Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Studijní program: N4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplin

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph. D.

diplomová práce

Vliv dlouhodobého handlingu na příznaky stresu u hraboše polního

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. František Sedláček, CSc.

autor diplomové práce: Bc. Lenka Janochová

České Budějovice, 2017

Fakulta zemědělská
Akademický rok: **2016/2017**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Lenka JANOCHOVÁ**
Osobní číslo:	**Z14315**
Studijní program:	**N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor:	**Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu:	**Vliv dlouhodobého handlingu na příznaky stresu u hraboše polního**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických disciplin**

Zásady pro vypracování:

1) Bude vypracován literární přehled o příznacích stresu a metodách jejich sledování a dále o způsobech snižování stresu u zvířat v lidské péči.
2) V laboratorních podmínkách budou sledovány dvě skupiny hrabošů:
a) zvířata denně ovlivňovaná "handlingem", u nichž budou měřeny dechová frekvence a hladina kortikosteronu na konci pokusu
b) zvířata kontrolní-intaktní, u nichž budou na konci pokusu také měřeny pro srovnání uvedené parametry.
3) Výsledky budou zhodnoceny, kromě jiného, také ve vztahu k osobnostním rysům sledovaných hrabošů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **40**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Ishii K., Kuwahara M., Tsubone H., Sugano S. 1996: The telemetric monitoring of heart rate, locomotor activity, and body temperature in mice and voles (*Microtus arvalis*) during ambient temperature ganges. Laboratory Animals 30: 7-12.

Schilling A.-K., Reese S., Palme R., Erhard M., Wöhr A.-C. 2015: Stress Assessment in Small Ruminants Kept on City Farms in Southern Germany, Journal of Applied Animal Welfare Science

Woodruff J.A., Lacey E.A., Bentley G.E., Kriegsfeld L.J. 2013: Effects of social environment on baseline glucocorticoid levels in a communally breeding rodent, the colonial tuco-tuco (*Ctenomys sociabilis*). Hormones and Behavior, 64 (2013) 566-572.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. František Sedláček, CSc.**
Katedra zoologie

Datum zadání diplomové práce: **31. března 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2017**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

L.S.

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 31. března 2017

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podoběelektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 19.4. 2017 ……

Bc. Lenka Janochová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Františkovi Sedláčkovi za jeho metodickou pomoc a vedení diplomové práce, jeho cenné rady a připomínky. Gabriele Urbánkové za cenné rady a připomínky. Dále Nelle Mladěnkové za rady při statistickém zpracování. Tereze Dikošové za poskytnutí dat a zodpovězení dotazů ohledně její diplomové práce. Petře Kolářové za rady k anglickému abstraktu. Radce Peškové za pomoc při testování hrabošů. A nakonec rodině, že měla se mnou trpělivost a věřila mi.

Abstrakt

Úkolem této práce bylo zjistit, zda handling může ovlivnit sledované fyziologické parametry, dechovou frekvenci a hladinu kortikosteronu u hraboše polního (*Microtus arvalis*). Dále, zda sledované fyziologické parametry mohou souviset s behaviorálním typem zvířete, jelikož je hraboš polní stále častěji využíván jako modelový druh pro studie zabývajících se osobností zvířat

Dechová frekvence byla zaznamenána pomocí přístroje skládajícího se z komůrky, tlakového čidla, převodníku a osciloskopu. Hladina kortikosteronu byla analyzována ELISA testem. Osobnostní charakteristiky sledovaných zvířat byly získány z výsledků Open field testu (OFT) a vyvýšeného labyrintu (EPM).

Handling neměl signifikantní vliv na klidovou dechovou frekvence a basální a stresové hladiny kortikosteronu. Handlovaní jedinci oproti kontrolním měli téměř signifikantně nižší stresovou dechovou frekvenci.

Nebyl nalezen signifikantní vztah mezi dechovou frekvencí a behaviorálním typem zvířete. Jedinci s nižší stresovou hladinou kortikosteronu ušli signifikantně delší vzdálenost v EPM.

klíčová slova: stres, dechová frekvence, kortikosteron, coping style, handling

Abstract

The objective of this study was to examine the handling influence on breath rate and plasma corticosterone in adult common voles. Furthermore, the examination of relationship between physiological and personality traits was performed.

A device consisting of chamber, pressure sensor and oscilloscope measured the breath rate. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for corticosterone analysis. Behavioural characteristics were assessed in Open field test (OFT) and Elevated Plus Maze (EPM).

The results did not prove the significant impact on resting breath rate and plasma corticosterone level. However, the handled individuals had nearly significantly lower stress breath rate compared to the non-handled individuals.

Significant relationship between breath rate and behavioural traits was not detected. Nevertheless, the individuals with lower stress-induced plasma corticosterone performed significantly longer exploration in Elevated Plus Maze.

keywords: stress, breath rate, corticosterone, coping style, handling

Obsah

1. Úvod 10
2. Literární přehled 11
2.1 Osobnost zvířat 11
2.1.1 Struktura osobnosti. 12
2.1.2 Proactive-reactive 12
2.1.3 Fast slow kontinuum 13
2.1.4 Shy-bold kontinuum 13
2.1.5 Coping style 14
2.2 Metody hodnocení osobnosti 15
2.2.1 Open field test 15
2.2.2 Vyvýšený labyrint EPM (Elevated Plus Maze test) 15
2.3 Stres a příznaky stresu 16
2.4 Dechová frekvence 17
2.4.1 Metody měření dechové frekvence 18
2.5 Tepová frekvence 19
2.5.1 Metody měření tepové frekvence 20
2.6 Glukokortikoidy 20
2.6.1 Metody měření 22
2.7 Metody snižování stresu 25
2.7.1 Handling 26
2.8 Hraboš polní 27
3. Cíle práce a testované hypotézy 30
4. Materiál a metodika 31
4.1 Testovaný druh, podmínky chovu 31
4.2 Experimentální design 31
4.3 Startle test 32
4.4 Handling 32
4.5 OFT 33
4.6 Vyvýšený labyrint EPM 33
4.7 Měření dechové frekvence 33
4.8 Měření hladiny kortikosteronu v krevní plazmě 34
4.8.1 Odběr vzorku, uchování 36
4.8.2 Příprava pufrů (buffer) 37
4.8.3 Extrakce plazmy 37

4.8.4 Příprava specifického reagentu 38
4.8.5 Plate set up, inkubace 38
4.8.6 Fotometrická analýza vzorků, zjištění koncentrace kortikosteronu 39
4.9 Získaná data a statistické zpracování 39
4.9.1 Reakce hrabošů na stresové podněty 40
4.9.2 Vztah mezi dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu 40
4.9.3 Vliv handlingu na vybrané fyziologické parametry 41
4.9.4 Vztah mezi fyziologickými parametry a osobnostními rysy zvířete 41
5. Výsledky 42
5.1 Reakce hrabošů na stresové podněty 42
5.2 Vztah mezi dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu 44
5.3 Vliv handlingu na vybrané fyziologické parametry 46
5.4 Vztah mezi fyziologickými parametry a osobnostními rysy zvířete 47
6. Diskuze 50
6.1 Reakce hrabošů na stresové podněty 50
6.2 Vztah mezi dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu 51
6.3 Vliv handlingu na vybrané fyziologické parametry 52
6.3.1 Vliv handlingu na basální hladiny fyziologických parametrů 52
6.3.2 Vliv handlingu na stresové hodnoty fyziologických parametrů 52
6.4 Vztah mezi fyziologickými parametry a osobnostními rysy zvířete 53
6.4.1 Vztah mezi stresovou dechovou frekvencí a osobnostními rysy zvířete 53
6.4.2 Vztah mezi stresovou hladinou kortikosteronu a osobnostními rysy zvířete 53
7. Závěr 55
8. Seznam použité literatury 56
9. Seznam použitých zkratek 69
10. Příloha 70

1. Úvod

Zvíře reaguje na stresové podněty řadou fyziologických změn, např. vyplavením adrenalinu, zvýšením tepové frekvence, dechové frekvence, vyplavením glukokortikoidů (Reeder & Kramer, 2005; Rietmann et al., 2004; Renwrantz & Spielvogel, 2011; Sapolsky et al., 2000). V reakci na stresor může být pozorována vnitrodruhová variabilita ve fyziologických parametrech, která často souvisí i s příslušností zvířete k osobnostnímu typu (např. Koolhaas et al., 1999). Laboratorní prostředí, stejně jako testování zvířat, často představuje pro jedince stres, který může ovlivnit a zkreslit získané výsledky (Poole, 1997). Jednou ze zkoumaných možností snížení stresové reakce u zvířat je vliv dlouhodobého handlingu (např. Meerlo et al., 1999; Vallée et al., 1996).

Studovaným druhem zde byl hraboš polní (*Microtus arvalis*), hojný hlodavec našeho území (Kratochvíl et al., 1959), na kterém byla již prokázána vnitrodruhová variabilita chování – tzv. zvířecí personalita (např. Lantová et al., 2011)

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv handlingu na vybrané fyziologické parametry, dechovou frekvenci a hladinu kortikosteronu. Dále zjistit, zda existuje vztah mezi těmito fyziologickými parametry a behaviorálním typem zvířete.

2. Literární přehled

2.1 Osobnost zvířat

Na rozdíl od lidské psychologie byla vnitrodruhová variabilita zvířat po dlouhou dobu opomíjena. Rozdílné chování jedinců bylo pak vysvětlováno jako důsledek nepřesnosti měření nebo neadaptivní variace kolem adaptivního průměru (Carere & Locurto, 20111; Gosling & John, 1999).

Jedny z prvních studií personality zvířat jsou studie zabývající se chováním makaků rhesus (Stevenson-Hinde & Zunz, 1978; Stevenson-Hinde et al., 1980). Další práce provedené v 90. letech dokázaly konzistentní povahu vnitrodruhových rozdílů v chování zvířat (např. Wilson et al., 1994; Benus et al., 1991). Selekčními studiemi byla též prokázána dědičnost u určitých osobnostních charakteristik, např. explorační chování (Drent et al., 2003; van Oers et al., 2004). Zájem o studium zvířecí personality během posledních desetiletí značně narůstá. Variabilita v chování byla již prokázána u řady druhů, na ptácích (př. sýkora), hlodavcích (potkan, myš, sysel, hraboš), rybách (koljuška), ale i bezobratlých (př. chobotnice) (přehled např. v Koolhaas et al., 1999; Gosling, 2001).

Je zde však nesourodost v používaných termínech osobnosti a samotné vymezení osobnosti je složité. V současnosti osobnost můžeme pojmout v širším slova smyslu, kdy je definována jako konzistentní inter-individuální rozdíly ve vybraném druhu chování, které jsou konzistentní v čase a napříč situacemi (Gosling, 2001; Réale et al., 2007; Sih et al., 2004). Nebo v užším slova smyslu, jenž je definována soubory vzájemně korelovaných chování (osobnostní rysy), které společně vytváří mnohorozměrnou charakteristiku psychických vlastností každého jedince (Réale et al., 2007).

Častým termínem vnitrodruhové variability je samotná personalita, dále coping style (Koolhaas et al., 1999), behaviorální syndrom (Sih et al., 2004), behaviorální profil (Groothuis & Carere 2005), temperament (Réale et al., 2000). Tyto termíny jsou si velmi podobné, liší se jen velmi málo, často záleží pouze na tom, kterému termínu dává samotný autor přednost.

2.1.1 Struktura osobnosti.

Osobnost je mnohorozměrná charakteristika jedince, složená z několika dimenzí (Gosling, 2001). V lidské psychologii se hojně využívá pětifaktorový model, tzv. Velká pětka (Big Five model, John, 1990). Pracuje se zde s pěti dimenzemi, kterými jsou Extraverze, Přívětivost, Svědomitost, Emociální stabilita a Otevřenost vůči nové zkušenosti.

Avšak těchto pět dimenzí nelze univerzálně využít u všech živočišných druhů, např. Svědomitost byla zatím nalezena pouze u šimpanzů, kteří jsou člověku nejblíže příbuzní (Gosling, 2001). Nicméně tři z těchto dimenzí byly nalezeny u většiny testovaných druhů, jedná se o dimenze Extraverze, Přívětivost, Emocionalita. Extraverze zahrnuje sociabilitu a aktivitu jedince, Přívětivost hodnotí sklony k agresivitě a dominanci a Emocionalita odráží schopnost vyrovnávat se s podněty prostředí (Gosling & John, 1999).

Za další využívané dimenze v některých studiích jsou Dominance a Aktivita (Gosling & John, 1999). Všechny univerzální dimenze se odráží ve zvířecích super-rysech (super-faktorech) navržených v rámci rysového studia osobnosti. Kdy rys je definován behaviorální vlastností jedince, která je stálá napříč různými situacemi (Pervin & John, 1999).

2.1.2 Proactive-reactive

Poloha jedince na ose proactive-reactive je dána jeho mírou agrese (Koolhaas et al., 1999). Proaktivní jedinci, kteří byli dříve označováni jako „fight-flight“ (útok-útěk, Cannon 1915 in Koolhaas et al., 1999) jsou více agresivní, více brání své teritorium, mají vysokou míru explorace, ale nevšímají si tolik detailů (Koolhaas et al., 1999). Oproti tomu jedinci reaktivní, dříve označovaní jako „conservation-withdrawal“ (ocharna-ústup, Engel and Schmale,1972 in Koolhaas et al., 1999), vykazují nízkou míru agrese až bázlivost, pomaleji explorují, ale více si všímají detailů (Koolhaas et al., 1999).

Ve stabilním prostředí jsou více ve výhodě proaktivní jedinci, pokud ale dojde ke změně, dostávají se do výhody jedinci reaktivní, kteří se lépe vyrovnávají se změnou (Van Oortmerssen et al., 1985).

2.1.3 Fast slow kontinuum

Model fast-slow je podobný s osou proactive-reactive, využívá se při studiích zabývajících se personalitou ptáků. Vychází ze selekčních studií prováděných na sýkorách koňadrách (Parus major, např. Dingemanse et al., 2003).

Z reakce na nový podnět jsou vyselektovány linie fast a slow. Jedinci typu fast aktivněji explorují nové prostředí, jsou agresivnější, zároveň mají větší sklony k rutinnímu chování oproti jedincům typu slow. (Verbeek et al., 1994; Verbeek et al., 1996; Drent et al., 2003; Sih et al., 2004). Jedinec typu fast je tedy podobný proaktivnímu jedinci, zatímco jedinec typu slow je podobný reaktivnímu jedinci.

2.1.4 Shy-bold kontinuum

Koncept shy-bold kontinua je používán v lidské psychologii, z které byl převzat. Definuje míru odvážnosti (boldness) a nesmělosti (shyness) jedince. Jedinci na krajních bodech shy-bold kontinua se diametrálně liší. Zatímco jedinec typu shy v reakci na nový podnět jsou zdrženlivější, snaží se uniknout, ustoupit a jejich stresová reakce je často intenzivnější, jedinci typu bold budou daleko odvážnější, budou se snažit nový objekt prozkoumat, i za cenu vystavení se riziku, např. napadnutí predátorem (Wilson et al., 1994; Coleman & Wilson, 1998).

Již v raném věku jedince lze zaznamenat jeho poloha v shy-bold kontinuu (Coleman & Wilson, 1998), která je stabilní v čase, tedy je-li jedinec v mládí charakterizován jako shy, bude se chovat jako shy i v dospělosti (Kagan et al., 1987). Do určité míry je poloha v kontinuu dědičná (Wilson et. al 1994; Réale et. al., 2000) a může ovlivnit i rychlost dosažení dospělosti a reprodukční úspěšnost (Réale et. al 2000).

Studie na volně žijících živočiších mohou narazit na problém spojený s polohou jedince na ose shy-bold kontinua. Pokud je při studiích použito pastí vyžadujících aktivního přístupu jedince, budou se spíše chytat jedinci odvážní než bojácní (Wilson et al., 1993; Coleman & Wilson, 19988; Biro & Dingemanse, 2009). V této souvislosti může docházet k nevědomé a nechtěné selekci a následkem toho ke zkreslení výsledků studií.

Koncept shy-bold kontinua byl prokázán u řady živočišných druhů, primátů (Fairbanks, 1993; Réale et al., 2000; Suomi et al., 1991), kočkovitých šelem (Feaver

et al., 1986; Svartberg & Forkman, 2002), psovitých šelem (MacDonald, 1983), hlodavců (Blanchard et al., 1986), ptáků (Jones, 1991), ryb (Wilson et al., 1994; Coleman & Wilson, 1998).

2.1.5 Coping style

Za coping style se označuje sada koherentních behaviorálních prvků a fyziologických prvků, které jsou projevem v odpovědi na stres a jsou konzistentní v čase a v různých situacích (Koolhaas et al., 1999; de Ruiter et al., 1992; Sgoifo et al., 1996; Koolhaas et al., 2010).

Často je ve studiích zaměřených na coping style dokládána těsná vazba mezi osobnostním typem a fyziologickými vlastnostmi daného zvířete. Přitom je sledována reaktivita osy hypotalamus-hypofýza-nadleviny (HPA osa) a aktivita sympatiku a parasympatiku. Dle Koolhaase et al. (1999) proaktivní jedinci hlodavců vykazují při stresu nízkou hladinou glukokortikoidů v plazmě v důsledku nižší reaktivity HPA osy. Jejich hladina katecholaminů je naproti tomu vysoká (vykazují vyšší sympatickou reaktivitu). Naopak je tomu u reaktivních jedinců.

Při selekčních studiích na myších domácích, kdy byla provedena selekce na základě latence útoku na linie „short attack latency“ (SAL, rychle útočící) a „long attack latency (LAL, pomalu útočící), bylo zjištěno, že jedinci SAL se projevovali vyšší agresivitou, rychleji prozkoumávali nové prostředí, byli více náchylní ke stereotypnímu chování než jedinci LAL (Benus et al., 1990). Tyto dvě linie se lišily navíc i v hladinách testosteronu, kdy jedinci SAL měli vyšší hladinu testosteronu oproti jedincům LAL (de Rutier et al., 1992). Studie Veenema et al. (2003) dokládá vztah agrese a hladiny kortikosteronu, kdy jedinci SAL měli vyšší hladinu basálního kortikosteronu oproti jedincům LAL, zatímco stresem-indukované vyšší hladiny kortikosteronu byly nalezeny u jedinců LAL oproti jedincům SAL.

Sgoifo et al. (1996) ve studii na potkanech zjistili, že jedinci SAL byli více úzkostní a zároveň měli vyšší koncentraci katecholaminů v plasmě. Ferrari et al. (2013) ve studii provedené na divoké populaci svišťů prokázali pozitivní vztah mezi zájmem o nové podněty a dechovou a srdeční frekvencí.

2.2 Metody hodnocení osobnosti

U zvířat se využívá ke zhodnocení personality dvou principů, buď metoda hodnocení vlastností, a nebo záznam prvků chování (Altmann, 1974). Při první metodě pozorovatel, který zvíře dobře zná, hodnotí vlastnosti sledovaného jedince předem stanoveným souborem termínů (Itoh, 1997).

