

Stressmessung bei brachyzephalen Hunden
Ein standardisierter Belastungstest bei Hunden

Von Elisa Kähler

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Stressmessung bei brachyzephalen Hunden
Ein standardisierter Belastungstest bei Hunden

Von Elisa Kähler
aus Bologna

München, 2025

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.- Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Mitbetreuung durch:
Dr. Maike Schroers

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dorothea Döring

Tag der Promotion: 8. Februar 2025

Inhalte der Dissertation wurden auf der folgenden nationalen Tagung vorgestellt:

DVG Vet-Congress

67. Jahreskongress der DVG-Fachgruppe DGK-DVG

19.11.2021

Kortisolkonzentrationen im Speichel von Mops-Hunden im Rahmen eines
standardisierten Fitness-Tests.

M. Schroers, E. Kähler, A. Meyer-Lindenberg

INHALTVERZEICHNIS

INHALTVERZEICHNIS	XIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XV
I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT.....	3
1. <i>Brachyzephalie bei Hunden</i>	3
2. <i>Geschichte der brachyzephalen Hunderassen</i>	4
3. <i>Anatomische Veränderungen und Pathophysiologie des brachyzephalen obstruktiven Atemwegssyndroms (BOAS)</i>	6
4. <i>Genetik der Brachyzephalie</i>	8
5. <i>Symptome und Diagnostik</i>	9
6. <i>Test zur Bestimmung des Grades der Brachyzephalie</i>	12
7. <i>Kortisol als Parameter zur Beurteilung von Stress</i>	14
8. <i>Soziale Aspekte</i>	17
III. PUBLIKATION.....	19
IV. DISKUSSION.....	30
1. <i>Herzfrequenz</i>	30
2. <i>Atemfrequenz</i>	32
3. <i>Temperatur</i>	33
4. <i>Kortisol</i>	33
5. <i>Zukunftsaußichten</i>	38
V. ZUSAMMENFASSUNG	39
VI. SUMMARY	41

Inhaltverzeichnis

VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	43
VIII. DANKSAGUNG	57

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

6MWT	6-Minutes-Walking-Test
TH	Adrenocorticotropic hormone
BMP3-Gen	Bone Morphogenetic Protein 3
BOAS	brachyzephales obstruktives Atemwegssyndrom
BOAS (-)	Hund ohne brachyzephales obstruktives Atemwegssyndrom
BOAS (+)	Hund mit brachyzephalem obstruktiven Atemwegssyndrom
BWT	Bronchial-wall-thickening
CG	Kontroll Gruppe
CgA	Chromogranin A
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CT	Computertomographie
FB	Französische Bulldogge
GH	Growth hormone
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IRT	Infrared Thermography
LBI	Längen-Breiten-Index
LLI	Längen-Längen-Index
OSAS	Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
PG	Mops
SMOC2-Gen	SPARC Related Modular Calcium Binding 2
THBS2-Gen	Thrombospondin 2
TSH	Thyroid-stimulating hormone
WBBP	Whole-Body-Barometric-Plenthysmography

I. EINLEITUNG

Das brachyzephale obstruktive Atemwegssyndrom (BOAS) ist eine komplexe Erkrankung, die hauptsächlich die oberen Atemwege betrifft und durch eine Fehlbildung des Schädelns bei bestimmten Rassen verursacht wird (Emmerson, 2014). Besonders häufig betroffen sind v.a. Rassen wie der Mops, die Französische Bulldogge und die Englische Bulldogge. Diese Rassen weisen die körperlichen Merkmale auf, die am stärksten für die Entwicklung dieses Syndroms prädisponieren, wie z. B. stenotische Nasenlöcher, fast vollständiges Fehlen der Nasenscheidewand, Hypertrophie der Turbinate, übermäßig langer weicher Gaumen und Trachealhypoplasie (Emmerson, 2014). Diese Merkmale verhindern den normalen Luftstrom in den Atemwegen, wodurch ein Unterdruck entsteht, der zum Kollabieren der Atemwege führt, was eine immer größere Atemanstrengung zur Folge hat (Emmerson, 2014). Es handelt sich um eine fortschreitende Erkrankung, die in einigen Fällen zum vorzeitigen Tod des Patienten führen kann. Das Vorhandensein und der Schweregrad der Erkrankung variieren von Individuum zu Individuum und sind erblich bedingt (Bannasch et al., 2010; Marchant et al., 2017; Schoenebeck et al., 2012). Hunde, die diese Krankheit entwickeln, sind oft nicht mehr in der Lage, ihre täglichen Aktivitäten ohne Beschwerden oder Schmerzen auszuführen. Schlafen, Fressen, Spielen und Laufen können für diese Hunde problematisch sein. Aus diesem Grund ist es notwendig, die genetischen Linien, die zur Entwicklung von BOAS führen, frühzeitig zu identifizieren und von der Zucht auszuschließen (Lilja-Maula et al., 2024; Packer & Tivers, 2015).

Zahlreiche Autoren haben prädiktive Belastungstests entwickelt, um auf nicht-invasive Weise die Hunde zu identifizieren, die am anfälligsten für die frühe Entwicklung eines brachyzephalen obstruktiven Atemwegssyndroms sind (Aromaa et al., 2019; Bernaerts et al., 2010; Gallman et al., 2023; Lilja-Maula et al., 2014; Liu et al., 2015, Liu et al., 2017a; Mach et al., 2022; Manens et al., 2014; Riggs et al., 2019; Swimmer & Rozanski, 2011).

In einer aktuellen Studie entwickelten Autoren einen Submaximaltest auf dem Laufband mit dem Ziel, die Auswertung zu standardisieren, mögliche externe Faktoren auszuschließen, eine konstante Luftfeuchtigkeit und Temperatur aufrechtzuerhalten und die Laufgeschwindigkeit und -dauer mechanisch zu steuern (Mach et al., 2022).

In Studien mit Schlittenhunden konnte eine Korrelation zwischen körperlicher Belastung und einem Anstieg des Kortisolspiegels bei Hunden festgestellt werden (Fergestad et al., 2015; Royer et al., 2005). Kortisol ist ein bekannter Parameter zur Beurteilung von Stress bei Hunden und Menschen (Chmelíková et al., 2020; Cobb et al., 2016). Obwohl die Schwankungen des Kortisolspiegels von verschiedenen subjektiven, umweltbedingten und zirkadianen Faktoren beeinflusst werden, gibt es Hinweise darauf, dass er als Parameter zur Beurteilung von körperlichem Stress (Schlittenfahren, Militär) verwendet werden kann (Angle et al., 2009; Fergestad et al., 2015; Haverbeke et al., 2008). Soweit dem Autor bekannt ist, wurde dieses Hormon noch nicht bei brachyzephalen Hunden nach körperlicher Anstrengung untersucht.

In der vorliegenden Studie wurden die Vitalparameter und der Kortisolspiegel von brachyzephalen Hunden unter körperlicher Belastung untersucht und mit denen von normozephalen Hunden unter der gleichen Belastung verglichen. Es wurde angenommen, dass sich die Vitalparameter und die Kortisolkurve zwischen brachyzephalen und normozephalen Hunden unterscheiden und dass die Erholungszeit bei ersteren länger ist.

Ziel der Studie war es, die Eignung eines solchen Tests zur Früherkennung von Hunden mit BOAS zu untersuchen. Es sollte ferner überprüft werden, ob der Kortisolspiegel ein geeigneter Indikator ist, um anhand des Stresses nach körperlicher Belastung zwischen brachyzephalen und nicht-brachyzephalen Hunden zu unterscheiden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Brachyzephalie bei Hunden

Die Definition der Brachyzephalie ist eine anatomische Anomalie, bei der die Breite des Schädelns im Verhältnis zur Länge überwiegt. Einer der wichtigsten anatomischen Aspekte der Brachyzephalie ist eine deutliche Verkürzung der Schädelform (Drake & Klingenberg, 2008). Beim erwachsenen normozephalen Hund (mesozephal und dolichocephal) sind der Hirnschädel und der Gesichtsschädel deutlich voneinander zu unterscheiden. Die Entwicklung des Gesichtsschädelns ist notwendig, um Platz für die Zähne zu schaffen (Drake & Klingenberg, 2008). Bei brachyzephalen Hunden unterscheiden sich Form und Größe des Sinus frontalis und der Conchae nasales wesentlich von denen des normozephalen Schädelns (Oechtering et al., 2007). Der Sinus frontalis ist bei der Französischen Bulldogge besonders klein und fehlt bei dem Mops vollständig. In der Nasenhöhle des brachyzephalen Schädelns ist nicht genügend Platz für das postnatale Wachstum der Conchae nasales, die oft hypertroph und hyperplastisch sind. Septum Defekte können vor allem beim Mops Hund auftreten (Oechtering et al., 2007). Bei zunehmender Brachyzephalie kommt es zu einer Verengung der Nasenlöcher und des Naseneingangs. Außerdem werden das rostrale Ende des Gehörgangs, der Meatus nasi ventralis, die Conchae nasales und das gesamte Os ethmoidale in eine vertikale Position gedrückt. Der Tränenkanal ist vertikaler und hat einen größeren Winkel (Nöller et al., 2006).

Es wird angenommen, dass der brachyzephale Phänotyp ursprünglich als potenzieller Vorteil im Kampf selektiert wurde, basierend auf der Annahme, dass diese kraniofaziale Konformation zu einer erhöhten Beißkraft führt; im Gegensatz dazu wurden viele der heutigen brachyzephalen Rassen als attraktiv aussehende Begleithunde gezüchtet (Ekenstedt et al., 2020). Die weltweit zunehmende Beliebtheit von Rassen wie Englische Bulldogge, Französische Bulldogge und Mopshund wird auf die besonders „niedlichen“ Gesichtsmerkmale zurückgeführt: ein pädomorphes Gesicht, das sich aus einem runden Schädel, einer verkürzten Schnauze, einer breiten Stirn und großen, hervortretenden Augen ergibt (Ekenstedt et al., 2020).

2. Geschichte der brachyzephalen Hunderassen

Der brachyzephale Hund hat sich im Laufe von 300 Jahren zu dem entwickelt, was wir heute kennen. Die Abbildung 1 zeigt einen Mops aus dem Jahr 1743, der eine deutlich längere Nase hatte, als es dem heutigen Rassestandard entspricht. Abbildung 2 zeigt den Mops heute gemäß dem Rassestandard. Er hat eine sehr kurze Nase, die oft von Hautfalten überlagert wird.



*Abbildung 1. Mops, 1743,
Bayerisches Nationalmuseum
(eigenes Foto)*



*Abbildung 2. Mops Heute, nach
Rassenstandard (Verband für das
Deutsche Hundewesen, 2022)*

Die Vielfalt der Hundeschädel hängt von der Variation zwischen kurzen und langen Schädeln und von der Verteilung des Gesichtsschädelns im Verhältnis zum Hirnschädel ab (Drake & Klingenberg, 2010). Als dolicocephal werden Hunde bezeichnet, die einen langen, schmalen Schädel mit hervorstehender Nase, vorspringender Crista sagittalis externa und schmalem zygomatischen Winkel haben. Im Gegensatz dazu werden Hunde mit einem runden Kopf ohne Crista sagittalis und einem Hirnschädel, der länger als der Gesichtsschädel ist, als brachyzephale Hunde bezeichnet (Drake & Klingenberg, 2010).

Hunde, deren Merkmale zwischen diesen beiden Extremen liegen, werden als mesozephale bezeichnet (Ellenberger et al., 1977).

Die ersten Schädelmessungen zur Klassifizierung der Schädelformen wurden von Brehm et al. (1985) und Evans (1993) durchgeführt. Anhand von Messungen an Schädelpräparaten verschiedener Hunderassen teilten sie diese in dolicho-, meso- und brachyzephale Rassen ein. Die oben genannten Autoren beider Literaturquellen maßen die Länge des Gesichtsschädelns von der Grenze zwischen Os frontale und Os nasale bis zum Prosthion, die Länge der Hirnkapsel vom rostralsten Punkt der Crista occipitalis externa bis zur Grenze zwischen Os frontale und Os nasale und die Breite der Hirnkapsel vom lateralsten Punkt des Hirnschädelns (meist die Grenze zwischen Os parietale und Os temporale). Das Verhältnis der Länge der Hirnkapsel zur Länge des Gesichtsschädelns ergibt den Längen-Längen-Index (LLI). Der Längen-Breiten-Index (LBI) ergibt sich aus dem Verhältnis der Hirnkapsellänge zur Hirnkapselbreite. Als dolicocephal gelten demnach Hunde mit einem LLI von 0,80 bis 0,98 und einem LBI größer als 1,5. Mesozephale Rassen haben einen LLI von 1,0 bis 1,13 und einen LBI von 1,38 bis 1,48. Hunde mit einem LLI von 1,60 bis 3,44 und einem LBI nahe 1 werden den brachyzephalen Rassen zugeordnet (Brehm et al., 1985).

Evans (1993) maß die Schädelbreite als Abstand zwischen den beiden Zygomaticusbögen und die Schädellänge vom kaudalen Rand des Os occipitale bis zum Prosthion, Alveolarrand des Os incisivum. Daraus wurde der Schädelindex berechnet. Zu den dolicocephalen Rassen zählten Hunde mit einem Index von 0,39 bis 0,51, z. B. der Irische Wolfshund. Hunde mit einem Index von 0,52 bis 0,80 wurden den mesozephalen Rassen zugeordnet, z. B. der Deutsche Schäferhund. Die brachyzephalen Rassen hatten einen Index von 0,81 und höher, wie zum Beispiel der Pekinese. Später, im Jahr 2012, identifizierten Koch et al. (2012) zwei Indizes, um die Größe des Schädels zu messen: den Schädelindex (S-Index) und den Längen-Breiten-Index (LW-Index). Es wurde

festgestellt, dass bei brachyzephalen Hunden der S-Index immer kleiner oder gleich 1,25 und der LW-Index immer kleiner als 1,44 war. Drei Jahre später untersuchte dieselbe Forschergruppe die Veränderung des Schädels bei brachyzephalen Hunden über einen Zeitraum von 100 Jahren. Bei Verwendung der gleichen Indizes wurde eine fortschreitende Verschlechterung der Brachyzephalie beobachtet (Koch et al., 2014).

