

PROCJENA STRESA U PASA ODREĐIVANJEM KONCENTRACIJE KORTIZOLA: OD FIZIOLOŠKOG POKAZATELJA DO BIOMARKERA DOBROBITI

Anamaria Ekert Kabalin^{1*}, Vladimir Dimitrijević², Sven Menčik¹, Aneta Piplica¹, Aleksandra Aleksić-Agelidis², Velimir Sušić¹, Marcela Šperanda³, Niko Popović¹, Mladenka Vukšić¹, Mario Ostović¹

¹Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska

²Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Republika Srbija

³Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek, Hrvatska

* e-mail kontakt osobe: akabalin@vef.unizg.hr

Kratak sadržaj

Stresori različitog intenziteta sastavni su dio života pasa te mogu utjecati na njihovo ponašanje, zdravstveni status i ukupnu dobrobit. Aktivacija osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA os) dovodi do povećanog lučenja kortizola koji je jedan od najčešće korištenih fizioloških pokazatelja stresnog odgovora. Kortizol se može određivati u različitim biološkim uzorcima, uključujući krv, slinu, urin, feces i dlaku, pri čemu svaki od njih pruža uvid u različite aspekte fiziološke aktivnosti povezane sa stresom.

Promjene koncentracije kortizola mogu se pojaviti u pasa izloženih različitim situacijama, uključujući boravak u skloništu, prijevoz, veterinarske postupke, promjene okoliša, sportske aktivnosti i sudjelovanje na kinološkim izložbama. Istodobno, čak i među psima izloženima usporedivim uvjetima okoliša mogu se uočiti značajne individualne razlike u intenzitetu stresnog odgovora. Uočene razlike mogu biti posljedica zajedničkog djelovanja okolišnih čimbenika, fiziološkog stanja i genetske podloge. Određivanje kortizola u dlaci sve je zanimljivije kao pokazatelj dugotrajne izloženosti stresu jer odražava aktivnost HPA osi tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Nasuprot tome, određivanje kortizola u slini predstavlja praktičnu i neinvazivnu metodu procjene akutnog odgovora na specifične podražaje. Krv omogućuje procjenu trenutačnih promjena koncentracije kortizola, ali sam postupak uzorkovanja može utjecati na stresni odgovor životinje. Urin i feces pružaju širi, vremenski odgođen uvid u izlučivanje i metabolizam glukokortikoida te mogu biti korisni za procjenu kumulativnog odgovora na stres. Različite vremenske informacije sadržane u pojedinim biološkim uzorcima stoga doprinose široj procjeni stresnog odgovora, osobito kada se fiziološki pokazatelji tumače zajedno s ponašanjem životinje.

Osim toga, istraživanja sve više usmjeravaju pozornost na genetske čimbenike koji mogu utjecati na individualnu osjetljivost na stres, osobito na gen *NR3C1* koji kodira glukokortikoidni receptor. Razumijevanje povezanosti između koncentracije kortizola, odgovora na stres i genetske podloge moglo bi doprinijeti identificiranju pouzdanih biomarkera dobrobiti, unaprijediti procjenu dobrobiti pasa te omogućiti individualiziraniji pristup držanju, uzgoju i skrbi za pse izložene različitim okolišnim i društvenim izazovima.

Ključne riječi: dobrobit životinja, biomarkeri, kortizol, pas, glukokortikoidni receptor, stres.

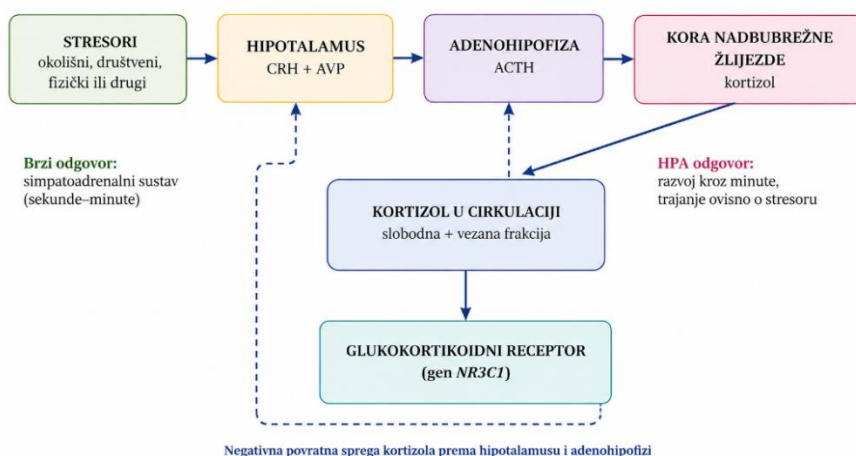
UVOD

U svakodnevnom životu pasa prisutni su različiti fizički, okolišni, društveni i psihološki stresori. Prijevoz, boravak u skloništu, veterinarski pregled, promjena okoliša, buka, trening, sportske aktivnosti i različiti oblici društvene interakcije mogu aktivirati neuroendokrini odgovor, ali isti podražaj ne mora izazvati jednak odgovor u svih jedinki (Beerda i sur., 1998; Beerda i sur., 1997). Intenzitet odgovora ovisi o karakteristikama stresora, prethodnom iskustvu, temperamentu, dobi, zdravstvenom stanju i sposobnosti prilagodbe psa (Kaszycka i sur., 2025; Csoltova i sur., 2017; Hennessy, 2013). Kortizol je jedan od najčešće korištenih fizioloških pokazatelja aktivnosti osi hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlijezda (HPA os). Njegova je prednost mogućnost određivanja u više bioloških uzoraka, pri čemu pojedini uzorak pruža informaciju o različitom vremenskom razdoblju aktivnosti HPA osi (Palme, 2019; Sheriff i sur., 2011; Möstl i Palme, 2002). Međutim, koncentracija kortizola ne može se jednostavno izjednačiti sa „stresom“, niti sama po sebi dokazuje narušenu dobrobit. Fiziološka aktivacija HPA osi može pratiti negativna iskustva, ali i intenzivnu tjelesnu aktivnost, uzbuđenje, igru, očekivanje nagrade ili druge situacije koje nisu nužno povezane s narušavanjem dobrobiti (Cobb i sur., 2025; Márza i sur., 2024). Suvremena procjena dobrobiti stoga se temelji na kombiniranju fizioloških i okolišnih pokazatelja s ponašanjem i zdravstvenim stanjem životinja. Posebno zanimljiv smjer predstavlja povezivanje endokrinoloških pokazatelja s molekularno-genetičkim čimbenicima. Gen *NR3C1* (engl. *Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1*), koji kodira glukokortikoidni receptor, predstavlja ključnu poveznicu između koncentracije kortizola i odgovora ciljnih tkiva te je jedan od kandidatnih gena za istraživanje individualnih razlika u odgovoru na stres u pasa (Tayler i sur., 2022; Costa i sur., 2016). Cilj ovog preglednog rada je prikazati mogućnosti određivanja koncentracije kortizola u pasa, njihovu primjenu u različitim situacijama, glavna ograničenja interpretacije te potencijalnu ulogu gena *NR3C1* u objašnjenju individualne varijabilnosti.

