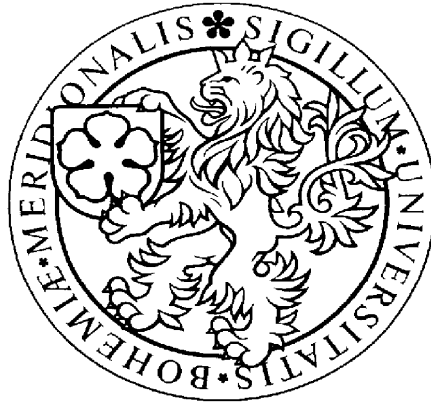


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie



Bakalářská diplomová práce

Vliv chovných podmínek na hladiny glukokortikoidů u savců (rešerše)

Lucie Třísková

Školitel: RNDr. František Sedláček, CSc.

České Budějovice 2008

Třísková, L. 2008: Vliv chovných podmínek na hladiny glukokortikoidů u savců (rešerše) [Effect of breeding conditions on the levels of glucocorticoids in mammals (review)]. Bc. thesis, in Czech], 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This thesis is focused on glucocorticoids as indicators of stress. I discuss if there are some interspecific and intraspecific differences in the levels of glucocorticoids in mammals and if change of breeding conditions causes an elevation of the level of glucocorticoids. I find out which methods are suitable for monitoring the stress response.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 30.4.2008

Lucie Třísková

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat mému školiteli Františku Sedláčkovi za to, že se mě ujal v dobách, kdy nebylo snadné sehnat vyhovující téma, za všechen čas a moudré rady, které mi věnoval a za jeho lidský přístup. Děkuji Petře Lantové za její nápady a ochotu pomáhat, dále Radce za péči o zvířata a pomoc v laboratoři a mým hraboším kolegyním Klárce a Lence za výpomoc v chovech. Veliké poděkování patří mým rodičům, kteří mě ve studiu podporují a také Venouškovi, který je pro mě nesmírnou oporou.

| | |
|--|-----------|
| SEZNAM ZKRATEK..... | 1 |
| 1. Úvod..... | 2 |
| 1.1 Proč se stresem zabývat? | 2 |
| 1.2 Glukokortikoidy | 2 |
| 1.3 Glukokortikoidové receptory | 4 |
| 1.4 Stresová odpověď | 5 |
| 2. Liší se hladiny glukokortikoidů mezidruhově?..... | 7 |
| 2.1 Cirkadiální a cirkannuální rytmy..... | 7 |
| 2.2 Potrava a exkrece..... | 9 |
| 2.3 Sociální párování..... | 9 |
| 3. Liší se hladiny glukokortikoidů vnitrodruhově?..... | 9 |
| 3.1 Věk | 10 |
| 3.2 Pohlaví..... | 10 |
| 3.3 Sociální postavení..... | 12 |
| 3.4 Reprodukční status | 12 |
| 3.5 Habituace..... | 13 |
| 4. Vyvolá změna chovných podmínek měřitelný stres?..... | 14 |
| 4.1 Uvěznění v pasti | 14 |
| 4.2 Chov v zajetí..... | 15 |
| 4.3 Nové prostředí | 15 |
| 4.4 Sociální separace | 16 |
| 4.5 Chronický stres..... | 17 |
| 5. Jak glukokortikoidy měříme? | 18 |
| 5.1 Měření GC z plazmy | 19 |
| 5.2 Měření metabolitů GC z trusu..... | 19 |
| 5.3 Časové zpoždění v exkreci..... | 20 |
| 5.4 Identifikace vzorků..... | 22 |
| 5.5 Uskladnění..... | 22 |
| 5.6 Extrakční procedury | 23 |
| 5.6.1 Manipulace ve vzorky | 23 |
| 5.6.2 Vlastní extrakce | 24 |
| 5.7 Stanovení FMG | 25 |
| 5.7.1 Biologické/fyziologické ověření..... | 25 |
| 6. Příprava budoucího experimentu..... | 26 |
| 6.1. Co z rešerše plyne pro přípravu budoucího experimentu?..... | 26 |
| 6.2. Příprava experimentátora | 27 |
| 6.3. Plán pokusu | 27 |
| 7. Literatura | 28 |

SEZNAM ZKRATEK

ACTH – adrenokortikotropní hormon

CBG – globulin vázající kortikosteroidy (corticosteroid binding globulin)

CRH – kortikotropní hormon

FMG – fekální metabolity glukokortikoidů

GC – glukokortikoidy

HHS – hypotalamo-hypofyzární systém

SNS – sympatický nervový systém

1. Úvod

1.1 Proč se stresem zabývat?

Stres má podstatný vliv na různé tělesné funkce. Jsou známy jeho škodlivé účinky na imunitní systém, reprodukci, rozpoznávání, chování atd. Stresové hormony, které jsou uvolňovány v odpovědi na stres, hrají významnou roli v širokém rozpětí potíží. Avšak stres není z podstaty negativní, ve skutečnosti může mít pozitivní účinky na fitness zvířete tím, že zvyšuje dostupnost energie v kritické situaci (Goymann et al. 1999). Dopad stresu na organismus je tudíž nezbytné znát pro pochopení a zlepšení prosperity, zdraví a reprodukce jedince.

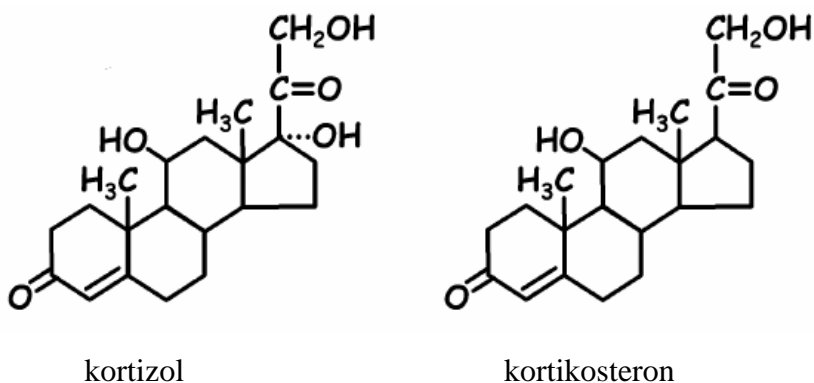
1.2 Glukokortikoidy

Vliv stresových hormonů na chování zvířat není úplně znám a většina behaviorálních studií těchto hormonů se zaměřila na změny v hladinách glukokortikoidů jako odpovědi na domnělý stresor.

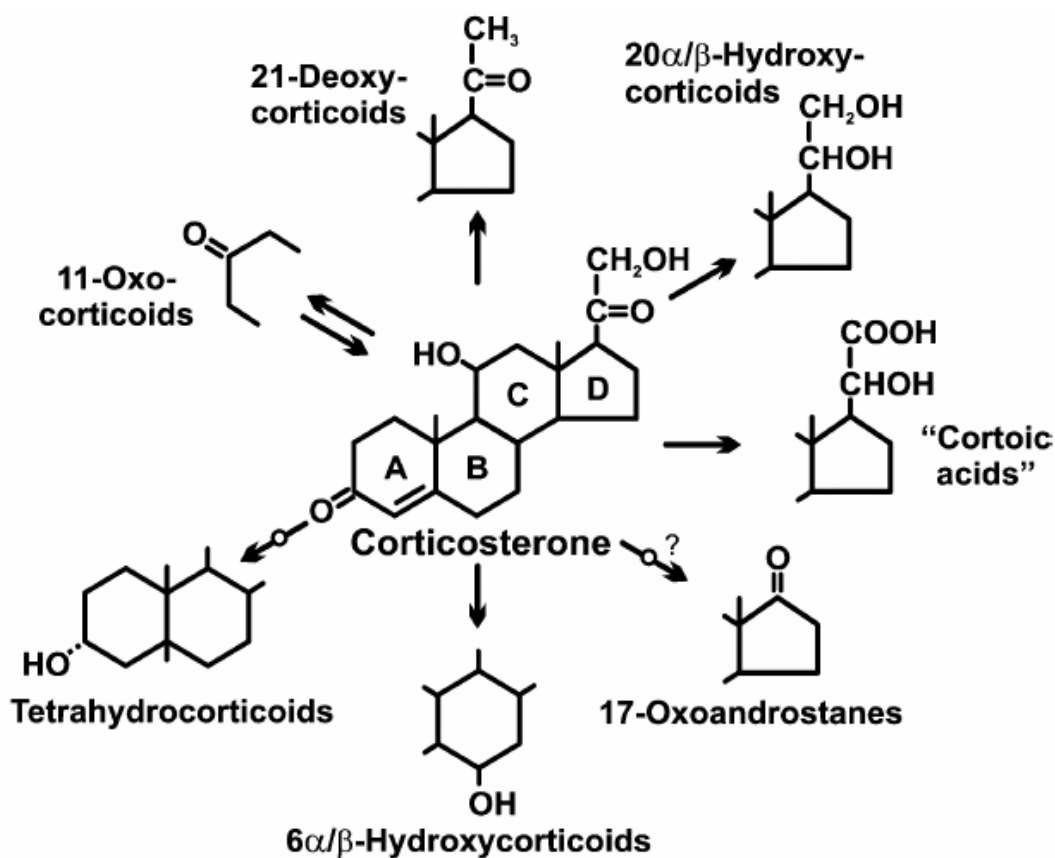
Glukokortikoidy (GC), mezi které patří kortizol a kortikosteron, zastávají mnoho důležitých funkcí v metabolismu, a to jak při bazální, tak při stresově indukované hladině, hlavně vzrůstem dostupné energie přes zvýšenou glukoneogenezi, sníženým využitím glukózy, sníženou citlivostí vůči inzulínu a metabolismu bílkovin a tuků. Usnadňují doručení energie pracujícím svalům zvýšením rychlosti dechu a srdeční činnosti, zvyšují krevní tlak, posunují energetické zdroje pryč z periferních tkání, které není třeba zásobovat pro krátkodobé přežití. GC mají početné neurobiologické a imunologické účinky - silně potlačují imunitu, projevy chování, významně se podílejí na inhibici trávení, zánětů a reprodukce během stresové odpovědi (Sapolsky et al. 2000).

Jestli hlavním produkovaným glukokortikoidem bude kortizol nebo kortikosteron záleží na konkrétním druhu zvířete (von Holst 1998). U některých malých savců je hlavním GC kortikosteron (hraboši), u středně velkých a velkých savců kortizol (primáti). Některé druhy produkují ve významné míře oba tyto hormony (veverky). Poměr mezi těmito hormony se může měnit v průběhu života nebo po stimulaci pomocí adrenokortikotropního hormonu (ACTH). Tyto dva hormony mohou mít v těle rozdílné funkce. Kortikosteron například dominuje

v mozku, zatímco hlavním glukokortikoidem v periferní cirkulaci je kortizol (de Kloet et al. 2002). Množství uvolněných GC následně odráží závažnost stresoru.