Es ist bekannt, dass viele Menschen eine Vorliebe für Tiere mit kindlichem Aussehen haben, d. h. mit runden Gesichtern, großen Augen und kleinen Nasen (Harvey et al., 2019). Als Grund für die Selektion und ihre anschließende Extremisierung nimmt Fournier an, dass diese kindlichen Gesichtsmerkmale bei Erwachsenen die gleiche Anziehung, Fürsorglichkeit und positive Emotionen auslösen wie ein menschlicher Säugling (Fournier, 2002). Das Vorhandensein körperlicher Beeinträchtigungen führt bei den Besitzern zudem zu einem verstärkten Schutzbedürfnis gegenüber ihren Hunden (Fournier, 2002).

3. Anatomische Veränderungen und Pathophysiologie des brachyzephalen obstruktiven Atemwegssyndroms (BOAS)

Mehrere anatomische Veränderungen der oberen Atemwege führen bei betroffenen Hunden zu einer Reihe von pathophysiologischen Veränderungen, die in ihrer Gesamtheit das brachyzephale obstruktive Atemwegssyndrom ausmachen (Oechtering et al., 2007).

Die auffälligste Veränderung bei brachyzephalen Hunden ist die Verkürzung des Gesichtsschädels. Dies betrifft vor allem die Knochen des Oberkiefers (Maxilla) und des Zwischenkiefers (Prämaxilla). Die Verkürzung dieser Knochen führt zu einer Rotation der Gesichtsknochen nach dorsal, die als Airorhynchie bezeichnet wird. Weitere charakteristische Merkmale des brachyzephalen Schädels sind eine Verbreiterung des Schädels in der medio-lateralen Ebene, ein verkürzter und oft nach oben gerichteter Nasenrücken, ein häufig auftretender Unterbiss (Prognathie), reduzierte oder fehlende Stirnhöhlen und veränderte, oft übergroße Nasenmuscheln, die bis in den Nasenrachenraum reichen können (Ekenstedt et al., 2020). Beim normozephalen Tier wird der Boden der Nasenhöhle, der diese kaudal vom Nasenrachen trennt, von der Ala vomeris und der Lamina perpendicularis des Gaumenbeins gebildet. Die Lamina basalis bildet auch den Abschluss der Nasenhöhle zum Nasenrachen und dient als Ansatzstelle

für die mittlere Nasenmuschel. Beim brachyzephalen Tier ist die Lamina basalis viel früher ausgebildet, so dass der Ansatzpunkt der mittleren Nasenmuschel viel weiter rostral liegt. Stattdessen ist der Raum mit Muschelmaterial ausgefüllt, das sich so ungehindert in die Atemwege und auch in die Choanen und den Nasenrachen ausbreiten kann (Oechtering et al., 2007).

Diese Veränderungen der knöchernen Strukturen haben erhebliche Auswirkungen auf die oberen Atemwege. Als primäre Verengungen der Atemwege sind Stenosen der Nasenlöcher und ein relativ zu langes Gaumensegel anzusehen (Aron & Crowe, 1985; Harvey, 1982; Koch et al., 2003; Riecks et al., 2007; Wykes, 1991).

Die Nasenhöhle ist bei brachyzephalen Hunden stark verkürzt. Trotz der Verkürzung sind die Nasenmuscheln (Conchae nasales) oft hypertroph und hyperplastisch und können in den Nasenrachenraum hineinragen. Dies führt zu einer zusätzlichen Einengung der Atemwege (Ekenstedt et al., 2020).

Bei brachyzephalen Tieren sind die Nasenlöcher nur schlitzförmig, die Nasenflügel sind hervorstehend, die Plica alaris ist vergrößert. Die Nasengänge sind dadurch verengt. Die Naseneingangsfalten sind gegeneinander verschoben. Im Bereich des Naseneingangs ist dies durch asymmetrische Schleimhautfalten und abnorme, nach rostral gerichtete mittlere Nasenmuscheln bedingt (Oechtering et al., 2007). Der Nasengang (Meatus nasi ventralis) ist häufig durch Muschelmaterial der ventralen oder mittleren Nasenmuschel verlegt. Teile der ventralen oder mittleren Nasenmuschel können in die Choanen hineinragen und den Übergang vom Atem- zum Nasenrachenraum stören. Im Extremfall ragen Lamellen der mittleren Nasenmuschel über die Choanen hinaus nach kaudal in den Nasenrachenraum. In einer Studie von Oechtering et al. (2007) waren die Atemwege bei allen untersuchten brachyzephalen Tieren in ihrem gesamten Verlauf quer gebogen.

Eine der häufigsten Anomalien bei brachyzephalen Hunden ist ein verlängerter weicher Gaumen. Durch die Verkürzung des Gesichtsschädels ist der weiche Gaumen oft zu lang für den verkürzten Rachenraum. Dies führt dazu, dass der Gaumen in den Kehlkopfeingang hineinragt und die Atemwege teilweise verlegt sind (Ekenstedt et al., 2020; Geiger et al., 2021). Der weiche Gaumen ist nicht nur zu lang, sondern auch verdickt, und die Zunge ist zu lang und zu dick für die Maulhöhle (Oechtering, 2010).

Der durch die Obstruktion der oberen Atemwege erhöhte Unterdruck beim Einatmen kann zu einer Ödematisierung des Nasopharynxgewebes sowie zu einer Verlagerung der Kehlkopftaschen (Sacculi laryngei) und der Tonsillen führen. Im fortgeschrittenen Stadium kann es auch zu einem Kehlkopfkollaps oder Trachealkollaps kommen (Aron & Crowe, 1985). Bei einigen brachyzephalen Rassen, insbesondere bei der Englischen Bulldogge, kommt es außerdem häufig zu einer Hypoplasie der Luftröhre. Hier ist der Durchmesser der Luftröhre im Verhältnis zur Körpergröße zu klein, was den Atemwiderstand zusätzlich erhöht (Geiger et al., 2021). Dies führt zu einer erhöhten Atemanstrengung und zu einem turbulenten Luftstrom in den oberen Atemwegen. Dies ist oft als Atemgeräusch oder Stridor hörbar und trägt zu einer erhöhten Atemarbeit bei. Diese Schädigungen führen im Laufe des Hundelebens zu weiteren Atemwegsobstruktionen und erhöhtem Unterdruck, einem *circulus vitiosus* (Koch et al., 2003).

In einer Studie wiesen 35 von 40 brachyzephalen Hunden bronchiale Stenosen auf, wobei der Mops am stärksten von BOAS betroffen war (De Lorenzi et al., 2009). Im Vergleich zu anderen brachyzephalen Rassen zeigte sich ein meist linksseitiger Bronchialkollaps (Oechtering, 2010).

Die eingeschränkte Atmung beeinträchtigt auch die Fähigkeit zur Thermoregulation. Hunde regulieren ihre Körpertemperatur hauptsächlich durch Hecheln. Bei körperlicher Anstrengung oder hohen Umgebungstemperaturen führt die Erweiterung der Blutgefäße, die die reichhaltige Gefäßversorgung der Nasenschleimhaut ausmachen, zu einem verbesserten Wärme- und Feuchtigkeitsaustausch. Bei extremer Anstrengung oder hohen Temperaturen gehen Hunde zum Hecheln über, um die Verdunstungskühlung durch die größere Oberfläche der Maulschleimhaut weiter zu verstärken (Goldberg et al., 1981; Schmidt-Nielsen et al., 1970). Beim Hecheln kommt es zu einer vermehrten Belüftung des Totraumes und somit zu einem vermehrten Gasaustausch (Jessen, 2000). Bei brachyzephalen Hunden ist diese Fähigkeit eingeschränkt, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Hitzschlag führt (Ekenstedt et al., 2020; Geiger et al., 2021).

4. Genetik der Brachyzephalie

Die genetischen Grundlagen der Brachyzephalie beim Hund sind komplex und noch nicht vollständig geklärt. Insbesondere die Schädelmorphologie hat eine komplexe genetische Grundlage und wird durch mehrere Gene bestimmt (Bannasch et al., 2010; Schoenebeck et al.,

2012). Mehrere Gene und Genvarianten wurden mit der Entwicklung des brachyzephalen Phänotyps in Verbindung gebracht:

Eine Studie von Marchant et al. (2017) identifizierte eine Mutation im SMOC2-Gen (SPARC Related Modular Calcium Binding 2), die mit Brachyzephalie bei Hunden assoziiert ist. Diese Mutation führt zu einem fehlerhaften Spleißen des Gens und zu einer verminderten Expression von SMOC2. Schoenebeck et al. (2012) fanden heraus, dass Variationen im BMP3-Gen (Bone Morphogenetic Protein 3) zur Diversität des Schädels bei Hunden beitragen, einschließlich der Entwicklung brachyzephaler Schädelformen. Eine weitere Studie von Bannasch et al. (2010) identifizierte eine Assoziation zwischen einer Region auf Chromosom 1, die das THBS2-Gen (Thrombospondin 2) enthält, und der Schädelform bei Hunden.

Die Identifizierung dieser genetischen Faktoren könnte in Zukunft gezieltere Zuchtprogramme fördern, die darauf abzielen, extreme Formen der Brachyzephalie zu reduzieren und gleichzeitig die charakteristischen Merkmale der Rassen zu erhalten.

5. Symptome und Diagnostik

Klinische Symptome

Die klinischen Symptome eines Hundes mit BOAS sind vielfältig. Zu den häufigsten gehören Atemgeräusche, Atemnot und Belastungsintoleranz.

Abhängig vom Grad der stenotischen Veränderungen treten bei BOAS unterschiedliche klinische Symptome auf. Dazu gehören pfeifende Atmung, lautes Schnarchen, Husten, Würgen, Synkopen und Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme (Lorison et al., 1997). Das klinische Leitsymptom ist der inspiratorische Stridor (Koch et al., 2014). Darüber hinaus zeigen die Hunde eine verminderte Stress- und Belastungstoleranz sowie Anzeichen von Atemnot. In schweren Fällen führt die Hypoxie zu Zyanose und Kollaps. Gleichzeitig zeigen die Hunde eine starke Wärmeintoleranz. Durch die verengten Strukturen der Nasenhöhlen und damit der Nasenmuscheln ist die Thermoregulation der brachyzephalen Hunde gestört, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Hitzschlag führt (Ekenstedt et al., 2020; Geiger et al., 2021; Oechtering, 2010). Die Symptome verschlimmern sich oft bei Hitze, Aufregung oder körperlicher Anstrengung

(Ekenstedt et al., 2020; Geiger et al., 2021). Die Schwere der Symptome hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen.

Zudem erkranken viele Hunde bereits vor dem dritten Lebensjahr (Oechtering et al., 2007).

Die Mechanismen des Respirations- und Gastrointestinaltrakts, die für die Atmung und das Schlucken notwendig sind, können sich gegenseitig pathologisch beeinflussen (Grobman, 2021; Luciani et al., 2022). Die häufigsten klinischen Symptome sind Regurgitation, Erbrechen und Dysphagie (Freiche & German, 2021; Roedler et al., 2013). Eine kongenitale oder erworbene Hiatushernie ist eine häufige Zusatzdiagnose bei Hunden, die für eine BOAS-Operation vorgestellt werden. Die Hiatushernie definiert als Prolaps von Bauchorganen durch den Hiatus Ösophagus in das Mediastinum, wird bei brachyzephalen Hunden durch einen abnormalen intrathorakalen und intraösophagealen Druck verschlammert (Broux et al., 2018; Eivers et al., 2019; Reeve et al., 2017). Eine Hiatushernie führt zu chronischer Regurgitation und begünstigt Ösophagitis, Magenvolvulus und Aspirationspneumonie (Mayhew et al., 2021). Pathologischer Reflux von Magen- oder Darminhalt führt zu Ösophagitis, Ösophagusulzeration und in einigen Fällen zu Ösophagusstrikturen (Freiche & German, 2021).

BOAS weist Ähnlichkeiten mit dem obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) beim Menschen auf, weshalb brachyzephale Hunde als wertvolle Modelle für die menschliche Erkrankung dienen können (Hendricks et al., 1987; Veasey et al., 1999). Bei Menschen und Hunden ähnelt der Zyklus von chronischer intermittierender Hypoxämie und Reoxygenierung wiederholten Ischämie- und Reperfusionsereignissen (Facin et al., 2020; Gianella et al., 2019). Zu den klinisch-pathologischen Anomalien zählen ein verminderter arterieller Sauerstoffpartialdruck, ein erhöhter arterieller Kohlendioxidpartialdruck, ein erhöhter Hämatokrit, Hyperglykämie, Hyperlipidämie und erhöhte Spiegel des C-reaktiven Proteins (Gianella et al., 2019; G. Hoareau & Mellema, 2015; Mellema & Hoareau, 2014). Diese Ergebnisse deuten auf die Aktivierung einer chronischen Stressreaktion durch Hypoxie, Insulinresistenz, veränderten Leberfettstoffwechsel und systemische Entzündung beim Menschen hin. Derselbe Mechanismus wird auch bei brachyzephalen Hunden vermutet (Barker et al., 2021; Gianella et al., 2019; Hendricks et al., 1987; Jawa et al., 2021).

Diagnose

Die Diagnose des brachyzephalen Atemwegssyndroms beruht in erster Linie auf der klinischen Untersuchung und der Anamnese. Die Beurteilung der Nasenlöcher und die Auskultation der

Atemgeräusche können im wachen Zustand durchgeführt werden. In einer Studie (Rosaspina, 2005) wurden Hundeköpfe von vorne fotografiert. Um das Verhältnis der Nasenlöcher zum Nasenspiegel zu bestimmen, wurde die Nase anhand der Fotos vermessen. Die Breite der Nase und die Breite der Nasenlöcher wurden jeweils an der breitesten Stelle gemessen. Das Verhältnis ergab sich aus der Breite der Nasenlöcher geteilt durch die halbe Länge des Nasenspiegels. In der Studie von Koch et al. (2014) wurde dieses Verhältnis zusammen mit dem S-Index, der Gaumensegellänge und den rhinomanometrischen Werten als Unterscheidungskriterium zwischen brachyzephal und nicht brachyzephal verwendet. Die zephalometrische Beurteilung des anatomischen Zustandes des Schädelns kann auch anhand von Röntgenaufnahmen erfolgen (Balli, 2004).

