Demeditec DES6611 – saliva.

3.7 STATISTIČNA ANALIZA

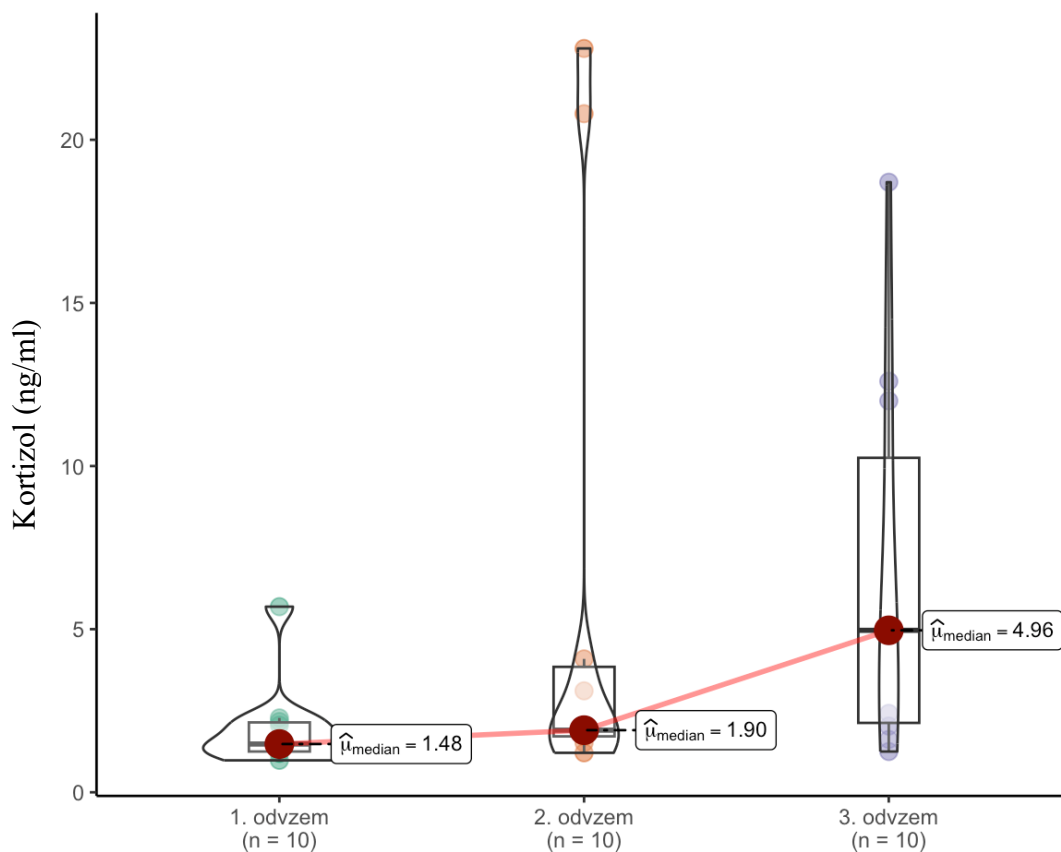
S pomočjo Shapiro-Wilk testa in pripadajočih QQ grafov smo preverili porazdelitev podatkov pri vsaki časovni točki, z namenom ugotoviti ali izpolnjujejo predpostavke za uporabo parametričnega testa. Zaradi kršenja predpostavk smo se odločili za uporabo neparametrične metode. Koncentracije kortizola pri posameznih časovnih točkah smo primerjali z uporabo Friedmanovega neparametričnega testa. Poleg tega je bil, za oceno velikosti učinka, izračunan tudi Kendallov W koeficient, skupaj z 95-odstotnim intervalom zaupanja. Koncentracije kortizola so predstavljene z medianami in interkvartilnim razponom. Mejo statistične značilnosti smo določili pri p-vrednosti v višini 0,05.

4 REZULTATI

V raziskavo je bilo vključenih 10 psov srednje velikosti, starih $5,73 \pm 3,52$ let s telesno maso $28,93 \pm 12,23$ kg naslednjih pasem: beli švicarski ovčar, labradorec, sibirski haski, resasti istrski gonič, bernski planšarski pes in mešanci.