Při druhé metodě je zvíře podrobeno behaviorálnímu testu. Je tak vystaveno specifickým podmínkám, často navozujících stresovou situaci, k lepšímu zachycení behaviorální variability. Tyto podmínky jsou konstatntí a pro sledované jedince stejné, tato metoda tudíž umožňuje porovnání fokálních jedinců. Chování zvířete je natočeno a následně vyhodnoceno předem definovanými prvky chování s využitím počítačového programu (např. Observer nebo Ethowatcher) (Gosling, 2001).

2.2.1 Open field test

„Open Field“ test (dále jen OFT) je behaviorální experiment sloužící k ohodnocení individuální míry explorace, spontánní lokomoční aktivity a anxiety zvířat (Hall, 1934). Princip spočívá v umístění sledovaného jedince do prázdné, nasvícené arény, která je výrazně větší než domovský box jednice. Tento typ prostředí vyvolává ve zvířeti stres. U úzkostných jedinců je exploračním chování v takovém prostředí potlačeno strachem z otevřeného a nasvíceného prostoru (Archer, 1973).

V testu je tak hodnoceno celkové trvání a frekvence výskytu vybraných prvků chování (např. lokomoce, panáčkování, čištění), či je měřena délka trajektorie pohybu zvířete. Reakce zvířat mohou být značně individuální, přičemž za spolehlivý ukazatel míry vyvolaného strachu lze považovat sníženou lokomoční aktivitu (tj. krátkou trajektorii pohybu), zdržování se u stěn aparatury (tzv. thigmotaxe) či zvýšenou defekaci (viz např. Hall, 1934; Archer, 1973).

2.2.2 Vyvýšený labyrint EPM (Elevated Plus Maze test)

Je zaměřen na hodnocení míry úzkosti a reakci na stres. Aparaturou je labyrint tvaru plus (+), u něhož jsou dvě protilehlá ramena po stranách opatřena stěnami (zavřená), zatímco druhá dvě jsou bez stěn (otevřená). Do středu aparatury, místa, kde se ramena střetávají, je na počátku testu zvíře vypuštěno (Walf & Frey, 2007; de Paula et al., 2005).

Míra úzkosti se dá poté hodnotit podle času stráveného v otevřených ramenech a počtu vstupů do otevřených ramen. Zvíře, které vykazuje vyšší počet vstupů do otevřených ramen a delší čas strávený v otevřených ramenech, je bráno jako odvážné a má nižší úzkostnost (Walf & Frey, 2007).

2.3 Stres a příznaky stresu

Stres lze definovat jako stav, při kterém dochází k narušení homeostázy. K tomu dochází vlivem tzv. stresorů, které mohou být faktory vnitřními nebo vnějšími, fyzického, či psychického charakteru, nebo jejich kombinací (Barreto & Volpato, 2004; Reeder & Kramer, 2005). Mezi stresory fyzické vnitřní patří např. hypoglykémie, anoxie, mezi vnější pak např. chlad, teplo, zranění. Za psychické stresory můžeme považovat podněty ovlivňující emoce, kdy vyvolávají strach, hněv, úzkost (anxietu). Na stresory ohrožující homeostázu organismus reaguje stresovou odpovědí, souborem fyziologických a behaviorálních změn, při které se snaží o neutralizaci působení stresoru a obnovení homeostáze (Reeder & Kramer, 2005).

V těchto situacích je nutné zmobilizovat co nejvíce energie. To se děje dvěma hlavními fyziologickými odpověďmi na stres, těmi jsou u savců stimulace sympatického nervového systému a osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (tzv. hypothlalamic-pituitary-adrenal axis, HPA osa) (Renwrantz & Spielvogel, 2011; Rietmann et al., 2004; Reeder & Kramer, 2005; Barreto & Volpato, 2004; Sapolsky et al., 2000). V prvním případě jde o téměř okamžitou reakci. Paraventrikulární jádra hypotalamu produkují impulzy, na jejichž základě dojde k aktivaci sympatického nervového systému, a nakonec k sekreci katecholaminů noradrenalinu a adrenalinu. Zvýšení jejich hladin působí na zvýšení tepové frekvence, dechové frekvence a krevního tlaku a podporují glykogenolýzu a lipolýzu k získání energie (Reeder & Kramer, 2005; Rietmann et al., 2004; Renwrantz & Spielvogel, 2011; Sapolsky et al., 2000).

Druhá dráha je pomalejší. Paraventrikulární jádra hypotalamu, která jsou stimulována informacemi z prodloužené míchy, amygdaly, produkují kortikotropin-releasing hormon a další jako arginin a vasopresin. Kortikotropin-releasing hormon putuje do hypofýzy, kde dochází k uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH) do krve. ACTH působí na kůru nadledvin, která poté uvolňuje

glukokortikoidy kortizol a kortikosteron. Ty hrají důležitou roli, k získání více energie zvyšují glukoneogenezi, snižují využití glukózy v periferii, snižují citlivost na inzulín (Redeer & Kramer, 2005; Matteri et al., 2000; Sapolsky et al., 2000). Také interreagují s imunitním systémem a osou hypothalamus-hypofýza-gonády (Reeder & Kramer, 2005; Sapolsky et al., 2000).

Krátkodobý stres jako fyziologický stav není pro organismus škodlivý, pomáhá organismu vyrovnávat se s nastalými situacemi. Stresová zkušenost tak může představovat adaptivní fyziologickou reakci jedince na hrozby (Moberg, 2000; Sapolsky et al., 2000; Lupien et al., 2009), pokud však přetrvává tento stav dlouhodobě, ovlivňuje negativně fyziologické funkce (Sapolsky et al., 2000), např. katabolické funkce, kardiovaskulární, imunitní a reprodukční systém až samotný růst (Axelrod & Reissine, 1984; Moberg, 2000; Möstl & Palme, 2002).

Na základě principu stresové reakce jsou ve studiích zaměřených na stanovení míry stresu brány jako ukazatelé srdeční tepová frekvence (Renwrantz & Spielvogel, 2011; Bauer et al., 2011; Ishii et al., 1996), dechová frekvence (na rybách, Bell et al., 2010; Barreto & Volpato, 2004; Barreto et al., 2003; Altimiras & Larsen, 2000; ptácích Carere & van Oers, 2004; van Oers & Carere, 2007; David et al., 2012; savcích, Jürgens et al., 1996) a hladiny stresových hormonů (katecholaminy Ayala et al., 2012; Costa et al., 2012; Sgoifo et al., 1996 a glukokortikoidy, Vera et al., 2011; Vallée et al., 1996; Place & Kenagy, 2000; Bauer et al., 2014; Fletcher & Boonstra, 2006; Armario et al., 1986; Gracceva et al., 2014; Panagiotaropoulos et al., 2004; Reeder et al., 2004; Costa et al., 2012; Sgoifo et al., 1996).

2.4 Dechová frekvence

Dechová frekvence, nejčastěji vyjádřená počtem dechů za minutu (viz např. Koudela, 2003; Sova, 1990). je u malých zvířat výrazně vyšší než u velkých. Vliv na rychlost dechové frekvence je dán z velké části intenzitou metabolismu, která je u malých zvířat úměrně vyšší (Crosfill & Widdicombe, 1961). Zatímco dechová frekvence např. psa se pohybuje kolem 10 – 40 dechů.min^{-1}, kočky kolem 20 – 50 dechů.min^{-1}, u potkana, se pohybuje už kolem 60 -110 dechů.min^{-1}, u myši 80 – 200 dechů.min^{-1} (Kleinman & Radford 1964) a u bělozubky nejmenší (*Suncus etruscus*) až kolem 661 dechů.min^{-1} (Jürgens et al., 1996).

Jak je uvedeno výše, v reakci na stres dochází ke zvýšení dechové frekvence, např. Jürgens et al. (1996) zjistili, že v reakci na stresový podnět se dechová frekvence bělozubky nejmenší (*Suncus etruscus*) zvýšila 1,15krát.

Několik studií dokládá navíc přítomnost výrazné vnitrodruhové variability. Na úrovni populací je to práce Bella et al. (2010) prováděná na koljuškách tříostných (*Gasterosteus aculeatus*), kdy ryby z populace s vysokým predačním tlakem měly vyšší změnu dechové frekvence vyvolané stresorem a zároveň vykazovaly vyšší agresi.

Studie Carera a van Oerse (2004) a Fučíkové et al. (2012) na sýkoře koňadře (*Parus major*) dokládají spojitost osobnostního typu zvířete s dechovou frekvencí. Zatímco adultní jedinci typu SLOW vykazovali vyšší dechovou frekvencí oproti FAST (Carere & van Oers, 2004), 14denní mláďata typu FAST prokazovali opačně vyšší dechovou frekvencí oproti SLOW (Fucikova et al., 2012). Dále vztah dechové frekvence a osobnostního typu byl nalezen i na rybách, kdy proaktivní jedinci vykazovali nižší stresovou dechovou frekvenci (Barreto & Volpato, 2011). A jak již bylo zmíněno dříve, též studie na divoké populaci svišťů alpských dokládá pozitivní korelaci mezi frekvencí dechovou, tepovou a explorací (Ferrari et al., 2013).

V bakalářské práci na hraboši polním byl doložen vztah dechové frekvence a osobnostního rysu zvířete. Kdy stresová dechová frekvence a změna dechové frekvence souvisely negativně s průměrnou délkou trajektorie hraboše v Open Field testu. Tedy jedinci projevující se jako „shy“ měli vyšší stresovou dechovou frekvenci a změnu dechové frekvence než jedinci „bold“ (Janochová, 2014).

2.4.1 Metody měření dechové frekvence

U různých skupin obratlovců jsou využívány rozdílné metody měření dechové frekvence. Ve studiích na rybách se můžeme setkat s visuální neinvazivní metodou, při které se měří časový interval, během kterého dojde k 20 pohybům skřele (Barreto et al., 2003; Barreto & Volpato, 2004), nebo počet pohybů skřele za danou jednotku času (Bell et al., 2010). U ptactva se k měření dechové frekvence využívá pohybů prsou, které jsou měřeny za určitou časovou jednotku (David et al., 2012; van Oers & Carere, 2007; Fucikova et al., 2009; Carere & van Oers, 2004).

U savců lze využít visuálního měření, kdy se počítají jednotlivé nádechy za jednotku času. Toho bylo využito ve studii provedené na divoké populaci svišťů (Ferrari et al., 2013). U drobných savců se pak může využít laserového systému s automatickým zaostřováním, který může měřit pohyby hrudníku s přesností na mikrometry, aniž by se zvířete dotýkal. Úspěšně byla využita i elektrokardiografie (EKG), kdy elektrody snímají elektrické změny vlivem pracovní aktivity dýchacích svalů v podobě elektrokardiogramu, i když původně byl tento způsob použit k měření tepové frekvence (zaznamenávání aktivity svalu srdce) (Jürgens et al., 1996). Lze též využít piezoelektrického převodníku v kombinaci s EKG a získat současně záznam o dechové a tepové frekvenci (Zehendner et al., 2013).

K měření dechové frekvence lze též využít invazivní metody telemetrických sond (Kramer et al., 2001; Lundt et al., 2015). Studie Barra (1954) byla jedna z prvních využívající u lidí telemetrickou sondu k záznamu srdeční akce a dechové frekvence.

V bakalářské práci na hraboši polním byl využit tlakový senzor propojený s komůrkou a osciloskopem. Vlivem dýchání jedince docházelo ke změnám tlaku v komůrce, na osciloskopu se výsledně tyto změny promítly ve formě jednotlivých peaků (Janochová, 2014). Detailnější popis metody je popsán v podkapitole „4.7 Měření dechové frekvence“.

2.5 Tepová frekvence

Tepová frekvence je druhově specifická. Např. u myši se klidová hodnota tepové frekvence pohybuje v průměru kolem 646 tepů.min^{-1}, u hraboše polního v průměru kolem 432 tepů.min^{-1} (Jürgens et al., 1996). Změny v tepové frekvenci u každého druhu závisí na mnoha faktorech (Bastian 1984), např. na pohybové aktivitě, sezónním vlivu, cirkadiánním rytmu, či sociálních interakcích (Wascher et al., 2008).

Jak již bylo poznamenáno v kapitole „2.3 Stres a příznaky stresu“, v reakci na stresor se tepová frekvence zvyšuje, např. u bělozubky nejmenší (*Suncus etruscus*) se klidová tepová frekvence, která činila průměrně 835 tepů.min^{-1}, zvýšila po stresovém stimulu (taktilní stimul na čumák) na hodnotu činící v průměru 1039 tepů.min^{-1} (Jürgens et al., 1996). Zvýšení tepové frekvence vlivem stresového podnětu, např. při agonistických sociálních interakcích dokazují i další studie (např. Kralj-Fišer et al., 2010; Wascher et al., 2008; Viblanc et al., 2012). Kralj-Fišer et al. (2010) zjistili ve

své studii na huse velké (*Anser anser*) spojitost mezi agresí a stresovou tepovou frekvencí, kdy jedinci s vyšší agresivitou vykazovali při agresivních interakcích vyšší stresovou tepovou frekvenci než jedinci méně agresivní. Pozitivní vztah mezi stresovou tepovou a dechovou frekvencí a míry explorace dokládá již zmíněná studie na svištích (Ferrari et al., 2013).

2.5.1 Metody měření tepové frekvence

Ke změření tepové frekvence v terénní studii na divoké populaci svišťů byl využit jednoduchý způsob, a to poslech zvířete stetoskopem, kdy byl měřen počet úderů za jednotku času (Ferrari et al., 2013).

Sofistikovanější způsob k měření tepové frekvence je elektrokardiografie, kdy elektrody snímají pracovní činnost svalu srdce, výsledkem je záznam v podobě kardiogramu (Jürgens et al., 1996; Zehendner et al., 2013). Nevýhodou je, že zvířata jsou zde svým způsobem omezena v pohybu, což může vyvolávat u zvířat stresovou reakci. Naproti tomu čím dál tím více používané telemetrické sondy umožňují zvíře sledovat při vědomí a volném pohybu (Kramer, et al., 2001).

Využití telemetrických sond nalezneme u řady testovaných druhů od myší po primáty (Kramer, et al., 2001). Sondy se mohou využít v dlouhodobých studiích, v řádu až několika měsíců (Stöhr, 1988), v souvislosti např. s behaviorálními projevy (Ishii et al., 1996; Kralj-Fišer et a. 2010).

2.6 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy patří mezi steroidní hormony, jejich syntéza probíhá v kůře nadledvin ve vrstvě *zona fasciculata* přeměnou cholesterolu, který je u obratlovců získáván z živočišných tuků z potravy anebo vyráběn endokrinními steroidogenními buňkami (Hill et al., 2004).

Spolu s katecholaminy je lze považovat za hlavní hormony uplatňujících se při stresových reakcí (Palme et al., 2005). Nejdůležitějšími glukokortikoidy jsou kortizol a kortikosteron, jejich zastoupení v organismu se mezidruhově liší. U primátů, koček, psů, koní a prasat převažuje kortizol, zatímco u myší, králíků, potkanů nebo ptáků převažuje kortikosteron (Palme et al., 2005). I když u člověka dominuje v plazmě

kortizol, při průchodu do mozku je zvýhodňován více kortikosteron (de Kloet et al., 2005).

Hladiny glukokortikoidů v krvi jsou kromě stresového podnětu ovlivněny cirkadiánním rytmem, např. studie na myších a krysách zjistily, že nejvyšší „basální" hladiny kortikosteronu dosahují jedinci ráno, zatímco večer jsou jejich hladiny o dost nižší (Touma et al., 2003; Bamberg et al., 2001). U samic může hrát roli estrální cyklus. Např. samice krys produkovaly více kortikosteronu v proestru než v samotném estru a následném metestru (Cavigelli et al., 2005).

Dále hladina glukokortikoidů vykazuje i sezónní rytmicitu (Place & Kenagy, 2000; Quispe et al., 2014; Vera et al., 2011; Romero et al., 2008; Romero 2002). Avšak vrchol hladiny glukokortikoidů není mezi druhy konzistentní a liší se i výsledky studií na stejném druhu (Romero et al., 2008). Vera et al. (2011) zjistili, že tukotuko (*Ctenomys talarum*) vykazoval variabilitu v hladině kortizolu v různých fázích reprodukční sezóny, nejvyšší hladiny dosahoval na vrcholu reprodukční sezóny, nejnižší pak na jejím začátku. Quispe et al. (2014) zjistili, že u osmáka degu (*Octodon degus*) samice a samci měli vyšší basální i stres-indikující hladinu kortizolu v době páření než mimo reprodukční sezónu. Zatímco Bauer et al. (2014) nezjistili u stejného druhu sezónní změny v basální hladině kortizolu, zaznamenali změny u stres-indikující hladiny kortizolu, kdy dosahovali jedinci nejnižších hladin během páření (červen, červenec), nejvyšších během laktace (září) a středních mimo reprodukční sezónu (prosinec, leden).

Jak již bylo zmíněno v kapitole „2.1.5 Coping style", hladiny glukokortikoidů jsou spojovány s osobností zvířete. Proaktivní jedinci vykazují v odpovědi na stres nižší hladiny glukokortikoidů oproti jedincům reaktivním (Koolhaas et al., 1999). Toto tvrzení je shodné se studií Veenema et al. (2003) na myších, kdy 5minutové nucené plavání (forced swimming) vyvolávalo u LAL myší vyšší imobilitu a zároveň vyšší koncentraci kortikosteronu oproti jedincům SAL. Vyšší koncentrace kortikosteronu navíc u jedinců LAL přetrvávala po delší dobu. Avšak Sgoifo et al. (1996) nenašli u potkana žádnou korelaci mezi hladinou kortikosteronu v reakci na stresor a mírou agresivity jedince.

2.6.1 Metody měření

Dle způsobu získání vzorků můžeme metody měření steroidních hormonů rozdělit na invazivní, kdy se za účelem stanovení stresových hormonů získává od zvířete krevní plasma, a neinvazivní metody, využívané zejména v posledních desetiletích, kdy se měří až metabolity hormonů např. v moči, nebo trusu. Oba přístupy mají své výhody i nevýhody. Jejich podrobnější popis je popsán v následujících kapitolách.

2.6.1.1 Invazivní metody

Při invazivním přístupu je zvířeti odebrána krev např. z ocasní žíly (např. Vallée et al., 1996; Haemisch et al., 1999), orbitálního sinu (např. Eilam et al., 1999; DeVries et al., 1997; Quispe et al., 2014; Fletcher & Boonstra, 2006), z permanentního srdečního katetru (např. Sgoifo et al., 1996; Meerlo et al., 1999), nebo se využívá vytékající krev po dekapitaci (např. Armario et al., 1986; Durand et al., 1998; Costa et al., 2012). Přehled dalších možností odběru krve se dá najít např. u Morton et al. (1993); Diehla et al. (2001).