FIZIOLOŠKA OSNOVA STRESNOG ODGOVORA I ULOGA KORTIZOLA

Stresni odgovor predstavlja koordiniranu aktivaciju živčanog, endokrinog i imunskog sustava kojom se organizam prilagođava promjenama u okolišu. Koncept alostaze naglašava da se stabilnost organizma postiže aktivnim prilagođavanjem promjenjivim uvjetima, a ne održavanjem potpuno nepromjenjivog unutarnjeg stanja (Koolhaas i sur., 2011; McEwen i Wingfield, 2003). Kod pasa se razlikuju brži simpatoadrenalni odgovor i sporiji odgovor HPA osi. Simpatoadrenalni sustav

omogućuje gotovo trenutačnu mobilizaciju energije, dok HPA os osigurava hormonsku regulaciju tijekom duljeg trajanja podražaja (Nicolaidis i sur., 2015; Charmandari i sur., 2005; Moberg, 2000; Sapolsky i sur., 2000). Aktivacija HPA osi započinje oslobađanjem *kortikotropin oslobađajućeg hormona* (CRH) iz hipotalamusa, uz doprinos arginin-vazopresina (AVP), koji potiču adenohipofizu na lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH). ACTH djeluje na koru nadbubrežne žlijezde i potiče sintezu kortizola. Nakon ulaska u cirkulaciju, kortizol se najvećim dijelom veže za transportne proteine, dok slobodna frakcija ulazi u stanice i veže se na glukokortikoidni receptor (slika 1). Receptor je kodiran genom *NR3C1*, a nastali kompleks regulira ekspresiju brojnih gena uključenih u metabolizam, imunosni odgovor, upalu i prilagodbu organizma (Nicolaidis i sur., 2015; Oakley i Cidlowski, 2013; Nicolaidis i sur., 2010; Charmandari i sur., 2005). U fiziološkim uvjetima povećanje koncentracije kortizola aktivira negativnu povratnu spregu koja ograničava daljnju aktivaciju HPA osi. Biološko značenje kortizola zato nije ograničeno na negativne emocionalne događaje. Kortizol osigurava dostupnost energetskih supstrata, modulira imunosni odgovor i sudjeluje u prilagodbi na različite zahtjeve organizma. Posljedica toga je da prolazno povećanje koncentracije može biti normalan dio odgovora na fizički napor ili emocionalno uzbuđenje, dok dugotrajna ili ponavljana aktivacija može doprinijeti alostatskom opterećenju i nepovoljnim učincima na zdravlje i dobrobit (Chrousos, 2009; McEwen i Wingfield, 2003). Stoga je pri interpretaciji koncentracije kortizola važnije razmotriti što je izazvalo aktivaciju i u kojem je vremenskom okviru mjerena, nego pojedinačnu vrijednost promatrati kao univerzalnu mjeru stresa. Vrijeme uzorkovanja također je važno. U pasa su opisane povremene promjene lučenja kortizola, bez jasnog cirkadijalnog obrasca (Kempainen i Sartin, 1984). Na izmjerene vrijednosti mogu dodatno utjecati hranjenje, tjelesna aktivnost, dob, reproduksijski status, zdravstveno stanje i prethodna manipulacija životinjom. Zbog toga standardizacija vremena i okolnosti uzorkovanja predstavlja jedan od osnovnih preduvjeta za usporedbu rezultata (Cobb i sur., 2025; Kaszycka i sur., 2025; Chmelíková i sur., 2020).



Slika 1. Pojednostavljena shema aktivacije HPA osi i djelovanja kortizola.