Obr.1 Glukokortikoidy (převzato Palme et al. 2005)



Obr.2 Schéma metabolismu kortikosteronu (převzato Möstl, Rettenbacher & Palme 2005)

1.3 Glukokortikoidové receptory

Glukokortikoidové receptory se nacházejí v adenohipofýze stejně jako v mnoha dalších místech mozku – hypotalamu, hipokampu a amygdale. Vázání GC v těchto místech slouží ke snížení hladiny kortikotropního hormonu (CRH) a adrenokortikotropního hormonu (ACTH), což má za následek sníženou sekreci GC. ACTH má zpětnou vazbu na hypotalamus, kde dochází k regulaci produkce CRH.

Známe dva typy GC receptorů: typem I jsou mineralokortikoidní receptory, které jsou normálně sdíleny při bazální hladině GC a typem II glukokortikoidní receptory, které mají mírně nižší afinitu než typ I a jsou primárně okupovány, když je hladina GC vyšší z důvodu stresu (Sapolsky et al. 2000). Receptory typu II hrají roli v negativní zpětné vazbě GC v mozku. Negativní zpětná vazba hypotalamo-hipofyzárního systému (HHS) přes receptory typu II pomáhá tento systém regulovat (Jessop 1999).

GC dosahují cílových tkání prostřednictvím krve. Jako ostatní steroidy jsou vázány v krevním řečišti pomocí vázajících nebo přenašečových proteinů. Jedná se o globulin, který váže kortikosteroidy (CBG), a tím je chrání před degradací. Pouze 5-10 % GC je nevázaných a jenom tato volná část GC je biologicky aktivní (Rosner 1990). CBG slouží k tomu, aby vázal nadbytek GC, a tudíž chránil tkáně před jejich vysokou hladinou. CBG tedy funguje jako jakýsi rezervoár GC, které mohou být rychle uvolněny v odpovědi na stres (Rosner 1990). Volné GC jsou běžně rychle vyloučeny. Chronický stres má za následek vysokou koncentraci GC, která způsobí značnou redukci CBG a vzrůst volných GC (Boonstra 2005).

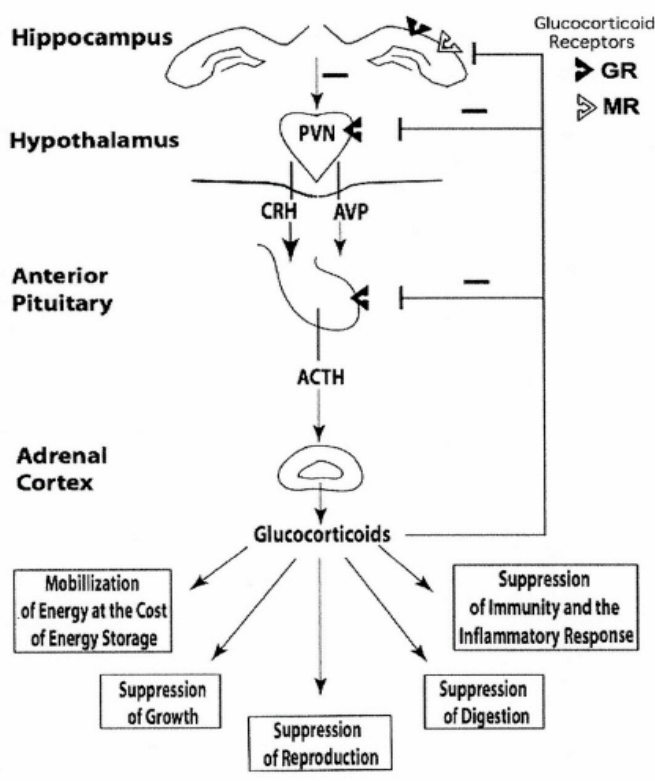
O tomto globulinu mluvíme v souvislosti buď s „tlumící“ hypotézou (Romero 2002), nebo s alternativní „přenašečovou“ hypotézou. Podle druhé hypotézy CBG slouží jako transportní molekula, která usnadňuje přenos GC k cílovým tkáním, a tak potenciálně zprostředkovává jejich působení (Breuner & Orchinik 2002). Zjištění, která z těchto hypotéz je správná, není ale klíčové pro sledování zoofyziologických cílů.

1.4 Stresová odpověď

Stresová odpověď je kaskáda událostí, zprostředkovaná propojenou sítí neuroanatomických struktur a periferních orgánů, které vyvolají fyziologické změny a změny chování nezbytné pro znovuustanovení rovnováhy v organismu. Kaskáda událostí je spuštěna, když je stresový podnět přijat mozkiem zvířete. Jestli se určitý podnět stane stresorem, záleží na individuálním vnímání každého jedince. To, co vyvolá stresovou odpověď u jednoho druhu, ji nemusí způsobit u jiného a záleží také na faktorech, jako jsou např. reprodukční podmínky, pohlaví, stáří apod. (Reeder & Kramer 2005). Behaviorální odpověď na stres může zahrnovat vyhýbání se určitému chování, pozměněnou schopnost poznávání, zvýšenou všímavost, posunutý smyslový práh, zbystřenou paměť, potlačení potravního a reprodukčního chování. Tyto behaviorální odpovědi slouží k přesměrování chování, které může pokračovat později (žraní a rozmnožování), k tomu, které je nezbytné pro vypořádání se s okamžitým stresem (von Holst 1998). Behaviorální odpovědi doprovází spontánní stimulace řady fyziologických procesů. Dvě nejdůležitější fyziologické odpovědi na stresový podnět jsou stimulace sympatického nervového systému (SNS) a hypotalamo-hypofyzárního systému (HHS). Oba systémy jsou aktivovány v centrálním nervovém systému a mají za následek pozměněné fyziologické procesy nejen v centrálním, ale i v periferním systému. Při jejich aktivaci dochází k mobilizaci energie a boji se zdrojem stresu (Reeder & Kramer 2005).

Stresový podnět způsobí aktivaci paraventriculárních jader hypotalamu, což vede k uvolnění CRH. Ten poté putuje skrz hypofyzární vrátnicový systém (uzavřený cirkulační systém, který spojuje hypotalamus s předním lalokem hypofýzy). Z adenohipofýzy se uvolní ACTH, který působí na kůru nadledvin, kde během pár minut dojde k sekreci glukokortikoidních steroidních hormonů do krve (Sapolsky et al. 2000).

Ačkoliv každá složka stresové odpovědi spolupracuje s dalšími složkami, působení rozličných hormonů je časově velmi variabilní. Uvolnění CRH, noradrenalinu a adrenalinu nastává téměř okamžitě, zatímco hladina ACTH a GC vzroste po několika minutách a zůstává zvýšená po delší dobu. Toto načasování způsobí, že zvíře může přesměrovat své chování a energii na vyrovnání se s akutním stresem (během sekund) a jeho následky (během minut), stejně jako s podněty, které se stávají stresovými pouze po delším časovém období (Boonstra 2005).



Obr. 3 Schéma uvolnění glukokortikoidů při stresové odpovědi (převzato Boonstra 2005)

Seyle popsal stresovou odpověď tak, že se skládá ze tří částí, které jsou v současnosti známé jako hlavní adaptační syndrom. První část tvoří „alarmní fáze“ (aktivace SNS), druhou „rezistenční fáze“ (aktivace HHS) a třetí zahrnuje „fázi vyčerpání“, během které začíná mít zvýšená hladina GC škodlivé účinky (Seyle 1956 ex Reeder & Kramer 2005). Stresová osa je tedy klíčová pro úspěšnou adaptaci ze tří důvodů. Zaprvé dovoluje zvířeti pomocí krátkodobých adaptací přežít působení akutního stresu (Sapolsky 2002), což zahrnuje klasickou reakci „utéct nebo bojovat“ na nejrozmanitější stresové podněty (vliv fyzických a psychických stresorů, nepříznivé počasí atd.). Zadruhé je zapojena do běžných aktivit spojených s diurnálním cyklem, jako je např. zvýšená lokomoce, explorační chování, vyhledávání potravy apod. (Reeder & Kramer 2005). Zatřetí, tato osa je klíčová v některých dlouhotrvajících evolučních adaptacích na konkrétní tlaky prostředí (Boonstra 2005).

Stres je nezbytnou součástí života organismů, přičemž je vystaven permanentním změnám, pokud se podmínky prostředí mění. Stav homeostázy a stresová odpověď také nejsou fixní, ale modifikované mnoha faktory, např. i zkušeností (Reeder & Kramer 2005).

Stres má pozitivní vliv, když je akutní (trvá několik minut až hodiny); pokud trvá delší dobu (dny až měsíce), jedná se o stres chronický, který má řadu negativních účinků - inhibuje růst, ovlivňuje dlouhodobější přežití a fitness jedince sníženou plodností a zhoršenou odolností vůči různým nemocem atd. Dlouhodobé vystavení vysoké hladině GC má za následek smrt nervových buněk, hyperglykémii, rezistenci vůči inzulínu, svalovou a kostní atrofii, hypertenzi nebo dokonce kolaps imunitního systému až smrt.

2. Liší se hladiny glukokortikoidů mezidruhově?

Podíl a složení GC a jejich metabolitů se významně liší mezi druhy (Mostl et al. 1999; Bahr et al. 2000). Zatímco kortikosteron je hlavním GC u ptáků a malých savců (hraboši, myši, potkani, králíci), kortizol se vyskytuje u ryb a větších savců (primáti, psi, kočky, koně, prasata). K těmto rozdílům přispívá celá řada faktorů, mezi nejvýznamnější patří cirkadiální a cirkannuální rytmy, potrava a cesta exkrece, schopnost sociálního párování atd.

2.1 Cirkadiální a cirkannuální rytmy

Cirkadiální a cirkannuální rytmy se významně podílejí na modulaci hladiny GC v krvi a metabolitů vyloučených do trusu. Rytmy u organismů jsou nezbytné pro regulování energetické vyváženosti ve vztahu k prostředí.

Zvýšená hladina GC byla zjištěna při vrcholení cirkadiálního rytmu (Coe & Levine 1995), což je doba právě před probuzením ze spánku. Vrchol sekrece hormonů nastává ke konci noci u primátů a dalších denních zvířat, zatímco u primárně nočních zvířat jako je většina hlodavců se vrchol objevuje ke konci dne (Touma & Palme 2005). Zvýšená hladina GC poskytuje dostatek energie potřebné pro chování, které nastává po probuzení, jako je např. zvýšená pohyblivost, explorační chování a vyhledávání potravy (Romero 2002, von Holst 1998). U samic kosmanů byl zaznamenán výrazný vzrůst hladiny fekálních metabolitů glukokortikoidů (FMG) odpoledne, narozdíl od vzorků sbíraných ráno (Sousa & Ziegler 1998). Tyto denní výkyvy mohou být u různých druhů výrazně odlišné. Pokud jsou GC či jejich metabolity sledovány v trusu, pak u malých savců, kteří se často vyprazdňují, není velkým problémem zjistit změny sekrece GC během dne. U zvířat, která potřebují dlouhou dobu

k průchodu potravy střevem nebo se vyprazdňují nepravidelně (např. většina masožravců), může být nemožné tyto cirkadiální změny zjistit (Touma & Palme 2005).