4.1 KONCENTRACIJA KORTIZOLA

Rezultati Friedmanovega neparametričnega testa so pokazali, da se koncentracija kortizola med odvzemi ni statistično značilno razlikovala (χ^2 Friedman(2) = 4,20; $p = 0,12$). Kljub temu je iz grafa (Slika 5) opazen trend večanja koncentracije kortizola in razlika med prvim in tretjim odvzemom. Ravno tako izračun Kendallovega koeficienta nakazuje srednjo velikost učinka ($W = 0,21$, 95% CI = [0,04, 1,00]). Neznačilnost razlik med odvzemi je lahko posledica razpršenosti podatkov in majhnega vzorca ($n = 10$), kar vpliva na moč testa.

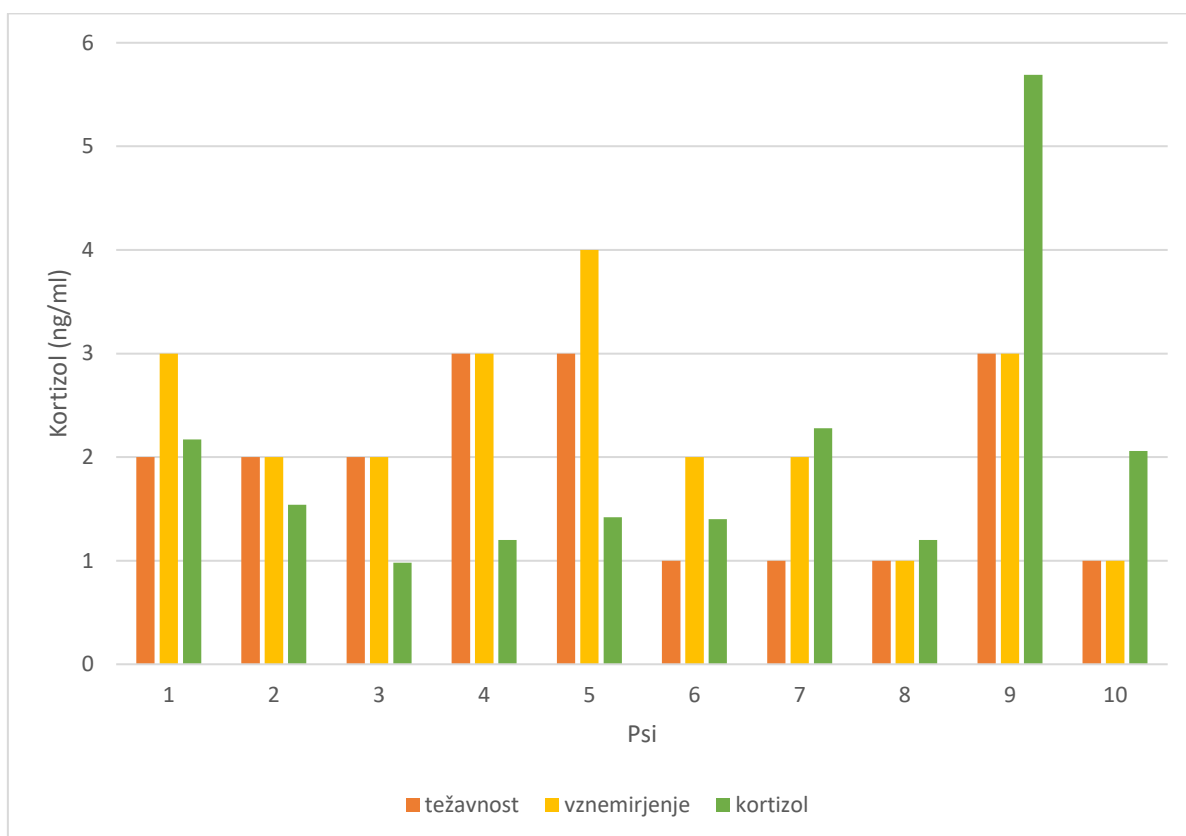


Slika 5: Koncentracija kortizola pri vseh treh odvzemih. Razlike med skupinami niso bile značilne