BIOLOŠKI UZORCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KORTIZOLA

Izbor biološkog uzorka treba biti podređen istraživačkom pitanju i vremenskom okviru koji se želi procijeniti. Krv, slina, dlaka, urin i feces ne predstavljaju međusobno zamjenjive vrste uzoraka, nego pružaju informacije o različitim vremenskim razdobljima aktivnosti HPA osi (tablica 1) (Palme, 2019; Sheriff i sur., 2011; Möstl i Palme, 2002). Krv je tradicionalno najčešće korišten uzorak i važna je u kliničkoj endokrinologiji. Omogućuje procjenu trenutnog hormonskog statusa i predstavlja referentni pristup za brojne kliničke postupke (Behrend i sur., 2013). Međutim, venepunkcija, fiksacija i sama manipulacija mogu aktivirati HPA os, osobito u plašljivih pasa. Stoga koncentracija dobivena iz krvi može sadržavati i komponentu odgovora na sam postupak uzorkovanja. Slina je osobito prikladna za istraživanja akutnog stresa jer predstavlja neinvazivan način uzorkovanja, a salivarni kortizol pretežno odražava slobodnu frakciju hormona. Promjene se mogu registrirati relativno brzo nakon aktivacije HPA osi, što omogućuje praćenje odgovora na veterinarski pregled, prijevoz, trening ili druge kratkotrajne podražaje (Chmelíková i sur., 2020; Dreschel i Granger, 2009; Vincent i Michell, 1992). Međutim, količina sline, način prikupljanja, prisutnost hrane ili krvi u uzorku te vrijeme proteklo od hranjenja mogu utjecati na rezultate. Stoga je standardizacija postupka od ključne važnosti. U novijim pregledima salivarni kortizol ističe se kao praktična metoda, ali uz potrebu oprezne interpretacije i jasnog opisa protokola (Kaszycka i sur., 2025). Dlaka pruža drukčiji vremenski uvid. Kortizol se tijekom rasta ugrađuje u vlas, zbog čega njegova koncentracija može odražavati aktivnost HPA osi tijekom više tjedana ili mjeseci. To je osobito korisno kada se istražuje dugotrajnija izloženost stresorima ili kada neposredno uzorkovanje nije moguće (Gupta i sur., 2023; Bryan i sur., 2013). Prednost je i jednostavno skladištenje i transport uzorka. Ograničenja uključuju razlike u brzini rasta, sezonskim promjenama i njezi dlake, mjestu uzorkovanja i mogućoj vanjskoj kontaminaciji. Urin i feces mogu pružiti informaciju o kumulativnoj aktivnosti glukokortikoida, ali je vremenska interpretacija složenija. Urin odražava izlučivanje kortizola tijekom određenog razdoblja, dok fekalni metaboliti glukokortikoida odražavaju hormonsku aktivnost s određenim vremenskim odmakom zbog metabolizma i prolaska metabolita kroz probavni sustav (Palme, 2019; Möstl i Palme, 2002). Njihova primjena može biti korisna kada je potrebno potpuno ili gotovo potpuno neinvazivno uzorkovanje, ali su manje praktični uzorci od sline za praćenje neposrednog odgovora na pojedinačni podražaj. Laboratorijska metoda također može biti izvor varijabilnosti. Imunokemijske metode, uključujući enzimski povezani imunosorbentni test (ELISA, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) i radioimunološki test (RIA, engl. *Radioimmunoassay*), široko su dostupne i praktične, ali njihova specifičnost može biti ograničena križnom reaktivnošću. Metode tekućinske kromatografije povezane s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS, engl. *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*) omogućuju veću analitičku specifičnost, ali zahtijevaju složeniju opremu i stručnost (Schroers i sur., 2025; Palme, 2019). Zbog toga se rezultati različitih istraživanja ne smiju uspoređivati bez uzimanja u obzir vrste biološkog uzorka, protokola uzorkovanja i analitičke metode.

Tabela 1. Usporedba bioloških uzoraka za određivanje koncentracije kortizola u pasa.

Biološki uzorak	Vremenski okvir	Glavna prednost	Glavno ograničenje
Krv	Minute	Važan klinički uzorak ("standard"); trenutni odgovor	Invazivnost; manipulacija može sama aktivirati HPA os
Slina	Minute	Neinvazivno; pogodno za akutni odgovor	Potrebna standardizacija uzorkovanja
Dlaka	Tjedni–mjeseci	Procjena dugotrajnije izloženosti	Ovisno o rastu dlake, mjestu uzorkovanja i vanjskoj kontaminaciji
Urin	Nekoliko sati	Kumulativna sekrecija; neinvazivno	Otežano standardiziranje; korekcija kreatininom
Feces	Približno 12–24 sata	Vrlo malo manipulacije	Vremenski odmak; utjecaj metabolizma i prehrane

DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA PROMJENA KONCENTRACIJE KORTIZOLA U RAZLIČITIM SITUACIJAMA

Istraživanja provedena na psima pokazuju da se promjene koncentracije kortizola mogu promatrati u vrlo različitim kontekstima (tablica 2). U veterinarskoj ambulanti aktivacija HPA osi može biti povezana s prijevozom, čekanjem, nepoznatim okolišem, prisutnošću drugih životinja i fizičkom manipulacijom. Csoltova i sur. (2017) pokazali su da interakcija vlasnika i psa može utjecati na fiziološki i ponašajni odgovor tijekom pregleda. Takvi rezultati podupiru razvoj pristupa kojima se nastoji smanjiti strah i stres tijekom veterinarskih postupaka (Lloyd, 2017; Mariti i sur., 2015b). Važno je, međutim, razlikovati prolaznu aktivaciju HPA osi tijekom pregleda od dugotrajnog narušavanja dobrobiti. Skloništa predstavljaju jedan od najčešće proučavanih modela dugotrajnog prilagođavanja pasa. Nakon dolaska u novo okruženje psi mogu pokazivati povišene vrijednosti kortizola, nakon čega kod dijela životinja slijedi postupno smanjenje, što može biti povezano s habituacijom i prilagodbom (Hennessy, 2013; Hennessy i sur., 2001; Hennessy i sur., 1997). Međutim, individualne razlike ostaju izražene, a uvjeti smještaja, društveni kontakt, mogućnost aktivnosti i obogaćivanje okoliša mogu utjecati na dobrobit pasa. Prijevoz