Hladina GC u savců je také modulována sezónně (Kenagy & Place 2000, Romero 2002). Vliv sezóny na stresovou odpověď je vysoce druhově specifický. Dva odlišné druhy žijící ve stejném prostředí mohou mít značně odlišnou odpověď na stresový podnět. Například sysel Parryův (*Spermophilus parryii*) v zimě hibernuje, ale vykazuje daleko větší odpověď na stimulaci ACTH než čikarí červený (*Tamiasciurus hudsonicus*), který přežívá zimu hájením individuálního teritoria a zdrojů (Boonstra & McColl 2000).

Změny v hladině GC v důsledku sezóny jsou zaznamenávány hlavně u druhů žijících v polárních oblastech, kde je omezené množství zdrojů a změny sezóny extrémní. Sezónní změny sekrece GC se vyvinuly pravděpodobně proto, aby umožnily zvířatům vyrovnávat energetické potřeby například změnou metabolické rychlosti. Rychlost metabolismu se sezónně mění u jelena lesního (*Servus elaphus*), kde došlo k značnému vzrůstu FMG v prosinci a lednu (Huber et al. 2003), zatímco u křečka dlouhoocasého (*Peromyscus maniculatus*) a norníka rudohřbetého (*Clethrionomys gapperi*) vykazovaly sezónní výkyvy FMG maximum na přelomu srpna a září a v druhé polovině září (Harper & Austad 2001). Peacock et al. (2004) ovšem nezaznamenali žádný rozdíl v intenzitě metabolismu u norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*). Toto ale může být spíše výjimka, neboť ve většině studií byla zaznamenána zvýšená hladina GC během nepříznivých podmínek v zimě nebo během období sucha (Harper & Austad 2001).

Vztah mezi konkrétní sezónou a hladinou GC je druhově a pohlavně specifický a pravděpodobně závisí na relativních energetických potřebách každého druhu v dané sezóně. Například někteří savci si ve zdrojově omezeném a extrémním prostředí udržují energii pomocí hibernace. Většina spáčů se na hibernaci připravuje ukládáním tuku a zvýšení váhy je také spojeno se zvýšenou hladinou GC u mnoha druhů savců (Kenagy & Place 2000). Naopak nízkou hladinu GC v době předcházející hibernaci změnil Kenagy a Place (2000) u čipmanka západního (*Tamias amoenus*).

Ani bazální hladina GC, ani odpověď na stresor nezůstává konstantní během ročního cyklu a změny těchto dvou hladin nejsou nezbytně blízce korelovatelné (bazální koncentrace může být někdy vyšší a odpověď na stres může být ztlumena – Romero 2002).

2.2 Potrava a exkrece

Získat určitý typ potravy (nebo mít nedostatek jiné potravy, zejména v důsledku sezóny) může být pro zvíře stresujícím faktorem. Samotná potrava, kterou zvíře zkonsumuje, pak může mít vliv na stanovení hladiny FMG. Např. potrava bohatá na vlákninu může ovlivnit metabolismus GC ve střevě (Wasser et al. 1993). Živočišná potrava masožravců může obsahovat přímo GC (Millspaugh & Washburn 2004).

Každý druh má také specifickou cestu odbourávání GC v játrech a odlišné množství a druhy bakterií v zažívacím traktu, které mohou metabolizovat GC. Množství FMG vyloučených prostřednictvím trusu se mezidruhově významně liší - např. pouhých 7% u prasat (Palme et al. 1996) až 86% u koček (Schatz & Palme 2001).

2.3 Sociální párování

Navzdory vážným poškozením, které způsobuje dlouhodobě zvýšená hladina GC, několik druhů má konstantně zvýšenou bazální hladinu kortikosteroidů bez toho, aniž by u nich docházelo k nějakým patologickým změnám. Zdá se, že sociální párování je časté zejména u druhů necitlivých vůči GC, které jsou schopny produkovat mimořádně vysoké hladiny GC. Nejznámějšími zvířecími modely „kortikorezistence“ jsou primáti Nového světa anebo hlodavci – např. hraboš prérijní (*Microtus ochrogaster*), který má až 10x vyšší bazální hladinu kortikosteronu než potkan (Taymans et al. 1997). Jestli druhové rozdíly v sociálních systémech opravdu souvisejí s proměnami v aktivitě HHS, není stále jasné.

3. Liší se hladiny glukokortikoidů vnitrodruhově?

Hladiny GC se také liší v rámci konkrétního druhu v závislosti na věku a pohlaví zvířete, jeho sociálním postavení, reprodukčním statutu, habituaci zvířete na stres a mnoha dalších faktorech. Vnitrodruhové změny v bazální hladině GC tedy musíme vzít v úvahu, když používáme hladinu GC ke zhodnocení stresu.

3.1 Věk

Ke změnám hladiny GC dochází již během prenatalního vývoje jedince, který je citlivý na permanentní modifikace stresorů, které ovlivňují matku (Matthews 2002). Odpověď GC na stres bude naprogramována odlišně, pokud matka nebude pod neustálým tlakem prostředí. Postnatální období u potkanů zahrnuje sníženou vnímavost vůči stresu ve stáří tří až čtrnácti dnů. Toto období je charakterizováno jako důsledek necitlivosti nadledvin vůči ACTH. Mírný stresový podnět je pak nedostatečný, aby překonal „hyporesponsivní“ období. Intenzivnější stres po separaci od matky však produkuje významné zvýšení aktivity HHS a dlouhotrvající změny v expresi CRH v dospělosti (Bakshi & Kalin 2000). Hraboši préríjní zřejmě tuto postnatální hyporesponsivní periodu postrádají a obě pohlaví mohou být běžně vystavena zvýšené hladině kortikosteronu (Shapiro & Insel 1990). Tito hraboši jsou zřejmě vůči vysoké hladině kortikosteronu rezistentní.

Jinak může vypadat stresová odpověď u mláďat a dospělců. Například nadledviny juvenilů hraboše pensylvánského (*Microtus pennsylvanicus*) jsou méně vnímavé na ACTH než u dospělců (Seabloom et al. 1978). Naopak u mladých svišťů žlutobříchých je hladina kortikosteroidů výrazně vyšší než u dospělců (Armitage 1991), zatímco u čipmanka západního (*Tamias amoensus*) nebyl žádný rozdíl zaznamenán (Kenagy & Place 2000).

Deregulace HHS nastává s věkem, ale její podstata se poněkud liší mezi druhy i vnitrodruhově. S přibývajícím věkem dochází ke zhoršení systému negativní zpětné vazby, která reguluje odpověď GC na stres. U různých druhů savců od laboratorních potkanů až po primáty je čas zotavení po stresovém podnětu (návrat k bazální hladině GC) výrazně vyšší u starších zvířat než u mladších (Sapolsky 1983b).

3.2 Pohlaví

Je známo, že pohlaví hraje klíčovou roli v metabolismu a exkreci steroidů. To je pravděpodobně důvod, proč některá měření FMG přinesla dobré výsledky u jednoho pohlaví, ale ne u druhého (Touma & Palme 2005). Za pohlavně specifické rozdíly mohou být zodpovědné různé faktory. Podle Breunera a Orchinika (2002) mají samičky vyšší hladinu GC v plazmě než samci, což může být způsobeno vyšší kapacitou globulinu vázajícího steroidy, který vykazuje jistou afinitu ke GC. Cirkulující GC jsou tedy ve značném množství svázány

globulinem, a tudíž celková koncentrace GC může být vyšší. Koncentrace GC se také významně liší v průběhu samičího estrálního cyklu v důsledku měnící se koncentrace estrogenu a progesteronu, jež ovlivňují expresi a zabírání těchto globulinů v plazmě.

Harper a Austad (2004) však ve svém pokusu nezjistili žádný vliv pohlaví na hladinu FMG u křečka dlouhoocasého ani u normíka rudohřbetého, což je v přímém rozporu s mnoha jinými studiemi, které zaznamenaly pohlavní rozdíly v hladině kortikosteronu v plazmě právě křečků dlouhoocasých nebo hraboše préríjního (Taymans et al. 1997).

To, že samice mají vyšší hladinu GC je obecným trendem, který se vyskytuje u většiny druhů savců. Je to způsobeno zejména vlivem samičích pohlavních steroidů na syntézu a uvolnění GC z kůry nadledvin. Samičky tudíž mají robustnější stresovou odpověď – např. samičky sysla Parryova odpovídají na stresor dvanáctinásobným vzrůstem hladiny kortizolu v plazmě, zatímco u samců se kortizol zvýšil pouze čtyřikrát (Boonstra et al. 2001). Důležitá výjimka z tohoto pravidla je u kaloňů pobřežních (*Pteropus hypomelanus*), kde samci mají výrazně vyšší bazální hladinu GC než samičky (Reeder et al. 2004b), není ale známo proč. Zaznamenané pohlavní rozdíly v sekreci GC však mohou být důsledkem toho, že studované populace jsou drženy v zajetí po několik generací, což významně ovlivňuje růst, rychlost dospívání a cirkulující hladiny mnoha hormonů (Miller et al. 2002). Výsledky získané od chovných a volně žijících zvířat nemůžeme tedy snadno srovnávat.

Také hladina metabolitů vyloučených močí nebo v trusu se může významně lišit mezi pohlavími. Touma et al. (2003) poprvé zaznamenal tuto situaci u laboratorních myší - samci vylučovali okolo 73% radioaktivně značených metabolitů kortikosteronu trusem, zatímco samičky vylučovaly touto cestou pouze 53%. Samičky tudíž vylučovaly močí více metabolitů kortikosteronu než samci. Důvody této odlišnosti jsou však nejasné. Časový průběh vyloučení radioaktivních metabolitů v moči a trusu byl podobný u obou pohlaví. Podobné výsledky byly zaznamenány pro kočky (Schatz & Palme 2001). Naopak u jelenů rozdíly mezi pohlavími zaznamenány nebyly (Huber et al. 2003).

3.3 Sociální postavení

Sociální interakce jsou významnou příčinou stresu u zvířat. Rozmnožovací úspěch samců se často odvíjí od jejich sociálního postavení ve skupině a koncentrace GC odráží postavení samce v hierarchii. U některých druhů může být udržení vysokého sociálního postavení větším stresem než dominance samotná (Sapolsky 1992). Když hustota populace roste, zvířata se stávají aktivnějšími v sociálních interakcích. Vysoká hustota a rychlost disperze vede k sociální nestabilitě a je pravděpodobně hlavní příčinou zvýšené koncentrace GC u savců (Sapolsky 1983a). U monogamního hraboše prérijního zvýšená hladina kortikosteronu stimuluje párování u samců, zatímco samičky mají na zvýšení kortikosteronu opačnou odpověď (DeVries et al. 1996).