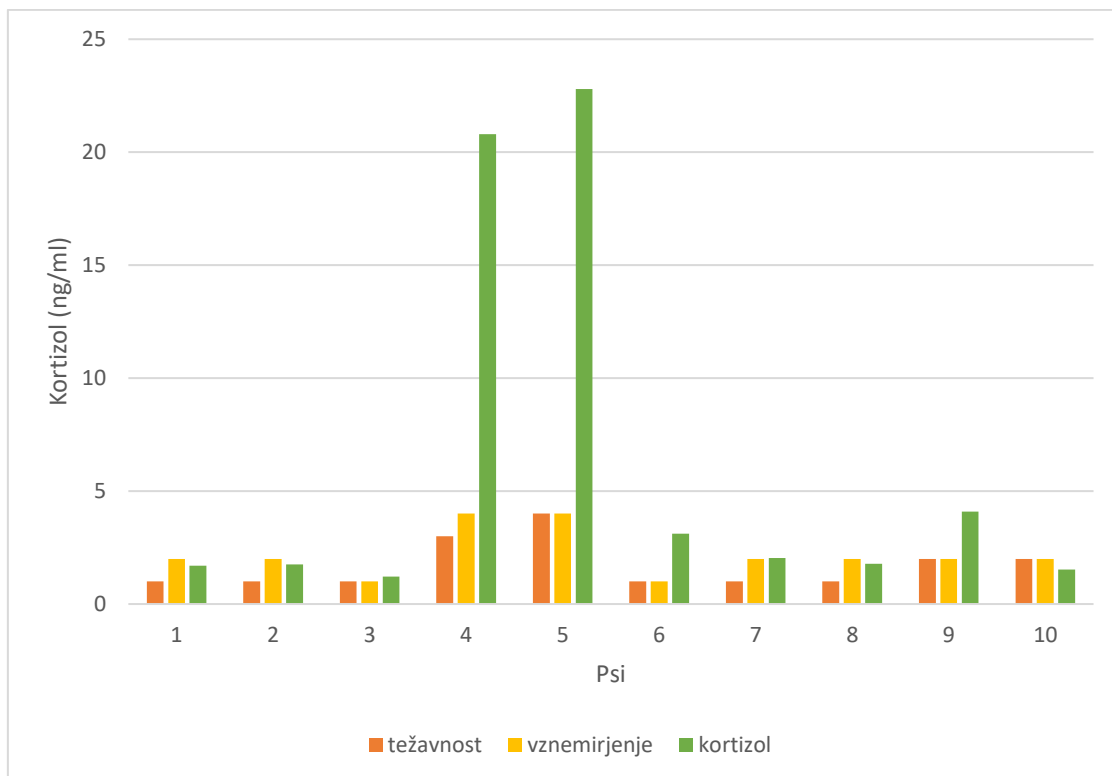
4.2 TEŽAVNOST ODVZEMA IN VZNEMIRJENOST PSOV

S pomočjo vprašalnika o težavnosti odvzema in vznemirjenosti psov smo pridobili podatke za vsak odvzem posebej in jih prikazali v spodnjih grafih ob koncentracijah kortizola.