predstavlja kombinaciju više stresora – manipulacije, vibracija, buke, promjene temperature i ograničenja kretanja. **Radisavljević i sur. (2017) navode da je koncentracija kortizola u krvi pasa bila viša neposredno nakon prijevoza nego 24 sata poslije, kada su psi bili smješteni u novi okoliš, premda razlika nije bila statistički značajna.** U istraživanju Herbel i sur. (2020) zabilježen je porast salivarnog i plazmatskog kortizola u pasa tijekom prijevoza, pri čemu ponavljanje situacije nije dovelo do jasnog smanjenja odgovora na stres. To pokazuje da samo ponavljanje podražaja nije dovoljno za pretpostavku da će se svaka životinja na njega brzo naviknuti. U radnih i službenih pasa povećanje koncentracije kortizola tijekom aktivnosti ne treba automatski interpretirati kao narušenu dobrobit. **Fiziološki odgovor tijekom rada u velikoj mjeri ovisi o razini uvježbanosti, iskustvu i predvidljivosti zadataka. U dobro uvježbanih pasa porast koncentracije kortizola najčešće predstavlja fiziološku prilagodbu povećanim energetskeim zahtjevima, dok se vrijednosti nakon završetka aktivnosti relativno brzo vraćaju na početnu razinu** (Horváth i sur., 2007). Način treninga i interakcije s vlasnikom također može utjecati na ponašanje i dobrobit pasa. U pasa kućnih ljubimaca češća primjena kaznenih metoda treninga bila je povezana s nepoželjnim obrascima ponašanja i slabijim pokazateljima učenja (Rooney i Cowan, 2011). Sportska natjecanja, uključujući natjecateljske aktivnosti pasa zaprežnog tipa i intenzivne radne aktivnosti, isto tako mogu biti praćena promjenama koncentracije kortizola. U pasa sudionika natjecanja zabilježene su promjene hormonskog odgovora koje se mogu povezati i s hormonskim stanjem vodiča (Mariti i sur., 2015a). Kod pasa uključenih u intenzivnu tjelesnu aktivnost opisane su promjene koncentracije kortizola, pri čemu smjer odgovora na stres može ovisiti o vrsti, trajanju i intenzitetu aktivnosti te razini uvježbanosti (Angle i sur., 2009; Rovira i sur., 2008). Stoga povećanje koncentracije kortizola nakon aktivnosti ne treba uvijek tumačiti u negativnom kontekstu. U terapijskih pasa opisane su promjene koncentracije salivarnog kortizola koje su se razlikovale ovisno o tijeku aktivnosti i ponašanju pasa, što podupire potrebu za istodobnim praćenjem fizioloških i ponašajnih pokazatelja (Glenk i sur., 2014). Podaci koji se odnose na kinološke izložbe još su ograničeni u usporedbi s veterinarskim pregledima, prijevozom ili sportskim aktivnostima pa se za sada ne može izvesti pouzdan zaključak o obrascu kortizolnog odgovora pasa na takvim manifestacijama. Pozitivna interakcija između čovjeka i psa također nije uvijek povezana s istim hormonskim odgovorom. Istraživanja u skloništima pokazuju da način i karakteristike ljudske interakcije mogu utjecati na koncentraciju kortizola i ponašanje pasa. Primjerice, maženje može ublažiti stresni odgovor na venepunkciju (Hennessy i sur., 1998).

Tabela 2. Određivanje koncentracije kortizola kod pasa u različitim situacijama.

Situacija	Uobičajeni nalaz	Ključni čimbenici interpretacije	Reference
Veterinarski pregled	Često prolazno povećanje	Čekanje, manipulacija, prethodno iskustvo, prisutnost vlasnika	Csoltova i sur., 2017; Lloyd, 2017; Mariti i sur., 2015b
Boravak u skloništu	Povišenje nakon dolaska; potom prilagodba kod dijela pasa	Trajanje boravka, društveni kontakt, obogaćivanje okoliša	Radisavljević i sur., 2017; Hennessy, 2013; Hennessy i sur., 2001; Hennessy i sur., 1997
Prijevoz	Prolazno povećanje	Trajanje, prethodno iskustvo, način prijevoza, prisutnost vlasnika	Herbel i sur., 2020; Radisavljević i sur., 2017;
Rad i trening službenih pasa	Aktivacija tijekom zadatka; obrazac odgovora ovisi o načinu rada	Uvježbanost, vrsta zadatka, način treninga	Rooney i Cowan, 2011; Horváth i sur., 2007
Sport i natjecanje	Promjenjiv odgovor; moguće povećanje	Fizički napor, uzbuđenje, kontekst natjecanja	Mariti i sur., 2015a; Angle i sur., 2009; Rovira i sur., 2008
Terapijski rad	Nema jednoznačnog obrasca odgovora; promjene mogu biti blage	Trajanje rada, broj interakcija, individualne razlike	Glenk i sur., 2014
Interakcija čovjek-pas	Varijabilan odgovor	Kvaliteta odnosa, poznata osoba, vrsta interakcije	Mariti i sur., 2015a; Bergamasco i sur., 2010; Hennessy i sur., 1998

Tabela 3. Čimbenici koji utječu na koncentraciju kortizola i otežavaju interpretaciju.

Čimbenik	Mogući utjecaj na kortizol	Zašto je važan	Reference
Dob i fiziološko stanje	Promjena bazalnih vrijednosti	Razlike u regulaciji HPA osi	Cobb i sur., 2025; Kemppainen i Sartin, 1984
Pasmina i temperament	Različita reaktivnost	Pasminske razlike i individualni način reagiranja na stres	Cobb i sur., 2025; Csoltova i sur., 2017
Prethodno iskustvo	Habitucija ili pojačan odgovor	Utječe na doživljaj podražaja	Herbel i sur., 2020; Hennessy, 2013
Zdravstveno stanje	Promjena bazalnog i izazvanog odgovora	Bolesti mogu aktivirati ili mijenjati aktivnost HPA osi	Kállai i sur., 2021; Behrend i sur., 2013
Vrijeme uzorkovanja	Varijabilnost vrijednosti	Kortizol nije konstantan; uzorkovanje mora biti standardizirano	Chmelíková i sur., 2020; Kemppainen i Sartin, 1984
Vrsta biološkog uzorka i laboratorijska metoda	Analitička i vremenska varijabilnost	Različite metode i uzorci nisu nužno izravno usporedivi	Schroers i sur., 2025; Palme, 2019
Genetska podloga	Moguća razlika u osjetljivosti na glukokortikoide	<i>NR3C1</i> i drugi kandidatni geni	Tayler i sur., 2022; Kállai i sur., 2021; Costa i sur., 2016