Im Vereinigten Königreich werden Englische Bulldoggen, Französische Bulldoggen und Mopshunde im Rahmen des *Respiratory Function Grading Scheme* des Kennel Clubs und der Universität Cambridge anhand eines Punktesystems auf BOAS untersucht:

Grad 0: Der Hund ist klinisch unauffällig und zeigt derzeit keine Anzeichen von BOAS in den Atemwegen.

Grad 1: Der Hund ist klinisch nicht betroffen, hat aber Atemgeräusche. Die körperliche Leistungsfähigkeit wird dadurch nicht beeinträchtigt.

Grad 2: Der Hund ist klinisch betroffen und zeigt mäßige Anzeichen von BOAS in der Atmung.

Grad 3: Der Hund ist klinisch betroffen und zeigt schwere Anzeichen von BOAS.

Um diesen Grad zu bestimmen, wird der Hund vor und nach einer kurzen, leichten Übung von einem geschulten Tierarzt untersucht. Die Besitzer werden ermutigt, ihre Hunde ab dem Alter von einem Jahr vorzustellen und die Untersuchung in regelmäßigen Abständen zu wiederholen (The Kennel Club, 2024).

Bildgebende Verfahren sind die Computertomographie (CT) und die Endoskopie. Nach einem festen Protokoll sollten die Verhältnisse der Nasenstruktur von rostral nach kaudal untersucht werden, beginnend mit der Beurteilung der Nasenlöcher unter Einbeziehung der Nasenflügel, weiter kaudal die Nasenhaupthöhle, der Nasenausgang und schließlich die Untersuchung von

Pharynx, Larynx, Trachea und deren Aufteilung (Oechtering et al., 2007). CT und Endoskopie sind nur am narkotisierten Tier möglich. Bei brachyzephalen Hunden, die sich einer Routineoperation oder einer bildgebenden Untersuchung unterziehen, besteht ein höheres Risiko für peri- und postanästhetische Komplikationen als bei nicht brachyzephalen Hunden (Gruenheid et al., 2018).

6. Test zur Bestimmung des Grades der Brachyzephalie

Da Belastungsintoleranz und eingeschränkte Erholungsfähigkeit aufgrund einer gestörten Thermoregulation zu den wesentlichen Merkmalen des BOAS gehören, könnte ein Belastungstest ein praktikables und nicht-invasives Screening-Verfahren darstellen. Zahlreiche Studien haben prädiktive Testverfahren entwickelt, um Hunde mit erhöhtem Risiko für die frühzeitige Entwicklung eines brachyzephalen obstruktiven Atemwegssyndroms zu identifizieren.

Der erste Belastungstest für brachyzephale Hunde in Deutschland wurde 2009 vom Deutschen Mopsclub e. V. standardisiert, mit dem Ziel, zuchtaugliche Mopshunde zu identifizieren. Die Hunde müssen eine Strecke von 1 km in höchstens 11 Minuten zurücklegen, wobei die Geschwindigkeit freigestellt ist. Der Test gilt als bestanden, wenn die Herz- und Atemfrequenz nach 15 Minuten Erholungszeit wieder im Normalbereich liegt (Deutscher Mopsclub, 2024).

Im Jahr 2012 wurden im Rahmen einer Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München anatomische Indizes gemessen und der Fitnesszustand der Hunde mittels eines Laufbandtests ermittelt. In dieser Studie zeigten brachyzephale Hunde eine signifikant höhere Atemfrequenz als die Kontrollgruppe. Über den Nasenlochindex, die Herzfrequenz und die Körpertemperatur in Ruhe konnten keine verlässlichen Aussagen gemacht werden (Martin, 2012).

In einer aktuellen Studie (Riggs et al., 2019) wurde die Sensitivität klinischer Untersuchungen in Kombination mit Belastungstests zur Bestimmung des Schweregrads von Erkrankungen der oberen Atemwege bei brachyzephalen Hunden untersucht. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Sensitivität klinischer Untersuchungen zur Diagnose von BOAS durch die Einbeziehung von Belastungstests, insbesondere des 3Minuten-Trabtests, verbessert wurde. In dieser Studie wurde auch eine *Whole-Body-Barometric-Plenthysmography* (WBBP) als vergleichendes und objektives Maß für den Schweregrad der Erkrankung verwendet. Die WBBP ist eine nicht-invasive,

objektive Technik zur Messung der Atemfunktion bei Tieren, die bei vollem Bewusstsein sind. Bei der Atmung kommt es zu Luftdruckschwankungen, die proportional zum Atemvolumen sind. Der gepumpte polarisierte Luftstrom hält Kohlendioxidgehalt, Temperatur und Feuchtigkeit im Normbereich und ermöglicht so Langzeitmessungen. Diese Technik wurde erfolgreich in zahlreichen Studien an brachyzephalen Hunden zur Messung der Atmungsfunktion eingesetzt (Bernaerts et al., 2010; Liu et al., 2015; Liu et al., 2017b; Riggs et al., 2019).

Ein weiterer submaximaler Belastungstest, der 6-Minutes-Walking-Test (6MWT), ist einfach durchzuführen und reproduzierbar für das Screening der Belastungstoleranz bei Hunden (Lilja-Maula et al., 2014; Manens et al., 2014; Swimmer & Rozanski, 2011). In der Studie von Lilja-Maula et al. (2017) legten Probanden mit schwerem BOAS eine kürzere Strecke zurück, gingen langsamer und erholten sich langsamer von der Belastung als Hunde mit nur leichten Anzeichen von BOAS, während Hunde anderer Rassen in der Kontrollgruppe eine längere Strecke zurücklegten und sich schneller erholten als Englische Bulldoggen. Der Anstieg der Körpertemperatur während der Belastung war bei den Englischen Bulldoggen signifikant höher als bei den Kontrollhunden.

In einer Pilotstudie aus dem Jahr 2023 wurde die Sensitivität des 6MWT und der Infrarot-Thermografie bewertet, um die Veränderung der Vitalparameter und der thermoregulatorischen Kapazität bei Hunden mit BOAS im Vergleich zu einer Gruppe brachyzephaler Hunde und einer Kontrollgruppe im Rahmen eines sicheren und minimalinvasiven Tests zu bestimmen. In dieser Studie wurde eine mäßige Korrelation zwischen der Thermoregulationsfähigkeit, der zurückgelegten Strecke und der Rektaltemperatur festgestellt, was die Hypothese unterstützen könnte, dass BOAS zu einer gestörten Thermoregulation beiträgt (Gallman et al., 2023).

In einer weiteren Studie wurden zwei verschiedene Belastungstests miteinander verglichen: Hier wurde die Aussagekraft des 6MWT und des 1.000-Meter-Gehtests zur Unterscheidung zwischen nicht oder nur leicht an BOAS erkrankten Hunden und schwer betroffenen Hunden untersucht. Die längere Übung, nämlich der 1.000m-Test, schien etwas besser in der Lage zu sein, zwischen betroffenen Hunden und weniger betroffenen Hunden zu unterscheiden (Aromaa et al., 2019).

In einer aktuellen Studie (Mach et al., 2022) wurde ein submaximaler Fitnessstest auf dem Laufband als Instrument zur Erkennung von Anzeichen einer Atemwegsobstruktion bewertet, die unter Ruhebedingungen nicht nachweisbar sind. Darüber hinaus wurde untersucht, inwiefern verschiedene Körperperformen und -maße mit BOAS korrelieren. Die Durchführung des Tests auf

einem Laufband erleichtert die kontinuierliche Überwachung der Patienten, ermöglicht die Standardisierung der Testumgebung und bietet eine konstante und ununterbrochene Belastung. Der Laufbandtest wird von den meisten Hunden toleriert und kann unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden. Die Sensitivität des Tests wird erhöht, wenn andere Parameter wie Atemmuster und Atemgeräusche berücksichtigt werden, um die Hunde zuverlässig zu klassifizieren.

7. Kortisol als Parameter zur Beurteilung von Stress

Ein wichtiger Aspekt des BOAS ist die Belastung für das Tier aufgrund der Atembeschwerden. Ein guter Indikator für Stress ist das Hormon Kortisol (Cobb et al., 2016).

Die Definition und das Verständnis von Stress haben sich seit Anfang 1900 stark verändert. Der australische Arzt Hans Selye legte den Grundstein für die moderne Stressforschung, indem er Stress als "unspezifische Reaktion des Organismus auf jede Belastung" definierte. Diese Definition basierte auf seinen Beobachtungen, dass Tiere auf verschiedene äußere Reize mit einer gemeinsamen physiologischen Reaktion reagierten. Selye erkannte, dass diese Stressoren eine konstante Reaktion im Körper auslösen, die durch die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) gekennzeichnet ist. Er beschrieb die komplexen Veränderungen im Körper als "allgemeines Anpassungs- oder Stresssyndrom", das durch adrenale Hyperplasie, gastrointestinale Ulzera und thymolymphatische Involution gekennzeichnet war (Selye & Fortier, 1950; Selye, 1950; Tan & Yip, 2018).

Im Laufe der Zeit hat sich das Konzept der Allostase entwickelt, das die adaptive Reaktion des Organismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase beschreibt. Diese Reaktion wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Zellaktivitäten und Mediatoren des Immunsystems, des zentralen und autonomen Nervensystems und der HPA-Achse gesteuert (McEwen, 2007).

Die unmittelbare Stressreaktion, von Walter Cannon als "Kampf oder Flucht-Syndrom" beschrieben, äußert sich in einer massiven Ausschüttung von Katecholaminen. Diese schnelle, aber kurzlebige Reaktion hat ihren Ursprung im Hirnstamm und führt durch die Stimulation

sympathischer und parasympathischer Nervenwege zu raschen physiologischen Veränderungen (Cannon, 1935).

Die HPA-Achse spielt eine zentrale Rolle bei der Stressantwort. Bei Stress stimulieren kortikale und subkortikale Zentren den paraventrikulären Kern des Hypothalamus, was zur Freisetzung von Corticotropin Releasing Hormon (CRH) führt. CRH stimuliert die Produktion von ACTH in der Hypophyse, was wiederum die Produktion und Sekretion von Kortisol in der Nebennierenrinde anregt. Kortisol hat eine Doppelfunktion: Einerseits unterstützt es die Homöostase des Organismus angesichts von Bedrohungen, indem es den Stoffwechsel reguliert und die Energieverfügbarkeit erhöht. Andererseits schließt es einen negativen Rückkopplungskreis, indem es die weitere Aktivierung der HPA-Achse verhindert. Kurzfristig unterstützen Glukokortikoide das Überleben, indem sie Energie mobilisieren und den kardiovaskulären Tonus erhöhen. Zu hohe Glukokortikoidspiegel können jedoch langfristig zu Gesundheitsproblemen wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus Typ II und Immunsuppression führen. Neben seiner Funktion als endokriner Freisetzungsfaktor für ACTH hat CRH auch modulatorische und neuroprotektive Funktionen. Es beeinflusst auch die Sekretion anderer Hormone wie GH, TSH und GnRH, was zu einer komplexen Interaktion zwischen verschiedenen endokrinen Systemen führt. Es ist wichtig zu verstehen, dass Stress nicht immer negativ ist. Kurzfristiger, akuter Stress kann adaptive Prozesse fördern und die Leistungsfähigkeit steigern. Chronischer Stress hingegen kann zu einem Ungleichgewicht verschiedener Körpersysteme führen und die Anfälligkeit für Krankheiten erhöhen (Chrousos, 2009; Herman et al., 1997; McEwen, 2007).

Bei Menschen gibt es zwei Hauptmechanismen, die neuroendokrinen Reaktionen und Nervenreize zum Hypothalamus regulieren: reaktive und antizipatorische Mechanismen. Reaktive Mechanismen werden durch Schmerz sowie autonome und entzündliche Reize beeinflusst, während antizipatorische Mechanismen auf angeborenen Programmen oder konditionierten Reizen basieren und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) steuern (Chapman et al., 2008; Herman et al., 1997). Glukokortikoidhormone wie Kortisol regulieren diese Achse durch negative Rückkopplungen auf die Hypophyse, den Hypothalamus und das limbische System, insbesondere den Hippocampus und die Amygdala. Bei chronischem Stress kann es zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren kommen, was zu einer Fehlfunktion der HPA-Achse führt und erhöhte Stressreaktionen aufrechterhält. Im Zentralnervensystem werden

Stresspfade in prozessuale und systemische Mechanismen unterschieden. Der *Locus ceruleus* spielt eine zentrale Rolle bei der Verstärkung von Stressreaktionen durch noradrenerge und multisynaptische Interaktionen mit dem limbischen System. Verschiedene Stressoren können die HPA-Achse durch unterschiedliche Mechanismen aktivieren, wobei adrenerge Neuronen eine entscheidende Rolle bei der Sekretion der HPA-Achse und der Reaktion auf Hypoglykämie spielen (Herman et al., 1997; Smith & Vale, 2006).

Wiederholte Stressexposition kann zu Gewöhnungseffekten führen, während neue oder chronische Stressoren die HPA-Achse ständig beanspruchen (Guilliams & Edwards, 2010). Die Stressreaktion führt zu einer Umverteilung von Energie zur Unterstützung des zentralen Nervensystems und des Bewegungsapparates und aktiviert Prozesse wie Glukoneogenese, Lipolyse und Proteolyse. Chronischer Stress vermindert langfristig die Immunreaktion und kann zu Entzündungsreaktionen beitragen (Black, 2002; Preiser et al., 2014).