Studie prováděné na zvířatech v zajetí ukázaly, že prohrávání v bojích může zvyšovat sekreci GC. Chronický stres tak může potlačovat reprodukci podřízených jedinců v kooperativně se rozmnožující skupině (Johnson et al. 1992). V rozporu s touto hypotézou jsou nedávné studie kooperativních skupin v přírodě, které ukázaly, že dominantní jedinci mají více zvýšenou hladinu GC než podřízení jedinci (Creel 2001). Zjištění, že zvýšení hladiny GC může být důsledkem podřízenosti nebo cenou za dominanci komplikuje pohled na sociální stres.

3.4 Reprodukční status

Reprodukční status zvířete může také ovlivnit hladinu hormonů vyloučených do trusu. U vysoce sociálního kaloně malajského (*Pteropus vampyrus*), ale ne u relativně solitérního kaloně Millerova (*Pteropus pumilus*), bylo zaznamenáno, že samci sídlící v rozmnožujících se skupinách měli výrazně vyšší hladiny GC během období vysoké reprodukční aktivity než samci, kteří žili pouze v samčích skupinách (Reeder et al. 2004b). U sysla Parryova může být hladina kortizolu dokonce vyšší u samců než samic během rozmnožovací sezóny (Boonstra et al. 2001).

Z energetického hlediska je březost a laktace nejvíce metabolicky náročným obdobím v životě samičky. Není tedy překvapující, že se tato zátěž odrazí dramatickým posunem v regulaci GC. Kvůli těmto komplikacím jsou studie mnohem častěji zaměřeny na samce a samice jsou opomíjeny. U savců má mnoho samiček vysokou hladinu GC uprostřed a během pozdní březosti. Tato hladina poklesne až po porodu (např. u netopýra hnědavého – *Myotis lucifugus*), i když zůstává stále zvýšená v porovnání se samci a nebřezími samičkami

(Reeder et al. 2004a). Hladina GC v plazmě je mnohem vyšší u březích a kojících samic čipmanků západních než u těch, které právě vylezly z nory po hibernaci nebo během prehibernačního období (Kenagy & Place 2000). Hladina GC výrazně stoupá blízko termínu porodu u většiny druhů samic savců, protože spouští kaskádu událostí, které vyvolají porod (Möstl & Palme 2002).

Navzdory tomu, že bazální hladina GC je zvýšena během pozdní gravidity, stresem indukovaná hladina GC během březosti a laktace značně klesá (Lightman et al. 2001). Např. odpověď na ACTH u hraboše pensylvánského je nižší u březích samic než u nebřezích (Seabloom et al. 1978). Navíc nižší citlivost nadledvin na ACTH může mít podle Boonstra et al. (2001) za následek změněnou kapacitu vázaných kortikosteroidů např. u sysla kavkazského (*Spermophilus musicus*), což může odrážet potřebu minimalizovat velké fluktuace GC u plodu během březosti a v novorozeneckém období během laktace (GC mohou vstupovat do těla přes mateřské mléko – Lightman et al. 2001).

3.5 Habituační

Jak si jednou zvíře navykne na stres, může dojít ke zmenšení nárůstu hladiny GC v odpovědi na stres. Např. jedinci malpy hnědé (*Cebus apella*) zvyklí na pravidelný odchyt a odebírání vzorků neměli zvýšenou hladinu kortizolu, ovšem zvířata, která nikdy dříve tuto proceduru nepodstoupila, vzrůst kortizolu v plazmě vykazovala. U těchto zvířat došlo k poklesu hladiny kortizolu v plazmě po sedmi týdnech (Dettmer et al. 1996).

Prostředí, ve kterém zvířata žijí, také značně modifikuje hladiny GC. Například sysel Parryův je více chronicky stresován v boreálním lese než v oblasti alpinských luk, což může být způsobeno podle Hika et al. (2001) rozdílným predaním tlakem v těchto dvou prostředích.

4. Vyvolá změna chovných podmínek měřitelný stres?

Monitorovat fyziologické a behaviorální parametry volně žijících zvířat je často obtížné nebo dokonce nemožné kvůli logistickým problémům a potenciálním komplikacím spojeným s chytáním a omezováním divokých druhů. K mnoha experimentům, včetně monitorování hladiny GC, se tedy často používají zvířata odchycená ve volné přírodě a umístěná do chovů. Jedná se nejčastěji o drobné savce, jakými jsou například hlodavci (myši, hraboši aj.). Jedním z modelových organismů se stává hraboš polní (*Microtus arvalis*), který je v našich podmínkách hojný, poměrně snadno odchytitelný a dobře snáší život v zajetí. Také se rychle množí, takže je možné testovat více generací.

4.1 Uvěznění v pasti

Proces chycení a následné omezení může významně měnit sekreční vzory řady hormonů (Kenagy and Place 2000), často během několika minut. Jedinci, kteří zůstali v pasti déle než 4 hod., měli výrazně vyšší hladiny FMG v důsledku ulovením vyvolané aktivity nadledvin než ti, kteří v pasti strávili méně než 4 hod. a FMG odrážely bazální hladinu GC (Harper & Austad 2004).

Fletcher a Boonstra (2006) zkoumali u hraboše pensylvánského vliv chycení do pasti na stresovou odpověď. Tato událost se pro hraboše ukázala jako jasně stresující a došlo k okamžité aktivaci HHS. Zvířata, která byla odchycena opakovaně vypadala mnohem klidněji, tiše seděla v pasti a čekala na manipulaci a vypuštění místo toho, aby zběsile pobíhala. I jejich stresová odpověď byla nižší (Boonstra 2005).

Faktorem, který by mohl zvyšovat rozdíly v sekreci GC mezi druhy, může být odlišná délka času, které zvíře v pasti stráví. Harper a Austad (2001) našli pozitivní vztah mezi délkou času strávenou v zajetí a hladinou FMG u křečka dlouhoocasého, avšak nikoli u norníka rudohřbetého. Odlišné výsledky mohou být způsobeny nedostatečnou citlivostí analýzy některých metabolitů kortikosteronu (Touma et al. 2003) nebo tím, že vzorky nebyly odebrány ve stejný čas během dne, a tudíž denní kolísání GC mohlo výsledky ovlivnit. Fletcher & Boonstra (2006) nenašli žádnou úměrnost mezi dobou strávenou v pasti a hladinou testosteronu a glukózy; ta ale vykazovala zvýšenou hladinu stále. Ačkoliv jsou hraboši značně stresováni chycením do pasti, prodloužená doba uvěznění nemá za následek postupně rostoucí hladinu GC.

4.2 Chov v zajetí

K definovanému stanovení hladin GC resp. FMG nebo k přesnějšímu zhodnocení účinků potenciálních stresorů musí být zvířata držena v laboratorních podmínkách (Washburn et al. 2003). Divoká zvířata držaná v zajetí však vykazují hladiny FMG, které jsou vyšší nebo dokonce nižší než u volně žijících jedinců. Se vzrůstající dobou strávenou v zajetí u odchycených divokých zvířat bazální hladina kortikosteronu klesá v důsledku aklimatizace (Wingfield et al. 1982). Jednotlivé druhy mohou na chycení odpovídat odlišně a doba aklimatizace může také být velmi rozmanitá. Pokud však zvířata v zajetí neměla dostatečný čas na aklimatizaci, odpověď na různé stimuly může být pozměněna jejich nepřírozenou hladinou GC.

Laboratorní studie ukázaly, že mláďata matky, která byla vystavena vysoké hladině stresu v době březosti (např. z důvodu odchytu matky) nebo která obdržela málo poporodní mateřské péče, jsou negeneticky naprogramovaná, aby měla nefunkční stresovou osu, která ovlivňuje jejich přežití a reprodukci (Matthews 2002).

4.3 Nové prostředí

Je známo, že u hlodavců vyvolá přemístění do nového prostředí zvýšení stresovou odpověď. Podle Harpera a Austada (2000) vykazovala odchycená divoká zvířata přemístěná do klece výrazné zvýšení FMG po 8 hod. od začátku experimentu. Když křečka dlouhoocasého a norníka rudohřbetého vystavovali nejen novému prostředí, ale i snížené teplotě (4° C po dobu 2 hod.), vrcholu hladiny GC bylo dosaženo již po 6 hod. od počátku stresu a k návratu k bazální hodnotě došlo po 22 hod. od ukončení vystavení chladu. Uvedení autoři také zjistili, že domestikované a odchycené divoké myši domácí mají podobnou odpověď na manipulaci, ale že domestikované myši zažívají v laboratorních podmínkách překvapivě větší stres než ty odchycené, což je v rozporu s mnoha studiemi. Miller et al. (1999) totiž očekávatelně ukázal, že divoká zvířata jsou více náchylná na stres laboratorního prostředí než domestikovaní jedinci. Výsledky mohou naznačovat, že mezi druhy a jedinci (personalita) jsou dramatické rozdíly ve vnímání stresu, které mohou efekt domestikace překonávat.

Celková rovnováha mezi explorací a vyhýbání se novému prostředí se může měnit během vývoje jedince – liší se u mláďat a dospělců. Vystavení novému prostředí výrazně zvyšuje

hladinu kortikosteronu především u juvenilních myší nilských (*Arvicanthis niloticus*), u kterých dochází k návratu k bazální hladině až po několika hodinách, zatímco u dospělých jedinců k návratu dochází během hodiny (Novak et al. 2007). Mláďata jsou méně zkušená a tudíž více zranitelná než starší jedinci, nicméně nové prostředí více prozkoumávají, aby o něm mohla získat potřebné informace. Zvýšená hladina GC jim pravděpodobně pomáhá připravit se na ohrožení, se kterým se mohou v neznámém prostředí setkat (Novak et al. 2007). Macri et al (2002) u laboratorních myší a potkanů zjistil, že hladina kortikosteronu v důsledku nového prostředí výrazněji vzrostla u dospívajících zvířat než u mláďat nebo dospělých jedinců.

Co se týká umístění jedinců v chovu po skupinách, tak přemístění páru jedinců nebo dokonce pouze jediného potkana z klece se může projevit jako významný stresor pro zbývající obyvatele (Kask et al. 2001). Samci morčat, kteří byli chováni ve věkově i pohlavně smíšené kolonii vykazovali neočekávaný pokles v hladině kortizolu ve věku čtyř měsíců po přemístění do nového prostředí (Hennessy et al. 2006). Tento efekt se objevil bez ohledu na to, jestli samci byli testováni v izolaci nebo se samičí společníci. Zvířata mladší a starší než čtyři měsíce vykazovala mnohem vyšší odpověď kortizolu, zejména když byla izolována. Ukázalo se, že oddělená a samostatně žijící zvířata po určité době aklimatizace nejsou více stresována než skupina jedinců v jedné kleci (Hunt & Hambly 2006).