ČIMBENICI KOJI OGRANIČAVAJU INTERPRETACIJU

Aktivacija HPA osi, a samim time i povećanje koncentracije kortizola, nisu uvijek povezani s negativnim stresom, boli ili narušenom dobrobiti. Kao što je prikazano u tablici 3, kortizol je dio adaptacijskog odgovora organizma i koncentracija mu se može povećati tijekom fizičkog napora, igre, treninga, očekivanja nagrade ili drugih motivirajućih situacija. Stoga se promjene koncentracije trebaju procjenjivati u odnosu na vrstu i intenzitet podražaja te druge pokazatelje fiziološkog i ponašajnog odgovora (Cobb i sur., 2025; Kaszycka i sur., 2025; Koolhaas i sur., 2011). Na rezultat

utječu i obilježja životinje: dob, spol, reproduksijski status, pasmina, temperament, prethodna iskustva, socijalizacija, zdravstveno stanje i razina uvježbanosti mogu modificirati odgovor HPA osi (Herbel i sur., 2020; Csoltova i sur., 2017; Hennessy, 2013; Hennessy i sur., 1998). Bolesti nadbubrežne žlijezde i druga patološka stanja mogu dodatno promijeniti koncentraciju kortizola te otežati zaključivanje o stresnom odgovoru (Behrend i sur., 2013). Vrijeme i način uzorkovanja predstavljaju dodatne izvore varijabilnosti. Krv i slina prikladnije su za akutne promjene, dok dlaka pruža informaciju o duljem razdoblju odgovora na stres. Usporedba rezultata dobivenih iz različitih vrsta bioloških uzoraka bez razumijevanja njihove vremenske dinamike može dovesti do pogrešnih zaključaka (Palme, 2019; Sheriff i sur., 2011; Möstl i Palme, 2002). Isto vrijedi za laboratorijske metode jer različiti imunokemijski testovi i kromatografski pristupi ne moraju dati potpuno usporedive rezultate (Schroers i sur., 2025). Zbog navedenih ograničenja kortizol treba promatrati kao jednu komponentu šire procjene. Model pet domena dobrobiti naglašava da procjena dobrobiti treba obuhvatiti fizičko zdravlje i funkcionalno stanje, ali isto tako i iskustva životinje te pozitivna i negativna emocionalna stanja (Mellor i sur., 2020). U tom smislu kombiniranje izmjerene koncentracije kortizola s ponašanjem, srčanom frekvencijom, varijabilnošću srčanog ritma i drugim kliničkim pokazateljima može dati pouzdaniju interpretaciju nego oslanjanje na jedan biomarker (Cobb i sur., 2025; Polgár i sur., 2019; Bergamasco i sur., 2010).

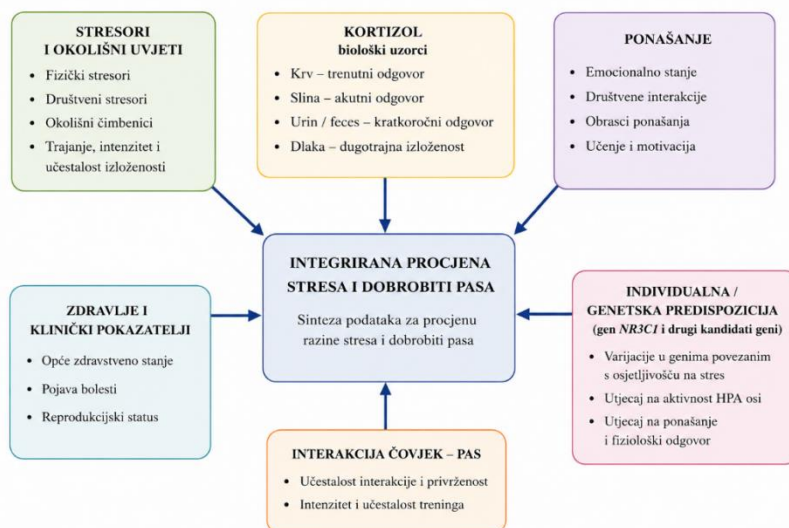
GEN *NR3C1* I INDIVIDUALNE RAZLIKE U ODGOVORU NA STRES

Koncentracija kortizola nije jedini čimbenik koji određuje učinak glukokortikoida. Biološki odgovor ovisi i o osjetljivosti ciljnih tkiva, a glukokortikoidni receptor predstavlja ključnu molekularnu poveznicu između hormona i staničnog odgovora. Receptor je kodiran genom *NR3C1*, a različiti transkripcijski i proteinski oblici receptora mogu doprinijeti razlikama u osjetljivosti na glukokortikoide. Istraživanja u ljudi pokazala su da varijante *NR3C1* gena mogu biti povezane s razlikama u osjetljivosti na glukokortikoide, regulaciji HPA osi i odgovoru na terapiju (Nicolaidis i sur., 2015; Oakley i Cidlowski, 2013). U pasa su dostupni podaci još ograničeni. Costa i sur. (2016) identificirali su šest SNP-ova (engl. *single-nucleotide polymorphism*) u kodirajućim regijama *NR3C1α* u 97 pasa, uključujući četiri sinonimne i dvije nesinonimne varijante. **Za dvije nesinonimne varijante predviđeno je da bi mogle biti štetne** za strukturu i funkciju proteina, iako kliničko značenje tih varijanti nije potvrđeno. Tayler i sur. (2022) proučavali su *NR3C1α* u koker španijela s primarnom imunotrombocitopenijom. U 24 psa nisu pronađene prethodno opisane nesinonimne SNP varijante, a istražena varijanta nije pokazala jasnu povezanost s brzinom odgovora na glukokortikoidnu terapiju. Kállai i sur. (2021) pokazali su da kod pasa postoji više transkriptnih varijanti glukokortikoidnog receptora te da je smanjena ekspresija određenih varijanti povezana s nepovoljnijim ishodom u pasa sa sindromom sustavnog upalnog odgovora. Važno je, međutim, razlikovati dokaz postojanja genetske varijabilnosti od dokaza da određena varijanta određuje stresnu reaktivnost. Trenutačni podaci nisu dovoljni da bi se pojedini SNP gena *NR3C1* koristio kao samostalan biomarker stresa ili dobrobiti. Ipak, gen *NR3C1* je posebno zanimljiv zbog svoje središnje uloge u signalnom putu glukokortikoida, dok se istodobno istražuju i drugi geni povezani s regulacijom HPA osi, uključujući *NR3C2* i *FKBP5* (Nicolaidis i sur., 2015). Buduća istraživanja trebala bi kod istih životinja povezivati genetske varijante i ekspresiju *NR3C1* gena s koncentracijom