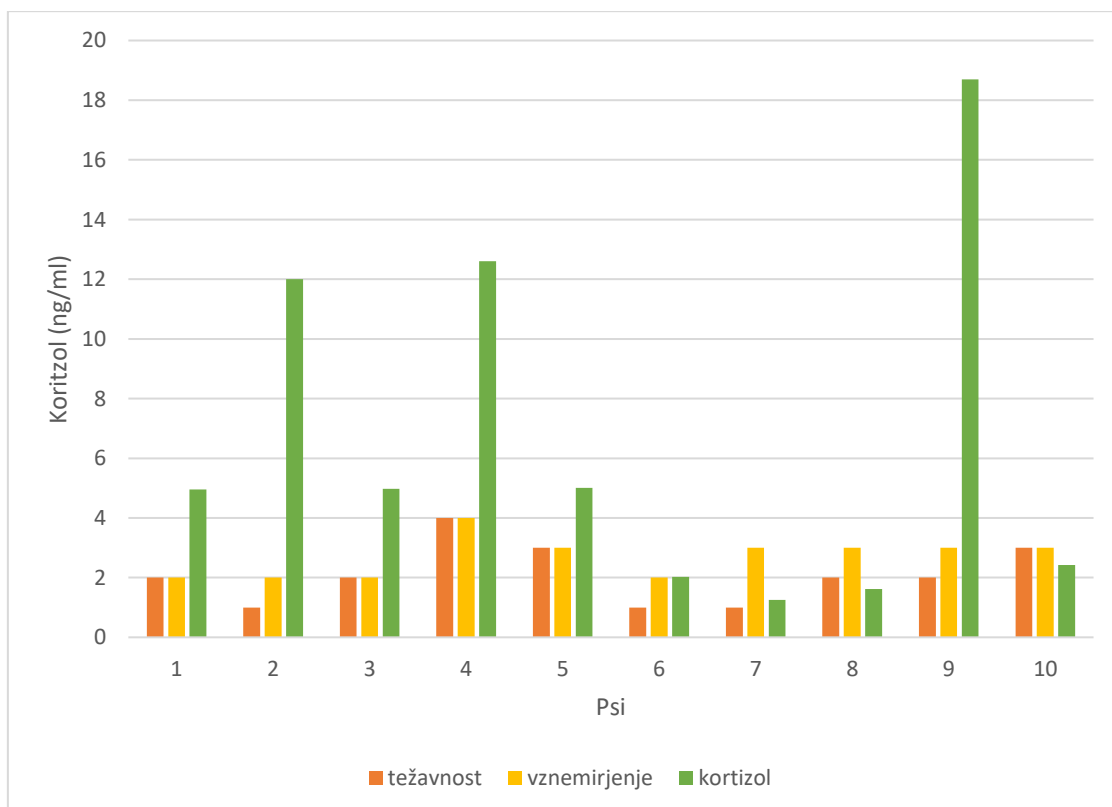
Slike 6 (1. odvzem), 7 (2. odvzem) in 8 (3. odvzem) prikazujejo subjektivno oceno težavnosti odvzema vzorcev (oranžni stolpec), vznemirjenja psov (rumeni stolpec) in koncentracijo kortizola v slini (zeleni stolpec).



Slika 6: Ocena težavnosti odvzema, vznemirjenja psov in koncentracija kortizola v slini (ng/ml) pri 1. odvzemu



Slika 7: Ocena težavnosti odvzema, vznemirjenja psov in koncentracija kortizola v slini (ng/ml) pri 2. odvzemu



Slika 8: Ocena težavnosti odvzema, vznemirjenja psov in koncentracija kortizola v slini (ng/ml) pri 3. odvzemu

5 RAZPRAVA

Namen raziskave je bil, na osnovi vrednosti kortizola v slini psov, ugotoviti, ali transport in enourna namestitvev na kliniki povzročita stres pri psih.

Odvzem vzorca sline za določanje koncentracije kortizola se mora opraviti v čim krajšem možnem času po prebujanju (Chmelíková in sod., 2020). Zaradi različne oddaljenosti psov od klinike (vendar vsi v mejah do ene ure oddaljenosti) to pomeni, da so se nekateri psi v naši raziskavi zbudili prej, drugi pa kasneje glede na svojo jutranjo rutino. Razmere na cesti med transportom živali lahko potencialno vplivajo na koncentracijo kortizola (Ishizaki in Kariya, 2010). Nekateri psi (št. 1, 7, 9 in 10) so imeli vrednosti kortizola doma višje kot po transportu do klinike. To si lahko razlagamo s tem, da transport zanje ni predstavljal stresorja in je, po poročilih nekaterih lastnikov, prevoz z avtomobilom za nekatere pse celo pozitivna izkušnja. Prvi vzorec so jemali lastniki sami, zato je lahko, zaradi neizkušenosti glede procesa odvzema, samo vzorčenje predstavlja stresni dejavnik za psa in je bil zato pri prvem, sedmem, devetem in desetem psu kortizol doma višji kot po prihodu na kliniko. Prve hipoteze o povišani koncentraciji kortizola po transportu v primerjavi z bazalno vrednostjo doma tako nismo mogli potrditi.