Při zvětšení chovného prostoru skupina šesti samců vykazovala výrazně méně stresu než v původním prostředí (Hunt & Hambly 2006), což je v kontrastu s domněnkou, že zvětšení chovného prostředí může u samců vyvolat větší stres v důsledku zvýšené agrese mezi samci (Hurst et al. 1993).

4.4 Sociální separace

Odpověď HHS na stres je u samců i samic ovlivněna přítomností nebo absencí partnera. Důkazy o aktivaci HHS v odpovědi na sociální separaci byly získány u mnoha druhů, avšak zvýšená hladina kortikosteronu v důsledku izolace nebyla vždy prokázána (Brain & Benton 1979). Separace partnerů vykazujících znaky emoční náklonnosti vede k okamžité a stále odpovědi HHS, zatímco separace partnerů, kteří byli přidružení, ale nedávají najevo náklonnost, má menší nebo žádný vliv na aktivitu HHS (Hennessy 1997).

Carter et al. (1995) zkoumali hladinu kortikosteronu u samic hraboše prérijního, kterým byly odebrány vaječníky, a u nezkušených samců, kteří byli s uvedenými samičkami spárováni po dobu dvou týdnů a potom: a) separováni na 24 hod., b) separováni po dobu 24 hod. a

následně se znovu setkali se známým partnerem po dobu 30 min, c) separování a potom umístění dohromady s neznámým pohlavně nezkušeným samcem. Samičky měly vyšší bazální hladinu kortikosteronu a vykazovaly dramatičtější odpověď na sociální podněty než samci, ale odpověď na řízenou sociální separaci a znovusetkání byla podobná u obou pohlaví. V pokusu b) separace od partnera vyvolala malé zvýšení kortikosteronu a opětovné setkání s partnerem bylo spojeno s výrazným poklesem hladiny kortikosteronu až pod bazální hladinu. V pokusu c) samičky, které byly umístěny dohromady s neznámým samcem, měly zvýšenou hladinu kortikosteronu, zejména ve srovnání s hladinou kortikosteronu po znovusetkání se známým partnerem. Avšak pohlavně nezkušení samci a samice, jež neměli zkušenost soužití s dospělým, nepříbuzným jedincem, odpovídali na jejich první setkání s neznámým jedincem opačného pohlaví rapidním poklesem kortikosteronu. Naopak hraboši, kteří navázali párová pouta, shledali vystavení neznámému jedinci jako stresující událost, zatímco znovusetkání se známým partnerem pro ně bylo podnětem redukcujícím stres. Mláďata hraboše prérijního vykazovala silnější fyziologickou odpověď na separaci od matky než mláďata blízce příbuzného hraboše horského (Shapiro & Insel 1990).

Samičky potkanů častěji vykazovaly zvýšený kortikosteron v souvislosti s izolací než samci (Brain & Benton 1979), ale v pokusu, který uspořádali Razzoli a Valsecchi (2006) byl vliv separačního stresu po narušení párového pouta zjištěl pouze u samců, ale nikoliv u samic tarbika mongolského (*Stylodipus andrewsi*). Separace od známého jedince je složitý jev: izolovaná zvířata mohou čelit větším energetickým požadavkům na udržení tělní teploty, ale jsou v méně komplikovaném prostředí než kontrola, se sníženou hmatovou, sluchovou, chuťovou a čichovou stimulací, která je u hlodavců nejdůležitější (Kim & Kirkpatrick 1996).

4.5 Chronický stres

Rozrušení laboratorních zvířat je obvykle spojeno s probíhajícím experimentem, ale tento konkrétní stres trvá pouze krátkou dobu, většinou odezní během 24 hod. Když je však zvíře během studie vystaveno nevhodným podmínkám, stres se stává dlouhodobějším. Opakované nebo dlouhotrvající vystavení zvířete stresovému podnětu vede k trvale vysokým hladinám GC, které mají značně škodlivé účinky na organismus (způsobují mj. pokles hmotnosti a úbytek tukové hmoty, zakrnění brzlíku, zvětšení nadledvin, zvýšení krevního tlaku). Negativní sociální vztahy mohou také být významným zdrojem chronického stresu (Bartolomucci et al. 2005). Harper a Austad (2000) předpokládají, že druhy odchycené v přírodě budou odlišně citlivé na

chronický stres laboratorního života, ale že relativní hladina stresu mezi jedinci bude během času dosti konzistentní.

Studie podle Riche a Romera (2005) demonstruje pokles bazální a stresově indukované hladiny GC na počátku a během chronického stresu. Avšak mnoho dalších studií zjistilo, že chronický stres je spojen se zvýšením GC (např. Bartolomucci et al. 2005). Zmenšení stresové odpovědi chronickým stresem badatelé často připisují přivyknutí, méně častěji vyčerpání, nejpravděpodobněji se však jedná o kontrolovanou regulaci HHS v odpovědi na chronický stres. Tato odpověď by mohla mít za cíl minimalizování škodlivých účinků chronicky uvolňovaného kortikosteronu (Romero 2002; Sapolsky et al. 2000). Změny vnímavosti HHS na hormonální výzvy naznačují, že pokles kortikosteronu nastává kvůli změnám ve fyziologii, nikoliv v rozpoznávání ani ve vnímání stresoru. Chronický stres se tedy nemusí vždy projevovat vysokou hladinou kortikosteronu (Rich & Romero 2005).

5. Jak glukokortikoidy měříme?

Koncentrace GC je používána jako indikátor přítomnosti stresu. Měření hormonů, jejichž hladina vzrůstá téměř okamžitě, není možné u volně žijících savců a tyto hormony je velmi těžké stanovit také u savců v zajetí. To, že máme nedostatek dat bazálních hladin GC u savců je způsobeno obtížemi získat vzorek během pár minut od vyrušení (většinou do tří minut), abychom se vyhnuli měření odpovědi na chycení a odebrání samotného vzorku. Další komplikací je to, že většina savců jsou noční a solitérní zvířata, která není snadné vystopovat. Stresem vyvolanou sekreci GC lze tak u volně žijících zvířat měřit jednodušeji než bazální hodnoty, protože většina zvířat stráví více než cca tři minuty v pasti před vlastním odebráním vzorku. Srovnávání základní hladiny GC a hladiny, které je dosaženo nějaký čas po působení stresového podnětu je jednou z hlavních metod, která je používána ke zhodnocení stresové odpovědi u savců a jiných obratlovců (Reeder & Kramer 2005). Aktivita SNS může být u volně žijících druhů nepřímo stanovena monitorováním srdeční rychlosti nebo výkyvů tělní teploty. Jak ale měřit bazální hladiny GC?

5.1 Měření GC z plazmy

GC a ACTH lze stanovit relativně snadno (Reeder & Kramer 2005). Je známo mnoho metod dostupných k měření koncentrace GC a jejich metabolitů z různých biologických vzorků. Ke sledování hladiny GC se tradičně používalo stanovení v krvi. Během tří minut od chycení musí být odebrán krevní vzorek pro stanovení bazální hladiny GC. Načasování je klíčové, protože stresová odpověď je tak rychlá, že koncentrace GC se začne zvyšovat 3-5 minut po chycení (Reeder et al. 2004a).

Odebírání krve zvířatům, zvláště opakované, je však často stresující událostí, což má za následek zvýšení hladiny GC v plazmě. Stres prožitý během odebírání vzorku a limitované množství celkové dostupné krve (zejména u malých zvířat jako jsou hlodavci) způsobuje vážná omezení. Odebírání krevních vzorků může být nebezpečné nebo dokonce nemožné u divokých druhů (Palme et al. 2005). Navíc vzorek získaný odebráním krve nemusí charakterizovat dlouhotrvající hormonální hladinu kvůli pulzační sekreci GC do krve (Harper & Austad 2000). V důsledku toho hladina GC v plazmě i spontánně velmi kolísá - koncentrace hormonů může být až desetinásobná během několika minut (Ylönen et al. 2006; von Holst 1998). Je všeobecně uznáváno, že hladina GC v těle se liší mj. v závislosti na cirkadiálních rytmech (von Holst 1998), takže daný vzorek nakonec představuje koncentraci GC v krvi pouze pro daný okamžik v čase.

5.2 Měření metabolitů GC z trusu

Během posledních dvaceti let se velmi využívanou metodou stalo měření metabolitů steroidních hormonů z trusu (nebo moči). Tato metoda začala být propagována ke konci sedmdesátých let u ptáků a na počátku let osmdesátých minulého století u savců. V posledních letech je zaváděna u vzrůstajícího počtu druhů. Tato neinvazivní metoda je nyní velmi využívána, slouží k vyšetření vztahu mezi hladinou GC a příslušným chováním zvířete, jeho reprodukčním úspěchem, prosperitou apod. (Millspaugh & Washburn 2004).

FMG nabízejí několik podstatných výhod. Předně vzorky mohou být snadno sbírány bez nutnosti vyrušení, odchycení a manipulace se zvířetem (Mostl & Palme 2002). Touto metodou se také vyhneme nezbytnosti odběru vzorku během krátkého časového intervalu tří minut. Vzorky můžeme sbírat v pravidelných intervalech v průběhu delšího období. Navíc ve fekálních

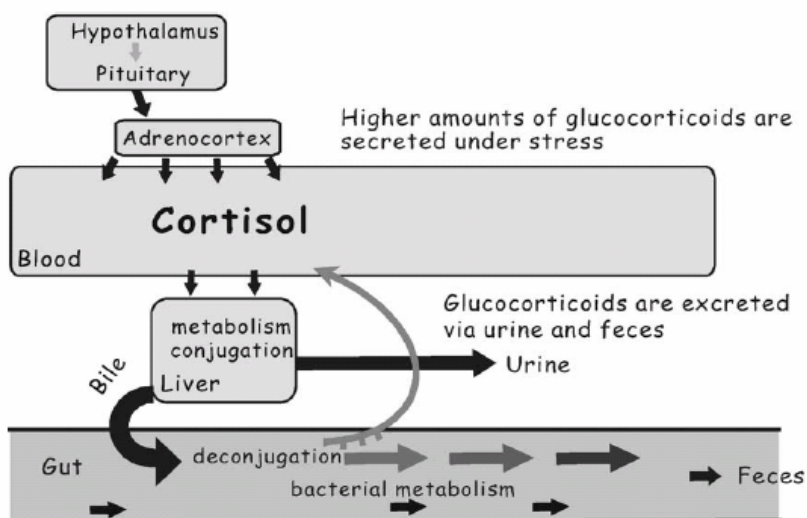
vzorcích jsou tlumena krátkodobá kolísání a denní změny hladin GC (Palme 2005). FMG tedy odráží průměrnou hladinu cirkulujících GC za určité časové období, a tudíž poskytují přesnější zhodnocení dlouhotrvající hladiny GC než krevní vzorky (Harper & Austad 2000).