Die Regulation der Stressantwort durch Glukokortikoide ist der Schlüssel zur Anpassung an Umwelteinflüsse. Akute Stressreaktionen verbessern kurzfristig das Gedächtnis, den Appetit und die Immunfunktion, während chronischer Stress das Gesundheitsrisiko durch Stoffwechsel- und Herz-Kreislauf-Probleme sowie geistige und körperliche Erschöpfung erhöht (Russell & Lightman, 2019). Die individuelle Empfindlichkeit und Anfälligkeit für Stress variiert und kann durch Entwicklungsfaktoren beeinflusst werden. Chronische Stressbelastung kann die Funktion des allostatischen Systems beeinträchtigen und zu Erkrankungen wie Depression und metabolischem Syndrom führen. Insgesamt zeigt sich, dass Stress sowohl akute als auch langfristige Auswirkungen auf den gesamten Organismus hat, wobei die Regulation der HPA-Achse eine zentrale Rolle spielt (Chrousos & Gold, 1992; Sapolsky et al., 2000).

Das Kortisol kann in Plasma, Speichel, Urin, Fäkalien und Haaren gemessen werden (Chmelíková et al., 2020). In dieser Studie wird Kortisol im Speichel gemessen, da es gut mit Plasma korreliert, einfach zu gewinnen und für den Hund gut verträglich ist.

In einem Review aus dem Jahr 2016, in den mehrere Studien analysiert wurden, wurde festgestellt, dass verschiedene Faktoren Veränderungen der Kortisolkonzentration im Speichel von Hunden beeinflussen. Es konnte jedoch keine Korrelation mit körperlicher Anstrengung festgestellt werden (Cobb et al., 2016). In einer norwegischen Studie mit Schlittenhunden wurde

hingegen ein Anstieg des Plasmakortisolspiegels bei Hunden beobachtet, die einer hohen körperlichen Belastung ausgesetzt waren (Fergestad et al., 2016).

Auch in der Humanmedizin gibt es mehrere Studien, in denen die Kortisolkonzentration nach dem Training gemessen wurde; so konnte in allen diesen Studien beobachtet werden, dass Kortisol nach der Belastung ansteigt und dann wieder abfällt (Arent et al., 2010; Di Luigi et al., 2012; Di Luigi et al., 2003; Webb et al., 2008).

8. Soziale Aspekte

Brachyzephale Hunde sind trotz bekannter Gesundheitsprobleme immer noch sehr beliebt. Es gibt verschiedene wissenschaftliche Hypothesen und Erklärungen für dieses Phänomen.

Einer der Hauptgründe für die anhaltende Beliebtheit brachyzephaler Hunde ist ihr charakteristisches Aussehen. Menschen neigen dazu, menschliche Eigenschaften auf Tiere zu übertragen. Die flachen Gesichter brachyzephaler Hunde können als menschenähnlicher wahrgenommen werden, was zu einer stärkeren emotionalen Bindung führen kann. Flache Gesichter, große Augen und kleine Nasenlöcher gelten bei vielen Menschen als besonders niedlich und attraktiv. Solche Merkmale lösen den so genannten „Kindchenschema-Effekt“ aus. Dieser evolutionäre Mechanismus bewirkt, dass wir auf kindliche Merkmale mit positiven Emotionen und liebevollem Verhalten reagieren (Lorenz, 1943; Serpell, 2003).

Die Popularität dieser Rassen in den Medien und sozialen Netzwerken kann zu einem sich selbst verstärkenden Effekt führen, bei dem Menschen sich für diese Hunde entscheiden, um soziale Anerkennung zu erlangen oder Teil eines Trends zu sein. Der Besitz eines brachyzephalen Hundes kann in bestimmten Kreisen als Statussymbol oder als Mittel zum persönlichen Ausdruck dienen. Hunde dieser Rassen werden oft als Modeaccessoires angesehen und können ein Zeichen von Wohlstand und Stil sein (Beverland et al., 2008; Ghirlanda et al., 2014).

Viele Hundebesitzer sind sich der mit brachyzephalen Rassen verbundenen Gesundheitsproblemen nicht bewusst (Schroers & Meyer-Lindenberg, 2022). Obwohl Informationen über die Risiken und Probleme im Zusammenhang mit diesen Hunden verfügbar sind, fehlt es oft an ausreichender Aufklärung. Wenn bestimmte Symptome von den Besitzern als

normal angesehen werden, kann dies auch zu einer Verzögerung der tierärztlichen Behandlung führen (Packer et al., 2012).

Um die Gesundheit und das Wohlbefinden brachyzephaler Hunde zu verbessern, sind nach Packer und Tivers (2015) Strategien zur Optimierung der Zucht dieser Hunde erforderlich. Die mit BOAS verbundenen Risikofaktoren sollten vermieden werden, um die Aufrechterhaltung dieser schweren Erkrankung zu verhindern. Der Eindruck, dass BOAS bei brachyzephalen Rassen normal sei, muss von Besitzern, Züchtern und Tierärzten gleichermaßen widerlegt werden, um eine Unterversorgung einzelner Tiere sowie das Fortbestehen der Krankheit zu vermeiden (Packer & Tivers, 2015).

III. PUBLIKATION

Die Publikation „Salivary cortisol measurements in brachycephalic dog breeds as part of a standardized stress test“ von Elisa Kähler, Andrea Meyer-Lindenberg, Yury Zablotski und Maike Schroers wurde am 17.07.2024 zur Publikation im *Frontiers in Veterinary Science* akzeptiert. Es wurde am 31.07.2024 publiziert.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Muhammad Saqib,
University of Agriculture, PakistanREVIEWED BY
Mariangela Albertini,
University of Milan, Italy
Krisztina Nagy,
University of Hertfordshire, United Kingdom*CORRESPONDENCE
Maike Schroers
✉ Maike.Schroers@lmu.deRECEIVED 06 December 2023
ACCEPTED 17 July 2024
PUBLISHED 31 July 2024CITATION
Kähler E, Meyer-Lindenberg A, Zablotski Y and Schroers M (2024) Salivary cortisol measurements in brachycephalic dog breeds as part of a standardized stress test. *Front. Vet. Sci.* 11:1351225.
doi: 10.3389/fvets.2024.1351225COPYRIGHT
© 2024 Kähler, Meyer-Lindenberg, Zablotski and Schroers. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Salivary cortisol measurements in brachycephalic dog breeds as part of a standardized stress test

Elisa Kähler, Andrea Meyer-Lindenberg, Yury Zablotski and Maike Schroers*

Veterinary Faculty, Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

Introduction: Brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS) is a common condition in brachycephalic dogs, with Pugs (PG) and French Bulldogs (FB) appearing to be particularly typically affected. Objective and easy-to-perform tests are necessary to detect the disease at an early stage and to exclude dogs affected by BOAS from breeding.

Methods: The present study investigated the extent to which vital signs and salivary cortisol concentrations can be used to distinguish between healthy and BOAS-affected dogs in a standardized fitness test. A total of 57 PG, 56 FB and 27 meso- and dolichocephalic dogs were studied as control group (CG). In addition to vital signs, salivary cortisol concentrations were measured before and after the exercise test.

Results: It emerged that non-brachycephalic dogs showed a higher fitness level than brachycephalic dogs. The PG recovered significantly slower than the FB after the exercise test. In unaffected PG, cortisol levels rose significantly after the test and then fell again, in unaffected FB they fell significantly during the test. Unexpectedly, cortisol levels remained constant in BOAS affected dogs of both breeds.

Discussion: A possible explanation could be a disturbance of the pituitary–hypothalamic–adrenal axis, which could be due to the chronic stress of affected animals. This would have to be clarified in further studies. In conclusion, a submaximal fitness test may be a useful method to identify dogs suffering from BOAS as it is imperative to prevent the breeding and reproduction of affected dogs.

KEYWORDS

dog, stress, saliva, cortisol, fitness, test, boas

1 Introduction

The controversial discussion about the health status of brachycephalic dogs represents a very topical issue in veterinary medicine worldwide (1, 2). Recent studies have shown that brachycephalic dogs are predisposed to many diseases compared to non-brachycephalic dogs (3, 4). The popularity of these breeds is associated with “childlike” facial features, including a particularly short nose and large eyes. This led to the selection of anatomical features and abnormalities, such as the relative restriction of airways, narrower nostrils, clogged conches and longer soft palate (5, 6). Such anomalies can often cause chronic respiratory problems in brachycephalic dog breeds, such as the Pug, French Bulldog or English Bulldog, which consequently have a predisposition to develop a Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome (BOAS) (7–10). It is remarkable that this disease is one of the most common causes of shortened life expectancy in these breeds (11, 12). In a study on the quality of life of brachycephalic dogs, the owners reported in particular reduced physical activity, sleep

disturbances and sensitivity to heat in their animals (13). An increased risk of breathing disorders during sleep is also reported (14). In fact, brachycephalic dogs have already been used as a natural model for sleep apnoea syndrome (OSA) in humans (15, 16).

The increase in intrathoracic pressure due to upper airway obstruction may also cause gastrointestinal symptoms such as ptalism, regurgitation and vomiting (17, 18). Diagnosis is based on symptoms, clinical examination and diagnostic imaging (19). The treatment of choice is surgical correction of anatomical defects, such as widening the nostrils or shortening the soft palate (20).

BOAS is widespread and associated with pain, suffering and harm to the animals (21). To prevent breeding with diseased dogs, it is necessary to identify early signs of airway obstruction, which are not always apparent under resting conditions (16). In fact, several studies have demonstrated the utility of a submaximal exercise test to more accurately diagnose dogs with BOAS (16, 21–23). Identifying the intensity and nature of breath sounds to accurately assess the degree of BOAS during exercise testing is based on a careful clinical examination that requires a great deal of experience (21).

A number of parameters can be used to assess physical stress in the context of physical exercise, as has already been used, for example, in studies on sled dogs (24, 25). Cortisol is a well-known stress hormone, that is controlled by the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (26). It has already been used in both human and veterinary medicine to assess acute physical and psychological stress and pain (10, 27–29). Fluctuations in cortisol levels can be tracked by the concentrations in serum and saliva and correlate with each other (30, 31). Cortisol levels in dogs can be influenced by different physiological or environmental factors, e.g., an unfamiliar environment or the absence of the owner (27).

BOAS is often not recognized by the owner and for this reason often not diagnosed (32, 33). To the authors' knowledge, cortisol measurements related to stress in brachycephalic dogs have not been studied in the context of physical exercise. The aims of the study were therefore to evaluate the procedure of a standardized stress test and to detect BOAS predisposed dogs at an early stage. Cortisol concentrations in the saliva of the dogs were also examined to obtain indications of acute as well as chronic stress in the dogs.

2 Materials and methods

All studies and treatments were approved by the Ethics Committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich (application 167-02-05-2019).

2.1 Study protocol

The study was conducted from May 2019 to November 2021 at the Surgical and Gynaecological Small Animal Clinic, Ludwig-Maximilians-University Munich, Germany. Inclusion criteria for the study group were healthy purebred Pugs and French Bulldogs older than 2 years, with no previous diseases or surgical treatment of the respiratory tract. Small, dolicho or mesocephalic dog breeds that were lighter than 15 kg and older than 2 years served as control group, also without previous diseases.

As part of the study, a medical history questionnaire was completed, a clinical examination and a standardized stress test were performed (16) and saliva samples were collected at specific time points (Figure 1).

The questionnaire consisted of an assessment of the owner's perception of breathing sounds, limitations in physical fitness and concomitant diseases. Owners were asked about the dog's breathing sounds when awake and asleep, the subjective degree of limited physical activity and the perceived level of stress.

A general examination including respiratory and heart rate, throat and thoracic auscultation and measurement of body temperature was performed as part of the preliminary examination. A heart rate belt (Polar H10 Electro, Kempele, Finland) was placed on the patient's chest to measure the pulse rate continuously. Body temperature was measured with a digital thermometer. The weight of all dogs was recorded and the body condition score (BCS) was determined on a scale of 1 to 9 points (34). A modified stress test was used to assess the degree of BOAS (16), based on the method originally developed and validated by Liu et al. (35). In the 10-min adaptation phase, the dogs first got used to the environment and learned to run on the treadmill. This was followed by a 15-min break before the stress test was performed (16).

In the first step of the study, both the stress test results and the cortisol measurements of the Pugs and French Bulldogs were compared with the animals of the control group. In the second step, an internal comparison was made between the two brachycephalic breeds, divided into BOAS(+) (suffering from BOAS) and BOAS(–) (not suffering from BOAS).

2.2 Standardized stress test

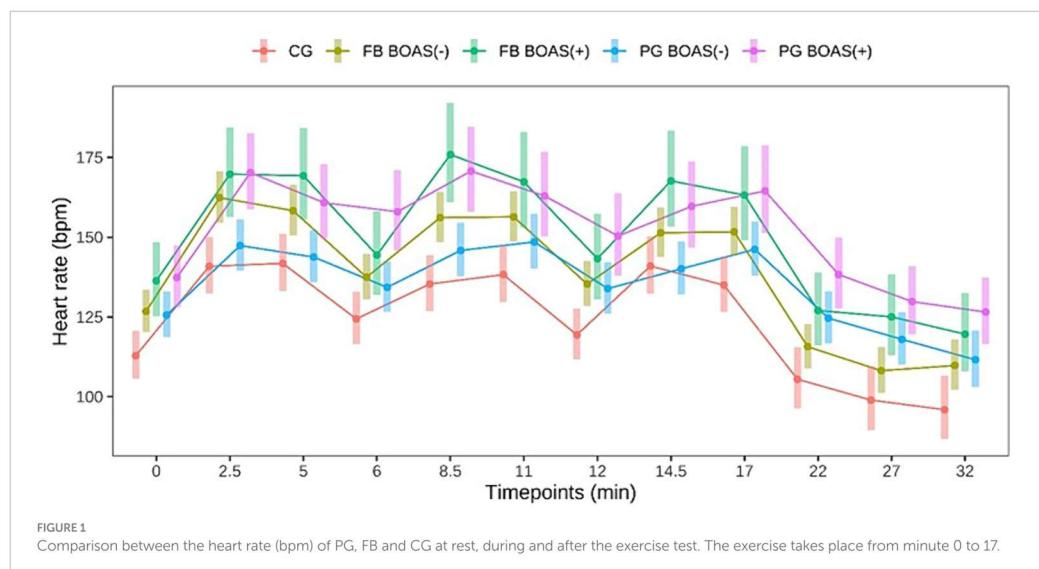
A ventilated room with a constant temperature between 20 and 24°C was chosen for the test. The exercise test was performed using a motorized treadmill (Kistler Instrumente GmbH, Munich, Germany). It lasted a total of 17 min, taking into account the 15 min of running and the two breaks of 1 min each after 5 and 10 min of running time. During the exercise test, the dogs trotted at their individual minimum speed on the treadmill (16). The owner of the dog was present during the entire test to avoid an additional stress factor. Dogs that refused to run on the treadmill were excluded from the test.