Pri odvzemu sline ob drugem in tretjem vzorčenju smo naleteli na določene težave, kar si lahko razlagamo kot potencialen vzrok za nekatere rezultate. Vsa vzorčenja drugega odvzema so potekala med 7:50 in 8:25, takoj po prihodu psov na kliniko, vendar se kljub temu rezultati nekaterih psov močno razlikujejo od ostalih. Tako je bila pri drugem vzorčenju pri psih številka 4 in 5 koncentracija kortizola višja kot pri ostalih psih. S tem bi prvo hipotezo, da je transport močan stresor sicer lahko potrdili, vendar je treba upoštevati tudi druge dejavnike, ki so potencialno lahko sami po sebi stresorji. Pri teh dveh psih je bil odvzem vzorca težavnejši, prav tako sta bila bolj vznemirjena. To bi potencialno lahko pomenilo, da narava psov in predvsem odziv na vzorčenje sline predstavljata pomemben dejavnik in s tem postavljata pod vprašaj rezultate. Psa med enourno nastanitvijo nista bila mirna oz. brez odsotnosti znakov stresa. Kljub temu se je vrednost kortizola po enourni nastanitvi pri njima zmanjšala v primerjavi z drugim vzorčenjem (Slika 7). Pri teh dveh psih je drugo vzorčenje glede na prvo in tretje trajalo najdlje ravno zaradi težavnosti in tako se nismo mogli popolnoma držati časovnega okvirja procesa vzorčenja kot pri ostalih. Če je vzorčenje opravljeno v manj kot 4 minutah, ne predstavlja

vzroka za dvig koncentracije kortizola (Kobelt in sod., 2003), zato bi pri omenjenih dveh psih lahko tako visoke vrednosti pri drugem odvzemu pripisali tudi podaljšanemu in oteženemu vzorčenju.

Glede na Sliko 5 lahko opazimo jasno razliko med vrednostmi kortizola doma (prvo vzorčenje) in po enourni nastanitvi na kliniki (tretje vzorčenje), kar bi potrdilo drugo hipotezo. Ta predpostavlja, da bo vrednost kortizola po enourni nastanitvi višja v primerjavi z bazalnimi vrednostmi (doma). Ker pa je razpršenost podatkov pri tretjem vzorcu tako velika in velikost vzorcev majhna, ničesar ne moremo trditi z gotovostjo in lahko trend pripišemo tudi zgolj naključju.

Glede na neparametrični Friedmanov test so podatki prvega, drugega in tretjega vzorčenja niso statistično različni. Tako nismo mogli potrditi nobene hipoteze. Kljub temu je raziskovanje stresnega odziva na transport in nastanitev na veterinarski kliniki s pomočjo kortizola v slini pomembno in smiselno za nadaljnje raziskave. Naši rezultati sledijo določenemu trendu (razlika med prvim in tretjim odvzemom), vendar zaradi premajhnega vzorca ne moremo podati dokončnih zaključkov. Raziskava je pilotna in rezultati se lahko uporabijo za izračun moči študije in določitev ustrezno velikega vzorca psov za nadaljnje raziskave.

Ta raziskovalna naloga ima nekaj šibkih točk. Vzorčenje na domu je potekalo brez naše prisotnosti, zaradi česar ne vemo, kaj se je dogajalo in kako je potekalo. Psi so se po vsej verjetnosti drugače odzvali v domačem okolju, ko je vzorčil lastnik v primerjavi z vzorčenjem na kliniki, ki ga je opravil raziskovalec. Za nekatere pse je bil prihod na kliniko tako močan stresni dejavnik, da je bilo vzorčenje oteženo in podaljšano. Tako ne moremo vedeti, ali je razlog za dvig koncentracije kortizola transport, prihod na kliniko, sam proces vzorčenja ali pa vsi trije dejavniki skupaj. Težavo smo imeli tudi s pridobivanjem slin – nekateri psi so bili manj kooperativni kot drugi ali so se slinili manj.