Palme et al. (1999) potvrdili, že koncentrace metabolitů kortizolu v trusu odráží jeho celkové vyloučené množství, a tudíž odráží sekreci kortizolu lépe než jeho koncentrace v krvi, která se rychle mění. Protože pouze volná část GC v krvi je dostupná pro metabolismus a exkreci, koncentrace FMG přesněji odráží biologicky aktivní část (Palme 2005). U mnoha druhů (zejména u těch větších a u těch, které je obtížné chytit) je toto neinvazivní monitorování jediný možný způsob sběru vzorků.

Navzdory výhodám je zde i mnoho faktorů, které ztěžují využití této metodiky. Množství FMG může být, podobně jako jiné fyziologické parametry, ovlivněno řadou faktorů. Je třeba počítat s tím, že také hladiny FMG budou ovlivněny délkou času, po kterou jsou zvířata držena v zajetí, cirkadiálními a cirkannuálními rytmy (je důležité odebírat vzorky ve stejný čas v průběhu dne, pokud dochází k opakovaným měřením během dalších dnů nebo pokud srovnáváme odlišné skupiny či populace zvířat), kondicí jedince, pohlavím (reprodukční status), věkem, sociálním postavením zvířete, potravou, technikou ošetření, uskladněním a stářím vzorku, jeho stavem a hmotností. Co dále komplikuje interpretaci a využití tohoto způsobu stanovení je zřejmě druhově specifická odpověď na výše uvedené faktory (Millspaugh & Washburn 2004). Závisí také na metabolismu a exkreci steroidů, které se významně liší mezi druhy a někdy dokonce mezi pohlavími téhož druhu. Téměř nevhodná je tato metodika pro sledování krátkodobých výrazných píků (Touma & Palme 2005). Tudíž tato neinvazivní metoda musí být pečlivě zvážena a ověřena pro každý druh, než dojde k jejímu využití v dalším badání nebo v praxi.

5.3 Časové zpoždění v exkreci

Aby mohla být metodika adekvátně aplikována, je zásadní znát dobu, po které se stresový impuls objeví v trusu jako zvýšení hladiny metabolitů GC. Většina steroidů (zejména GC) je intenzivně metabolizována v játrech. Kortizol a kortikosteron sám o sobě není v trusu přítomen. To platí i pro další steroidy, jako je např. progesteron a testosteron. Ačkoliv termín „fekální glukokortikoidy“ je často používán v literatuře, je nesprávný, protože v trusu se vyskytují hlavně metabolity GC. Hlavní GC přítomné v krvi tedy ve skutečnosti v trusu chybí (Touma et al. 2003).



Obr.4 Schéma sekrece, metabolismu a exkrece glukokortikoidů
(převzato Möstl & Palme 2002)

Metabolity jsou následně vyloučeny jako konjugáty (sulfáty nebo glukuronidy) přes žluč do střeva a přes ledviny do moči (Möstl & Palme 2002). Tyto produkty jsou více rozpustné ve vodě než původní steroidy. Část metabolitů je ze střeva reabsorbována a vrací se zpět do jater (Palme et al. 2005). Na metabolity ve střevě působí mikrobiální enzymy, které můžou způsobit změnu jejich struktury.

Rozdílné steroidní hormony jsou tedy metabolizovány a vyloučeny v odlišném množství močí, trusem nebo oběma cestami. U některých druhů, jako jsou například kočky nebo potkani, je vysoké procento GC metabolitů vyloučeno přes trus, zatímco u jiných (např. u ovcí, prasat, psů nebo slonů) je hlavní cestou moč. Bahr et al. (2000) zaznamenal, že u kosmanů, makaků a šimpanzů je 82– 91% kortizolu vyloučeno močí, zatímco 9-18 % je vyloučeno trusem. Cestu exkrece také významně ovlivňují rozdíly mezi pohlavími. Touma et al. (2003) poprvé zaznamenali tyto rozdíly u myší.

Doba průchodu trávené potravy střevem poskytuje hrubý odhad očekávaného zpoždění. Toto časové zpoždění může trvat méně než 30 minut, ale také více než jeden den – liší se druh od druhu, ale někdy také dokonce v rámci jednoho druhu a závisí na aktivitních rytmech zvířat (Touma & Palme 2005). U kuřat je v rozmezí 2-6 hodin, 6-12 h u myší (Möstl & Palme 2002) a až dva dny u šimpanzů. U norníka rudohřbetého a křečka dlouhoocasého byl vrchol hladiny FMG v trusu zaznamenán po 8-12 hodinách od stresové události (Harper & Austad 2000). Rytmy aktivity však mohou tuto dobu výrazně zkrátit či prodloužit. Pokud stresová událost

nastane v inaktivní fázi, vrchol hladiny metabolitů kortokosteronu se u myší domácích může vyskytnout až po uplynutí 10 hodin, zatímco během aktivní fáze se tento vrchol může objevit již po čtyřech hodinách. Znalost časového zpoždění ve fekální exkreci u konkrétního druhu je rozhodující pro uspořádání experimentu, protože tento čas nám určuje dobu odebrání vzorků.

5.4 Identifikace vzorků

Trus sbíraný pro analýzy FMG by měl být známého stáří, od známého jedince, což je často obtížné zjistit při studiu v terénu. Sbíráni ne úplně čerstvých vzorků předpokládá, že trus stále obsahuje biologicky reprezentativní množství FMG. Avšak vzorky, které byly vystaveny srážkám nebo nadměrným teplotám již přesné zhodnocení hladiny FMG neumožňují (Khan et al. 2002). Identifikace vzorku je nezbytná při monitorování změn hladiny GC v čase z důvodu odlišnosti hladin mezi jedinci odlišného věku, sociálního postavení a mnoha jiných faktorů (Keay et al. 2006). Vzorky od právě odchycených zvířat nebo zvířat již zvyklých na přítomnost člověka mohou být sbírány po pozorování defekace konkrétního jedince. V jiných studiích byla používána barviva nebo byla přidávána např. kukuřičná zrna, malé barevné plastové korálky nebo kousky barevných stužek do zvířecího žrádla. Tyto látky přejdou společně s nestrávenými zbytky potravy do trusu, což usnadní jeho identifikaci. U zvířat, která nemohou být přímo pozorována nebo nalákána na označené žrádlo, se pro identifikaci vzorků používá DNA.

V laboratorních pokusech je možné použít odběrové zařízení, které umožňuje i u sociálně žijících savců získat trus od jednotlivců bez přerušení kontaktu se skupinou (Frynta et al. submitted).

5.5 Uskladnění

Metody uskladnění hrají důležitou roli v kvalitě a kvantitě měřených FMG. Nejlepší možností je sbírat trus krátce po defekaci a co nejrychleji jej zmrazit alespoň při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Millsbaugh & Washburn 2004; Palme et al. 2005; Touma & Palme 2005). Avšak toto zmrazení nezničí bakteriální enzymy, které metabolizují steroidy. Pokud tyto enzymy nejsou inaktivovány před uskladněním (vysušením, alkoholem), metabolismus může pokračovat bezprostředně po rozmrazení (Möstl et al. 2005). Rozmrazení vzorků teplem (95°C) bakteriální enzymy zničí.

Další možností je udržovat krátké intervaly mezi rozmrazením a přidáním organického rozpouštědla (Möstl et al. 1999).

Zmrazení není vždy možné, zejména když vzorky sbíráme přímo v terénu. Po sesbírání můžeme vzorky ukládat do konzervačních látek ve snaze předejít bakteriálnímu rozkladu metabolitů. Bez těchto ochranných látek bylo zaznamenáno, že přirozeně se vyskytující bakterie a jejich enzymy degradují steroidní metabolity během několika hodin (Möstl & Palme 2002). Při zpracování vzorků tudíž musí dojít k rychlému odstranění vody vysušením (např. v elektrické peci) nebo aplikací chemických látek, jako je alkohol nebo kyseliny (Touma & Palme 2005). U etanolu bylo zjištěno, že zabíjí bakterie a inaktivuje jejich destruktivní enzymy při běžné okolní teplotě (Wasser et al. 1988). Přídavek alkoholu ke vzorku však způsobuje pomalou steroidní extrakci, a tato ztráta může ovlivnit výsledky (Palme 2005). Je tudíž vhodné standardizovat jak množství trusu, tak alkoholu a používat pevně uzavřené nádoby, abychom se vyhnuli jakékoliv ztrátě. Podle Khana et al. (2002) bychom neměli nechávat vzorky v etanolu při pokojové teplotě déle než 30 dní. Dlouhodobější uskladnění FMG v ethanolu je pak vhodné kombinovat s nižší teplotou ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), avšak ideální je nepřekračovat 90 – 120 dní. Výsledky Khana et al. (2002) překvapivě ukázaly, že po delší době skladování došlo ke zvýšení stanovené koncentrace FMG. Metoda, která poskytuje asi nejlepší podmínky pro uchovávání vzorků je okamžité zmrazení v tekutém dusíku (Wasser et al. 1988).

5.6 Extrakční procedury

5.6.1 Manipulace ve vzorky

U savců bylo zaznamenáno, že FMG nejsou v trusu rovnoměrně rozloženy (Millspaugh & Washburn 2004), tudíž je doporučeno vzorky homogenizovat. Pro analýzu se používají buď suché, nebo vlhké čerstvé vzorky trusu, přičemž obojí měření docela dobře koreluje (Wasser et al. 2000). S vlhkými čerstvými vzorky se lépe manipuluje a jsou mnoha badateli upřednostňovány (Palme et al. 2005). Když však čerstvé vzorky trusu nejsou k dispozici nebo když potřebujeme nestrávený materiál roztřídit, používány jsou vzorky suché (Millspaugh & Washburn 2004).

Před vlastním pokusem je vhodné testovat stabilitu FMG za stejných podmínek prostředí, jaké nastanou během experimentu. Bakterie v trusu se liší od zvířete ke zvířeti, a to jak kvantitativně, tak kvalitativně, což má za následek individuální rozdíly ve stabilitě FMG (Möstl

et al. 2005). Je tedy nezbytné vykonat pokusy s uskladněním vzorků trusu od několika zvířat obou pohlaví zkoumaného druhu, pokud vzorky nebudou rovnou zamrazeny (Touma & Palme 2005). Musíme také vzít v úvahu, že kontaminace vodou (např. napájecí voda, déšť) nebo močí může u savců významně ovlivnit koncentraci měřených steroidních metabolitů (Palme 2005).

5.6.2 Vlastní extrakce

Před analýzou musí být FMG extrahovány z trusu. Podle Khana et al. (2002) můžeme etanol, ve kterém jsou vzorky uchovány, nechat odpařit při pokojové teplotě 1-3 dny před vlastní extrakcí. Möstl et al. (2005) však odpaření etanolu nedoporučují, protože znovurozpuštění materiálu při rozboru může způsobit problémy. Raději tedy ethanol neodpařujeme. V mnoha studiích se využívá lyofilizace, která odstraní ze vzorků vlhkost, ale zároveň je ponechá zmrazené (Khan et al. 2002). Potom jsou vzorky většinou rozdrceny v třecí misce a přefiltrovány k odstranění nejrůznějších nečistot.