Odběr krve musí být proveden co nejrychleji od začátku manipulace se zvířetem, protože steroidní hormony, v reakci na stresový faktor, manipulaci a samotný odběr, se uvolňují do krve během pár minut. Pokud by tato podmínka nebyla dodržena, došlo by ke zkreslení výsledků (Haemisch et al., 1999; Romero 2002). Pro většinu studovaných druhů se začíná hladina glukokortikoidů zvyšovat po dvou až třech minutách v reakci na stresor (Romero 2002; Bamberg et al., 2001). Záleží ovšem na druhu zvířete a intenzitě jeho metabolismu, kdy tato hranice může být posunuta. Např. u některých plazů nebyla nalezena zvýšená hladina glukokortikoidů po dobu 10 minut (přehled v Tyrrell & Cree, 1998), u tukotuko (*Ctenomys talarum*) nebylo nalezeno konzistentní zvýšení hladiny po 8 minutách od manipulace (Vera et al., 2011), u morčat nedošlo ke zvýšení hladiny v rozpětí 5 minut v reakci na stresor (Künzl et al., 2003). Naopak k maximální hladině vyplavených hormonů dochází u potkanů do 20 minut. Pro měření za delší dobu ale již tento postup není tolik vhodný, protože aktivní hormony podléhají inaktivaci a degradaci v řádu hodin, poločas kortikosteronu v plasmě je zhruba 60 minut (Bamberg et al. 2001). Po odběru se k vlastní analýze z krve získá odstředěním plasma.

2.6.1.2 Neinvazivní metody

Neinvazivní metody spočívají, jak již bylo zmíněno, ve zjišťování metabolitů steroidních hormonů. Tedy měřeny jsou metabolické produkty hormonů po odstranění z krevního oběhu a případné metabolizaci střevní mikroflórou (Palme et al., 2005; Palme, 2005; Touma et al., 2003). Využívají se pro to vzorky trusu (Bamberg et al., 2001; Touma et al., 2004; Möstl & Palme, 2002; Touma et al., 2003), moče (Bamberg et al., 2001; Dallman et al., 2006; Touma et al., 2003), slin (Kobelt et al., 2003; Palme, 2012; Boyce et al., 1995), srsti (Bennet & Hayssen, 2010), mléka (Palme, 2012), peří (Bortolotti et al., 2009), vajec (Rettenbacher et al., 2013). Při těchto odběrech nedochází k fyzickému zásahu do organismu zvířete, ty jsou tak výrazně méně stresovány (Palme et al., 2005; Palme, 2005).

Na odběr slin lze některá zvířata snadno naučit, koně jsou zvyklí na cizí těleso v tlamě při manipulaci (Palme, 2012), psy lze k slinění vycvičit, nebo podpořit slinění pamlskem v dlani (Bennet & Hayssen, 2010). K odběru slin ale musí dojít do 4 minut, během tohoto intervalu nedochází k ovlivnění hladiny kortizolu. U malých zvířat je to méně vhodné kvůli malému vzorku, a právě potřebné manipulaci se zvířetem (Touma et al., 2004).

Vzhledem k tomu, že srst roste velmi pomalu, odraz hladiny metabolitů hormonů zde nebude v řádech hodin, či dní, ale až týdnů, či měsíců. Z tohoto důvodu je tato metoda vhodná spíše pro měření chronického stresu než pro více krátkodobých stresorů. Peří má ovšem i úseky, které dorůstají denně, dá se tedy zjistit hladina metabolitů během několika dnů. Tento způsob stanovení je ale ještě na začátku a chybí dostatečné ověření, že takto získané hodnoty odrážejí dlouhodobé plasmatické hladiny glukokortikoidů (Sheriff et al., 2011).

U hlodavců se často využívá k měření steroidních hormonů vzorek trusu. To však s sebou nese nevýhodu, neboť v trusu nejsou metabolity uvolněného kortikosteronu přítomny ihned, ale v závislosti na intenzitě metabolismu. Tato intenzita je různá v závislosti na druhu a někdy i na pohlaví v rámci druhu. Intenzita metabolismu se navíc odvíjí i od teploty prostředí a denní doby. Z těchto důvodů musí být aplikace metody před začátkem pokusů validována pro určitý druh (Palme, 2005; Touma et al., 2004).

Fyziologickými validacemi se zjišťuje, po jaké době se odrazí změna v krevní hladině steroidů v metabolitech obsažených v trusu. Využívá se k tomu syntetických hormonů, které buďto snižují, nebo naopak zvyšují koncentraci glukokortikoidů v krvi, to se pak následně promítne i v koncentraci metabolitů v trusu. Pro to, za jakou dobu se promítne v trusu zvýšení glukokortikoidů v krvi, se využívá stimulační ACTH challenge test, pro snížení pak inhibiční Dex (dexamethasone suppression) test, kdy je zvířatům píchnut syntetický hormon dexametason (Touma et. al., 2004).

2.6.1.3 Imunochemické metody

Pro stanovení hormonů, či jejich metabolitů se využívají metody založené na specifické reakci mezi antigenem a protilátkou (Springer, 2008), které jsou ve formě radioimunologické analýzy (RIA) (např. Quispe et al., 2014; Panagiotaropoulos et al., 2004; Ferrari et al., 2013; DeVries et al., 1997; Eilam et al., 1999; Reeder et al., 2004; Place & Kenagy, 2000; Veenema et al., 2003; Haemisch et al., 1999; Bauer et al., 2014; Vera et al., 2011), nebo ve formě enzymových imunoanalýz, a to „enzyme immunoassay“ (EIA), v případě vazby enzym-značka, a „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA), v případě vazby enzym-protilátka (Möstl et al. 2005) (využitých např. ve studiích Henriksen et al., 2011; Costa et al., 2012; Kralj-Fišer et al., 2010; Touma et al., 2004).

Tyto metody se dělí dle principu stanovení na kompetitivní, kdy antigen ze vzorku soutěží se stejným značeným antigenem ze soupravy o omezené množství protilátky, a stanovení nekompetitivní (sendvičové), kdy je antigen ze vzorku vychytáván mezi dvě protilátky vyskytující se v reakční směsi v přebytku (Springer, 2008).

V RIA analýze se využívají ke značení radioisotopy ^{125}I nebo ^{3}H (Springer, 2008; Sheriff et al., 2011). Jedná se o starší náročnou techniku, kdy se musí postupovat obzvláště opatrně, neboť se pracuje s radioaktivní látkou. Zároveň se ale jedná o velmi citlivou a přesnou metodu (Springer, 2008). K odečtení výsledků se využívá gamma nebo scintilační detektor (Sheriff et al., 2011). Enzymové imunoanalýzy jsou také velmi citlivé a bezpečné k používání. K odečtení výsledků se využívá spektrofotometru (Springer, 2008).

2.7 Metody snižování stresu

Jak již bylo zmíněno v kapitole „2.3 Stres a příznaky stresu“, déletrvající stres má negativní účinky, které se odráží ve zdraví, psychice a reprodukci zvířete (Axelrod & Reissine, 1984; Moberg, 2000; Möstl & Palme, 2002).

Samotné zajištění dobrých životních podmínek a šetrná manipulace zvířatům napomáhají eliminovat stresové reakce (Poole, 1997; Botreau et al., 2007). V souvislosti s tím se studie zaměřují na tzv. welfare zvířat, které zahrnují vhodné krmení (absence hladu, žízně), dobré ubytování (snadný pohyb, komfortní odpočinek), dobré zdraví (absence poranění, nemoci, bolesti), plné a vhodné chování (umožnění sociálního a jiného přirozeného chování, dobrý vztah člověk-zvíře, absence obecného strachu) (Botreau et al., 2007).

Pro zvíře je laboratorní prostředí často stresujícím, neboť jim neposkytuje dostatečnou stimulaci a sociální kontakt, to vede k vytváření nevhodných podmíněných reflexů, nebo ke stereotypnímu chování, může dojít k habituaci, či senzitizaci na dané podmínky. Výsledky studií jsou pak zkresleny způsobem chovu a použitými metodami (Poole, 1997; Vecsey et al., 2013). Experimentátor hraje též důležitou roli, neboť většina laboratorních savců a ptáků vnímá člověka jako jedince a je schopna jednotlivé lidi od sebe rozlišit (Poole, 1997). Neznámé osoby (experimentátoři) pak vyvolávají ve zvířeti nervozitu, strach a stres. V případě, že zvíře bylo navyknuto na manipulaci konkrétním experimentátorem, dochází u tohoto jedince ke snížení strachu nebo úzkosti, a tím k odstranění nežádoucího zkreslení výsledků (Poole, 1997).

I v zemědělských chovech se ukazuje, že šetrné laskavé zacházení se zvířaty je prospěšné, např. vyšší růstová rychlost a reprodukční úspěch u prasat (Hemsworth & Barnet, 1987), vyšší výnos mléka u krav (Seabrook,1984).

Snížení úzkosti a neuroendokrinní odpovědi na stres ukazují též studie provedené na myších po sociálním obohacení (social enrichment) a společném odchovu mláďat (communal rearing) (Cirulli et al., 2010; Curley et al., 2009).

V následující kapitole je detailněji popsán vliv manipulace se zvířetem na jeho chování a fyziologické parametry. Jelikož v češtině není jednoslovný termín pro manipulaci se zvířetem, byl převzat z angličtiny výraz handling.

2.7.1 Handling

Za handling může být označena v širším slova smyslu veškerá manipulace se zvířetem či záměrné změny v okolním prostředí, v užším slova smyslu je to pak samotné zacházení rukami se zvířetem (Costela et al., 1995). V některých studiích je proto pro samotné braní zvířete do rukou používán výraz jemný hnadling („gentle handling“) (Poole, 1997; Vecsey et al., 2013).

Dle způsobu handlingu a jeho zpětné vazby můžeme rozlišovat handling pozitivní a negativní. Za pozitivní lze označit handling, který působí na jedince tak, že dochází u něho např. taktilní stimulací k snižování stresu, úzkosti, zvýšení úrovně paměti, kognitivních schopností, učení, snížení emocionality (Meerlo et al., 1999; Poole, 1997). Handlovaní jedinci se poté vykazují např. intenzivnějším exploračním chováním díky snížení hladiny stresu (Meerlo et al., 1999; Costela et al 1995; Schmitt & Hiemke, 1998), nárůstem explorace v otevřených ramenech a zvýšením času stráveného v otevřených ramenech EPM (Cirulli et al., 2010; Meerlo et al., 1999; Schmitt & Hiemke, 1998; Costa et al., 2012), delší dobou strávenou v centru arény OFT, zkrácenou dobou latence vstupu do středu OFT (Schmitt & Hiemke, 1998; Costa et al., 2012), nebo do otevřeného ramene (Schmitt & Hiemke, 1998; Meerlo et al., 1999; Costa et al., 2012; Cirulli et al., 2010), kratší dobou imobility a freezingu (Costela et al., 1995; Meerlo et al., 1999), zvýšenou zvídavostí (Costa et al., 2012) oproti jedincům bez handlingu.

Zatímco negativní handling se projevuje zvýšením stresové reakce, úzkostnosti, emocionality a v důsledku toho snížením explorace. Do negativního handlingu zahrnujeme např. úchopy za ocas, či kůži na zátylku (Poole, 1997).

Často je handling prováděn na juvenilních jedincích v prvních dnech života, kdy jsou mláďata oddělena od matky po krátkou dobu, během této doby je na nich prováděna taktilní stimulace nebo např. vážení (Meerlo et al., 1999; Vallée et al., 1996; Papaioannou et al., 2002; Cirulli et al., 2010). V tomto raném období u savců dochází k dynamickému tělesnému a mozkovému vývoji. V důsledku stimulů z prostředí v této době může dojít k fyziologickým změnám a změnám v chování, které mohou přetrvat až do dospělosti (Meerlo et al., 1999). Dále bývá použit prenatální handling, kdy dochází k ovlivnění ještě nenarozených mláďat skrz handlovanou matku (Vallée

et al., 1996), nebo naopak handling až dospělých jedinců (např. Costa et al., 2012; Schmitt & Hiemke, 1998).

2.7.1.1 Handling a fyziologické změny

Z počátku handling působí na zvíře jako střední stresor. Zvíře vykazuje v odpovědi na manipulaci zvýšenou dechovou frekvenci (Fucikova et al., 2012; Ferrari et al., 2013; Carrere & van Oers 2004; van Oers & Carere, 2007), a zrychlený srdeční tep, (Ferrari et al., 2013) jako důsledek změn aktivity autonomního nervového systému a humorální regulace HPA osy, které napomáhají vypořádat se s novým, stresujícím stimulem (Vallée et al., 1996; Meerlo et al., 1999; Cirruli et al., 2010). Během první manipulace se zvířetem dochází u stresových hormonů k dočasnému zvýšení hladiny adrenalinu (Costa et al., 2012) a kortikosteronu (Cirulli et al., 2010; Vecsey et al., 2013). Při dlouhodobém handlingu se hladiny již nezvyšují a dochází k návratu k původním hodnotám (Vecsey et al., 2013; Costa et al., 2012). Některé studie dokazují u handlovaných jedinců dokonce nižší bazální hladiny kortikosteronu (Papaioannou et al., 2002), stresové hladiny kortikosteronu (Meerlo et al., 1999; Panagiotaropoulus et al., 2004), kratší dobu potřebnou k navrácení se k původní hladině kortikosteronu po stresorovém podnětu (Vallée et al., 1996), nižší stresové hladiny adrenalinu (Meerlo et al 1999). Dále dochází ke snížení hladin noradrenalinu (Costa et al., 2012), adrenokortikotropního hormonu (ACTH) (Papaioannou et al., 2002) a prolaktinu (Meerlo et al., 1999).

Skutečnost, že při dlouhodobém handlingu dochází ke snížení hladin stresových hormonů, poukazuje na to, že dochází ke snížení aktivity sympatika (Costa et al., 2012). Jak bylo zmíněno v kapitole „2.3 Stres a příznaky stresu“, zvýšená aktivita sympatiku se následně projevuje zvýšenou dechovou frekvencí. Pokud je tedy aktivita sympatiku snížená, mělo by se to projevit i na dechové frekvenci zvířete.

2.8 Hraboš polní

Hraboš polní patří k nejhojnějšímu druhu hlodavců naší fauny (Kratochvíl et al., 1959; Niethammer & Krapp, 1982). Dříve tento drobný savec obýval hlavně stepi a lesostepi, dnes jej nalézáme především v zemědělské krajině po téměř celé Evropě (Pelikán, 1955; Zejda et al., 2002; Anděra & Gaisler, 2012). Hojně se vyskytuje na

polích, úhorech, loukách, holých mezích (Pelikán, 1955; Zejda et al., 2002). Na okrajích lesa se s ním můžeme setkat při vysokých populačních hustotách (Zejda et al., 2002).

Patří mezi euryfágní herbivory, jeho potrava zahrnuje zelené části rostlin, kořínky, dále pak semena, zrna obilí, kůru dřevin (Anděra & Gaisler, 2012; Holišová, 1959; Zejda et al., 2002). Zatímco subadultní jedinci se živí převážně zelenou potravou, kdy obsah semen v potravě nepřesahuje 5 %, u adultních jedinců je obsah semen vyšší, v potravě mají adultní jedinci zastoupenou, v malém množství, i živočišnou složku, zejména samice. Zastoupení jednotlivých složek potravy je dále závislé na ročním období (Holišová, 1959). Za den hraboš sežere množství potravy, které činí zhruba 110 až 120 % hmotnosti těla (Anděra & Gaisler, 2012).

Hraboš polní patří mezi druhy s polyfázickou aktivitou, je tedy aktivní ve dne i v noci po 2 až 3 hodinách (Niethammer & Krapp, 1982). Patří mezi sociálně žijící živočichy, kteří budují složité hnízdní systémy. Hnízdní systémy se skládají z několika zásobáren potravy, hnízdních komor, únikové chodby a východů, které jsou budovány v hloubce okolo 10 až 20 cm pod povrchem (Anděra & Gaisler, 2012; Boyce & Boyce, 1988b, Pelikán, 1959a). Používané chodby jsou udržovány čisté, vyhlazené, bez přesahujících kořínků a kamínků, a pokud některá z chodeb přestane býti využívána, časem se rozpadá a zarůstá kořeny (Pelikán, 1959a). Samice zde žijí ve skupině zhruba 3 samic, synchronizují svůj estrální cyklus a společně vychovávají potomky, kteří poté dispergují do blízkého okolí (Boyce & Boyce, 1988a, Doobly, 2008). Při vysoké populační hustotě jsou některé ze samic ze skupiny vyhnány a nuceny žít samostatně v malých jednoduchých hnízdních norách, kde vychovávají své potomstvo (Boyce & Boyce, 1988b). Paradoxně mají solitérní samice vyšší reprodukční úspěšnost než samice ze skupin (Boyce & Boyce, 1988a). Samice, které zůstávají s matkami, mají potlačenou reprodukci a opožděně se zapojují do pohlavní reprodukce, je pro ně proto výhodné sdružovat se s nepříbuznými samicemi (Doobly, 2008).

Samci nemají stálé území, která by si striktně bránili, ale postupně navštěvují v době rozmnožování říjné samice v koloniích (Niethammer & Krapp, 1982; Pelikán, 1959a, Anděra & Gaisler, 2012). Se samicí zůstávají jen po krátkou dobu, než zabřezne, poté vyhledají další samici v říji (Pelikán, 1959a).

Během reprodukční sezóny jsou samci vůči ostatním samcům značně agresivní (Boyce & Boyce, 1988c). Na podzim dochází k útlumu pohlavní aktivity a tím se utlumuje i rivalita mezi samci. Hraboši poté utváří tzv. zimní společenstva nezávisle na pohlaví nebo stáří zvířat (Pelikán, 1959a, Niethammer & Krapp 1982). Tato zimní společenstva bývají většinou tvořena jedinci příbuznými, ale mohou se zde vyskytovat i jedinci nepříbuzní (Pelikán, 1959a).

Rozmnožovací sezóna začíná březnem a trvá až do poloviny listopadu (Moravec, 1985), vrchol nastává v květnu, kdy je v rozmnožování zapojeno nejvíce samic, většina je březí nebo kojí (Pelikán, 1959b). Avšak pokud jsou dobré podmínky mohou se rozmnožovat i přes zimu (Moravec, 1985; Boyce & Boyce, 1988a).

Pohlavní dospělost nastává dříve u samic než u samců. Zatímco samice mohou zabřeznout již ve stáří 15 až 20 dnů, samci se začínají rozmnožovat až během 25 – 30 dnů stáří. V průměru pohlavně dospívají ve 4 – 6 týdnech života (Pelikán, 1959b, Pelikán et al., 1979). Samice je březí 19 až 21 dní, ve vrhu je průměrně 5 až 6 mláďat, jen ojediněle čítá vrh pouze jedno mládě (Pelikán, 1959b). Délka života hraboše je závislá na ročním období, ve kterém se jedinec narodil. Jarní kohorty, které se zapojují ještě tentýž rok do reprodukce, se dožívají 2 až 7 měsíců. Letní až podzimní kohorty mohou žít i více než 10 měsíců (Moravec, 1985), nejdéle v přírodě se dožívají rok a půl (Anděra & Gaisler, 2012).