kortizola, standardiziranim ponašajnim pokazateljima i karakteristikama okoliša. Takav integrirani pristup mogao bi pomoći u objašnjenju dijela individualne varijabilnosti koja se danas pripisuje samo „temperamentu” ili prethodnom iskustvu. Cilj pritom ne bi bio zamijeniti kortizol genetskim markerima, nego povezati različite razine biološkog odgovora na stres u jedinstveni model procjene.

INTEGRIRANA PROCJENA STRESA I DOBROBITI

Suvremeni podaci upućuju na potrebu prijelaza s jednostavnog pitanja „je li kortizol povišen?” na složeniji pristup koji uzima u obzir što je životinja doživjela, koliko je podražaj trajao, koji je uzorak uzet i kako se ponašala. Takav pristup posebno je važan zato što ista promjena koncentracije može imati drugačije značenje u različitim situacijama. Praktično, izbor biomarkera treba slijediti istraživačko pitanje. Za akutni odgovor na kratkotrajni podražaj salivarni kortizol ima posebnu vrijednost zbog neinvazivnog uzorkovanja i relativno brze dinamike. Za dugotrajniju izloženost stresorima korisniji može biti kortizol u dlaci. Krv ostaje važna u kliničkoj endokrinologiji, dok urin i feces mogu imati prednost kada su potrebni kumulativni pokazatelji i minimalna manipulacija životinjom. Niti jedan uzorak nije univerzalno najbolji. U procjeni dobrobiti posebno je važno istodobno procjenjivati uvjete u kojima se životinja nalazi, njezino ponašanje i zdravstveno stanje. Primjerice, povećana koncentracija kortizola nakon intenzivnog treninga kod dobro uvježbanog psa koji se brzo oporavlja ne mora imati isto značenje kao povećanje koje se ponavlja u psa s izraženim znakovima straha, izbjegavanja i dugotrajnog poremećaja ponašanja. Slično tome, prolazno povećanje tijekom veterinarskog pregleda treba razlikovati od kronične izloženosti nepovoljnim uvjetima. Integracija fizioloških i ponašajnih pokazatelja može se dodatno proširiti uključivanjem srčane frekvencije, varijabilnosti srčanog ritma, razine oksitocina i ostalih zdravstvenih pokazatelja te molekularno-genetskih obilježja (slika 2).



Slika 2. Integrirani model interpretacije koncentracije kortizola u procjeni stresa i dobrobiti pasa.

Upravo takav multidisciplinarni pristup omogućuje da kortizol zadrži važnu ulogu, uzimajući u obzir mogućnost variranja vrijednosti zavisno od vrste uzorka i primijenjene laboratorijske metode (Cobb i sur., 2025; Mârza i sur., 2024). U suglasju s modelom pet domena, procjena dobrobiti ne obuhvaća samo jedan pokazatelj, već i ponašanje, fizičko stanje te pozitivna i negativna iskustva životinje (Mellor i sur., 2020). Pregledni radovi o kortizolu u pasa također naglašavaju potrebu za opreznim tumačenjem pojedinačnih vrijednosti i povezivanjem fizioloških, ponašajnih i patoloških pokazatelja (Mârza i sur., 2024).

ZAKLJUČAK

Kortizol ostaje jedan od najkorisnijih fizioloških pokazatelja aktivnosti HPA osi u pasa. Njegova vrijednost proizlazi iz mogućnosti određivanja u različitim biološkim uzorcima i primjene u velikom broju istraživačkih i kliničkih situacija. Međutim, interpretacija mora biti usklađena s vremenskim okvirom pojedinog uzorka, načinom uzorkovanja, analitičkom metodom i karakteristikama životinje. Pregled istraživanja pokazuje da se koncentracija kortizola mijenja tijekom veterinarskih postupaka, prijevoza, boravka u skloništu, sportskih i radnih aktivnosti te različitih oblika interakcije čovjeka i psa. Te promjene ne mogu se automatski označiti kao dokaz negativnog stresa ili narušene dobrobiti. Individualne razlike u odgovoru proizlaze iz složene interakcije okolišnih, fizioloških, ponašajnih i genetskih čimbenika. Gen *NR3C1* jedan je od kandidatnih gena u istraživanjima individualne osjetljivosti na glukokortikoide, ali sadašnji podaci nisu dovoljni za njegovu primjenu kao samostalnog biomarkera stresne reaktivnosti. Buduća istraživanja trebala bi povezati kortizol, ponašanje, zdravstveno stanje, okolišni kontekst i genetske pokazatelje. Takav integrirani pristup mogao bi omogućiti pouzdaniju procjenu stresnog odgovora i dobrobiti pasa te bolje razumijevanje razloga zbog kojih jedinke različito reagiraju na iste podražaje, uz opreznju interpretaciju genetskih nalaza.

Napomena: Ovaj rad izrađen je u okviru institucionalnog istraživačkog projekta GenCortDog-GCD, financiranog u sklopu poziva Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za financiranje institucionalnih istraživačkih projekata sredstvima iz izvora 581 – Mehanizam za oporavak i otpornost, Europska unija – NextGenerationEU.

LITERATURA

1. Angle C.T., Wakshlag J.J., Gillette R.L., Stokol T., Geske S.M., Adkins T.O., Gregor C. 2009. Hematologic, serum biochemical and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high-intensity exercise in sled dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 38:370–374. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00122.x.
2. Beerda B., Schilder M.B.H., van Hooff J.A.R.A.M., de Vries H.W. 1997. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 52:307–319. doi:10.1016/S0168-1591(96)01131-8.
3. Beerda B., Schilder M.B.H., van Hooff J.A.R.A.M., de Vries H.W., Mol J.A. 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58:365–381. doi:10.1016/S0168-1591(97)00145-7.