Heart rate was measured with the help of a pulse belt throughout the test. The heart rate should increase by at least 40% of the initial value during the stress test to ensure a minimum workload (36). The exercise test was not performed or was terminated if the dog was tachycardic with a sustained heart rate above 220 beats per minute, dyspnoeic with difficult breathing or showed continuous stertor or stridor before or during the test.

After the exercise test (minutes 0–17), a 15-min rest period was established from minute 18 to minute 32, during which heart rate and respiratory rate were measured every 5 min in all dogs. For subjects that did not show a return to basal levels of these parameters, measurements were taken beyond minute 32 until normalization with a 10% tolerance (16).

2.3 Cortisol measurements

All dogs had the opportunity to spend a 15-min adaptation period in the treadmill room with the owner, at the end of which



the first saliva sample was taken. Saliva samples were taken immediately before and after the test (minute 17) and 15, 30 and 60 min after the test, i.e., at minutes 32, 47 and 77 using commercially available swabs (Salimetrics Children's Swab and Tubes, Pennsylvania, United States). The swabs were left in the animal's mouth for about 1 min, then transferred to appropriate tubes, centrifuged at 500 rpm, and saliva was then stored in an Eppendorf tube at -20 degrees until analysis. The saliva samples were analyzed in the in-house laboratory using an antibody-based ELISA kit (Cortisol Enzyme Immunoassay Kit, Salimetrics, Pennsylvania, United States) according to the manufacturer's instructions (37). For this purpose, the ELISA plate was first washed twice, the samples diluted with an appropriate buffer solution and then pipetted onto the ELISA plate. Afterwards, the Biotin-detection-Antibody (BDA) working solution was pipetted and the plate incubated covered at 37°C for 45 min. In the next step, the ELISA plate was washed 3 times and then the Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate solution was pipetted and the plate was incubated again at 37°C for 30 min. After washing the plate 5 times, the tetramethylbenzidine substrate, which was also pre-warmed at 37°C, was pipetted and the plate was covered again and incubated at 37°C for 15 min. Finally, a stop solution was pipetted and the plate was immediately measured (ELISA Reader Infinite® F50, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany).

3 Statistical analyses

Data analysis was performed using R 3.6.3 (2020-02-29). Results with a *p*-value <0.05 were considered statistically significant, while with *p*-values between 0.05 and 0.1 were considered a tendency. We used generalized linear mixed-effects models with negative binomial distributions family to predict counts of heart and breeding frequencies over time. Negative binomial family was chosen over poisson due to the violation of overdispersion assumption (38).

Temperature was modeled via generalized linear mixed-effects models with Gaussian distribution family, due to no violations in assumptions: approximately normal distribution of the residuals and no heteroscedasticity (39). We used generalized linear models with Gamma family (due to continuous and highly skewed distribution) to predict cortisol concentrations. Mixed models included individual animals as random effect fitted on the intercept. *p*-values after comparing pairwise categories were always adjusted with Tukey method for multiple comparisons.

4 Results

140 dogs were examined in this study. A total of 57 Pug dogs (PG) and 56 French Bulldogs (FB) were included. As a control group (CG), 27 non-brachycephalic dogs of similar age and body weight to the study population were included in the study.

Among the 57 PG, 25 males, six of which were neutered, and 32 females, 11 of which were neutered, the mean age was 6 years (range 2–14), the mean weight was 8 kg (range 4–12) and the mean BCS was 5/9 (range 4–7/9).

Regarding the medical history, none of the PG owners reported that their PG's quality of life was affected by serious illness or previous surgery, although 17/57 (10%) owners reported moderate to severe breathing problems at rest and 22/57 (13%) during sleep. 4/57 (7%) noted moderate to severe exercise intolerance in their dog, while 12/57 (21%) experienced high levels of stress and agitation.

Among the 56 FB, 25 males, ten of whom were neutered, and 31 females, nine of whom were neutered, the mean age was 4 years (range 2–10), the mean weight was 12 kg (range 7–19) and the mean BCS was 5/9 (range 4–7/9). Based on the medical history, 12/56 (21%) FB had moderate to severe respiratory symptoms at rest and 17/56 (30%) at sleep. Moderate to severe exercise intolerance due to physical fitness was felt by 9/56 (16%) of the

owners, while 15/56 (14%) of them reported high levels of stress and restlessness.

The CG, 8 males of which 5 were neutered and 19 females of which 6 were neutered, included eight Parsons Russell Terriers, four Jack Russell Terriers, four mixed breed dogs, three Beagles, three Dachshunds and one each of Bolonka, Coton de Tuléar, Poodle and West Highland White Terrier. The average age was 6 years (range 2–15 years), the average weight was 9 kg (range 5–20) and the average BCS was 5/9 (range 4–8/9). None of the owners reported that their dog's quality of life was affected by respiratory problems, exercise intolerance or high levels of stress.

4.1 Severity of BOAS

The dogs were classified into BOAS classes. In the P group 14/57 (25%) were classified as "without signs" of BOAS, 21/57 (37%) as "with mild" signs, 18/57 (32%) as "with moderate" signs and 4/57 (7%) as "with severe" signs of BOAS. In the FB group, 19/56 (34%) dogs were classified as "with no signs" of BOAS, 22/56 (39%) as "with mild" signs, 13/56 (23%) as "with moderate" signs and 2/56 (4%) as "with severe" signs of BOAS. Dogs with no or mild signs of BOAS were classified in this study as "BOAS(–)," i.e., not clinically significant, dogs with moderate or severe signs of BOAS were classified in this study as "BOAS(+)," i.e., clinically affected (7). Thus, 35 out of 57 (61%) PG or 41 out of 56 (73%) FB fell into the BOAS(–) group and 22 out of 57 (39%) P or 15 out of 56 (27%) FB fell into the BOAS(+) group. All dogs in the control group were classified as BOAS(–).

4.2 Fitness test

16 out of 57 PG (28%) could not complete the exercise test: nine were excluded due to a heart rate above 240 bpm, one developed

extreme respiratory distress and loud wheezing, the remaining six dogs were unable to complete the exercise test due to high stress. Ten of these 16 dogs were BOAS(+). Six of 56 French Bulldogs (11%) failed the stress test, two had severe respiratory distress, one had a persistently high heart rate of >220, and three dogs had to stop the test due to severe exhaustion. One of the control dogs (4%) failed the test due to a persistently high heart rate.

41 out of 57 PG could complete the test, 29 of them were BOAS(–) and 12 BOAS(+). Of the remaining 50 FB that completed the test, 39 were BOAS(–) and 11 were BOAS(+). In all dogs that completed the run, the heart rate had returned to baseline after 15 min of rest, with a tolerance of 10%. Three dogs one PG BOAS(–), one PG BOAS(+) and one FB BOAS(–) showed a higher respiratory rate even without loud breathing sounds, up to 30 min after the run.

4.2.1 Comparison between BOAS (+) and non BOAS (–) brachycephalic dogs and non-brachycephalic dogs

4.2.1.1 Heart rate, respiratory rate and body temperature

Heart rate before, during and after the test was significantly higher in BOAS(+) PG than in BOAS(–) ($p < 0.05$). With respect to FBs, heart rate was significantly higher in BOAS(+) than in BOAS(–) at the times of greatest physical exertion ($p < 0.05$), while it tended to converge between the two groups after breaks, especially at minute 6 ($p = 0.19$) and 12 ($p = 0.15$). The heart rate curves of both races are shown in Figure 1.

Regarding the respiratory rate in PG, the BOAS(+) showed a higher respiratory rate than the BOAS(–) during the test, while a higher respiratory rate was observed in the BOAS(–) PG after the test. However, the results were not statistically significant ($p > 0.06$). Also in FB, no statistically significant difference in respiratory rate was observed in the BOAS(+) and BOAS(–) dogs. The latter had a lower frequency throughout the test and at rest. The curve of the respiratory rate of the two breeds is shown in Figure 2.

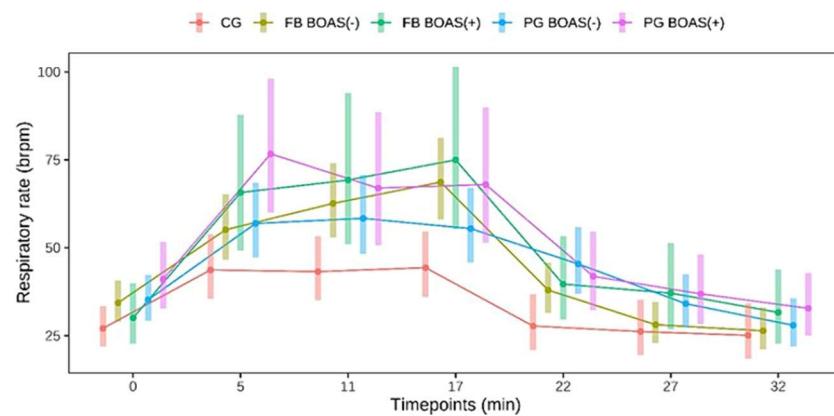


FIGURE 2
Comparison between the respiratory rate (brpm) of PG, FB and CG at rest, during and after the exercise test. The exercise takes place from minute 0 to 17.

The body temperature before and after exercise is shown in [Figure 3](#). The difference in the change of body temperature, before and after exercise, was statistically significant in PG and FB ($p <= 0.002$).

4.2.1.2 Salivary cortisol measurements

The measurement of cortisol was performed on a total sample of 87 dogs. Of these 87 dogs 27 were PG, 36 FB and 24 CG. Dogs that did not complete the exercise test and all those whose saliva samples were not sufficient for measurement with the antibody test

were excluded from this measurement. Salivary cortisol levels in PG, as shown in [Figure 4](#), showed a significant difference between BOAS(+) and BOAS(–) immediately before the test (minute 0), immediately after exercise (minute 17) and after 1 h of rest ($p < 0.05$). The cortisol concentrations of the PG with BOAS(–) rose significantly during the test and then fell again. In contrast, the cortisol concentrations of the PG with BOAS(+) were higher before and after the test, but did not show a statistically significant increase or decrease ($p > 0.8$).

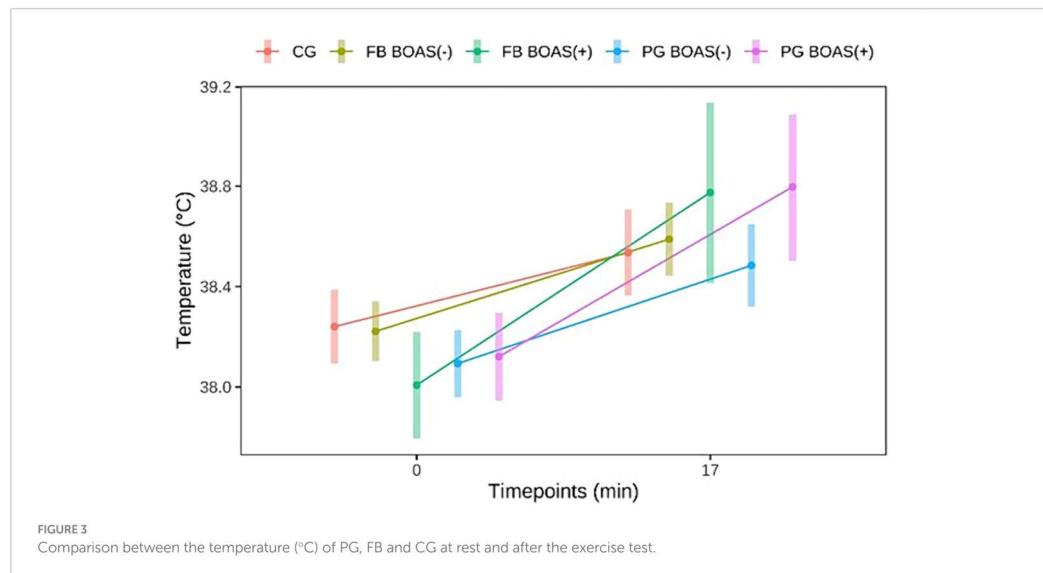


FIGURE 3
Comparison between the temperature (°C) of PG, FB and CG at rest and after the exercise test.

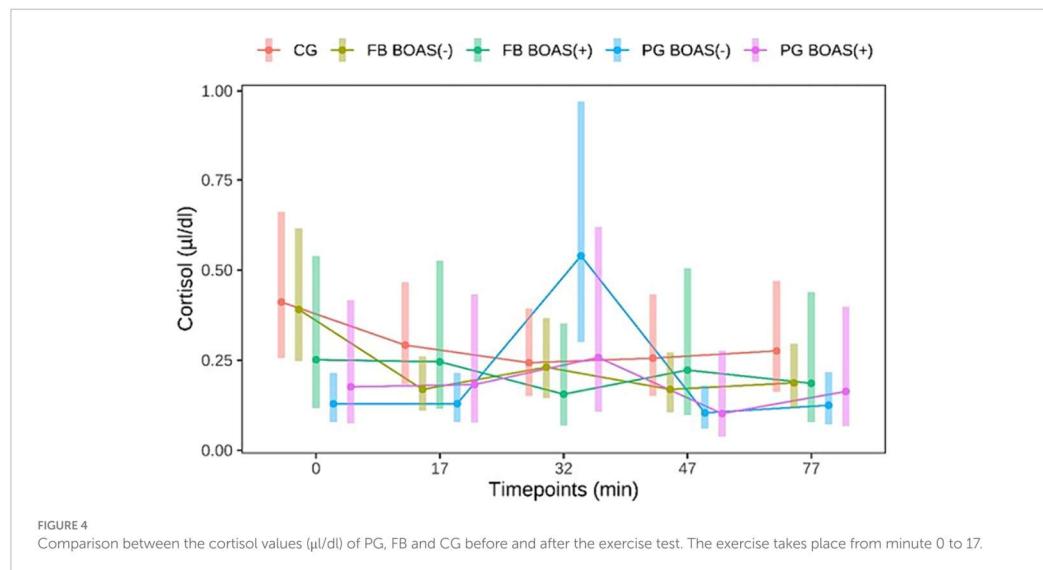


FIGURE 4
Comparison between the cortisol values (μl/dl) of PG, FB and CG before and after the exercise test. The exercise takes place from minute 0 to 17.