Na hraboši polním byla v několika studiích prokázána existence opakovatelných konzistentních inter-individuálních rozdílů napříč různými situacemi (Lantová et al., 2011, Herde & Eccard, 2013, Gracceva et al., 2014). Např. jedinci více odvážní a aktivní v OFT vykazovali vyšší aktivitu v bariérovém testu a opačně jedinci projevující se jako více anxiózní v OFT, vykazovali vyšší úzkostlivost i v bariérovém testu.

3. Cíle práce a testované hypotézy

Hlavními cíli této práce bylo zjistit:

1. Vliv handlingu na vybrané fyziologické parametry u hraboše polního

H_{01}: Handling neovliňuje klidové hodnoty sledovaných fyziologických parametrů

H_{02}: Handling neovliňuje stresové hodnoty sledovaných fyziologických parametrů

2. Vztah mezi vybranými fyziologickými parametry a osobnostními rysy hraboše polního

H_{03}: Osobnostní rys na ose „bold-shy“ nekoreluje s dechovou frekvencí

H_{04}: Osobnostní rys na ose „bold-shy“ nekoreluje s hladinou kortikosteronu

4. Materiál a metodika

4.1 Testovaný druh, podmínky chovu

K pokusům byli použiti laboratorně odchovaní hraboši polní (*Microtus arvalis*) pocházející z první generace mláďat (F1 generace) získaných množením jedinců odchycených ve volné přírodě. Odchyty byly prováděny v letním období roku 2015 na třech různých lokalitách v Českých Budějovicích a v září 2015 na lokalitě Lužnice u Třeboně. Chovné páry byly sestavovány z jedinců pocházejících z různých lokalit k zamezení inbreedingu. Byla provedena dvě páření, jedno v prosinci 2015; druhé v lednu 2016.

Zvířata byla po odstavu, v 21 dnech života, chována individuálně v chovných boxech typu Velaz T3 (rozměry 430 x 275 x 140 mm). Jako podestýlka byly použity dřevěné hobliny, plastová trubička sloužila jako úkryt. Chovné boxy byly umístěny do chovné místnosti s kontrolovanou teplotou (18-22 °C) a světelným režimem (12/12). Základem krmení byly směsi pro hlodavce MOK a ST1 doplněné o tvrdý chléb, seno, čerstvou trávu a kořenovou zeleninu. Potrava i voda byly zvířatům po celou dobu přístupné *ad libitum*.

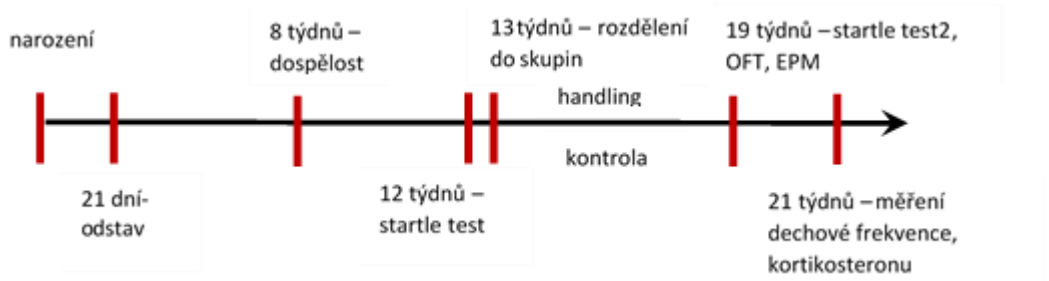
Všichni testovaní jedinci byli při odstavu individuálně označeni. Veškeré testy byly prováděny na jedincích až po dosažení jejich pohlavní dospělosti, po dosažení 3 měsíců věku.

4.2 Experimentální design

Ve věku 12 týdnů na základě úlekového testu, při kterém nedocházelo k přímému kontaktu s experimentátorem, byla zvířata rozdělena do dvou skupin, handlovaní a kontrolní, tak aby byl rovnoměrný podíl zvířat dle latence návratu k činnosti před úlekem (krátká odpovídala spíše jedincům „bold“, dlouhá „shy“) a dále dle pohlaví.

Následoval samotný handling trvající 6 týdnů. Po ukončení handlingu byly provedeny testy, druhý akustický úlekový test, OFT a EPM test. Tyto testy byly součástí diplomové práce Terezy Dikošové, s jejím svolením jsou zde využita data získaná z těchto testů.

Po provedení personalitních testů byly provedeny fyziologické testy, změření dechové frekvence a hladiny kortikosteronu. Pro lepší přehlednost je vytvořen časový harmonogram experimentu, viz Obr. 1.



Obr. 1: Časový harmonogram experimentu

4.3 Startle test

Na základě tohoto testu byla zvířata rozdělena do dvou skupin. Zvíře bylo přeneseno ve svém domovském boxu do experimentální místnosti. Z boxu mu byla odebrána 30 min před začátkem testu trubka (znemožnění úkrytu) a po habituaci jedince na změněné podmínky bylo provedeno písknutí pomocí ultrazvukové píšťalky po dobu 1 s. Byla pozorována reakce jedince - strnutí na místě, tzv. freezing - a měřena latence návratu k spontánnímu chování.

4.4 Handling

Handling byl prováděn na jedincích po dosažení dospělosti, v rozmezí 12 – 20 týdnů věku (viz Obr. 1). Probíhal po dobu 6 týdnů 4 dny v týdnu a to vždy mezi 14. - 16. hodinou. Zvíře bylo vyjmuto z domovského boxu a po určitou dobu bylo drženo v dlani a druhou rukou hlazeno po hřbetě. Doba, po kterou bylo zvíře handlováno, se z 30 sekund postupně prodlužovala na konečné 2 minuty – viz Tab. 1.

Tab. 1: Časový interval trvání handlingu během 6 týdnů

Den handlingu	Délka handlingu (s)
1.	30
2. – 8.	60
9. – 16.	90
17. – 24.	120

4.5 OFT

Při tomto testu bylo zvíře vždy přeneseno v domovské trubičce do stejného rohu pokusné aparatury (rozměry 750 x 750 x 400 mm). Test trval 5 minut, byl zaznamenán na kameru. Zvíře poté bylo vráceno do domovského boxu do chovné místnosti. Před dalším testovaným zvířetem byla aparatura očištěna a vytřena naředěným lihem k zamezení vlivu pachů předešlého jedince.

4.6 Vyvýšený labyrint EPM

Testovací aparatura byla vyrobena z neprůhledného plexiskla. Byla sestavena ze dvou otevřených ramen a kolmo na ně, ze středu, vybíhajících dvou uzavřených ramen. Ta byla na bocích ohraničená stěnami o výšce 40 cm. Šíře ramen byla 10 cm, jejich délka 50 cm. Podlaha aparatury byla od země ve výšce 60 cm. Na zemi pod aparaturou byly umístěny velké boxy s výstelkou, aby se zabránilo poranění zvířete způsobeného jeho pádem.

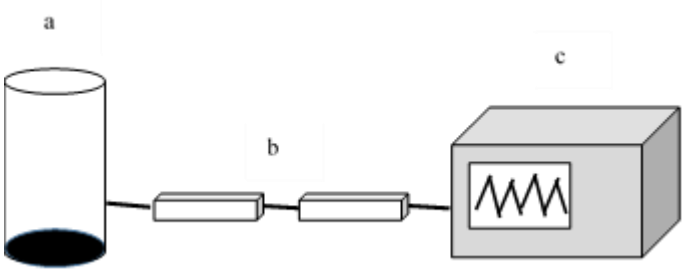
Test trval 5 minut a byl snímán kamerou. Zvíře bylo přeneseno v PVC trubičce z jeho domovského boxu do středu (na křižovatku) labyrintu, kde bylo vypuštěno. Po ukončení testu bylo odchyceno a vráceno do boxu. Aparatura byla před dalším testovaným zvířetem nejprve vyčištěna a poté vytřena naředěným lihem k odstranění pachových stop.

4.7 Měření dechové frekvence

K měření dechové frekvence jsem použila metodiku vyzkoušenou v mé bakalářské práci, kde bylo ukázáno, že dechová frekvence a osobnostní rys jsou u hraboše polního propojeny (Janochová, 2014).

Zvíře bylo za účelem měření dechové frekvence vloženo do komůrky o objemu 3 dm^3 napojené na tlakový senzor - změny tlaku v komůrce byly převodníkem převedeny na změny elektrického napětí. Následně se změny elektrického napětí v čase zobrazovaly na obrazovce osciloskopu - schéma testovacího zařízení je na Obr. 2. Komůrka byla opatřena dvojitým dnem. Do něho byl vždy umístěn filtrační papír napuštěný roztokem hydroxidu draselného o koncentraci 1 mol.l-1, který sloužil jako absorbent oxidu uhličitého. Absorbent tak zamezil nárůstu hladiny

oxidu uhličitého v komůrce, která by mohla zvýšit dechovou frekvenci hraboše. Důležité bylo též, aby koncentrace kyslíku ve vzduchu během testu jedince nepoklesla o více než 4 % (Sova, 1990). Drobný savec velikosti hraboše spotřebuje 3 ml kyslíku na 1g tělesné hmotnosti za hodinu (Vyskočil, 2004; Daan & Slopsema, 1978). Tato hranice nebyla při žádném mém experimentu překročena.



Obr. 2: Schéma testovacího zařízení. a) komůrka, b) tlakový senzor s převodníkem, c) osciloskop

Testovaný jedinec byl přendán z boxu do komůrky za pomoci PVC trubičky, která byla součástí chovného boxu. Měření dechové frekvence trvalo 20 min, průběh byl zaznamenáván digitální kamerou. Testovaný jedinec byl po umístění do testovací komůrky vystrašen zvukovým signálem a byla získána stresová dechová frekvence (*stress breath rate*, SBR) v reakci na tento podnět. Klidová dechová frekvence (*resting breath rate*, RBR) byla zaznamenána, když zvíře jevilo známky uklidnění (ležení, spánek). Po každém sezení byla komůrka vymyta vodou a naředěným lihem a vysušena. Tím se zabránilo, aby byly hodnoty dalšího zvířete ovlivněny pachovými stopami předešlých zvířat.

Na videozáznamu byl následně měřen počet nádechů v úseku 6 vteřin, vynásobením deseti byla získána dechová frekvence (dech.min^{-1}), viz Obr. 4 a Obr. 5, Příloha č. 1.

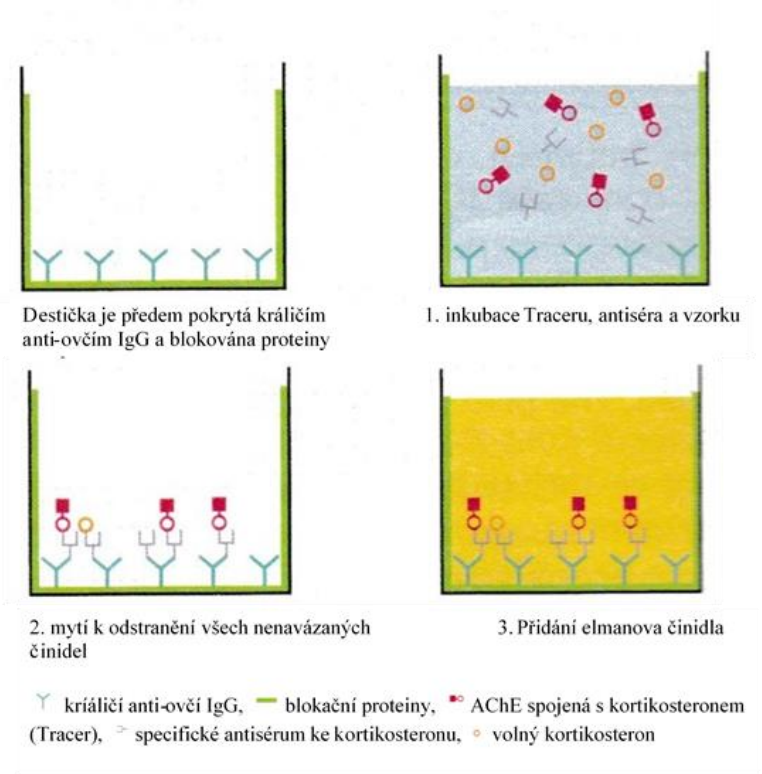
4.8 Měření hladiny kortikosteronu v krevní plazmě

K stanovení hladiny kortikosteronu byl použit Corticosterone ELISA Kit a jeho metodika od společnosti Cayman Chemical Company (www.caymanchem.com), Ann Arbor, Michigan, USA, jednotlivé součásti sady jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Složení ELISA Kitu, převzato z metodiky Corticosterone ELISA kit, Cayman Chemical Company, An Arbor, MI, USA

Číslo	Položka	Počet ampulek/velikost
400656	Corticosterone ELISA Antiserum	1/na 100 jamek
400655	Corticosterone AChE Tracer	1/na 100 jamek
400657	Corticosterone ELISA Standard	1
400060	ELISA Buffer Concebtrate (10x)	2/10 ml
400062	Wash Buffer Concetrate (400x)	1/5 ml
400035	Polysorbate 20	1/3 ml
400658	Rabbit Anti-Sheep IgG Coated Plate	1 destička
400012	96-Well Cover Sheet	1 krycí folie
400050	Ellman´s Reagent	3/na 100 jamek

Tato metoda je založena na kompetici mezi kortikosteronem a konjugátem kortikosteron-acetylcholinesterázou (AChE Corticosterone Tracer) o omezený počet vazebných míst s kortikosteron-specifickým ovčím antisérem. Koncentrace Corticosterone tracer je konstantní, zatímco koncentrace kortikosteronu je variabilní. Množství Corticosterone traceru, které je schopno se navázat na ovčí antiserum, je nepřímo úměrné s koncentrací volného (měřeného) kortikosteronu. Komplex ovčí antisérum-kortikosteron (měřený nebo tracer) se váže na králičí anti-ovčí IgG, které již jamky destičky (pro fotometr) obsahovaly. Po odstranění nenavázaných činidel a přidání Ellmanova činidla nastává enzymatická reakce, jejíž produkt má výraznou žlutou barvou. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství Corticosterone Tracer vázaného v jamkách, který je nepřímo úměrný volnému kortikosteronu v jamce během inkubace. Schéma procesu viz Obr 3.



Obr. 3: Schéma AChE ELISA testu, převzato z metodiky Corticosterone ELISA kit, Cayman Chemical Company, An Arbor, MI, USA

4.8.1 Odběr vzorku, uchování

Zvíře bylo přemístěno v chovném boxu do odběrové místnosti, pomocí úkrytové trubičky bylo přeneseno do narkózové komůrky. Zde bylo vystaveno inhalační narkóze pomocí isofluranu a poté mu byla odebrána krev z orbitálního sinu. K odběru byly využívány heparizované kapiláry, krev poté byla vypuštěna do mikrozkumavek označených ID číslem zvířete. Odběr byl vždy prováděn mezi 13. a 15. hodinou, aby se zamezilo zkreslení výsledků vlivem cirkadiánního rytmu, toto opatření se shoduje i s jinými studiemi, které též odebírají krev ve stejný čas v rozmezí 2–4 hodin (např. Fletcher & Bonstra, 2006; Durand et al., 1998; Costa et al., 2012). V tomto denním čase byl navíc se zvířaty prováděn handling.

Odběr vzorku krve pro stanovení basální (kontrolní, klidové) hladiny kortikosteronu byl proveden nejpozději do tří minut od započetí manipulace s jedincem, většině zvířat byla krev odebrána do dvou minut.

Pro stanovení stresové hladiny kortikosteronu byl použit lehce modifikovaný test, strach z neznámého prostředí tzv. „Novelty stress“, který byl použit ve studii Meerla

et al. (1999). Zvíře bylo přemístěno v PVC trubičce do neznámého boxu typu VELAZ 4, který byl větší než chovný box. Po 15 minutách byl jedinec vyjmut, vystaven narkóze a byla mu odebrána krev. Tuto zvolenou dobu pro odebrání stresové hladiny můžeme vidět i ve studii DeVries et al. (1997) na myši domácí a hraboše prérijového (*Microtus ochronogaster*). Krev byla odebrána opět nejpozději do tří minut od konce expozice „Novelty stresu“, nejčastěji do dvou minut. Box byl před každým pokusem vydezinfikován, aby zvíře nebylo ovlivněno pachy předešlých zvířat.

Každý vzorek krve byl ihned po odběru, přemístěn do chladničky při teplotě 4 °C, kde byl uchováván nejdéle po dobu 2 hodin. Po ukončení odběru všech vzorků byla z krve odstředěna plazma při přetížení 4750 g po dobu 4 minut. Tento způsob odstředění plasmy byl převzat ze studie Fletcher & Bonstra (2006). Poté byla plasma odpipetována a uchovávána při -80°C, až do změření hladin kortikosteronu. Použitá skladovací teplota se shoduje s dalšími studiemi, kde k uchovávání vzorků plasmy využívali teploty -70°C až –80°C (např. Fletcher & Bonstra, 2006; Costa et al., 2012; Meerlo et al., 1999).

4.8.2 Příprava pufrů (buffer)

10 ml ELISA pufru bylo zředěno 90 ml ultra-čisté vody. 5 ml omývacího (wash) pufru bylo zředěno na celkový objem 2 l s ultra-čistou vodou a poté byl přidán polysorbát 20 v množství 1 ml.

Takto připravené pufry byly uchovávány při teplotě 4 °C a použity do dvou měsíců od přípravy.

4.8.3 Extrakce plazmy

Od každého vzorku bylo odebráno 50 µl plazmy do čistých mikrozkumavek Eppendorf. Byl přidán metylenchlorid v množství 4x větším než množství vzorku. Vzorek byl několikrát intenzivně protřepán. Poté byl odpipetován methylenchlorid do čisté mikrozkumavky. Tento krok byl opakován dvakrát. Následně byl odpařen methylenchlorid ze vzorku při teplotě 30°C v sušičce. Vzniklý extrakt byl rozpuštěn v 50 µl přidaného ELISA pufru.

4.8.4 Příprava specifického reagentu

Kortikosteron ELISA standard byl připraven následovným postupem. Pomocí pipety bylo do čisté zkumavky převedeno 100 µl kortikosteron ELISA standardu a k tomu bylo přidáno 900 µl ultra-čisté vody. Vznikl tak zásobní (bulk) standart o koncentraci 50ng/ml. Dále bylo připraveno 8 zkumavek. Do první bylo napipetováno 900 µl ELISA pufru, do ostatních 750 µl ELISA pufru. Dále bylo napipetováno do první 100 µl zásobního standartu a promícháno. Z první zkumavky bylo odebráno 500 µl a přeneseno do druhé zkumavky, opět pečlivě promícháno. Poté bylo z druhé zkumavky odebráno 500 µl a přemístěno do třetí zkumavky a obsah byl promíchán. Tento postup se opakoval až do osmé zkumavky. Vznikly tak standardy kortikosteronu ELISA (Standards 1 až 8, S1 až S8) o koncentraci 5000; 2000; 800; 320; 128; 51,2; 20,5; a 8,2 pg/ml.