4. Behrend E.N., Kooistra H.S., Nelson R., Reusch C.E., Scott-Moncrieff J.C. 2013. Diagnosis of spontaneous canine hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM consensus statement (small animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27:1292–1304. doi:10.1111/jvim.12192.
5. Bergamasco L., Osella M.C., Savarino P., Larosa G., Ozella L., Manassero M., Badino P., Odore R., Barbero R., Re G. 2010. Heart rate variability and saliva cortisol assessment in shelter dog: Human–animal interaction effects. *Applied Animal Behaviour Science*, 125:56–68. doi:10.1016/j.applanim.2010.03.002.
6. Bryan H.M., Adams A.G., Invik R.M., Wynne-Edwards K.E., Smits J.E.G. 2013. Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 52:189–196. PMID: 23562104; PMCID: PMC3624789.
7. Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G.P. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, 67:259–284. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816.
8. Chmelíková E., Bolechová P., Chaloupková H., Svobodová I., Jovičić M., Sedmíková M. 2020. Salivary cortisol as a marker of acute stress in dogs: A review. *Domestic Animal Endocrinology*, 72:106428. doi:10.1016/j.domaniend.2019.106428.
9. Chrousos G.P. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5:374–381. doi:10.1038/nrendo.2009.106.
10. Cobb M.L., Jiménez A.G., Dreschel N.A. 2025. Beyond cortisol! Physiological indicators of welfare for dogs: Deficits, misunderstandings and opportunities. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. Online ahead of print. doi:10.1080/10888705.2025.2572616.
11. Costa A., Sellon R.K., Court M.H., Burke N.S., Mealey K.L. 2016. Polymorphisms in the canine glucocorticoid receptor alpha gene (NR3C1 α). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39:16–21. doi:10.1111/jvp.12241.
12. Csoltova E., Martineau M., Boissy A., Gilbert C. 2017. Behavioral and physiological reactions in dogs to a veterinary examination: Owner-dog interactions improve canine well-being. *Physiology & Behavior*, 177:270–281. doi:10.1016/j.physbeh.2017.05.013.
13. Dreschel N.A., Granger D.A. 2009. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and Behavior*, 55:163–168. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.09.010.
14. Glenk L.M., Kothgassner O.D., Stetina B.U., Palme R., Kepplinger B., Baran H. 2014. Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 9:98–106. doi:10.1016/j.jveb.2014.02.005.
15. Gupta A., Yadav U., Bansal K.N., Bala Bishnoi M., Bala R., Verma N., Bhardwaj S., Kumar P., Kumar D., Yadav P.S. 2023. Hair cortisol: A biomarker of chronic stress in animals and its association with reproduction. *Animal Reproduction Update*, 3:43–58. doi: 10.48165/aru.2023.3.2.5.

16. Hennessy M.B. 2013. Using hypothalamic-pituitary-adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 149:1–12. doi:10.1016/j.applanim.2013.09.004.
17. Hennessy M.B., Davis H.N., Williams M.T., Mellott C., Douglas C.W. 1997. Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Physiology & Behavior*, 62:485–490. doi: 10.1016/s0031-9384(97)80328-9.
18. Hennessy M.B., Voith V.L., Mazzei S.J., Buttram J., Miller D.D., Linden F. 2001. Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Applied Animal Behaviour Science*, 73:217–233. doi:10.1016/S0168-1591(01)00139-3.
19. Hennessy M.B., Williams M.T., Miller D.D., Douglas C.W., Voith V.L. 1998. Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: Can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? *Applied Animal Behaviour Science*, 61:63–77. doi:10.1016/S0168-1591(98)00179-8.
20. Herbel J., Aurich J., Gautier C., Melchert M., Aurich C. 2020. Stress response of Beagle dogs to repeated short-distance road transport. *Animals*, 10:2114. doi:10.3390/ani10112114.
21. Horváth Z., Igyártó B.Z., Magyar A., Miklósi Á. 2007. Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. *Hormones and Behavior*, 52:621–630. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.08.001.
22. Kállai B.M., Csöndes J., Kiss G., Bodrogi L., Rónai Z., Mészáros T. 2021. Restrained expression of canine glucocorticoid receptor splice variants α and P prognosticates fatal disease outcome in SIRS. *Scientific Reports*, 11:24505. doi:10.1038/s41598-021-03451-0.
23. Kaszycka K., Goleman M., Krupa W. 2025. Testing the level of cortisol in dogs. *Animals*, 15:1197. doi:10.3390/ani15091197.
24. Kemppainen R.J., Sartin J.L. 1984. Evidence for episodic but not circadian secretion of cortisol in the dog. *Journal of Endocrinology*, 103:219–227. doi:10.1677/joe.0.1030219.
25. Koolhaas J.M., Bartolomucci A., Buwalda B., de Boer S.F., Flügge G., Korte S.M., Meerlo P., Murison R., Olivier B., Palanza P., Richter-Levin G., Sgoifo A., Steimer T., Stiedl O., van Dijk G., Wöhr M., Fuchs E. 2011. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35:1291–1301. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.003.
26. Lloyd J.K.F. 2017. Minimising stress for patients in the veterinary hospital: Why it is important and what can be done about it. *Veterinary Sciences*, 4:22. doi:10.3390/vetsci4020022.
27. Mariti C., Carlone B., Protti M., Gazzano A. 2015a. Evidence for a synchronization of hormonal states between humans and dogs during competition. *Physiology & Behavior*, 147:54–62. doi:10.1016/j.physbeh.2015.04.010.