Výběr extrakční procedury je velmi důležitý, protože FMG jsou směsí několika metabolitů s odlišnou polaritou - odlišnou rozpustností ve vodě (Touma & Palme 2005). Extrakce by měla být proto vykonána směsí rozpouštědel tak jednoduše, jak jen to je možné. Při běžných koncentracích je doporučována směs metanolu a vody. Nižší množství FMG však žádá sofistikovanější extrakční procedury.

Platnost hormonálních extrakčních metod vyžaduje důkaz účinnosti znovuzískání hladiny hormonu ze vzorků trusu - k tomu se používají radioaktivně značené hormony (Goymann et al. 1999; Khan et al. 2002). Po extrakci je změřena koncentrace radioaktivně značeného hormonu a jeho výtěžek je následně použit ke zhodnocení účinnosti výtěžnosti metabolitů GC. Výsledky získané pomocí radioaktivně označených steroidů však neodráží zcela přesně znovuzískání, protože tyto steroidy se normálně v trusu nevyskytují (Mostl et al. 2005).

Co se týká měření FMG u savců, doporučenou procedurou je důkladné protřepání vzorku čerstvého vlhkého trusu (asi 0,5 g) v 5 ml 80% metanolu. Toto procento metanolu zajistilo nejvyšší výtěžek přirozeně se vyskytujících metabolitů u všech dosud testovaných druhů savců (Möstl & Palme 2002; Palme et al. 2005). Tato metoda je praktická, protože není třeba žádného odpařování. Když je však hmotnost vzorku menší než 0,05 g, dochází k ovlivnění výsledků (Millsbaugh & Washburn 2004). Chyby v měření mohou obecně vzrůstat s malým množstvím vzorku a prodloužováním časové periody jeho skladování (Touma & Palme 2005).

5.7 Stanovení FMG

K analyzování FMG z extrahovaných vzorků mohou být použity různé procedury. Vysokotlaková kapalinová chromatografie (HPLC) může být využita k přesné separaci jednotlivých FMG. Metabolity mohou potom být testovány a zhodnoceny na imunoreaktivitu. (Wasser et al. 2000). HPLC je prokázaná a přesná metoda k identifikování všech metabolitů přítomných ve vzorku (Keay et al. 2006). Tato metoda však vyžaduje laboratorní prostředí vyšší úrovně, kde je vybavení řádně kalibrováno.

Další možností jsou imunologické rozborů. Jedná se o metody, které jsou mnohem levnější a dovolují měření mnoha vzorků během krátkého času, ale jsou méně specifické. Narozdíl od HPLC, imunologické rozborů využívají protilátky, které neumožňují specifickou identifikaci všech individuálních metabolitů ve vzorku. Využívána je RIA (radioimmunoassay) a hlavně EIA (enzyme immunoassay). Předností RIA je vysoká přesnost a přímočarost. Tento rozbor má ale určité nedostatky, protože je primárně určen k měření nemetabolizovaných steroidů v plazmě a spoléhá se na křížovou reaktivitu protilátky s vyloučenými metabolity. Preferovanější metodou se stal EIA, který byl vyvinut přímo pro FMG. Je přesný, specifický a dostatečně citlivý. Využívá skupinově specifické protilátky, které umožňují detekci rozličných FMG (Möstl & Palme 2002). Testy RIA a EIA mají i své nevýhody - vyžadují činidla, která musí být uskladněna v chladu, pro použití RIA musíme mít licenci na používání radionuklidů, postupy vyžadují inkubaci, odstředování, třepání aj., pro což je nutné mít příslušné vybavení.

5.7.1 Biologické/fyziologické ověření

K ověření výše naznačené metodiky je vhodné použít test s ACTH pro zhodnocení nárůstu FMG v trusu. Poté, co je zvířatům injekčně podán ACTH, dojde k uvolnění GC, což způsobí vzrůst hladiny těchto steroidů v plazmě. Po několika hodinách se hladina navrátí k normální bazální hodnotě. Tento vzrůst a pokles se objeví také u FMG v trusu potom, co jsou GC zmetabolizovány a vyloučeny. Trus je sbírán dva až tři dny před injekcí ACTH a pět až sedm dní poté, což dovoluje přesnou dokumentaci vzrůstu a poklesu hladiny GC (Goymann et al. 1999). Test s ACTH může být také použit k měření času, který GC potřebují k průchodu trávicím traktem (Keay et al. 2006). Tato technika byla použita např. u hraboše pensylvánského při studiu sezónních změn (Seabloom et al. 1978).

Můžeme také použít potlačovací test s dexamethazonem. Zvířata držená po určitou dobu v omezeném prostoru - v pasti - mají v důsledku aplikace syntetického dexamethazonu přibližně stejnou hladinu GC. Dexamethazon zprostředkuje negativní zpětnou vazbu na HHS a vrací proto GC k bazální hladině. Potom je vhodné podat ACTH, který stimuluje produkci GC, a následně můžeme zhodnotit zvýšenou hladinu GC. Odolnost vůči dexamethazonu může indikovat, že je zvíře chronicky stresované (Sapolsky 1983b). Některé druhy zvířat jsou však přirozeně rezistentní vůči dexamethazonu (Taymans et al. 1997), protože mají zvýšenou hladinu GC - např. hraboš préríjní, veverka červenavá, morčata a někteří primáti Nového světa.

6. Příprava budoucího experimentu

6.1. Co z rešerše plyne pro přípravu budoucího experimentu?

Když si plánujeme časový harmonogram odebrání fekálních vzorků daného druhu, musíme vzít v úvahu zejména zvířecí rytmy aktivity, časové zpoždění v exkreci a defekační rychlost. Mezi těmito parametry mohou také existovat složité interakce. Například u myši se množství produkovaného trusu mění v průběhu dne v souladu se zvířecími rytmy aktivity, což ovlivňuje časové zpoždění exkrece FMG (Touma et al. 2003).

Je doporučeno používat dostatek zvířat obou pohlaví a nespoléhat se na výsledky získané na několika individuích daného druhu. Každé zvíře by mělo být použito jako vlastní kontrola, čímž minimalizujeme problémy individuálních rozdílů v bazální a vrcholové koncentraci FMG.

Metoda zamrazování se jeví jako spolehlivá. Po rozmrazení je však nutné vzorky co nejdříve zpracovat. U malých savců, jako jsou hraboši, bude nezbytné navážít menší množství trusu (0,05g – 0,1g) a přidat adekvátní množství alkoholu. Mohou tak vzniknout chyby v manipulaci s malými vzorky a malými objemy kapalin. Chyby mohou být minimalizovány pečlivým laboratorním postupem.

6.2. Příprava experimentátora

V rámci přípravy na magisterskou práci jsem se podílela na odchycích hrabošů polních a účastnila se pilotního pokusu, který měl prověřit všechny součásti „stresového“ projektu - od manipulace se zvířaty až po analytické stanovení metabolitů. Den před pokusem jsem odebírala kontrolní vzorek - vždy ve stejnou dobu kvůli výkyvům GC v důsledku cirkadiálních rytmů. Druhý den začal vlastní pokus. Každé zvíře bylo umístěno do speciálního boxu, kde bylo pevné dno nahrazeno drátěným pletivem, pod kterým byl filtrační papír, na který mohl trus volně propadávat. Vzorky byly sbírány po 4, 6, 8 a 10 hodinách a co nejrychleji zamrazeny při teplotě -20°C . V prvních vzorcích byl očekáván odraz bazální hladiny GC, po 6 a 8 hodinách její nárůst a po 10 hodinách přibližný vrchol. Poté byla zvířata vrácena do svého původního boxu.

Detailně jsem se naučila také zpracovávat vzorky. Postup jsem si vyzkoušela na vzorcích od rypošů. Den před zpracováním se trus nechá vysušit v peci a poté se rozdrtí pomocí tloučku. Následně se naváží (podle druhu) 100 - 250 mg vzorku, ke kterému se přidá 5 ml 80% metanolu, poté se použije ruční vortex po dobu 30 s a směs s trusem se dá zcentrifugovat (2500g; 15min.). Nakonec se odpipetují 4ml extraktu do speciálních zkumavek. Takto jsou vzorky připraveny pro analytickou laboratoř, kde budou metabolity určeny pomocí hmotnostní spektrometrie.

6.3. Plán pokusu

V chovech katedry zoologie jsou chováni, kromě jiných druhů hlodavců, také hraboši. Doposud jejich umístění do různě velikých nádob a do různě velikých sociálních skupin probíhalo více méně intuitivně. Připravovaný pokus bude uspořádán tak, abychom našli pro hraboše nejlepší možné podmínky chovu, tedy takové, které povedou k nejnižším hladinám GC. Testovány budou:

- 1) Tři velikosti chovných nádob - T4, T3, T2
- 2) Umístění zvířat soliterní, v páru, celé rodiny, dvou cizích samců, dvou cizích samic
- 3) Přemístění do nového prostředí – nové chovné nádoby stejné a jiné velikosti
- 4) Izolace zvířat držených ve skupině a sdružení zvířat držených samostatně.

7. Literatura

- Armitage, K.B. (1991). Factors affecting corticosteroid concentrations in yellow-bellied marmots. *Comparative Biochemistry and Physiology* 98A: 47-54
- Bahr, N., Palme, R., Möhle, U., Hodges, K. & Heistermann, M. (2000). Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. *General and Comparative Endocrinology* 117: 427-438
- Bakshi, V.P. & Kalin, N.H. (2000). Corticotropin releasing hormone and animal models of anxiety: Gene-environment interactions. *Biology of Psychiatry* 48: 1175-1198
- Bartolomucci, A., Palanda, P., Sacerdote, P., Panerai, A.E., Sgoifo, A., Dantzer, R. & Parmigiani, S. (2005). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 67-81
- Boonstra, R. & McColl, C.J. (2000). Contrasting stress response of male arctic ground squirrels and red squirrels. *Journal of Experimental Zoology* 286: 390-404
- Boonstra, R. (2005). Equipped for life: The adaptive role of the stress axis in male mammals. *Journal of Mammalogy* 86 (2):236-247
- Boonstra, R., Hubbs, A.H., Lacey, E.A. & McColl, C.J. (2001). Seasonal changes in glucocorticoid and testosterone concentrations in the free-living arctic ground squirrels from the boreal forest of the Yukon. *Canadian Journal of Zoology* 79: 49-58
- Brain, P. & Benton, D. (1979). The interpretation of physiological correlates of differential housing in laboratory rats. *Life Science* 24: 99-116
- Breuner, C.W. & Orchinik, M. (2002). Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *Journal of Endocrinology* 175: 99-112
- Carter, C.S., DeVries, A.C. & Getz, L.L. (1995). Physiological substrates of mammalian monogamy: The prairie vole model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19 (2): 303-314
- Coe, C.L. & Levine, S. (1995). Diurnal and annual variation of adrenocortical activity in squirrel monkey. *American Journal of Primatology* 35: 283-292
- Creel, S. (2001). Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology & Evolution* 16 (9): 491-497
- de Kloet, E.R., Grootendorst J., Karssem A.M. & Oitzl, M.L. (2002). Gene x environment interaction and cognitive performance: animal studies on the role of corticosterone. *Neurobiology of Learning and Memory* 78:570-577
- Dettmer, E.L., Philips, K.A., Rager, D.R., Bernstein, I.S. & Fragaszy, D.M. (1996). Behavioral and cortisol responses to repeated capture and venipuncture in *Cebus apella*. *American Journal of Primatology* 38: 357-362