Kortikosteron AChE tracer na sto jamek byl rozpuštěn s 6 ml ELISA pufru. Stejným způsobem bylo rozpuštěno i kortikosteron ELISA Antiserum. Takto připravené látky byly uchovány při 4 °C a použity do 4 týdnů.

4.8.5 Plate set up, inkubace

K testování byla použita titrační destička o 96 jamkách (součást setu), ve které byly připraveny podle návodu dvě „blank“ jamky, dvě jamky nespecifické vazby (non-specific binding, NSB), dvě maximální vazby (maximum binding, B0), jedna jamka celkové aktivity (Total Activity, TA) a 2 x 8 jamek se standardy kortikosteronu ELISA (Standards 1 až 8, S1 až S8) o 8 různých koncentracích. Do zbylých jamek byly napipetovány vzorky plazmy.

Do NSB jamek bylo napipetováno 100 µl ELISA pufru, do B0 jamek 50 µl ELISA pufru. Pokaždé do dvou jamek pro S1 až S8 bylo napipetováno 50 µl kortikosteron ELISA standardu o příslušné koncentraci. Od každého vzorku bylo použito dvou roztoků, každý byl napipetován v množství 50 µl do tří jamek.

Do jamek NSB, B0, S1 až S8 a jamek se vzorky bylo napipetováno 50 µl kortikosteron AChE traceru. Do jamek B0, S1 až S8 a jamek se vzorky bylo napipetováno 50 µl kortikosteron ELISA antiséra.

Poté byla destička překryta plastovou fólií a inkubována při pokojové teplotě v třepačce na dvě hodiny.

Bylo zředěno Ellmanovo činidlo na sto jamek s 20 ml ultra-čisté vody. Poté byly vyprázdněny jamky a propláchnuty omývacím pufrem 5x. Přidalo se 200 µl Ellmanova činidla do každé jamky. Do TA jamky bylo přidáno 5 µl kortikosteron AChE traceru. Destička byla přikryta plastovou fólií a dána na 90 minut do třepačky.

4.8.6 Fotometrická analýza vzorků, zjištění koncentrace kortikosteronu

Po vyjmutí z třepačky byla otřena spodní část destičky. Opatrně se sejmula fólie, aby nedošlo ke ztrátě Ellmanova činidla. Poté byla destička umístěna do fotometru (Uniskan II, Labsystems). Absorbance byly odečítány při vlnové délce 405 nm.

Pro zjištění koncentrace kortikosteronu za pomoci absorbance byly použity předem namodifikované vzorce pro výpočet koncentrace od společnosti Cayman na jejich webových stránkách www.caymanchem.com/analysis/elisa.

4.9 Získaná data a statistické zpracování

Získanými daty z fyziologických testů byly klidová a stresová dechová frekvence, klidová (bazální) a stresová hladina kortikosteronu, viz tab. 3. Kromě dat získaných z fyziologických testů byla pro zjištění možných korelací mezi fyziologickými parametry jedince a jeho osobnostním rysem využita data z OFT a EPM testu převzatá se svolením Terezy Dikošové z její diplomové práce, viz tab. 3. Data z testů byla otestována na normalitu rozložení a zlogaritmována. Pro statistickou analýzu byl použit program Statistica 64.

Tab. 3: Data z behaviorálních testů a získané fyziologické parametry

Název	Popis	Vzorec
OFT ubehnuto	celková vzdálenost ušlá v OFT, jak na periférii (OFTper), tak ve středu (OFTstred) arény	log(OFT per+OFTstred)
OFT central	podíl vzdálensti ušlé ve středu arény OFT z celku	OFTstred/ (OFTper+OFTstred)
EPM ubehnuto	celková vzdálenost ušlá v EPM, jak v otevřených (EPMopen), tak uzavřených (EPMclosed) ramenech	log(EPMopen+EPMclosed)
EPM open	podíl vzdálenosti ušlé v otevřených ramenech EPM z celku	EPMopen/ (EPMopen+EPMclosed)
logRBR	zlogaritmovaná hodnota klidové dechové frekvence (dech.min^{-1})	logRBR
logSBR	zlogaritmovaná hodnota stresové dechové frekvence (dech.min^{-1})	logSBR
logRCORT	zlogaritmovaná hodnota basální hladiny kortikosteronu (µg.100^{-1}ml)	logRCORT
logSCORT	zlogaritmovaná hodnota stresové hladiny kortikosteronu (µg.100^{-1}ml)	logSCORT

4.9.1 Reakce hrabošů na stresové podněty

K zjištění reakce hrabošů na stresové podněty zvýšením jejich dechové frekvence a hladiny kortikosteronu byl použit párový t-test jednotlivě pro každý fyziologický parametr. V případě reakce dechové frekvence byly porovnávány proměnné logRBR (log klidové dechové frekvence) a logSBR (log stresové dechové frekvence).

V případě reakce v hladině kortikosteronu byly porovnávány proměnné logRCORT (log basální hladiny kortikosteronu) a logSCORT (log stresové hladiny kortikosteronu).

4.9.2 Vztah mezi dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu

Ke zjištění vztahu mezi dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu byla použita jednoduchá lineární regrese. Nejprve byly porovnány mezi sebou klidové hodnoty, logRBR a logRCORT. Dále byly porovnány mezi sebou stresové hodnoty, logSBR a logSCORT.

4.9.3 Vliv handlingu na vybrané fyziologické parametry

Ke zjištění, zda handling ovlivňuje basální a stresové hodnoty sledovaných fyziologických parametrů, byl použit dvouvýběrový t-test. Rozdělující proměnná je v těchto t-testech handling (0=kontrolní skupina, bez handlingu; 1=handlovaná skupina), pro klidovou dechovou frekvenci je použita proměnná logRBR, pro stresovou dechovou frekvenci proměnná logSBR, pro basální hladinu kortikosteronu proměnná logRCORT, pro stresovou hladinu kortikoseronu logSCORT.

4.9.4 Vztah mezi fyziologickými parametry a osobnostními rysy zvířete

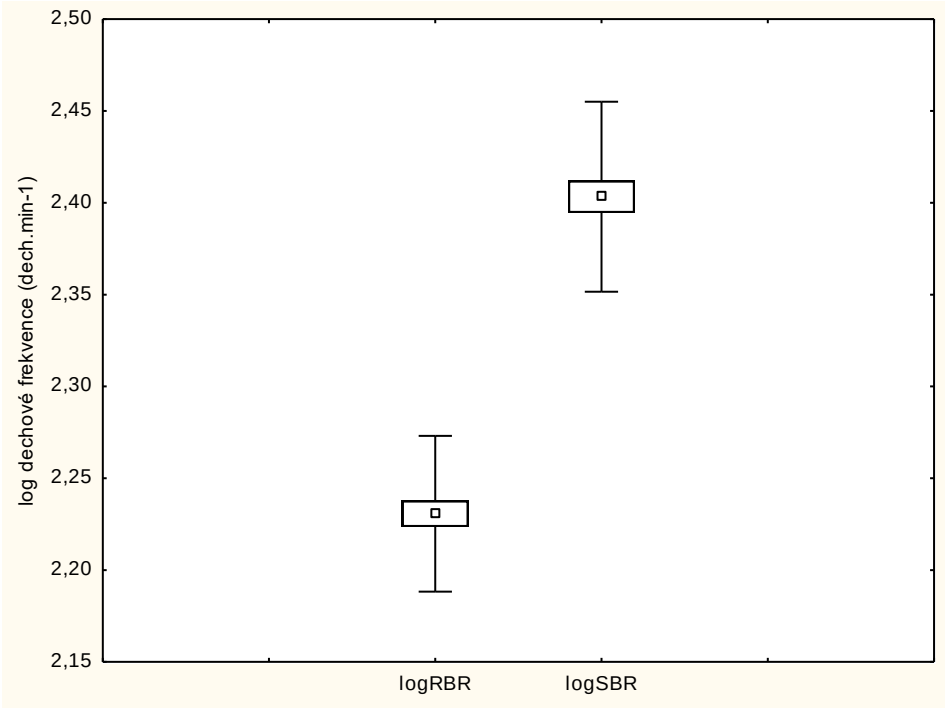
K zjištění vztahu mezi sledovanými stresovými hodnotami fyziologických parametrů a behaviorálními rysy byla použita jednoduchá lineární regrese. Použitými behaviorálními proměnnými byly OFTubehnuto, OFTcentral, EPMubehnuto, EPMcentral, fyziologickými proměnnými logSBR, logSCORT.

5. Výsledky

Celkem bylo otestováno 35 jedinců v testu k zjištění dechové frekvence, a basální hladiny kortikosteronu a 34 jedinců k zjištění stresové hladiny kortikosteronu. Bohužel při analýze dat pro kortikosteron došlo ke ztrátě části vzorků. Nakonec bylo počítáno u dechové frekvence s 35 jedinci, z toho bylo 19 jedinců handlovaných, 16 jedinců kontrolních. U basální hladiny kortikosteronu bylo počítáno s 25 jedinci, z toho bylo 13 handlovaných, 12 kontrolních. U stresové hladiny kortikosteronu bylo počítáno s 13 jedinci, z toho bylo 6 jedinců handlovaných, 7 kontrolních

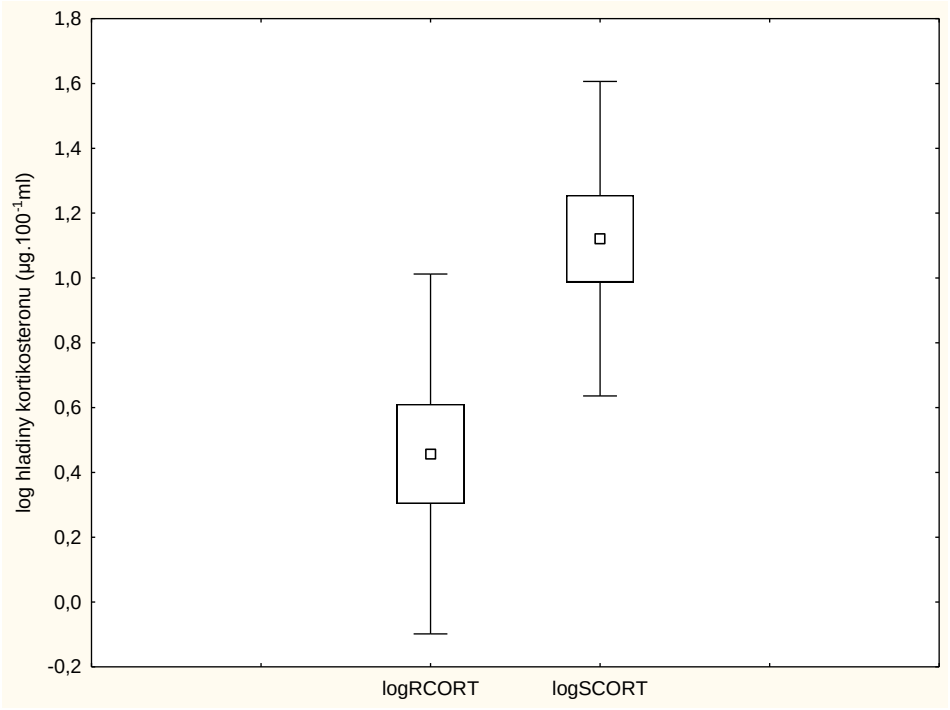
5.1 Reakce hrabošů na stresové podněty

Pomocí párového t-testu byla hodnocena reakce hrabošů v dechové frekvenci na stresor. Byly porovnávány mezi sebou proměnné zlogaritmovaná klidová dechová frekvence (logRBR) a zlogaritmovaná stresová dechová frekvence (log SBR). Bylo zjištěno, že stresová dechová frekvence je průkazně vyšší než klidová dechová frekvence ($n = 35$; $t = -17{,}2$; $df = 34$; $p < 0{,}01$), viz Graf 1. Zatímco průměrná klidová dechová frekvence činila 170 dechů/min^{-1}, průměrná stresová dechová frekvence činila 250 dechů/min^{-1}.



Graf 1: Porovnání klidové dechové frekvence a stresové dechové frekvence. Jedinci měli signifikantně vyšší dechovou frekvenci po stresovém podnětu (n = 35; t =-17,2; df = 34; p<0,01). logRBR = log klidové dechové frekvence; logSBR = log stresové dechové frekvence; ▫ značí průměr; box je ±SE; ⌶ je ±SD

Pomocí párového t-testu byly porovnány mezi sebou proměnné zlogaritmovaná basální hladina kortikosteronu (logRCORT) a zlogaritmovaná stresová hladina kortikosteronu (logSCORT). Bylo zjištěno, že stresová hladina kortikosteronu je signifikantně vyšší než basální (n = 13; t =-3,03; df = 12; p = 0,01), viz Graf 2. Zatímco průměr basální hladiny kortikosteronu byl 2,86 µg.100ml^{-1}, průměr stresové hladiny kortikosteronu byl 13,22 µg.100ml^{-1}.

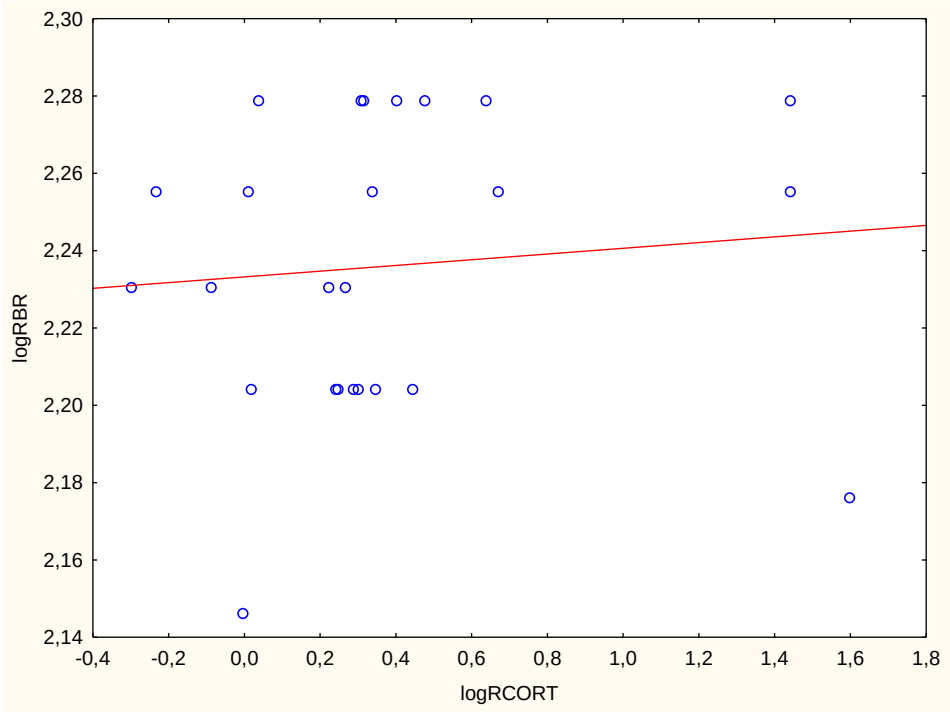


Graf 2: Porovnání basální hladiny kortikosteronu a stresové hladiny kortikosteronu. Stresová hodnota kortikosteronu byla výrazně vyšší než klidová hodnota (n = 13; t =-3,03; df = 12; p = 0,01). logRCORT = log basální hladina kortikosteronu; logSCORT = log stresové hladiny kortikosteronu; ▫ značí průměr; box je ±SE,; ⌶ je ±SD

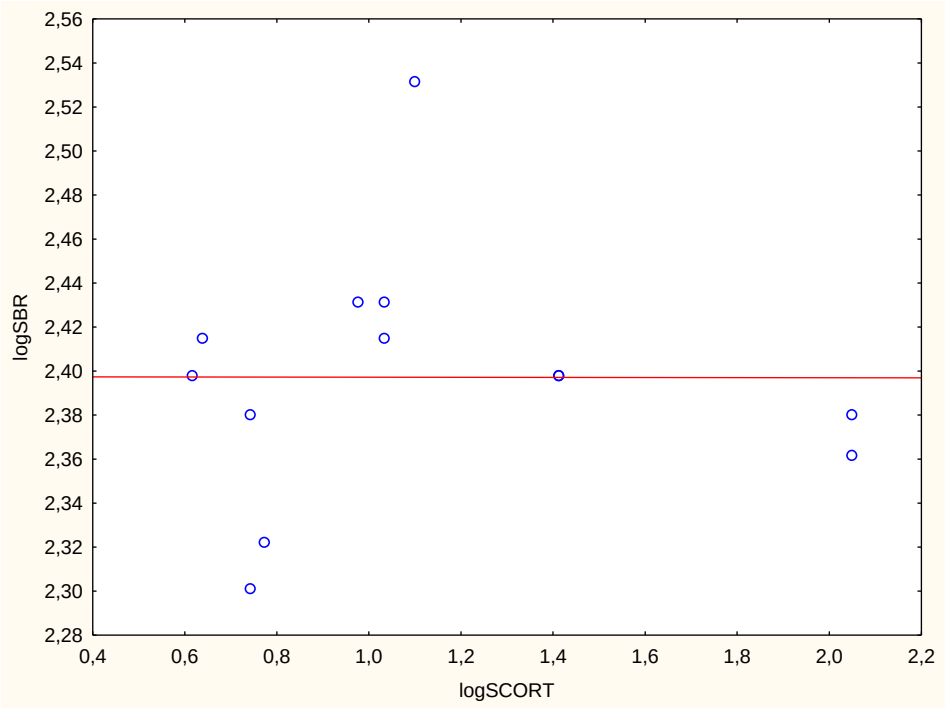
5.2 Vztah mezi dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu

Ke zjištění vztahu mezi klidovými hodnotami sledovaných fyziologických parametrů a zjištění vztahu mezi stresovými hodnotami sledovaných fyziologických parametrů byla použita jednoduchá lineární regrese. Sledovanými klidovými proměnnými byly zlogaritmovaná klidová dechová frekvence (logRBR) a zlogaritmovaná basální hladina kortikosteronu (logRCORT). Sledovanými stresovými proměnnými byly zlogaritmovaná stresová dechová frekvence (logSBR) a zlogaritmovaná stresová hladina kortikosteronu (logSCORT). Z výsledných hodnot (n=25, r=0,095, p=0,65) je patrné, že není signifikantní závislost mezi basálními hodnotami viz Graf. 3.

Dále je z výsledných hodnot (n=13, r= -0,002; p=0,99) patrné, že není signifikantní ani závislost mezi stresovými hodnotami viz Graf 4.