28. Mariti C., Raspanti E., Zilocchi M., Carlone B., Gazzano A. 2015b. The assessment of dog welfare in the waiting room of a veterinary clinic. *Animal Welfare*, 24:299–305. doi:10.7120/09627286.24.3.299.
29. Mârza S.M., Munteanu C., Papuc I., Lăcătuș R., Petraru D., Purdoui R.C. 2024. Behavioral, physiological, and pathological approaches of cortisol in dogs. *Animals*, 14:3536. doi:10.3390/ani14233536.
30. McEwen B.S., Wingfield J.C. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43:2–15. doi:10.1016/S0018-506X(02)00024-7.
31. Mellor D.J., Beausoleil N.J., Littlewood K.E., McLean A.N., McGreevy P.D., Jones B., Wilkins C. 2020. The 2020 Five Domains Model: Including human–animal interactions in assessments of animal welfare. *Animals*, 10:1870. doi:10.3390/ani10101870.
32. Moberg G.P. 2000. Biological response to stress: Implications for animal welfare. In *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare*. Eds. G.P. Moberg, J.A. Mench, CABI Publishing, Wallingford, pp. 1–21. doi:10.1079/9780851993591.0001.
33. Möstl E., Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23:67–74. doi:10.1016/S0739-7240(02)00146-7.
34. Nicolaides N.C., Galata Z., Kino T., Chrousos G.P., Charmandari E. 2010. The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids*, 75:1–12. doi:10.1016/j.steroids.2009.09.002.
35. Nicolaides N.C., Kyratzi E., Lamprokostopoulou A., Chrousos G.P., Charmandari E. 2015. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22:6–19. doi:10.1159/000362736.
36. Oakley R.H., Cidlowski J.A. 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132:1033–1044. doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007.
37. Palme R. 2019. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology & Behavior*, 199:229–243. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.11.021.
38. Polgár Z., Blackwell E.J., Rooney N.J. 2019. Assessing the welfare of kennelled dogs—A review of animal-based measures. *Applied Animal Behaviour Science*, 221:1–13. doi:10.1016/j.applanim.2019.02.013.
39. Radisavljević K., Vučinić M., Becskei Z.S., Stanojković A., Ostović M. 2017. Comparison of stress level indicators in blood of free-roaming dogs after transportation and housing in the new environment. *Journal of Applied Animal Research*, 45:52–55. doi:10.1080/09712119.2015.1091338
40. Rooney N.J., Cowan S. 2011. Training methods and owner–dog interactions: Links with dog behaviour and learning ability. *Applied Animal Behaviour Science*, 132:169–177. doi: 10.1016/j.applanim.2011.03.007.

41. Rovira S., Muñoz A., Benito M. 2008. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. *Veterinární Medicina*, 53:333–346. doi: 10.17221/1860-VETMED
42. 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*, 21:55–89. doi:10.1210/edrv.21.1.0389.
43. Schroers M., Zablotzki Y., Meyer-Lindenberg A. 2025. Comparison of the determination of cortisol in canine saliva by chemiluminescence immunoassay and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 37:539–544. doi:10.1177/10406387251327413.
44. Sheriff M.J., Dantzer B., Delehanty B., Palme R., Boonstra R. 2011. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166:869–887. doi:10.1007/s00442-011-1943-y.
45. Tayler S., Hazuchova K., Riddle A., Swann J.W., Glanemann B. 2022. Investigation of single-nucleotide polymorphisms in the NR3C1 α glucocorticoid receptor gene in Cocker Spaniels with primary immune thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36:1281–1286. doi:10.1111/jvim.16468.
46. Vincent I.C., Michell A.R. 1992. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science*, 53:342–345. doi:10.1016/0034-5288(92)90137-Q.

ASSESSMENT OF STRESS IN DOGS THROUGH CORTISOL MEASUREMENT: FROM A PHYSIOLOGICAL INDICATOR TO A WELFARE BIOMARKER

Anamaria Ekert Kabalin^{1*}, Vladimir Dimitrijević², Sven Menčik¹, Aneta Piplica¹, Aleksandra Aleksić-Agelidis², Velimir Sušić¹, Marcela Šperanda³, Niko Popović¹, Mladenka Vukšić¹, Mario Ostović¹

¹ University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Croatia

² University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Republic of Serbia

³ Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences
Osijek, Croatia

*Corresponding author's e-mail: akabalin@vef.hr

Summary

Stressors of varying intensity are an integral part of dogs' lives and may affect their behaviour, health status and overall welfare. Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis leads to increased cortisol secretion, making cortisol one of the most widely used physiological indicators of the stress response. Cortisol can be measured in a range of biological samples, including blood, saliva, urine, faeces and hair, each providing insight into different aspects of stress-related physiological activity.

Alterations in cortisol concentrations may occur in dogs exposed to a wide range of situations, including shelter housing, transportation, veterinary procedures, environmental changes, sporting activities and participation in dog shows. At the same time, substantial inter-individual variation in the magnitude of the response may be observed even among dogs exposed to comparable environmental conditions. The observed variation may reflect the combined effects of environmental influences, physiological status and genetic background. Hair cortisol analysis has gained interest as an indicator of long-term stress exposure because it reflects HPA axis activity over extended periods. In contrast, salivary cortisol determination represents a practical and non-invasive method for assessing acute responses to specific stimuli. Blood cortisol measurement allows the assessment of short-term changes in cortisol concentrations, although the sampling procedure itself may influence the animal's stress response. Urinary and faecal cortisol measurements provide a broader, time-delayed insight into glucocorticoid excretion and metabolism and may therefore be useful for assessing cumulative stress responses. The complementary information contained in different biological samples enables a broader assessment of the stress response, particularly when physiological measures are interpreted alongside behavioural indicators.

In addition, research has begun to examine genetic factors that may influence individual stress responsiveness, particularly *NR3C1* gene, which encodes the glucocorticoid receptor. Understanding the relationships between cortisol concentrations, stress responsiveness and genetic background could facilitate the identification of more reliable welfare biomarkers, improve welfare assessment in dogs and support more individualized management and care of dogs exposed to diverse environmental and social challenges.

Keywords: animal welfare, biomarkers, cortisol, dog, glucocorticoid receptor, stress.