Za bolj relevantne rezultate bi lahko lastniki odvzem doma sprva poskusno večkrat ponovili. Na tak način bi se lastniki navadili vzorčenja, psi pa privadili tujka v gobcu. S tem bi verjetno dobili bolj realne bazalne vrednosti in psi bi bili tudi verjetno manj vznemirjeni ob vzorčenju na kliniki. Lastniki bi lahko posneli odvzem vzorca slin, da bi raziskovalci dobili boljši vpogled, kako je vzorčenje potekalo doma brez, da bi psa vznemirjali z našo prisotnostjo na domu. Prijem sintetičnega zvitka s peanom se je izkazal kot uspešen, vendar bi bilo morda boljše

uporabiti kakšen drug material kot je filtrirni papir (Oyama in sod., 2013). Metoda z zvitkom se uporablja pri ljudeh, vendar se je pri psih, ki se niso veliko slinili ali bili popolnoma kooperativni, izkazala za dokaj neprimerno.

6 SKLEPI

Na osnovi rezultatov naše raziskovalne naloge smo prišli do sledečih sklepov:

- Naših hipotez, da se koncentracija kortizola v slini psov po transportu in enourni nastanitvi na kliniki zveča, nismo mogli potrditi. Vzorec je bil premajhen in rezultati ob določenih odvzemih preveč razpršeni zaradi različnih dejavnikov.
- Dejavnike, ki lahko in tudi so vplivali na rezultate, je potrebno vključiti v raziskavo ter upoštevati pri meritvah.
- V prihodnosti bi bilo za nadaljnje raziskave na tem področju smiselno narediti nekaj sprememb (npr. vzorčenje doma opraviti že večkrat pred dejanskim vzorčenjem in posneti vzorčenja doma ter potencialno uporabiti drug material za pridobivanje sline).
- Čeprav ima raziskovalna naloga nekaj šibkih točk, je pomembno omeniti, da se je opazil trend zvečanja koncentracije kortizola po enourni nastanitvi.
- Nadaljnje raziskave bi lahko doprinesle informacije o tem, kakšen stresni odziv povzročita transport in nastanitev na kliniki psom, posledično pa bi lahko poiskali načine kako zmanjšati količino stresa ob teh situacijah.

7 ZAHVALE

Za sam začetek in nastanek raziskovalne naloge bi se iskreno rada zahvalila mentorici izr. prof. dr. Alenki Seliškar. Hvala za potrpežljivost in vodenje ob pisanju mojega prvega raziskovalnega dela.

Zahvalila bi se rada tudi somentorju asist. dr. Maticu Pavlici predvsem za pomoč pri zbiranju vzorcev in usmerjanju praktičnega dela.

Iskreno se zahvaljujem izr. prof. dr. Tomažu Snoju in ekipi v laboratoriju na Veterinarski fakulteti za izvedbo ekstrakcije kortizola in lepo pregledne rezultate.

Zahvaljujem se tudi mag. kog. zn. Anžetu Bašu za statistično obdelavo podatkov.

Predvsem se želim zahvaliti vsem, ki so prijazno posodili svoje pse, da je raziskava lahko sploh potekla. Najlepša hvala, da ste kljub natrpanim urnikom in zgodnjim uram pripeljali svoje kosmatince ter pomagali pri nastanku tega dela. Hvala, da ste pustili pse na kliniki in jih kljub domotožju zaupali meni v varstvo.

Hvala prijateljem in družini, ki so mi nudili moralno podporo in vzpodbudne besede, kadar je bilo to potrebno ter poslušali o vseh preprekah pri nastanku dela.