Graf 3: Vztah mezi klidovou dechovou frekvencí a basální hladinou kortikosteronu. Závislost není signifikantní (n = 25, r = 0,095, p = 0,65). Pokud by byl výsledek signifikantní, znamenalo by to, že čím vyšší mají jedinci basální hladinu kortikosteronu, tím je vyšší i jejich klidová dechová frekvence. logRBR = log klidové dechové frekvence, logRCORT = log basální hladiny kortikosteronu)



Graf 4: Vztah mezi stresovou dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu. Závislost není signifikantní (n = 13, r = -0,002; p = 0,99). logSBR = log stresové dechové frekvence, logSCORT = log stresové hladiny kortikosteronu

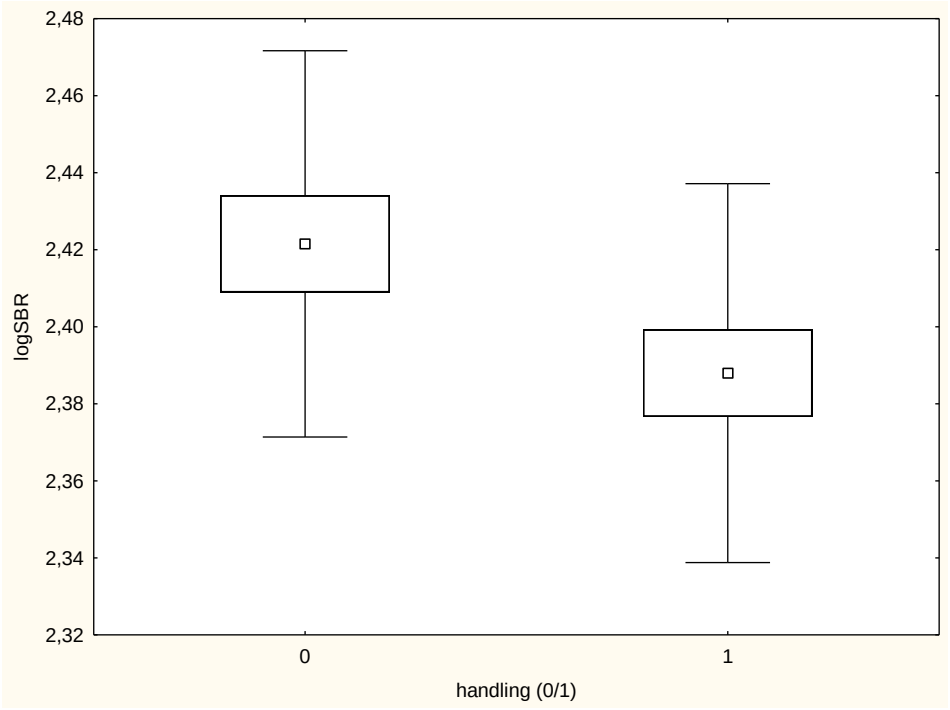
5.3 Vliv handlingu na vybrané fyziologické parametry

Pro zjištění vlivu handlingu na sledované fyziologické parametry byl použit dvouvýběrový t-test.. Výsledné hodnoty t-testů jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Porovnání t-testem handlované a kontrolní skupiny ve fyziologických parametrech

Kontrolní x handlovaná skupina - fyziologické parametry	t	df	p
logRBR	0,949	33	0,34
logSBR	1,99	33	0,05
logRCORT	-0,777	23	0,81
logSCORT	1,228	11	0,25

Zjištěné výsledky prokázali, že handling nemá vliv na basální (klidové) hodnoty fyziologických parametrů, a tedy nelze zamítnout H_{01} na 5% hladině významnosti. Dále též nebyl prokázán vliv handlingu na stresovou hladinu kortikosteronu, téměř signifikantního výsledku však bylo dosaženo u vlivu handlingu na stresovou dechovou frekvenci. Striktně vzato sice nelze zamítnout H_{02} na 5% hladině významnosti, avšak je zde jednoznačná tendence vlivu handlingu na stresovou dechovou frekvenci, viz. Graf 5.



Graf 5: Vliv handlingu na stresovou dechovou frekvenci. Jedinci, kteří prošli handlingem, vykazovali téměř signifikantně nižší stresovou dechovou frekvenci než jedinci kontrolní. (n = 35; t = 1,99; p = 0,05); logSBR = log stresové dechové frekvence; 0 = kontrolní skupina, bez handlingu; 1 = handling skupina; ▫ značí průměr; box je ±SE; I je ±SD).

5.4 Vztah mezi fyziologickými parametry a osobnostními rysy zvířete

K zjištění vztahu mezi stresovou dechovou frekvencí (logSBR) a osobnostními rysy (zastoupené proměnnými OFTubehnuto, OFTcentral, EPMubehnuto, EPMcentral) byla použita jednoduchá lineární regrese. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Závislost mezi behaviorálními proměnnými a stresovou dechovou frekvencí

Behaviorální proměnné	r	p
OFTubehnuto	0,223	0,19
OFTcentral	0,049	0,77
EPMubehnuto	0,239	0,16
EPMcentral	0,099	0,57

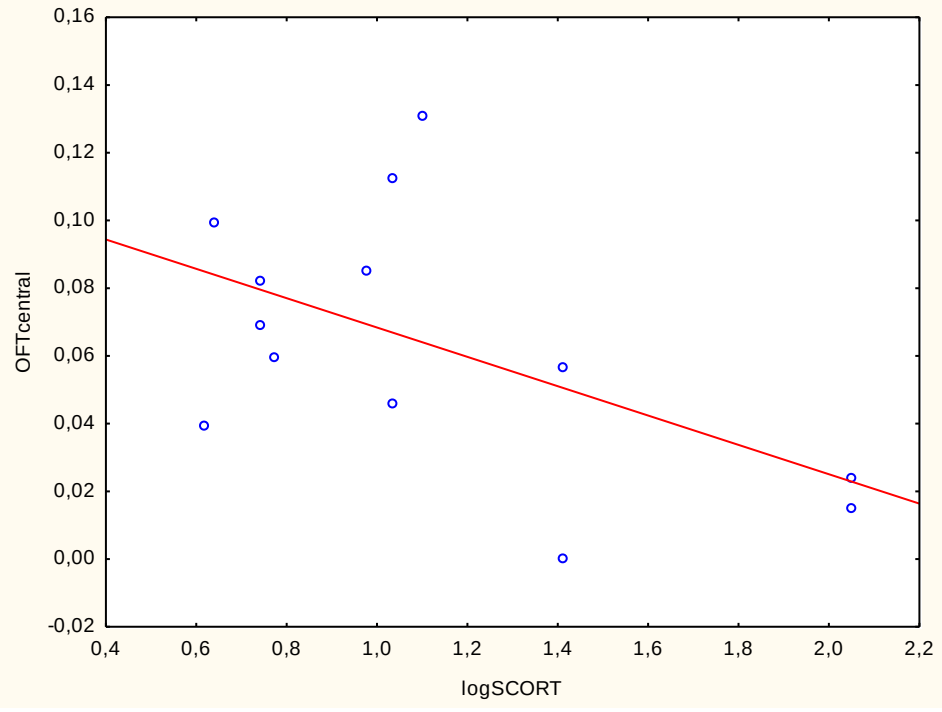
Z výsledných hodnot je patrné, že nebyl nalezen signifikantní vztah mezi osobnostními rysy zvířete a stresovou dechovou frekvencí, H_{03} nelze zamítnout na 5% hladině významnosti.

K zjištění vztahu mezi stresovou hladinou kortikosteronu (logSCORT) a osobnostními rysy (zastoupené proměnnými OFTubehnuto, OFTcentral, EPMubehnuto, EPMcentral) byla použita jednoduchá lineární regrese. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 6.

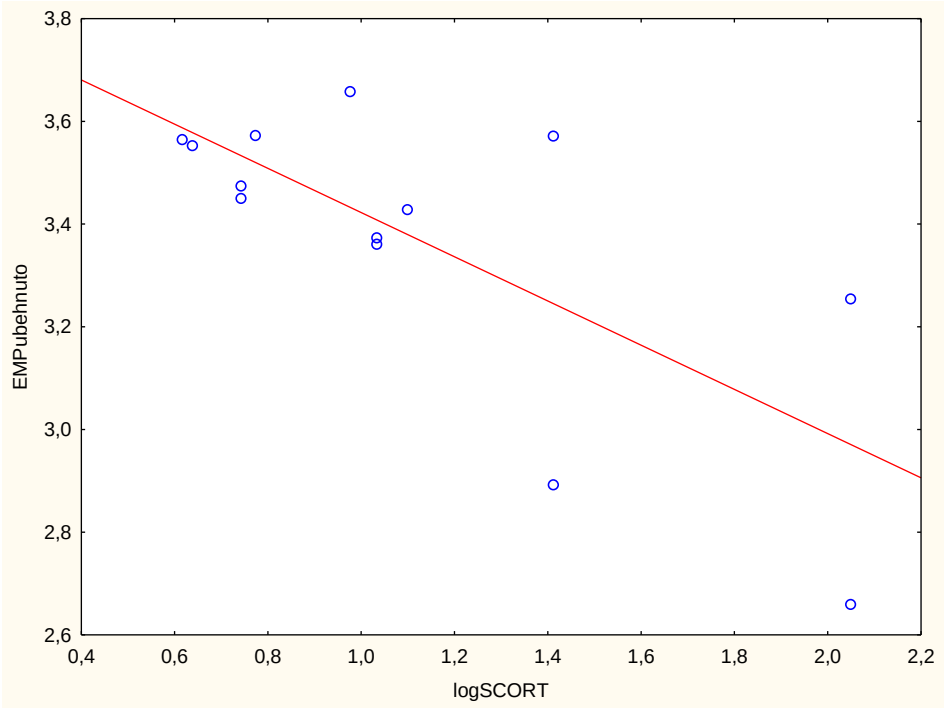
Tab. 6: Závislost mezi behaviorálními proměnnými a stresovou hladinou kortikosteronu

Behaviorální proměnné	r	p
OFTubehnuto	-0,161	0,59
OFTcentral	-0,543	0,05
EPMubehnuto	-0,722	0,005
EPMcentral	0,217	0,47

Byl nalezen téměř signifikantní vztah mezi poměrem vzdáleností, jež zvíře ušlo ve středu OFT k celkové vzdálenosti nachozené v OFT a stresovou hladinou kortikosteronu (viz Graf 6). Dále byl nalezen jasně signifikantní vztah mezi celkovou vzdáleností, kterou zvíře nachodilo v EPM testu a stresovou hladinou kortikosteronu - viz Graf 7. H_{04} lze tedy na 5% hladině významnosti zamítnout.



Graf 6: Závislost podílu vzdálenosti uběhlé ve středu arény z celkové uběhlé dráhy (OFTcnetral) na stresové hladině kortikosteronu (logSCORT). Zvíře s vyšší stresovou hladinou kortikosteronu uběhlo ve středu OFT kratší vzdálenost v poměru s celkovou trajektorií, oproti zvířeti s nižší stresovou hladinou, tato závilsost byla téměř signikikantní (n = 13; r = -0,543, p = 0,05).



Graf 7: Závislost celkové vzdálenosti ušlé v EPM (EPMubehnuto) na stresové hladině kortikosteronu (logSCORT). Zvíře s vyšší stresovou hadinou kortikosteronu ušlo v EPM signifikantně kratší vzdálenost, oproti zvířeti s nižší stresovou hladinou (n = 13; r = -0,722; p = 0,005).

6. Diskuze

6.1 Reakce hrabošů na stresové podněty

V obou parametrech, jak v dechové frekvenci, tak v hladině kortikosteronu, došlo v reakci na stresor k signifikantnímu navýšení těchto hodnot, oproti klidovým hodnotám. To je zcela v souladu s fyziologickými poznatky u obratlovců, kdy v reakci na stresové podněty dochází v těle ke komplexní alarmové reakci a navýšení dechové frekvence a hladiny kortikosteronu jsou její nedílnou součástí (např. Renwrantz & Spielvogel, 2011; Reeder & Kramer, 2005). Zvýšení dechové frekvence ve stresové situaci dokládá dlouhá řada dalších studií (např. na ptácích Carere & van Oers, 2004; Fucikova et al., 2009; rybách Barreto & Volpato, 2011; Barreto et al., 2003; Barreto & Volpato, 2004; Bell et al., 2010; savcích Jürgens et al., 1996 aj.) i má předchozí bakalářská práce (Janochová, 2014). Stejně tak vyšší hladinu kortikosteronu vyvolanou stresovými podněty můžeme nalézt v mnoha studiích (např. na potkanech Armario et al., 1986; Papaioannou et al., 2002; Haemisch et al., 1999; Vallée et al., 1996; myších Veenema et al. 2003; hraboších Gracceva et al., 2014; DeVries et al., 1997). Z toho vyplývá, že v provedených testech byly na jedné straně použity adekvátní stresové podněty a na druhé straně, že kontrolní zvířata byla pravděpodobně v náležitém klidovém stavu. U některých behaviorálních dat pak je možno je spojovat s fyziologicky ověřenou úrovní stresu či stresové odolnosti.

Avšak různé stresové podněty vyvolávají u zvířat různě vysokou míru stresové reakce. Stresory můžeme tak označit za mírné, střední, vysoké intenzity (Armario et al., 1986). Studie Armaria et al. (1986) ukazuje, že spolu se zvyšováním intenzity stresového podnětu se u potkanů zvyšovala úměrně i stresová hladina glukokortikoidů. Toto by mohlo být zdrojem rozdílnosti mezi jednotlivými laboratořemi, v nichž by mohly stejné podněty vyvolávat poněkud odlišné reakce v závislosti na habiuaci.

Také ne každý jedinec reaguje na stejný stresový podnět stejnou fyziologickou stresovou reakcí. Do hry vstupuje jeho osobnostní typ, vztah mezi osobnostními rysy a fyziologickými parametry v reakci na stresor je tak označován jako coping style (Koolhaas et al., 1999) a je analyzován v mnoha studiích (např. na ptácích Fucikova

et al., 2012; Carere & van Oers,, 2004; na hlodavcích Sgoifo et al., 1996; Gracceva et al., 2014; Veenema et al., 2003). V síle odpovědi na stresový faktor může hrát roli i vliv dlouhodobého handlingu doložen v několika studiích (např. Vallée et al., 1996; Meerlo et al., 1999; Panagiotaropoulus et al., 2004). Proto i zde jsem se dále zaměřila na možnost propojení osobnostního typu hraboše a jeho fyziologických parametrů, a zda handling ovlivňuje zde zkoumané fyziologické parametry hraboše.

6.2 Vztah mezi dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu

Zde nebyla nalezena signifikantní korelace mezi dechovou frekvencí a hladinou kortikosteronu, a to ani u jedince v klidu ani po stresovém podnětu, to může být dáno malým počtem jedinců, kdy by nemusela být tato korelace podchycena.

Podobně ani Ferrari et al. (2013) na divoké populaci svišťů nenalezli korelaci mezi dechovou frekvencí a kortizolem (glukokortikoidní hormon) nebo tepovou frekvencí a kortizolem, zatímco nalezli pozitivní korelaci mezi tepovou a dechovou frekvencí. Stejně tak studie na sviňuchách (*Phocoena phocoena*) nenalezla korelaci mezi kortizolem a dechovou frekvencí, nebo kortizolem a tepovou frekvencí (Eskesen et al., 2009).

V reakci na stresor dochází v organismu k celé kaskádě fyziologických změn, které dohromady připravují jedince na útok-útěk. Daleko dříve, než kortikosteron (nebo kortizol) je do těla vyplaven adrenalin, v jeho působení následně dochází k zvýšení dechové a tepové frekvence, za delší dobu po adrenalinu jsou až na základě ACTH vyplaveny do těla glukokortikoidy, které zvyšují např. glukoneogenezi a krevní tlak (Reeder & Kramer, 2005; Rietmann et al., 2004; Renwrantz & Spielvogel, 2011; Sapolsky et al., 2000). Je tedy možné, že spojitost mezi kortikosteronem a dechovou frekvencí není možné bez dalších fyziologických parametrů odhalit. Navíc, v práci zde, k zjištění stresové dechové frekvence a stresové hladiny kortikosteronu byl použit jiný stresor, a testy byly provedeny v jiných dnech i když ve stejnou denní dobu. Možná to mohlo hrát určitou roli v nenalezení signifikantního výsledku.

6.3 Vliv handlingu na vybrané fyziologické parametry

6.3.1 Vliv handlingu na basální hladiny fyziologických parametrů

Papaioannou et al. (2002) zjistili, že handlovaní jedinci vykazovali nižší basální hladinu kortikosteronu oproti jedincům nehandlovaným. Avšak zde nebyl pozorován vliv handlingu ani na basální hladinu kortikosteronu, ani na klidovou dechovou frekvenci. Stejně také Costa et al. (2012) nezaznamenali rozdíl v basální hladině kortikosteronu mezi handlovanou a kontrolní skupinou. To však dokazuje, že i když handling nesnížil basální (klidové) hodnoty fyziologických parametrů, nepůsobil na jedince jako chronický stres a zvířata naopak dokázala handling dobře přijímat a adaptovat se na něj (Costa et al., 2012).

6.3.2 Vliv handlingu na stresové hodnoty fyziologických parametrů

V této práci nebyl prokázán vliv handlingu na stresovou hladinu kortikosteronu u hraboše polního. To je v rozporu s jinými studiemi, které nalezly, že handlovaní jedinci měli v reakci na stresor nižší hladinu kortikosteronu oproti nehandlovaným jedincům (Meerlo et al., 1999; Panagiotaropoulus et al., 2004). Vallée et al., (1996) dokonce zjistili, že u handlovaných jedinců se hladina kortikosteronu vyvolaná stresorem vracela rychleji do původního stavu, před vyvoláním stresu. Papaioannou et al. (2002), kteří sice nalezli u potkanů vliv handlingu na basální hladinu kortikosteronu, též nenalezli vliv handlingu na stresovou hladinu kortikosteronu. Jejich vysvětlení dává do souvislosti rozdílně zvolený čas odběru krve. Avšak Meerlo et al. (1999), kteří měli za studovaný objekt též potkany, nalezli při odběru ve stejný čas, tedy v 5. minutě ihned po ukončení testu, signifikantní rozdíl mezi handlovanou a kontrolní skupinou. Možností, že zde nebyl nalezen vztah mezi handlingem a stresovou hladinou kortikosteronu, by však mohlo být dáno malým počtem vzorků, tudíž je možné, že na tak malém počtu vzorků nedokázal statistický test vliv handlingu odhalit.

Zatímco nebyl nalezen vliv handlingu na stresovou hladinu kortikosteronu, vykazovali handlovaní jedinci oproti nehandlovaným tendenci k nižší stresové dechové frekvenci. Zvýšení dechové frekvence ve stresových situacích je však dáno aktivitou sympatika a vyplavením katecholaminů (např. Renwrantz & Spielvogel, 2011). Takže nižší stresová dechová frekvence u handlovaných jedinců by mohla

poukazovat na to, že při stresovém podnětu došlo k nižšímu vyplavení katecholaminů, než u jedinců, kteří neprošli handlingem. Toto tvrzení se shoduje se studií Meerla et al. (1999) na potkanech, kde kromě nižší stresové hladiny kortikosteronu a prolaktinu u handlovaných jedinců nalezli i nižší hladinu adrenalinu.