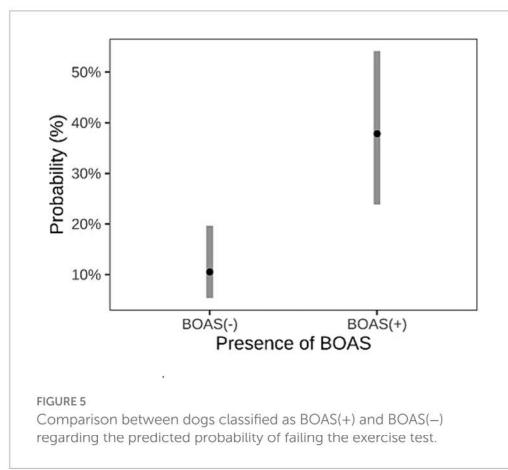


FIGURE 5
Comparison between dogs classified as BOAS(+) and BOAS(−) regarding the predicted probability of failing the exercise test.

With respect to FB, the BOAS(−) group showed significantly higher salivary cortisol levels before the test than the BOAS(+) group ($p=0.037$). During the test, the dogs in the BOAS(−) group showed a significant decrease in cortisol compared to time 0 ($p=0.002$). The BOAS(+) dogs showed no significant change in salivary cortisol.

4.2.1.3 Probability of failing the exercise test

Brachycephalic dogs BOAS(+) had a higher rate of failure in the exercise test (14/27) compared to those BOAS(−) (8/76), resulting in an odds ratio of 5.2 (95% CI, 1.97–14.50, $p=0.001$). The probability for a BOAS (−) dog to fail the exercise test was 10.5%, while the probability for a BOAS (+) dog to fail the exercise test was 37.8% as represented in Figure 5.

5 Discussion

The prevalence of brachycephalic breeds has increased greatly in recent decades, accompanied by an increase in the characteristics of brachycephaly (21, 40, 41). Breeding dogs with pronounced physical features of brachycephaly and BOAS has inevitably led to a deterioration in the quality of life (8, 9). It is therefore necessary to develop testing options to distinguish healthy individuals from those that are not suitable for breeding at an early stage. Several authors have already investigated a non-invasive predictive test that can be used to distinguish between BOAS-affected and non-affected dogs (16, 21, 35, 42). In a previous study (42) barometric whole-body plethysmography was used as a non-invasive and objective technique. Subsequently, the same group of researchers validated the stress test and laryngeal auscultation as an objective measurement method to determine the BOAS severity level (21). The authors advocated the use of the 3-min trot test, a low-cost test that increases the sensitivity of the clinical examination to determine BOAS severity. This allows affected dogs to be identified and treated more quickly and the effectiveness of surgery to be more accurately assessed (21). However, the clinical assessment of exercise intolerance, breath sounds and recovery time is still not completely objective, but depends largely on the experience of the

examiner (21). In the present study, however, a correlation between the inability to complete the exercise test and the dogs' probability of having BOAS was found, confirming the efficacy of a stress test in differentiating affected from unaffected dogs. The use of technologies such as whole-body plethysmography are particularly accurate and reliable, but also more complex and expensive (21). Hence, there is still a need for a standardized examination procedure for the diagnosis of brachycephaly that is reliable, repeatable and affordable for the dog owner everywhere (16).

To the authors' knowledge, salivary cortisol has not yet been studied in relation to exercise in brachycephalic breeds. The aim of the present study was therefore to find out whether vital signs and salivary cortisol concentrations could be used in a standardized, non-invasive exercise test to distinguish between healthy dogs and those suffering from BOAS.

5.1 Heart rate, respiratory rate, and body temperature

During exercise, CG showed a significantly lower heart rate than BOAS(+) brachycephalics and FBs, while during the recovery phase the heart rate of PGs remained significantly higher than that of CG, indicating that FB recover faster. Explanations for a comparatively poor physical condition also emerge from previous studies on PG. Compared to other brachycephalic breeds, PG have a particularly strong predisposition to develop laryngeal collapse and bronchial wall thickening (BWT) (43–45). In addition, a positive correlation between BOAS and BWT was found in a previous study (44). Two recent British studies (4, 46) found that PG have a greater predisposition to developing BOAS than FBs. Thus, the two studies found that PG have about a 54-fold higher risk of developing BOAS than non-PG, while FB have about a 31-fold higher risk than non-FB.

As for the BOAS(+) dogs, both studied breeds showed a higher heart rate than the BOAS(−) dogs for almost the entire duration of the test. This result correlates with that of a previous study (16) and may indicate that the body condition of the brachycephalic dogs is impaired when they show mild to severe symptoms of BOAS.

The CG had a significantly lower heart rate at most time points of the test, indicating a lower oxygen demand of the organism under stress. In terms of respiratory rate, brachycephalic breeds showed a significantly higher rate than the control group. It can be assumed that, as already examined in previous studies, dogs of non-brachycephalic breeds show better physical fitness on average (47) or are healthier (48). Also previous studies reported that brachycephalic dogs with upper airway obstruction have lower exercise capacity than dolicho- and mesocephalic dogs (49–52).

Heart rate variability (HRV) is a parameter that has been used in previous studies to assess the stress response in dogs, however, the utility of this parameter in dogs during exercise has yet to be determined. In a recent study, HRV in brachycephalic breeds was investigated, and according to the authors the dog's breed and morphology did not alter the HRV (53). Future studies are needed to determine the usefulness of HRV and its correlation with salivary cortisol in brachycephalic dogs undergoing a fitness test (54, 55). The evaluation of breath sounds should only be carried out by trained personnel, to avoid dogs with BOAS passing the test (21). In the present study, the assessment of breath sounds and wheezing was also

carried out through the subjective perception of the trained examiners. All examinations were performed by the same two examiners, trained in the assessment of BOAS dogs during the same time period, according to the standards of the same university facility.

5.2 Cortisol

Cortisol in saliva has already been investigated in other studies assessing stress in dogs (25, 27, 56–60). For example, one study examined serum cortisol in relation to physical exertion in sled dogs (25). The results showed a significant increase in cortisol after exertion. A less invasive sampling was chosen in the present study, as multiple blood sampling to measure serum cortisol would have represented an additional stress factor. Salivary cortisol, as an alternative to serum cortisol, has been investigated in previous studies as a marker to assess stress in dogs (27, 56–60). In the study by Csoltova et al. (59) the cortisol levels in the saliva of dogs were measured before and after the veterinary examination at an interval of about 12–13 min. The authors found no significant difference between the two measurements, which was probably due to a too short time interval or the low intensity of the stimulus, which may not have been sufficiently stressful. In another Canadian study, plasma and salivary cortisol were compared in a group of dogs, before and immediately after air transport (56). In this study, it was found that plasma and salivary cortisol levels increased significantly after transport in both awake and sedated dogs, which they attributed to the high intensity of the stimulus. With regard to separation anxiety, a study by Shin and Shin in 2016 observed that dogs separated from their owners had significantly higher salivary cortisol peaks, after 20 min, than dogs that could smell and hear their owners (60). Therefore, in the present study, the owner was present for the entire duration of the test, in order to avoid an additional stress factor for the dogs examined.

The present study shows that different breeds exhibited different cortisol curves in the context of a standardized stress test. Considering only the non-BOAS affected animals, the PG showed a significant cortisol increase about 15 min after the end of the exercise, while the bulldogs showed a significant decrease in cortisol 15 min after running. Concerning the increase in cortisol levels, considering the cortisol values obtained from the start of physical activity, it can be seen in Figure 4 that PG BOAS(–) reach cortisol peaks, following physical activity, above 0.5 µL/dL, a value never reached by the other two groups of dogs. It might be speculated that the stimulus of the test might be sufficient for PG, which among the two brachycephalic breeds are considered the less healthy ones (4, 46), but not for FB. For some dogs, an unfamiliar environment can itself be a stressor (61). However, in the present study, a significant reduction in cortisol values from baseline was observed only in the FB BOAS group (–). This result can be interpreted with increased initial stress despite the presence of the owner, and/or insufficient intensity of exercise. Interestingly, the BOAS(+) dogs showed no significant change in cortisol during the test compared to the BOAS(–) dogs. This result could indicate a decreased responsiveness of the HPA axis in dogs with BOAS since previous studies have shown that, after prolonged HPA stimulation, such as occurs with chronic pain and stress, cortisol release decreases in both humans and animals (62–65). Further studies, comparing measurements of different markers of acute and chronic stress, are needed to confirm this hypothesis.

Cortisol secretion is regulated by negative feedback from the paraventricular hypothalamic nucleus via corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotropic hormone (ACTH) and the secretory cells of the adrenal cortex (66). Sustained high levels of cortisol have an inhibitory effect on the central and pituitary levels of the HPA axis, so the pituitary can become increasingly resistant to CRH and ACTH (67–69). As reported in previous studies, brachycephalic dogs represent a human model of sleep apnoea syndrome (OSAS), in which patients experience a state of hypoxia at night due to respiratory distress (15). Hypoxia in OSAS, such as in Chronic Fatigue Syndrome (CFS) (70, 71) is a state of stress that, if prolonged, can alter HPA axis function and circadian cortisol rhythms (72–74). The present study aimed to measure acute stress, assumed that the major stress factor for brachycephalic dogs is respiratory distress and that this may be exacerbated by an exercise test. Regarding chronic stress, on the other hand, and its influence on the results obtained, no information is available. However, taking the four groups of brachycephalic dogs into consideration, only those considered healthy show significant changes in cortisol values. It could be speculated that the dogs most affected by airway obstruction might exhibit altered activity of the HPA axis. Further investigations to assess the HPA axis were not carried out in the present study, which is why no statements can be made on this.

Cortisol levels can be influenced by a variety of factors, including the circadian rhythm of cortisol and individual variability. Previous studies have shown that cortisol in dogs peaks in the morning, decreases throughout the day, and reaches its minimum in the evening (75, 76). However, some other studies have described the lack of circadian and diurnal variations in cortisol levels (56, 77–79). No conclusion can be drawn about this in the present study, since the investigation determined the time of the test, based on the availability of the owners. In general, all examinations took place in the late morning or early afternoon, i.e., neither early in the morning nor late in the evening.

Different temperament, age, breed, personality and individual previous experiences also influence the extent of the perceived stress in the dog and thus its expression (80, 81). According to Cobb et al. (27) when assessing cortisol levels in dogs, individual changes in cortisol levels should be interpreted with caution. The investigations in the present study were carried out in an unfamiliar environment, namely in a veterinary clinic. In order to reduce the dogs' stress as much as possible, the dogs did not have to wait in a waiting room, but instead entered the gait laboratory directly via a side entrance. The owners were permanently present during the test and the dogs were initially accustomed to the treadmill with a lot of time and patience. Also, only dogs that well tolerated the trot on the treadmill were included. Ideally, follow-up studies should be conducted by trained personnel in a familiar environment to reduce additional stressors. Therefore, future studies might consider performing multiple tests on the same dog at regular intervals, to compare possible varying results. The owner participation in the current study was voluntary, a larger number of subjects from each BOAS group could be included in follow-up studies.

To determine each subject's basal cortisol, multiple measurements should be taken over a 24-h period while the dog is in its familiar environment. In order to standardize the test for further studies, owners should be trained and have at least 24 h availability for complete sample collection.

In addition to cortisol, many other parameters can be used to assess a stressful situation. Within the sympathetic-adrenal system (SAM), the sympathetic and parasympathetic nervous systems are activated first (82). The release of catecholamines (epinephrine and norepinephrine) and the activation of the sympathetic nervous system serve to regulate blood pressure by contracting the smooth muscles in the blood vessels. Catecholamines cause increased contractility of the heart muscle and modulate the metabolism to increase blood sugar levels by stimulating glycogenolysis in the liver, increasing glucagon secretion, decreasing insulin secretion from the pancreas and stimulating lipolysis in adipose tissue (83). These physiological changes are associated with “fight-flight” responses in dogs and humans (84, 85). Chromogranin A (CgA) is released together with catecholamines during acute stress. Therefore, the CgA epitopes, catestatin (CST) and vasostatin (VS) could be measured in dog saliva to assess a stressful situation (88). It should be noted that sufficient sample material must be available to measure the relevant parameters. In the present study, only one parameter could be measured due to the small amount of saliva collected.

Besides, it is not to forget that taking a saliva sample can also be associated with stress for the animal (86, 87). For this reason, it was possible to measure cortisol only in dogs that tolerated saliva sampling for the required time. Further studies and development of new materials, dedicated to veterinary medicine, are necessary in order to optimize saliva collection in dogs.