8 LITERATURA

1. Beerda B, Schilder MBH, Janssen N, Mol JA. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Horm Behav* 1996; 30: 272–9. doi: 10.1006/hbeh.1996.0033
2. Beerda B, Schilder MBH, Hooff JARAM, Vries HW, Mol JA. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Appl Anim Behav Sci* 1998; 58 (3-4): 365-381. doi: 10.1016/S0168-1591(97)00145-7
3. Chmelíková E, Bolechová P, Chaloupková H, Svobodová I, Jovičić M, Sedmíková M. Salivary cortisol as a marker of acute stress in dogs: a review. *Domest Anim Endocrinol* 2020; 72; 106428. doi: 10.1016/j.domaniend.2019.106428
4. Colussi A, Stefanon B, Adorini C, Sandri M. Variations of salivary cortisol in dogs exposed to different cognitive and physical activities. *Ital J Anim Sci* 2018; 17: 1030–7. doi: 10.1080/1828051X.2018.1453756
5. Csoltovaa E, Martineaua M, Boissyb A, Gilberte C. Behavioral and physiological reactions in dogs to a veterinary examination: Owner-dog interactions improve canine well-being. *Physiol Behav* 2017; 177: 270–281. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.05.013
6. Dinwoodie IR, Dwyer B, Zottola V, Gleason D, Dodman NH. Demographics and comorbidity of behavior problems in dogs. *J Vet Behav* 2019; 32: 62–71. doi: 10.1016/j.jveb.2019.04.007
7. Engeland WC, Miller P, Gann DS. Pituitary-adrenal and adrenome-dullary responses to noise in awake dogs. *Am J Physiol* 1990; 258: 672–677. doi: 10.1152/ajpregu.1990.258.3.R672

8. Hekman JP, Karas AZ, Sharp CR, Grafton N, 2014. Psychogenic stress in hospitalized dogs: cross species comparisons, implications for health care, and the challenges of evaluation. *Animals* 2014; 4 (2): 331–347. doi: 10.3390/ani4020331
9. Herbel J, Aurich J, Gautier C, Melchert M, Aurich C. Stress Response of Beagle Dogs to Repeated Short-Distance Road Transport. *Animals* 2020; 10; 2114. doi: 10.3390/ani10112114
10. Ishizaki H, Kariya Y. Road transportation stress promptly increases bovine peripheral blood absolute NK cell counts and cortisol levels. *J Vet Med Sci* 2010; 72 (6): 747-753. doi: 10.1292/jvms.09-0441
11. Kobelt AJ, Hemsworth PH, Barnett JL, Butler KL. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Res Vet Sci* 2003; 75: 157–61. doi: 10.1016/s0034-5288(03)00080-8
12. Kooriyama T, Ogata N. Salivary stress markers in dogs: Potential markers of acute stress. *Res Vet Sci* 2021; 141: 48-55. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.10.009
13. Kurachi T, Irimajiri M, Mizuta Y, Satoh T. Dogs predisposed to anxiety disorders and related factors in Japan. *Appl Anim Behav Sci* 2017; 196: 69–75. doi: 10.1016/j.applanim.2017.06.018
14. Martínez-Mir'ó S, Tecles F, Ram'ón M, et al. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Vet Res* 2016; 12 (1); 171. doi: 10.1186/s12917-016-0791-8
15. Oyama D, Hyodo M, Doi H, et al. Saliva collection by using filter paper for measuring cortisol levels in dogs. *Domest Anim Endocrinol* 2014; 46: 20–25. doi: 10.1016/j.domaniend.2013.09.008

16. Salonen M, Sulkama S, Mikkolan S, et al. Prevalence, comorbidity, and breed differences in canine anxiety in 13,700 Finnish pet dogs. *Sci Rep* 2020; 10: 1–11. doi: 10.1038/s41598-020-59837-z
17. Tiira K, Sulkama S, Lohi H. Prevalence, comorbidity, and behavioral variation in canine anxiety. *J Vet Behav* 2016; 16: 36–44. doi: 10.1016/j.jveb.2016.06.008
18. Vincent IC, Michell AR. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res Vet Sci* 1992; 53: 342–5. doi: 10.1016/0034-5288(92)90137-q