6.4 Vztah mezi fyziologickými parametry a osobnostními rysy zvířete

6.4.1 Vztah mezi stresovou dechovou frekvencí a osobnostními rysy zvířete

Zde nebyl prokázán vztah mezi osobnostním rysem zvířete a dechovou frekvencí. To je v rozporu s mou bakalářskou prací na stejném druhu a studií Carere & van Oers (2004) na sýkorách koňadrách a studií Barreta a Volpata (2011) na rybách, kde jedinci projevující se jako „bold" vykazovali nižší stresovou dechovou frekvenci oproti jedincům „shy". Nicméně i další studie ukazují rozporuplné výsledky dechové frekvence, kdy Fucikova et al. (2009) na sýkorách koňadrách zjistili (oproti předešlé studii), že bold jedinci vykazovali vyšší dechovou frekvenci. V těchto dvou případech by mohl hrát vliv věk pozorovaných sýkor, kdy v prvním případě se jednalo o dospělce a v druhém o juvenily. Studie Davida et al. (2012) pak nedokládá žádný vztah mezi osobností jedince a stresovou dechovou frekvencí. Rozdílné výsledky by mohly být dány odlišnou metodikou. Zde a v bakalářské práci však byli testováni jedinci v dospělosti, i když v případě mé bakalářské práce byli testováni starší jedinci. Jelikož pro měření dechové frekvence byla použita stejná metodika měření jako v bakalářské práci, rozdílný výsledek tedy nemůže být vysvětlen odlišným způsobem měření dechové frekvence. Z tohoto důvodu by bylo potřebné ještě prozkoumat možné vlivy a souvislosti v další práci.

6.4.2 Vztah mezi stresovou hladinou kortikosteronu a osobnostními rysy zvířete

Na rozdíl od SBR byla u stresové hladiny kortikosteronu zjištěna korelace s behaviorálními osobnostními rysy jedince, které se odrážejí v trajektorii pohybu zvířete v EPM a poměru délky ušlé ve středu arény OFT k celkové dráze v OFT. Zvířata projevující se v behaviorálních testech jako „bold" (odvážná) s nachozenou delší trajektorií v EPM a delší nachozenou trajektorií ve středu arény v poměru

k celku, vykazovala nižší hladinu kortikosteronu vyvolanou stresorem, zde „Novelty stress“, oproti „shy“ zvířatům.

Koolhaas et al. (1999) vysvětlují tento vztah tím, že proaktivní (odvážní „bold“) jedinci se projevují v reakci na stresový stimul nižší reaktivitou HPA osy, a tím i nižší odpovědí ve vyplavení kortikosteronu do krve. To lze vidět např. ve studii de Boer et al. (1990), kteří zjistili, že aktivní vyhýbání se u potkanů v „shock-prod avoidance behavior“ testu bylo spojeno zároveň s nižší stresovou hladinou kortikosteronu, zatímco pasivní vyhýbání se (freezing) bylo spojeno s vyšší stresovou hladinou kortikosteronu.

Podobně Veenema et al. (2003) dokládají z testu nuceného plavání na myších, že jedinci vyselektované LAL linie (reaktivní jedinci) se projevovali delší dobou imobility a zároveň vyšší hladinou kortikosteronu, u které navíc trvalo delší dobu, než se vrátila k původní hladině, oproti jedincům linie SAL (proaktivní jedinci).

Též studie od autorů Gracceva et al. (2014) na hraboši polním zabývající se vlivem sezóny dokládá tento vztah. Hraboši byli v juvenilním věku podrobeni simulovaným podmínkám léta a zimy. Jedinci ovlivnění zimními podmínkami se projevovali jako „shy“, vykazovali nižší tělesnou váhu, nižší aktivitu a vyšší hladinu stresového kortikosteronu, oproti jedincům pod vlivem letních podmínek, projevujícím se celkově jako „bold“.

Tento vztah, kdy reaktivní (shy) jedinci se projevují zároveň vyšší stresovou hladinou kortikosteronu oproti jedincům proaktivním (bold), lze nalézt i v dalších studiích (např. na ptácích Korte et al., 1997; Carere et al., 2003; prasetech Schouten & Wiegant, 1997).

7. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, zda handling ovlivňuje sledované fyziologické parametry u hraboše polního. Handling nezvýšil basální hodnoty sledovaných parametrů, což by mohlo znamenat, že nepůsobil u handlovaných zvířat chronický stres, a zvířata se na něj dokázala adaptovat. I když nebyl nalezen rozdíl mezi stresovou hladinou kortikosteronu u handlovaných a kontrolních jedinců, handlovaní jedinci vykazovali prakticky nižší stresovou dechovou frekvenci oproti kontrolním jedincům. To poukazuje na to, že handling může pozitivně ovlivnit fyziologické reakce na stresový podnět.

Dalším cílem bylo zjistit, zda vybrané fyziologické parametry souvisí s behaviorálními osobnostními rysy zvířete. Na rozdíl od mé bakalářské práce, v této práci nebyl nalezen vztah mezi stresovou dechovou frekvencí a behaviorálními rysy zvířete. Přesto dechová frekvence ve spojitosti s behaviorálními rysy stojí dále za pozornost, jedná se o neinvazivní metodu, která může přinést zajímavé výsledky.

Nalezen zde byl ale vztah mezi stresovou hladinou kortikosteronu a behaviorálními rysy zvířete. Jedinci projevující se v behaviorálních testech jako „bold“ měli nižší hladinu kortikosteronu oproti jedincům „shy“. Tento parametr spolu s behaviorálními testy tedy může být využíván k ověření osobnostního typu zvířete.

8. Seznam použité literatury

Altimiras, J., & Larsen, E. (2000). Non-invasive recording of heart rate and ventilation rate in rainbow trout during rest and swimming. Fish go wireless!. *Journal of Fish Biology*, *57*(1), 197-209.

Altmann, J. (1974). Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour*, 49(3), 227-266.

Anděra, M., & Gaisler, J. (2012). Savci České republiky: popis, rozšíření, ekologie, ochrana. Praha, Academia, 288pp.

Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a°review. *Animal Behaviour*, *21*(2): 205–235

Armario, A., Montero, J. L., & Balasch, J. (1986). Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiology & behavior*, *37*(4), 559-561.

Axelrod J., & Reisine T.D. 1984: Stress hormones: their interaction and regulation. Science, 224(4648), 452-459.

Ayala, I., Martos, N. F., Silvan, G., Gutierrez-Panizo, C., Clavel, J. G., & Illera, J. C. (2012). Cortisol, adrenocorticotropic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in veterinary science*, *93*(1), 103-107.

Bamberg, E., Palme, R., & Meingassner, J. G. (2001). Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. *Laboratory Animals*, *35*(4), 307-314.

Barr, N. L. (1954). Radio transmission of physiological information. *Mil. Med*. 114, 79.

Barreto, E. R., Luchiari, A. C., & Marcondens, A. L. (2003). Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naive *Nile tilapia*. *Behavioural Processes*, 60, 235-239.

Barreto, R. E., & Volpato, G. L. (2004). Cauting for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioural Processes*, 66, 43-51.

Barreto, R. E., & Volpato, G. L. (2011). Ventilation rates indicate stress-coping styles in Nile tilapia. *Journal of biosciences*, *36*(5), 851-855.

Bastian, H. V. (1984). Die Änderung der Herzfrequenz als Maß der Erregung-eine Literaturübersicht. *Die Vogelwarte*, 32, 226-233.

Bauer, C. M., Hayes, L. D., Ebensperger, L. A., & Romero, L. M. (2014). Seasonal variation in the degu (Octodon degus) endocrine stress response. *General and Comparative Endocrinology*, *197*, 26-32.

Bauer, C.M., Glassman, L.W., Cyr, N.E. & Romero, L.M. (2011). Effects of predictable and unpredictable food restriction on the stress response in molting and non-molting European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Comparative Biochemistry and Physiology,* 160 (3), 390–399.

Bell, A. M., Henderson, L., & Huntingford, F. A. (2010). Behavioral and respiratory responses to stressors in multiple populations of three-spined sticklebacks that differ in predation pressure. *Journal Comp Physio,* 180(2), 211-220.

Bennett, A., & Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology*, *39*(3), 171-180

Benus, R. F., Bohus, B., Koolhaas, J. M., & Van Oortmerssen, G. A. (1991). Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia*, 47(10), 1008–1019.

Benus, R. F., Bohus, B., Koolhaas, J. M.,van Oortmerssen, G. A. (1990). Behavioural strategies of aggressive and non-aggressive male mice in response to inescapable shock. *Behavioural Processes*, 21(2), 127-141.

Biro, P. A., & Dingemanse, N. J. (2009). Sampling bias resulting from animal personality. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 66–67.

Blanchard, R. J., Flanelly, K. J., & Blanchard, D. C. (1986). Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus. Journal of comperative psychology,* 100(2), 101-107.

Bortolotti, G. R., Marchant, T., Blas, J., & Cabezas, S. (2009). Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. *Journal of Experimental Biology*, *212*(10), 1477-1482.

Botreau, R., Veissier, I., Butterworth, A., Bracke, M. B. M., & Keeling, L. J. (2007). Definition of criteria for overall assessment of animal welfare. *Animal welfare-potters bar then wheathampstead*, *16*(2), 225.

Boyce, C. C. K., & Boyce, J. L. (1988a). Population Biology of *Microtus arvali*s. I. Lifetime Reproductive Success of Solitary and Grouped Breeding Females. The Journal of Animal Ecology, 57(3), 711.

Boyce, C. C. K., & Boyce, J. L. (1988b). Population Biology of *Microtus arvalis*. II. Natal and Breeding Dispersal of Females. The Journal of Animal Ecology, 57(3), 723.

Boyce, C. C. K., & Boyce, J. L. (1988c). Population Biology of *Microtus arvalis*. III. Regulation of Numbers and Breeding Dispersion of Females. The Journal of Animal Ecology, 57(3), 737.

Boyce, W. T., Champoux, M., Suomi, S. J., & Gunnar, M. R. (1995). Salivary cortisol in nursery-reared rhesus monkeys: Reactivity to peer interactions and altered circadian activity. *Developmental Psychobiology*, *28*(5), 257-267.

Cannon, W. (1915). Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage. ed. *Appleton & Company*. In: Koolhaas et al. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews,* 23(7), 925-935.

Carere, C., & Locurto, Ch., (2011). Interaction between animal personality and animal cognition. *Current Zoology*, 57(4), 491-498.

Carere, C., & van Oers,K. (2004). Shy and bold great tits (*Parus major*): body temperature and breath rate in response to handling stress. *Physiology & behavior*, 82(5), 905-912.

Carere, C., Groothuis, T. G. G., Möstl, E., Daan, S., & Koolhaas, J. M. (2003). Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. *Hormones and Behavior, 43*(5), 540-548.

Cavigelli S.A., Monfort S.L., Whitney T.K., Mechref Y.S., Novotny M. & McClintock M.K. 2005: Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. *Journal of Endocrinology,* 184(1), 153-163.

Cirulli, F., Berry, A., Bonsignore, L. T., Capone, F., D'Andrea, I., Aloe, L., Branchi, I., & Alleva, E. (2010). Early life influences on emotional reactivity: evidence that social enrichment has greater effects than handling on anxiety-like behaviors, neuroendocrine responses to stress and central BDNF levels. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 34*(6), 808-820.

Coleman, K., Wilson, D. S. (1998). Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish: individual differences are context specific. *Animal Behaviour,* 56: 927-936.

Costa, R., Tamascia, M. L., Nogueira, M. D., Casarini, D. E., & Marcondes, F. K. (2012). Handling of adolescent rats improves learning and memory and decreases anxiety. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 51*(5), 548-553.

Costela, C., Tejedor-Real, P., Mico, J. A., & Gibert-Rahola, J. (1995). Effect of neonatal handling on learned helplessness model of depression. *Physiology & behavior*, 57(2), 407-410.

Crosfill, M. L., & Widdicombe, J. (1961). Physical characteristics of the chestandlungs and the work of breathing in different mammalian species. *The Journal of physiology,* 158(1), 1-14.

Curley, J. P., Davidson, S., Bateson, P., & Champagne, F. A. (2009). Social enrichment during postnatal development induces transgenerational effects on emotional and reproductive behavior in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *3*, 25.

Daan, S., & Slopsema, S. (1978). Short-term rhytms in foraging behaviour of the common vole, Microtus arvalus. *Journal of comparative Physiology,* 127(3), 215-227.

Dallmann, R., Touma, C., Palme, R., Albrecht, U., & Steinlechner, S. (2006). Impaired daily glucocorticoid rhythm in Per1 Brd mice. *Journal of Comparative Physiology A*, *192*(7), 769-775.

David, M., Auclair, Y., Dechaume-Moncharmont, F. X., & Cézilly, F. (2012). Handling Stress Does Not Reflect Personality in Female Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*). *Journal of Comparative Psychology*, 126(1), 10-14.

De Boer, S. F., Slangen, J. L., & Van der Gugten, J. (1990). Plasma catecholamine and corticosterone levels during active and passive shock-prod avoidance behavior in rats: effects of chlordiazepoxide. *Physiology & behavior*, 47(6), 1089-1098.

De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(6), 463-475.

de Paula, H. M. G., Gouveia, A., de Almeida, M. V., & Hoshino, K. (2005). Anxiety levels and wild running susceptibility in rats: assessment with elevated plus maze test and predator odor exposure. *Behavioural processes*, 68(2), 135-144.

de Ruiter, A. J. H., Koolhaas, J. M., Kijser J. N., van Oortmerssen, G. A., Bohus, B. (1992). Differential testosterone secretory capacity of the testes of aggressive and nonaggressive house mice during ontogeny. *Aggressive behavior,* 18 (2): 149-157.

DeVries, A. C., Gerber, J. M., Richardson, H. N., Moffatt, C. A., Demas, G. E., Taymans, S. E., & Nelson, R. J. (1997). Stress affects corticosteroid and immunoglobulin concentrations in male house mice (Mus musculus) and prairie voles (Microtus ochrogaster). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *118*(3), 655-663.

Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, JM, & Vorstenbosch, C. V. D. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of applied Toxicology*, *21*(1), 15-23.

Dikošová, T. (2016). Vliv handlingu na osobnostní rysy hraboše polního (*Microtus arvalis*). České Budějovice: Diplomová práce, PRF Jihočeské univerzity.

Dingemanse, N. J., Both, C., Van Noordwijk, A. J., Rutten, A. L., & Drent, P. J. (2003). Natal dispersal and personalities in great tits (Parus major). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *270*(1516), 741-747.

Dobly, A. (2008). Breeding suppression between two unrelated and initially unfamiliar females occurs with or without social tolerance in common voles (Microtus arvalis). Journal of Ethology, 27(3), 299–306.

Drent, P. J., van Oers, K., & van Noordwijk, A. J. (2003). Realized heritability of personalities in the great tit (*Parus major*). *Proceedings of the Roal Society of London* B, 270, 45-51.

Durand, M., Sarrieau, A., Aguerre, S., Mormede, P., & Chaouloff, F. (1998). Differential effects of neonatal handling on anxiety, corticosterone response to stress, and hippocampal glucocorticoid and serotonin (5-HT) 2A receptors in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology*, *23*(4), 323-335.

Eilam, D., Dayan, T., Ben-Eliyahu, S., Schulman, I., Shefer, G., & Hendrie, C. A. (1999). Differential behavioural and hormonal responses of voles and spiny mice to owl calls. *Animal Behaviour*, *58*(5), 1085-1093.

Engel, G. L., & Schmale, A. H. (1972).Conservation withdrawal: a primary regulatory process for organic homeostasis Physiology, emotions and psychosomatic illness, Elsevier, New York, pp. 57–95. In: Koolhaas et al. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews,* 23(7), 925-935.

Eskesen, I. G., Teilmann, J., Geertsen, B. M., Desportes, G., Riget, F., Dietz, R., Larsen, F., & Siebert, U. (2009). Stress level in wild harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) during satellite tagging measured by respiration, heart rate and cortisol. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(05), 885-892.

Fairbanks L. A. (1993). Risk-taking by juvenile vervet monkeys. *Behaviour*, 124, 57-72.

Feaver, J.,Mendl, M., & Bateson, P. (1986). A°method for rating the individual distinctiveness of domestic cats. *Animal Behaviour,* 34(4), 1016-1025.

Ferrari, C., Pasquaretta, C., Carere, C., Cavallone, E., von Hardenberg, A., & Réale, D. (2013). Testing for the presence of coping styles in wild mammal. *Animal Behaviour,* 85, 1385-1396.

Fletcher, Q. E., & Boonstra, R. (2006). Impact of live trapping on the stress response of the meadow vole *(Microtus pennsylvanicus*). *Journal of Zoology*, *270*(3), 473-478.

Fucikova E., Drent P. J., Smits N., & van Oers, K. (2009). Handling Stress as measurement of personality in Great Tit Nestlings (*Parus major*). *Ethology*, 115, 366-374.

Gosling, S. D. (2001). From mice to men: what can we learn about personality from animal research?. *Psychological bulletin*, *127* (1): 45-86.

Gosling, S. D., & John, O. P. (1999). Personality Dimensions in Nonhuman Animals: A Cross-Species Review. *Current Directions in Psychological Science*, 8(3), 69–75.

Gracceva, G., Herde, A., Groothuis, T. G., Koolhaas, J. M., Palme, R., & Eccard, J. A. (2014). Turning shy on a winter's day: effects of season on personality and stress response in Microtus arvalis. *Ethology*, *120*(8), 753-767.

Groothuis, T. G., & Carere, C. (2005). Avian personalities: characterization and epigenesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), 137-150.

Haemisch, A., Guerra, G., & Furkert, J. (1999). Adaptation of corticosterone-but not β-endorphin-secretion to repeated blood sampling in rats. *Laboratory animals*, *33*(2), 185-191.

Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385-403.

Hemsworth, P. H., & Barnett, J. L. (1987). Human-animal interactions. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *3*(2), 339-356.

Henriksen, R., Groothuis, T. G., & Rettenbacher, S. (2011). Elevated plasma corticosterone decreases yolk testosterone and progesterone in chickens: linking maternal stress and hormone-mediated maternal effects. *PloS one*, *6*(8), e23824, 1-8.

Herde, A., & Eccard, J. A. (2013). Consistency in boldness, activity and exploration at different stages of life. *BMC ecology*, 13(49), 1-10.

Hill R., Wyse G. & Anderson M. 2004: Animal physiology. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 77pp. ISBN 0878933158

Holišová V. (1959): Potrava hraboše polního. In: Kratochvíl, J. (ed.): Hraboš polní *Microtus arvalis*. ČSAV, Praha: 120-129 pp.