In conclusion, the assessment of vital signs during a standardized fitness test can be useful to differentiate between dogs suffering from BOAS and healthy brachycephalic dogs. However, affected dogs can also manage the 15-min trot and signs of BOAS, such as labored breathing and breath sounds should therefore be evaluated by experienced examiners. Whether and how the functionality of the HPA axis is limited in chronically ill BOAS patients, needs to be investigated in subsequent studies with long follow-up periods.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal studies were approved by the Ethics Committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary

References

1. Cage A, Chambers D, Crowther C, Davies S, Goodman M, Milne EG, et al. Improving pedigree dog health. *Vet Rec.* (2017) 180:309. doi: 10.1136/vr.j1471
2. Waters A. Brachycephalic tipping point: time to push the button? *Vet Rec.* (2017) 180:288. doi: 10.1136/vr.j1479
3. O'Neill DG, Pegram C, Crocker R, Brodbelt DC, Church DB, Packer RMA. Unravelling the health status of brachycephalic dogs in the UK using multivariable analysis. *Sci Rep.* (2020) 10:17251–13. doi: 10.1038/s41598-020-73088-y
4. O'Neill DG, Sahota J, Brodbelt DC, Church DB, Packer RMA, Pegram C. Health of pug dogs in the UK: disorder predispositions and protections. *Canine Med Genet.* (2022) 9:4–11. doi: 10.1186/s40575-022-00117-6
5. FVE and FECAVA. “Breeding healthy dogs: the effect of selective breeding on the health and welfare of dogs” [Position paper] (2018). Available at: https://www.fecava.org/wp-content/uploads/2019/03/2018_06_Extreme_breeding_adopted.pdf
6. Oechtering GU, Pohl S, Schlüter C, Lippert JP, Alef M, Kiefer I, et al. A novel approach to brachycephalic syndrome. 1. Evaluation of anatomical intranasal airway obstruction. *Vet Surg.* (2016) 45:165–72. doi: 10.1111/vsu.12446
7. Liu NC, Troconis EL, Kalmar L, Price DJ, Wright HE, Adams VJ, et al. Conformational risk factors of brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS) in pugs, French bulldogs, and bulldogs. F Staffieri, editor. *PLoS One* (2017) 12:e0181928. doi: 10.1371/journal.pone.0181928
8. O'Neill DG, Jackson C, Guy JH, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, et al. Epidemiological associations between brachycephaly and upper respiratory tract disorders in dogs attending veterinary practices in England. *Canine Genet Epidemiol.* (2015) 2:10. doi: 10.1186/s40575-015-0023-8
9. Packer RMA, Hendricks A, Tivers MS, Burn CC. Impact of facial conformation on canine health: brachycephalic obstructive airway syndrome. CE Ambrósio, editor. *PLoS One* (2015) 10:e0137496. doi: 10.1371/journal.pone.0137496

10. Wykes PM. Brachycephalic airway obstructive syndrome. *Probl Vet Med.* (1991) 3:188–97.
11. Nelson R W, Couto CG. "Brachycephalic airway syndrome." In: EH Sciences, editor. Small animal internal medicine (5th Edn.). St. Louis, Missouri: Mosby Inc. of Elsevier Inc.; (2014). p. 255–6.
12. Teng KT, Brodbelt DC, Pegram C, Church DB, O'Neill DG. Life tables of annual life expectancy and mortality for companion dogs in the United Kingdom. *Sci Rep.* (2022) 12:6415–1. doi: 10.1038/s41598-022-10341-6
13. Roedler FS, Pohl S, Oechtering GU. How does severe brachycephaly affect dog's lives? Results of a structured preoperative owner questionnaire. *Vet J.* (2013) 198:606–10. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.09.009
14. Amis TC, Kurpershoek C. Pattern of breathing in brachycephalic dogs. *Am J Vet Res.* (1986) 47:2200–4.
15. Hendricks JC, Klim LR, Kovalski RJ, O'Brien JA, Morrison AR, Pack AI. The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol.* (1987) 63:1344–50. doi: 10.1152/jappl.1987.63.4.1344
16. Mach R, Wiegel PS, Bach JP, Beyerbach M, Kreienbrock L, Nolte I. Evaluation of a treadmill-based submaximal fitness test in pugs, and collecting breed-specific information on brachycephalic obstructive airway syndrome. *Animals.* (2022) 12:1585. doi: 10.3390/ani12121585
17. Freiche V, German AJ. Digestive diseases in brachycephalic dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* (2021) 51:61–78. doi: 10.1016/j.cvs.2020.09.006
18. Poncet CM, Dupre GP, Freiche VG, Estrada MM, Poubaune YA, Bouvy BM. Prevalence of gastrointestinal tract lesions in 73 brachycephalic dogs with upper respiratory syndrome. *J Small Anim Pract.* (2005) 46:273–9. doi: 10.1111/j.1748-5827.2005.tb0320.x
19. Dupré G, Heidenreich D. Brachycephalic syndrome. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* (2016) 46:691–707. doi: 10.1016/j.cvs.2016.02.002
20. Costello MF. Upper airway disease In: DC Silverstein and K Hopper, editors. *Small Animal Critical Care Medicine*. St. Louis, Missouri: Elsevier (2009). 67–72.
21. Riggs J, Liu N, Sutton DR, Sagan D, Ladlow JF. Validation of exercise testing and laryngeal auscultation for grading brachycephalic obstructive airway syndrome in pugs, French bulldogs, and English bulldogs by using whole-body barometric plethysmography. *Vet Surg.* (2019) 48:488–96. doi: 10.1111/vsu.13159
22. Aromaa M, Lilia-Maula L, Rajamäki M. Assessment of welfare and brachycephalic obstructive airway syndrome signs in young, breeding age French bulldogs and pugs, using owner questionnaire, physical examination and walk tests. *Anim Welf.* (2019) 28:287–98. doi: 10.1120/09627286.28.3.327
23. Bartels A, Martin V, Bidoli E, Steigmeier-Raith S, Brühschwein A, Reese S, et al. Brachycephalic problems of pugs relevant to animal welfare. *Anim Welf.* (2015) 24:327–33. doi: 10.7120/09627286.24.3.327
24. Angle CT, Wakshlag JJ, Gillette RL, Stokol T, Geske S, Adkins TO, et al. Hematologic, serum biochemical, and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high-intensity exercise in sled dogs. *Vet Clin Pathol.* (2009) 38:370–4. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00122.x
25. Fergestad ME, Jahr TH, Krontveit RI, Skancke E. Serum concentration of gastrin, cortisol and C-reactive protein in a group of Norwegian sled dogs during training and after endurance racing: a prospective cohort study. *Acta Vet Scand.* (2015) 58:24. doi: 10.1186/s13028-016-0204-9
26. Herman JP, Adams D, Prewitt C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology.* (1995) 61:80–90. doi: 10.1159/000126839
27. Cobb ML, Iskandarani K, Chinchilli VM, Dreschel NA. A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domest Anim Endocrinol.* (2016) 57:31–42. doi: 10.1016/j.domaniend.2016.04.003
28. Dreschel NA, Granger DA. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Horser Behav.* (2009) 55:163–8. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.09.010
29. Takatsuji K, Sugimoto Y, Ishizaki S, Ozaki Y, Matsuyama E, Yamaguchi Y. The effects of examination stress on salivary cortisol, immunoglobulin a, and chromogranin a in nursing students. *Biomed Res.* (2008) 29:221–4. doi: 10.2202/biomedres.29.221
30. Srithunyarat T, Hagman R, Höglund OV, Stridsberg M, Hanson J, Lagerstedt AS, et al. Catestatin, vasostatin, cortisol, and visual analog scale scoring for stress assessment in healthy dogs. *Res Vet Sci.* (2018) 117:74–80. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.11.015
31. Vincent IC, Michell AR. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res Vet Sci.* (1992) 53:342–5. doi: 10.1016/0034-5288(92)90137-Q
32. Packer R, Hendricks A, Burn C. Do dog owners perceive the clinical signs related to conformational inherited disorders as 'normal' for the breed? A potential constraint to improving canine welfare. *Anim Welf.* (2012) 21:81–93. doi: 10.7120/09627281.2X13345905673809
33. Schroers M, Meyer-Lindenberg A. Einschätzung von Symptomen des brachycephalen obstruktiven Atemwegssyndroms und anderen rassettypischen Erkrankungen bei Mops-Hunden – eine Online-Umfrage. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere / Heimtiere.* (2022) 50:261–8. doi: 10.1055/a-1903-0973
34. Laflamme D. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Pr.* (1997) 22:10–5.
35. Liu NC, Sagan DR, Adams VJ, Ladlow JF. Characterisation of brachycephalic obstructive airway syndrome in French bulldogs using whole-body barometric plethysmography. *CS Rosenfield, editor. PLoS One* (2015) 10:e0130741. doi: 10.1371/journal.pone.0130741
36. Iwanuk N, Nolte I, Wall L, Sehn M, Raué J, Pilgram A, et al. Effect of Pimobendan on NT-proBNP and c troponin I before and after a submaximal exercise test in dogs with preclinical mitral valve disease without cardiomegaly – a randomised, double-blinded trial. *BMC Vet Res.* (2019) 15:237. doi: 10.1186/s12917-019-1980-z
37. Di Nardo F, Anfossi L, Ozella L, Saccani A, Giovannoli C, Spano G, et al. Validation of a qualitative immunochromatographic test for the noninvasive assessment of stress in dogs. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* (2016) 1028:192–8. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.06.019
38. Gelman A, Hill J. Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models. Cambridge: Cambridge University Press (2006).
39. Breusch TS, Pagan AR. A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. *Econometrica.* (1979) 47:1287–94. doi: 10.2307/1911963
40. Estevam MV, Beretta S, Smargiassi NF, Apparício M, Toniollo GH, Pereira GT. Congenital malformations in brachycephalic dogs: a retrospective study. *Front Vet Sci.* (2022) 9:1–10. doi: 10.3389/fvets.2022.981923
41. Oechtering GU. Brachycephalic syndrome - new information on an old congenital disease. *Vet Focus.* (2010) 20:2–9.
42. Liu N, Adams VJ, Kalmar L, Ladlow JF, Sagan DR. Whole-body barometric plethysmography characterizes upper airway obstruction in 3 brachycephalic breeds of dogs. *J Vet Intern Med.* (2016) 30:853–65. doi: 10.1111/jvim.13933
43. De Lorenzi D, Bertoncello D, Drigo M. Bronchial abnormalities found in a consecutive series of 40 brachycephalic dogs. *J Am Vet Med Assoc.* (2009) 235:835–40. doi: 10.2460/javma.235.7.835
44. Guillemin JS, Schiborra F, Rossanese M, Maddox TW, Mortier JR. Prevalence of bronchial wall thickening and collapse in brachycephalic dogs with and without brachycephalic obstructive airway syndrome and in nonbrachycephalic dogs. *J Am Vet Med Assoc.* (2022) 261:1–8. doi: 10.2460/javma.21.10.0448
45. Siedenburg JS, Dupré G. Tongue and upper airway dimensions: a comparative study between three popular brachycephalic breeds. *Animals.* (2021) 11:662. doi: 10.3390/ani1103062
46. O'Neill DG, Packer RMA, Francis P, Church DB, Brodbelt DC, Pegram C. French bulldogs differ to other dogs in the UK in propensity for many common disorders: a VetCompass study. *Canine Med Genet.* (2021) 8:13–4. doi: 10.1186/s40575-021-00112-3
47. Tipton CM, Carey RA, Eastin WC, Erickson HH. A submaximal test for dogs: evaluation of effects of training, detraining, and cage confinement. *J Appl Physiol.* (1974) 37:271–5. doi: 10.1152/jappl.1974.37.2.271
48. Sneddon JC, Minnall PP, Grosskopf JF, Groeneveld HT. Physiological and blood biochemical responses to submaximal treadmill exercise in Canaan dogs before, during and after training. *J S Afr Vet Assoc.* (1989) 60:87–91.
49. Hoareau GL, Jourdan G, Mellema M, Verwaerde P. Evaluation of arterial blood gases and arterial blood pressures in brachycephalic dogs. *J Vet Intern Med.* (2012) 26:897–904. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00941.x
50. Meola SD. Brachycephalic airway syndrome. *Top Companion Anim Med.* (2013) 28:91–6. doi: 10.1053/j.tcam.2013.06.004
51. Holt D. Surgery of the upper airway in the brachycephalic dog. *Proc ACVS Symp.* (1998) 1:25–31.
52. Lorison D, Bright RM, White RAS. Brachycephalic airway obstruction syndrome - a review of 118 cases. *Canine Pr.* (1997) 22:18–21.
53. Fernandes SL, Conti LMC, Souza MR, Artuzo RM, Bascherotto JS, Gnoatto FLC, et al. Heart rate variability and vasovagal tone index in brachycephalic dogs. *An Acad Bras Cienc.* (2024) 96:1–8. doi: 10.1590/0001-3765202420231250
54. Bidoli EMY, Erhard MH, Döring D. Heart rate and heart rate variability in school dogs. *Appl Anim Behav Sci.* (2022) 248:105574. doi: 10.1016/j.applanim.2022.105574
55. Flint HE, Weller JE, Parry-Howells N, Ellerby ZW, McKay SL, King T. Evaluation of indicators of acute emotional states in dogs. *Sci Rep.* (2024) 14:6406–33. doi: 10.1038/s41598-024-56859-9
56. Bergeron R, Scott SL, Émond JP, Mercier F, Cook NJ, Schaefer AL. Physiology and behavior of dogs during air transport. *Can J Vet Res.* (2002) 66:211–6.
57. Svbodová I, Chaloupková H, Končel R, Bartoš L, Hradecká L, Jebavý L. Cortisol and secretory immunoglobulin a response to stress in German shepherd dogs. *PLoS One.* (2014) 9:e90820. doi: 10.1371/journal.pone.0090820
58. Chmelíková E, Bolechová P, Chaloupková H, Svbodová I, Jovičík M, Sedmíková M. Salivary cortisol as a marker of acute stress in dogs: a review. *Domest Anim Endocrinol.* (2020) 72:106428. doi: 10.1016/j.domaniend.2019.106428
59. Csoltova E, Martineau M, Boissy A, Gilbert C. Behavioral and physiological reactions in dogs to a veterinary examination: owner-dog interactions improve canine well-being. *Physiol Behav.* (2017) 177:270–81. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.05.013
60. Shin YJ, Shin NS. Evaluation of effects of olfactory and auditory stimulation on separation anxiety by salivary cortisol measurement in dogs. *J Vet Sci.* (2016) 17:153–8. doi: 10.4142/jvs.2016.17.2.153