- DeVries, A.C., DeVries, M.B., Taymans, S.E. & Carter, C.S. (1996). The effects of stress on social preferences are sexually dimorphic in prairie voles. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93: 11980-11984
- Fletcher, Q.E & Boonstra, R. (2006). Impact of live trapping on the stress response of the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*). *Journal of Zoology* 270: 473-478
- Frynta D., Nováková M., Kotalová H., Palme R. & Sedláček F. A new apparatus for the collection of faecal samples in undisturbed spiny mice living in a complex social group. *Laboratory Animals* (submitted)
- Goymann, W.E., Möstl, E., Van't Hof, T., East, M.L. & Hofer, H. (1999). Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *General and Comparative Endocrinology* 114: 340-348
- Harper J.M., Austad S.N. (2000). Fecal glucocorticoids: a non-invasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Physiological and Biochemical Zoology* 73 (1):12-22
- Harper, J.M. & Austad, S.N. (2001). Effects of capture and season on fecal glucocorticoid levels in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*). *General and Comparative Endocrinology* 123: 337-344
- Harper, J.M. & Austad, S.N. (2004). Fecal corticosteroid levels in free-living populations of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and southern red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*). *The American Midland Naturalist* 152 (2): 400-409
- Hennessy, M.B.(1997). Hypothalamic-pituitary-adrenal response to brief social separation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21: 11-29
- Hennessy, M.B., Hornshuh, G., Kaiser, S. & Sachser, N. (2006). Cortisol response and social buffering: a study throughout the life span. *Hormones and Behavior* 49: 383-390
- Hik, D.S., McColl, C.J. & Boonstra, R. (2001). Why are arctic ground squirrels more stressed in the boreal forest than in alpine meadows? *Ecoscience* 8: 275-288
- Huber, S., Palme, R. & Arnold, W. (2003). Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Servus elaphus*). *General and Comparative Endocrinology* 130: 48-54
- Hunt, C & Hambly, C. (2006). Faecal corticosterone concentrations indicate that separately housed male mice are not more stressed than group housed males. *Physiology & Behavior* 87: 519-529
- Hurst, J.L., Fang, J. & Barnard, C.J. (1993). The role of substrate odours in maintaining social tolerance between male house mice. *Animal Behaviour* 45: 997-1006

- Jessop, D.S. (1999). Central non-glucocorticoid inhibitors of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Journal of Endocrinology* 160:169-180
- Johnson, E. O., Kamilaris, T.C., Chrousos G.P & Gold, P.W. (1992). Mechanisms of stress – a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16 (2): 115-130
- Kask, A., Nguyen, H.P., Pabst, R. & von Hörsten, S. (2001). Factors influencing behavior of group-housed male rats in the social interaction test: Focus on cohort removal. *Physiology & Behavior* 74: 277-282
- Key, J.M., Singh, J., Gaunt, M.C. & Kaur, T. (2006). Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: A literature review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37(3): 234-244
- Kenagy, G.J. & Place, N.J. (2000). Seasonal changes in plasma glucocorticosteroids of free-living female yellow chipmunks: effect of reproduction and capture and handling. *General and Comparative Endocrinology* 117: 189-199
- Khan, M.Z., Altmann, J., Isani S.S. & Yu, J. (2002). A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *General and Comparative Endocrinology* 128: 57-64
- Kim, J.W. & Kirkpatrick, B. (1996). Social isolation in animal models of relevance to neuropsychiatric disorders. *Biology of Psychiatry* 40: 918-922
- Lightman, S.L., Windle, R.J., Wood, S.A., Kershaw, Y.M., Shanks, N. & Ingram, C.D. (2001). Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Progress in Brain Research* 133: 111-129
- Macri, S., Adriani, F., Chiarotti, F. & Laviola, G. (2002). Risk taking behavior during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Animal Behaviour* 64: 541- 546
- Matthews, S.G. (2002). Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13:373-380
- Miller, R.A, Dysco, R., Chrisp, C., Seguin, R., Linsalata, L., Buehner, Harper J.M. & Austad, S.N. (1999). Mouse stocks (*Mus musculus*) derived from tropical islands: new models for genetic analysis of life history traits. *Journal of Zoology (London)* 250: 95-104
- Miller, R.A., Harper, J.M., Dysco, R.C., Durkee, S.J. & Austad, S.N. (2002). Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Experimental Biology and Medicine* 227: 500-508
- Millspaugh, J.J. & Washburn, B.E. (2004). Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology* 138: 189-199

- Möstl et al. (1999). Measurement of glucocorticoid metabolite concentration in faeces of domestic livestock. *Journal of Veterinary Medicine, Series A* 46: 621-632
- Möstl, E. & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23:67-74
- Möstl, E., Rettenbacher, S. & Palme, R. (2005). Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals New York Academy of Science* 1046: 17-34
- Novak, C.M., Parfitt, D.B., Sisk, Ch.L. & Smale, L. (2007). Associations between behavior, hormones, and Fos response to novelty differ in pre- and post-pubertal grass rats. *Physiology & Behavior* 90: 125-132
- Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids: guidelines for the practical application. *Annals New York Academy of Science* 1046:75-80
- Palme, R., Fischer P. et al. (1996) Excretion of infused ^{14}C – steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science* 43: 43-63
- Palme, R., Rettenbacher S., Touma, C., El-Bahr & Möstl, E. (2005). Stress hormones in mammals and birds. Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and non-invasive measurement in fecal samples. *Annals New York Academy of Science* 1040:162-171
- Palme, R., Robia, C., Messmann, S. et al. (1999). Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a noninvasive parameter of adrenocortical function. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 86: 237-241
- Peacock, W.L., Krol, E., Moar, K.M., McLaren, J.S., Mercer, J.G. & Speakman, J.R. (2004). Photoperiodic effects on body mass, energy balance and hypothalamic gene expression in the bank vole. *Journal of Experimental Biology* 207: 165-177
- Razzoli, M. & Valsecchi (2006). Different social bonds produce differential effects on behaviour and physiology in Mongolian gerbils. *Ethology, Ecology & Evolution* 18: 289-306
- Reeder, D.M., Kosteczko, N.S., Kunz, T.H. & Widmaier (2004a). Changes in baseline and stress-induced glucocorticoid levels during the active period in free-ranging male and female little brown myotis (*Myotis lucifugus*). *General and Comparative Endocrinology* 136:260-269
- Reeder, D.M. & Kramer, K.M. (2005). Stress in free-ranging mammals: Integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalogy* 86 (2): 225-235
- Reeder, D.M., Kunz, T.H. & Widmaier, E.P. (2004b). Baseline and stress-induced glucocorticoids during reproduction in the variable flying fox, *Pteropus hypomelanus* (Chiroptera: Pteropodidae). *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology* 301: 682-690

- Rich, E.L. & Romero, L.M. (2005). Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology* 288: 1628-1636
- Romero, L.M. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 128:1-24
- Rosner, W. (1990). The function of corticosteroid-binding globulin and sex-hormone binding globulin: recent advances. *Endocrine Reviews* 11:80-91
- Sapolsky R.M. (2002). Neuroendocrinology of the stress-response. *Behavioral Endocrinology* 409-450
- Sapolsky, R.M. (1983a). Endocrine aspects of social instability in the olive baboon (*Papio anubis*). *American Journal of Primatology* 5: 365-379
- Sapolsky, R.M. (1983b). Individual differences in cortisol secretory patterns in the wild baboon: role of negative feedback sensitivity. *Endocrinology* 113:2263-2267
- Sapolsky, R.M. (1992). Cortisol concentration and the social significance of rank instability among wild baboons. *Psychoneuroendocrinology* 17 (6): 701-709
- Sapolsky, R.M., Romeo L.M. & Munck A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Review* 21:55-89
- Seabloom, R.W., Iverson, S.L. & Turner, B.N. (1978). Adrenal response in a wild *Microtus* population: seasonal aspects. *Canadian Journal of Zoology* 56:1433-1440
- Seyle, H. (1956). *The stress of life*. McGraw-Hill, New York
- Shapiro, L.E. & Insel, T.R. (1990). Infant's response to social separation reflects adult differences in affiliative behavior: A comparative developmental study in prairie and montane voles. *Developmental Psychobiology* 23: 375-393
- Schatz, S. & Palme, R. (2001). Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a noninvasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications* 25: 71-287
- Sousa, M.B. & Ziegler, T.E. (1998). Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. *American Journal of Primatology* 46: 105-117
- Taymans, S.E. et al. (1997). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis of prairie voles (*Microtus ochrogaster*): evidence for target tissue glucocorticoid resistance. *General and Comparative Endocrinology* 106:48-61

- Touma, C. & Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of a biological validation. *Annals New York Academy of Science* 1046: 54-74
- Touma, C., Sachser, N., Möstl, E. & Palme, R. (2003). Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General Comparative Endocrinology* 130: 267-278
- von Holst, D. (1998). The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Advances in the Study of Behavior* 27: 1-131
- Washburn, B.E., Millspaugh, J.J., Schulz, J.H., Jones, S.B. & Mong, T.W. (2003). Using fecal glucocorticoids for stress assessment in mourning doves. *Condor* 105: 696-706
- Wasser, S.K., Hunt, K.E., Brown, J.L., Cooper, K., Crockett, C.M., Bechert, U., Millspaugh, J.J., Larson, S. & Monfort S.L. (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 120: 260-275
- Wasser, S.K., Risler, L. & Steiner, R.A. (1988). Excreted steroids in primate feces over the menstrual-cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction* 39: 862-872
- Wasser, S.K., Thomas, R., Lair, P.P., Guidry, C., Southers, J., Lucas, J., Wildt, D.E. & Monfort, S.L. (1993). Effects of dietary fibre on faecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 97: 569-574
- Wingfield, J.C., Smith, J.P. & Farner, D.S. (1982). Endocrine responses of white-crowned sparrows to environmental stress. *Condor* 84: 399-409
- Ylönen, H., Eccard, J.A., Jokinen, I. & Sundell, J. (2006). Is the antipredatory response in behaviour reflected in stress measured in faecal corticosteroids in a small rodent? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60:350-358