Ishii, K., Kuwahara, M., Tsubone, H., & Sugano, S. (1996). The telemetric monitoring of heart rate, locomotor activity, and body temperature in mice and voles (*Microtus arvalis*) during ambient temperature changes. *Laboratory animals*, *30*(1), 7-12.

Itoh, K. (1997). Personality assessment in primates. *Reichorui Kenkyu/Primate Research* 13(1), 64.

Janochová, L. (2014). Vnitrodruhová variabilita dechové frekvence během stresové reakce u hraboše polního (*Microtus arvalis*). České Budějovice: Bakalářská práce, ZF Jihočeské univerzity.

John, O. P. (1990). The "Big Five" factor taxonomy: Dimensions of personality in the natural language and in questionnaires. In L. A. Pervin (Ed.), *Handbook of Personality: Theory and Research.* New York: Guilford Press. 66–100.

Jones, R. B., Mills, A. D., & Faure, J. M. (1991). Genetic and experiential manipulation of fear-related behavior in Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Comparative Psychology*, *10*(1), 15-24.

Jürgens, K. D., Fons, R., Peters, T., & Sender, S. (1996). Heart and respirátory rates and their signifikance forconvective oxygen transport rates in the smallest mammal, the etruscan shrew Suncus etruscus. *The Journal of experimental biology,* 199(12), 2579-2584.

Kagan, J., Reznick, J.S.& Snidman, N. (1987). The physiology and psychology of behavioral inhibition in children. *Child Development,* 58 (6): 1459-1473.

Kleinman, L., & Radford, E. P. (1964). Ventilation standart for small mammals. *Journal of applied physiology,* 19(2), 360-362.

Kobelt, A. J., Hemsworth, P. H., Barnett, J. L., & Butler, K. L. (2003). Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in veterinary science, 75*(2), 157-161.

Koolhaas , J. M., Korte, S. M., de Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A. W., & Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews,* 23(7), 925-935.

Koolhaas, J. M., de Boer, S. F., Coopens, C. M., & Buwalda, B. (2010). Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. Frontiers in Neuroendocrinology, 31, 307-321

Korte, S.M., Beuving, G., Ruesink, W., Blokhuis, H.J. 1997. Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from high and low feather pecking lines of laying hens. *Physiology & Behavior*, 62:437-441

Koudela, K. (2003). Výměna plynů mezi organismem a°prostředím, hlasové projevy. In Jelínek, P., Koudela, K. (eds.): Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a°lesnická univerzita v°Brně, Brno: 414°pp.

Kralj-Fišer, S., Weiß, B. M., & Kotrschal, K. (2010). Behavioural and physiological correlates of personality in greylag geese (*Anser anser*). *Journal of Ethology*, *28*(2), 363-370.

Kramer, K., Kinter, L., Brockway, B. P., Voss, H. P., Remie, R., & Van Zutphen, B. L. (2001). The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent

advances. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 40(1), 8-16.

Kratochvíl, J., Balát, F., Grulich, I., Holišová, V., Pelikán, J., Sýkora, I., Zapletal, M. (1959). Hraboš polní *Microtus arvalis*. ČSAV, Praha: 359 pp.

Künzl, C., Kaiser, S., Meier, E., & Sachser, N. (2003). Is a wild mammal kept and reared in captivity still a wild animal?. *Hormones and Behavior*, *43*(1), 187-196.

Lantová, P., Šíchová, K., Sedláček, F., & Lanta, V. (2011). Determining Behavioural Syndromes in Voles - The Effects of Social Environment. *Ethology*, 117(2), 124–132.

Lundt, A., Wormuth, C., Siwek, M. E., Müller, R., Ehninger, D., Henseler, C., Broich, K., Papazoglou, A., & Weiergräber, M. (2015). EEG radiotelemetry in small laboratory rodents: a powerful state-of-the art approach in neuropsychiatric, neurodegenerative, and epilepsy research. *Neural plasticity*, 2016.

Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 434-445.

MacDonald, W. B. (1983). The wetness of a°dogs nose. *Malahat Review* 63: 157.

Matteri, R. L., Carroll, J. A., & Dyer, C. J. (2000). Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg G. P., Mench J.A. (eds): The Biology of Animal Stress. CABI Publishing: Oxon/New York, UK/USA, pp. 43-76.

Meerlo, P., Horvath, K. M., Nagy, G. M., Bohus, B., & Koolhaas, J. M. (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of neuroendocrinology*, *11*(12), 925-934.

Moberg G.P. (2000): Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg G. P., Mench J.A. (eds): The Biology of Animal Stress. CABI Publishing: Oxon/New York, UK/USA, pp. 1-21.

Moravec J. (1985). Age structures in a°wild population of *Microtus arvalis* during its population cycle (Mammalia: Rodentia). *Věštník československé Společnosti zoologické,* 49: 123-131.

Morton, D. B., Abbot, D., Barclay, R., Close, B. S., Ewbank, R., Gask, D., ... & Southee, J. (1993). Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals*, *27*(1), 1-22.

Möstl E., & Palme R. (2002): Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology*, 23(1), 67-74.

Möstl, E., Rettenbacher, S., & Palme, R. (2005). Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1046*(1), 17-34.

Niethammer, J., & Krapp, F. (1982). Handbuch der Säugetiere Europas, Band 2/I: Nagetiere II: Cricetidae, Arvicolidae, Zapodidae, Spalacidae, Hystricidae, Capromyidae. Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden, 649 pp.

Palme R., Rettenbacher S., Touma C., El-Bahr S.M. & Möstl E. 2005: Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. Annals of the New York Academy of Sciences, 1040(1), 162-171.

Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1046*(1), 75-80.

Palme, R. (2012). Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare-The UFAW Journal*, *21*(3), 331.

Panagiotaropoulos, T., Papaioannou, A., Pondiki, S., Prokopiou, A., Stylianopoulou, F., & Gerozissis, K. (2004). Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology*, *79*(2), 109-118.

Pelikán (1959a). Stanoviště sídliště a°etologie. In Kratochvíl, J. (ed.): Hraboš polní *Microtus arvalis*. ČSAV, Praha: 80-100 pp.

Pelikán (1959b). Rozmnožování a°populační dynamika. In Kratochvíl, J. (ed.): Hraboš polní *Microtus arvalis*. ČSAV, Praha: 130-166 pp.

Pelikán J. (1955): Studie über die Standorte von *Microtus arvalis* Pall. Práce Brněnské Základny ČSAV 27: 1-32.

Pelikán, J., Gaisler, J., & Rödl, P. (1979). Naši savci. Praha, Academia, 163pp. ISBN 21-003-78.

Pervin, L. A., & John, O. P. (Eds.). (1999). Handbook of personality: theory and research (2nd ed.). New York, Guilford Press. ISBN 157-2-3048-39.

Place, N. J., & Kenagy, G. J. (2000). Seasonal changes in plasma testosterone and glucocorticosteroids in free-living male yellow-pine chipmunks and the response to capture and handling. *Journal of Comparative Physiology B*, *170*(3), 245-251.

Poole, T. (1997). Happy animals make good science. *Laboratory Animals*, *31*(2), 116-124.

Quispe, R., Villavicencio, C. P., Addis, E., Wingfield, J. C., & Vasquez, R. A. (2014). Seasonal variations of basal cortisol and high stress response to captivity

in Octodon degus, a mammalian model species. *General and comparative Endocrinology*, *197*, 65-72.

Réale, D., Gallant, B. Y., Leblanc, M., & Festa-Bianchet, M. (2000). Consistency of temperament in bighorn ewes and correlates with behaviour and life history. *Animal Behaviour*, 60(5), 589-597.

Réale, D., Reader, S. M., Sol, D. McDougall, P. T., & Dingemanse, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82(2), 291-318.

Reeder, D. M., Kosteczko, N. S., Kunz, T. H., & Widmaier, E. P. (2004). Changes in baseline and stress-induced glucocorticoid levels during the active period in free-ranging male and female little brown myotis, *Myotis lucifugu*s (Chiroptera: Vespertilionidae). *General and comparative endocrinology*, *136*(2), 260-269.

Reeder, D. M., Kramer, K. (2005). Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ekology, and natural history. *Journal of Mamalogy*, 86(2), 225-235.

Renwrantz, L., & Spielvogel, F. (2011). Heart rate and hemocyte number as stress indicators in disturbed hibernating vineyard snails, *Helix pomatia*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *160*(4), 467-473.

Rettenbacher, S., Groothuis, T. G., Henriksen, R., & Möstl, E. (2013). Corticosterone in bird eggs: The importance of analytical validation. *Wien Tierärztl Monat*, *100*, 283-290.

Rietmann, T. R., Stauffacher, M., Bernasconi, P., Auer, J. A., & Weishaupt, M. A. (2004). The association between heart rate, heart rate variability, endocrine and behavioural pain measures in horses suffering from laminitis. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, *51*(5), 218-225.

Romero, L. M. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and comparative endocrinology*, 128(1), 1-24.

Romero, L. M., Meister, C. J., Cyr, N. E., Kenagy, G. J., & Wingfield, J. C. (2008). Seasonal glucocorticoid responses to capture in wild free-living mammals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(2), R614-R622.

Sapolsky R.M., Romero L.M. & Munck A.U. (2000): How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocrine reviews, 21(1), 55-89.

Seabrook, M. F. (1984). The psychological interaction between the stockman and his animals and its influence on performance of pigs and dairy cows. *The Veterinary Record*, *115*(4), 84-87.

Sgoifo, A., de Boer, S. F., Haller, J., Koolhaas, J. M. (1996). Individual differences in plasma catecholamine and corticisterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. *Physiology & Behavior*, 60 (6): 1403-1407.

Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, *166*(4), 869-887.

Schmitt, U., & Hiemke, C. (1998). Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *59*(4), 807-811.

Schouten, W. G., & Wiegant, V. M. (1996). Individual responses to acute and chronic stress in pigs. *Acta physiologica scandinavica. Supplementum*, 640, 88-91.

Sih A., Bell A., & Johnson C. (2004). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview *Trends in Ecology and Evolution*, 19(7), :372-378.

Sova, Z. (1990). Fyziologie hospodářských zvířat. Praha, Státní zemědělské nakladatelství, 472 pp. ISBN 80-209-0092-6.

Springer D. (2008). Problematika imunoanalytických metod (analytika nádorových markerů a hormonů. In Štulík, K., Zima, T. (eds.): Klinická a toxikologická analýza. VŠCHT Praha, vydáno ve spolupráci s Českou společností chemickou, Praha: 140-146 pp. ISBN 978-80-86238-51-7

Stevenson-Hinde, J., Stillwell-Barnes, R., & Zunz, M. (1980). Subjective assessment of rhesus monkeys over four successive years. *Primates*, 21 (1): 66–82.

Stevenson-Hinde, J., Zunz, M. (1978). Subjective assessment of individual rhesus monkeys. *Primates*, 19 (3): 473-482

Stöhr, W. (1988). Longterm heartrate telemetry in small mammals: A comprehensive approach as a prerequisite for valid results. *Physiology & Behavior*, 43(5), 567-576.

Suomi, S. J., O'Neill, P. L., & Novak, M. A. (1991). Normalizing laboratory-reared rhesus macaque(Macaca mulatta) behavior with exposure to complex outdoor enclosures. Zoo Biology, 10(3), 237–245.

Svartberg, K., & Forkman, B. (2002). Personality traits in the domestic dog (*Canis familiaris*). Applied Animal Behaviour Science, 79(2), 133–155.

Touma, C., Palme, R., & Sachser, N. (2004). Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*, *45*(1), 10-22.

Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., & Palme, R. (2003). Efects of sex and time of day on metobolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. General and comparative endokrinology, 130(3), 267-278.

Tyrrell, C. L., & Cree, A. (1998). Relationships between corticosterone concentration and season, time of day and confinement in a wild reptile (tuatara, Sphenodon punctatus). *General and comparative endocrinology*, *110*(2), 97-108.

Vallée, M., Mayo, W., Maccari, S., Le Moal, M., & Simon, H. (1996). Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain research*, *712*(2), 287-292.

van Oers, K., & Carere, C. (2007). Long-term effects of repeated handling and bleeding in ild caught Great Tits (*Parus major)*. *Journal of ornithology*, 148(2), 185-190.

van Oers, K., Drent, P. J., de Goede, P., & van Noodwijk, A. J. (2004). Realized heritability and repeatability of risk-taking behaviour in relation to avian personalities. *Proceedings of the Roal Society of London.* B 271, 65-73.

van Oortmerssen G.A., Benus I. & Dijk D.J. (1985). Studies in wild house mice: genotypeenvironment interactions for attack latency. *Netherlands journal of zoology* 35, 155-169.

Vecsey, C. G., Wimmer, M. E., Havekes, R., Park, A. J., Perron, I. J., Meerlo, P., & Abel, T. (2013). Daily acclimation handling does not affect hippocampal long-term potentiation or cause chronic sleep deprivation in mice. *Sleep*, 36(4), 601-607.

Veenema, A. H., Meijer, O. C., de Kloet, E. R., Koolhaas, J. M., & Bohus, B. G. (2003). Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. *Hormones and Behavior*, *43*(1), 197-204.

Vera, F., Antenucci, C. D., & Zenuto, R. R. (2011). Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *General and comparative endocrinology*, *170*(3), 550-557.

Verbeek, M. E. M., Drent, P. J., & Wiepkema, P. R. (1994). Consistent individual differences in early exploratory behaviour of male great tits. Animal Behaviour, 48(5), 1113–1121.

Verbeek, M. E., Boon, A., & Drent, P. J. (1996). Exploration, aggressive behaviour and dominance in pair-wise confrontations of juvenile male great tits. *Behaviour*, *133*(11), 945-963.

Viblanc, V. A., Valette, V., Kauffmann, M., Malosse, N., & Groscolas, R. (2012). Coping with social stress: heart rate responses to agonistic interactions in king penguins. Behavioral Ecology, 23(6), 1178-1185.

Vyskočil, F. (2004). Kapitoly z°fyziologie živočichů a°člověka. Praha: 132 pp.

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328.

Wascher, C. A., Arnold, W., & Kotrschal, K. (2008). Heart rate modulation by social contexts in greylag geese (*Anser anser*). *Journal of Comparative Psychology*, 122(1), 100.

Wilson D. S., Clark, A. B., Coleman, K., & Dearstyne T. (1994). Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology et Evolution,* 9, 442-446.

Wilson, D. S., Coleman, K., Clark, A. B., & Biederman, L. (1993). The shy-bold continuum in pupkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*): an ecological study of a°physiological trait. *Journal of Comperative Psychology,* 107(3), 250-260

Zehendner, Ch. M., Luhman, H. J., & Yang, J. W. (2013). A°simple and novel method to monitor breathing and heart rate in awake and urethane-anesthetized. *PLoS ONE,* 8(5), 1-9.

Zejda, J., Zapletal, M., Pikula, J., Obdržálková, D., Heroldová, M., & Hubálek, Z. (2002). Hlodavci v°zemědělské a°lesnické praxi. Praha, Agrospoj, s. r. o.

Zakoupený kit a jeho metodika k stanovení hladiny kortikosteronu:

Corticosterone ELISA kit, Cayman Chemical Company, 1180 East Ellsworth Road Ann Arbor, Michigan 48108, USA, www.chaymanchem.com

9. Seznam použitých zkratek

EIA = enzyme immunoassay, enzymová imunoanalýza

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, enzymová imunoanalýza

RIA = radioimunologická analýza

SBR = stresová dechová frekvence

RBR = klidová dechová frekvence

RCORT = basální hodnota kortikosteronu

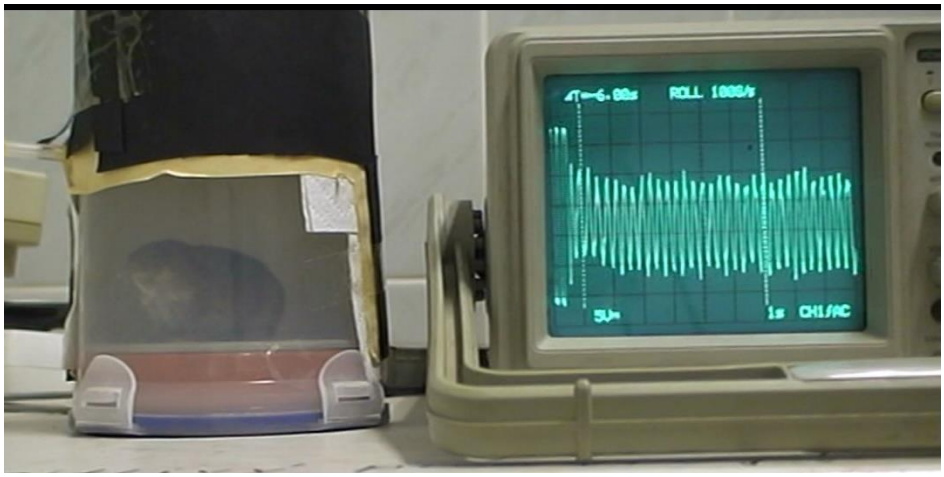
SCORT = stresová hladina kortikosteronu

OFT = open field test

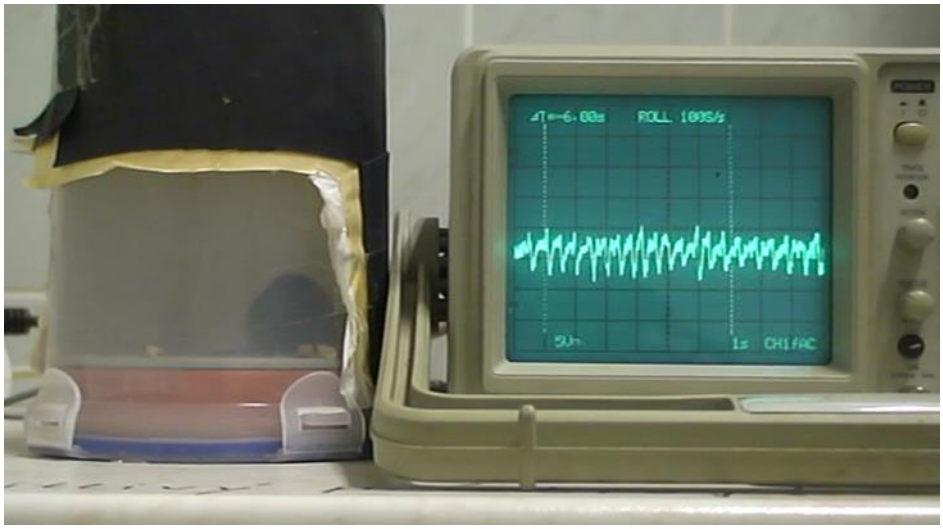
EPM = Elevated Plus Maze, vyvýšený labyrint

10. Příloha

Příloha č. 1



Obr. 4: Záznam z měření dechové frekvence. Stresová dechová frekvence hraboše zaznamenaná po zvukovém signálu.



Obr. 5: Záznam z měření dechové frekvence. Klidová dechová frekvence hraboše během spánku