61. Sandri M, Colussi A, Perrotta MG, Stefanon B. Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context. *J Vet Behav.* (2015) 10:302–6. doi: 10.1016/j.jveb.2015.03.011
62. Fries E, Hesse J, Hellhammer J, Hellhammer DH. A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology.* (2005) 30:1010–6. doi: 10.1016/j.psyneuen.2005.04.006
63. Muhtz C, Rodriguez-Raecke R, Hinkelmann K, Moeller-Bertram T, Kiefer F, Wiedemann K, et al. Cortisol response to experimental pain in patients with chronic low back pain and patients with major depression. *Pain Med.* (2013) 14:498–503. doi: 10.1111/j.1526-4637.2012.01514.x
64. Rijnberk A, Kooistra HS. Clinical endocrinology of dogs and cats: An illustrated text. 2nd ed. Hannover: Schlütersche (2010).
65. Tennant F. The physiologic effects of pain on the endocrine system. *Pain Ther.* (2013) 2:75–86. doi: 10.1007/s40122-013-0015-x
66. Hennessy MB, Paik KD, Caraway JD, Schiml PA, Deak T. Proinflammatory activity and the sensitization of depressive-like behavior during maternal separation. *Behav Neurosci.* (2011) 125:426–33. doi: 10.1037/a0023559
67. Feldman S, Conforti N, Weidenfeld J. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci Biobehav Rev.* (1995) 19:235–40. doi: 10.1016/0149-7634(94)00062-6
68. Mastorakos G, Pavlou M. Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus–pituitary–adrenal and the hypothalamus–pituitary–thyroid axes. *Horm Metab Res.* (2005) 37:577–84. doi: 10.1055/s-2005-870426
69. Tizabi Y, Aguilera G. Desensitization of the hypothalamic–pituitary–adrenal Axis following prolonged Administration of Corticotropin-Releasing Hormone or vasopressin. *Neuroendocrinology.* (1992) 56:611–8. doi: 10.1159/000126283
70. Van Den Eede F, Moorkens G, Van Houdenhove B, Cosyns P, Claes SJ. Hypothalamic–pituitary–adrenal Axis function in chronic fatigue syndrome. *Neuropsychobiology.* (2007) 55:112–20. doi: 10.1159/000104468
71. Van Houdenhove B, Vanthuyne S, Neerinckx E. Chronic fatigue syndrome. *Am J Med.* (2000) 109:257–8. doi: 10.1016/S0002-9343(00)00520-9
72. Bearda B, Schilder MBH, Van Hooff JARAM, De Vries HW, Mol JA. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiol Behav.* (1999) 66:233–42. doi: 10.1016/S0031-9384(98)00289-3
73. Guilliams TG, Edwards L. Chronic stress and the HPA axis: clinical assessment and therapeutic considerations. *Stand.* (2010) 9:1–12.
74. Park CS, Guillermault C, Hwang SH, Jeong JH, Park DS, Maeng JH. Correlation of salivary cortisol level with obstructive sleep apnea syndrome in pediatric subjects. *Sleep Med.* (2013) 14:978–84. doi: 10.1016/j.sleep.2013.05.012
75. Bearda B, Schilder MBH, Janssen NSCRM, Mol JA. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Horm Behav.* (1996) 30:272–9. doi: 10.1006/hbeh.1996.0033
76. Rijnberk A, der Kinderen PJ, Thijssen JHH. Investigations on the adrenocortical function of normal dogs. *J Endocrinol.* (1968) 41:387–95. doi: 10.1677/joe.0.0410387
77. Johnston SD, Mather EC. Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay: clinical absence of diurnal variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests. *Am J Vet Res.* (1978) 39:1766–70.
78. Kemppainen RJ, Sartin JL. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *J Endocrinol.* (1984) 103:219–26. doi: 10.1677/joe.0.1030219
79. Takahashi Y, Ebihara S, Nakamura Y, Takahashi K. A model of human sleep-related growth hormone secretion in dogs: effects of 3, 6, and 12 hours of forced wakefulness on plasma growth hormone, cortisol, and sleep stages. *Endocrinology.* (1981) 109:262–72. doi: 10.1210/endo-109-1-262
80. Hiby E, Rooney N, Bradshaw J. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. *Physiol Behav.* (2006) 89:385–91. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.07.012
81. Rooney NJ, Gaines SA, Bradshaw JWS. Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiol Behav.* (2007) 92:847–54. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.06.011
82. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* (2009) 10:397–409. doi: 10.1038/nrn2647
83. Paravati S, Rosani A, Warrington S. Physiology, Catecholamines. Treasure Island FL: StatPearls Publishing (2022).
84. Hennessy MB. Using hypothalamic–pituitary–adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: a review. *Appl Anim Behav Sci.* (2013) 149:1–12. doi: 10.1016/j.applanim.2013.09.004
85. Whirledge S, Cidlowski JA. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology.* (2013) 154:4450–68. doi: 10.1210/en.2013-1652
86. Sritthunyarat T, Hagman R, Höglund OV, Olsson U, Stridsberg M, Jitpean S, et al. Catestatin and vasostatin concentrations in healthy dogs. *Acta Vet Scand.* (2017) 59:1. doi: 10.1186/s13028-016-0274-8
87. Oyama D, Hyodo M, Doi H, Kurachi T, Takata M, Koyama S, et al. Saliva collection by using filter paper for measuring cortisol levels in dogs. *Domest Anim Endocrinol.* (2014) 46:20–5. doi: 10.1016/j.dame.2013.09.008

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde Speichelkortisol bei brachyzephalen Rassen in Verbindung mit körperlicher Aktivität untersucht. Das Ziel dieser Studie war es, zu überprüfen, ob anhand von Vitalparametern und Speichelkortisolkonzentrationen im Rahmen eines standardisierten Belastungstests zwischen gesunden Hunden und an BOAS erkrankten Hunden unterschieden werden kann.

Der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von BOAS und der Wahrscheinlichkeit eines Testversagens wurde anhand der Odds Ratio berechnet. Brachyzephale Hunde mit BOAS(+) hatten eine höhere Ausfallrate im Belastungstest (14/27) im Vergleich zu BOAS(-) (8/76), was zu einer Odds Ratio von 5,2 (95% CI, 1,97-14,50, $p = 0,001$) führte. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein BOAS(-)-Hund den Belastungstest nicht bestand, betrug 10,5%, während die Wahrscheinlichkeit, dass ein BOAS(+)-Hund den Belastungstest nicht bestand, 37,8% betrug (Kähler et al., 2024).

Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Einbeziehung eines standardisierten Belastungstests hilfreich sein kann, um das Vorhandensein von BOAS bei brachyzephalen Hunden zu beurteilen (Kähler et al., 2024).

1. Herzfrequenz

In der vorliegenden Studie wurde die Herzfrequenz effektiv mit einem Herzfrequenzmessgerät gemessen. Wie erwartet, wiesen die Kontrollhunde während der Belastung eine signifikant niedrigere Herzfrequenz auf als die brachyzephalen BOAS(+)-Hunde. Bei den brachyzephalen BOAS(-)-Hunden zeigten die Französischen Bulldoggen während der Belastung eine signifikant höhere Herzfrequenz als die Kontrollhunde, während die Mops-Hunde mit BOAS(-) eine höhere Herzfrequenz als die Kontrollhunde aufwiesen. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant. Bei den BOAS(+)-Hunden zeigten beide untersuchten Rassen eine höhere Herzfrequenz als die BOAS(-)-Hunde, jedoch waren auch diese Ergebnisse nicht zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant (Kähler et al., 2024). Dieses Ergebnis stimmt mit einer früheren Studie überein und könnte darauf hindeuten, dass die körperliche Verfassung

brachyzephaler Hunde beeinträchtigt ist, wenn sie leichte oder schwere BOAS-Symptome aufweisen (Mach et al., 2022).

Die Kontrollgruppe hatten zu den meisten Zeitpunkten des Tests eine signifikant niedrigere Herzfrequenz, was auf einen geringeren Sauerstoffbedarf des Körpers unter körperliche Belastung hinweist. In der Erholungsphase blieb die Herzfrequenz der Mops-Hunde signifikant höher als die der Kontrollhunde, während die der Französischen Bulldoggen entsprechend sank, was auf eine schnellere Erholung der Französischen Bulldogge hindeutet (Kähler et al., 2024).

Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass die körperliche Verfassung von Mops-Hunden im Allgemeinen schlecht ist, z. B. weil sie, verglichen mit anderen brachyzephalen Rassen, besonders anfällig für Kehlkopfkollaps und Bronchialwandverdickung sind (De Lorenzi et al., 2009; Guillem et al., 2022; Siedenburg & Dupré, 2021).

In der Studie von De Lorenzi et al. (2009) stellten die Autoren fest, dass der Bronchialkollaps bei brachyzephalen Rassen häufig ist, mit einem gewissen Grad des Bronchialkollapses in 87,5% der Fälle. Es wurde auch festgestellt, dass der linke kraniale Bronchus mit seinen Unterabschnitten am häufigsten befallen war und dass Mops-Hunde am häufigsten betroffen waren. In derselben Studie vermuteten die Autoren, dass BOAS zu einer Erhöhung des transmuralen Drucks während der Expiration führt, was in einer chronischen Kompression der Atemwege resultiert und vielmehr als Bronchialstenose und nicht als Bronchialkollaps angesehen werden sollte (De Lorenzi et al., 2009).

Darüber hinaus wurde in einer früheren retrospektiven Studie eine positive Korrelation zwischen BOAS und der Verdickung der Bronchialwand BWT (engl. Bronchial Wall Thickening) festgestellt, wenngleich sich anhand der Verdickung kein Hinweis auf den Schweregrad des BOAS ergab (Guillem et al., 2022). Zwei neuere britische Studien ergaben, dass Mops-Hunde eine größere Prädisposition für die Entwicklung von BOAS haben als Französische Bulldoggen (O'Neill et al., 2021; O'Neill et al., 2022). Die beiden Studien konnten zeigen, dass Mops-Hunde ein etwa 54-fach höheres Risiko haben, an BOAS zu erkranken als nicht Mops-Hunde, während Französische Bulldoggen ein etwa 31-fach höheres Risiko als nicht Französische Bulldoggen haben. Diese Ergebnisse zeigen eine höhere Wahrscheinlichkeit für Mops-Hunde, BOAS zu entwickeln, und somit eine schlechtere Fitness von Mops-Hunden im Vergleich zu Französischen Bulldoggen und stimmen mit den erzielten Ergebnissen überein.

2. Atemfrequenz

Bei der Atemfrequenz zeigten brachyzephale Rassen einen signifikant höheren Wert als die Kontrollgruppe (Kähler et al., 2024). Es kann angenommen werden, dass, wie in früheren Studien gezeigt, Hunde nicht-brachyzephaler Rassen im Durchschnitt eine bessere Fitness (Tipton et al., 1974) aufweisen oder gesünder sind (Sneddon et al., 1989). In mehreren Studien wurde auch berichtet, dass brachyzephale Hunde mit Obstruktion der oberen Atemwege eine geringere körperliche Leistungsfähigkeit aufweisen als dolichocephale und mesozephale Hunde (Hoareau et al., 2012; Holt, 1998; Lorison et al., 1997; Meola, 2013).

Wie in vorherigen Studien berichtet, stellen brachyzephale Hunde ein Modell für das menschliche Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) dar, bei dem die Patienten einen Zustand nächtlicher Hypoxie aufgrund von Atemnot erleben (Hendricks et al., 1987).

In der Humanmedizin ergab sich auch eine positive Korrelation zwischen OSAS und BWT bei Patienten ohne bekannte Atemwegserkrankung. Es wird vermutet, dass dies auf eine Veränderung des oxidativen Gleichgewichts infolge wiederholter Hypoxie-Episoden zurückzuführen ist, die zu einer Entzündung der Bronchialwand führt (Sariman et al., 2011).

Diese Korrelation wurde in der Veterinärmedizin noch nicht nachgewiesen, wird aber durch frühere Studien nahegelegt (Hendricks et al., 1987; Mortier et al., 2018; Szabo et al., 2015).

In der vorliegenden Studie wurde die Atemfrequenz nicht durch ein spezielles Gerät gemessen, sondern ausschließlich vom Untersucher ausgezählt. Alle Untersuchungen wurden von denselben zwei Untersuchern durchgeführt, die im selben Zeitraum in der Beurteilung von Hunden mit BOAS nach den Standards derselben Universität geschult worden waren (Kähler et al., 2024). Wie in früheren Studien vorgeschlagen, sollte die Beurteilung der Atemgeräusche nur von geschultem Personal durchgeführt werden, um zu verhindern, dass Hunde mit BOAS den Test bestehen (Riggs et al., 2019). Allerdings ist bei einer solchen Messung die subjektive Wahrnehmung der geschulten Untersucher naturgemäß nicht zu vermeiden.

3. Temperatur

Die Körpertemperatur stieg nach dem Test in allen Gruppen signifikant an. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Kähler et al., 2024). Dennoch war die Körpertemperatur der BOAS(+)-Hunde höher als die aller anderen Gruppen, was darauf hindeutet, dass der Thermoregulationsmechanismus bei diesen Hunden schlechter ist als bei nicht brachyzephalen Hunden (Kähler et al., 2024), wie in früheren Studien berichtet wurde (Ekenstedt et al., 2020; Geiger et al., 2021; Oechtering, 2010).

In einer neueren Studie wurde bei Hunden die Infrarot-Temperatur gemessen (Gallman et al., 2023). Diese Methode basiert darauf, dass die Temperatur der Hautoberfläche in Korrelation mit der Temperatur des tieferen Gewebes gemessen wird (Usamentiaga et al., 2014; Vainionpää, 2014).

Diese Methode wurde in der Humanmedizin zuvor bei Personen mit OSAS angewendet, bei denen eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der Apnoe und der Temperatur der oberen Atemwege festgestellt wurde (Jarnalo et al., 2018).

Gallman et al. (2023) identifizierten mittels dorsaler und rostraler Infrarot-Thermografie (IRT) signifikante Temperaturdifferenzen zwischen BOAS-betroffenen Hunden und meso-/brachyzephalen Kontrollgruppen. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die klinischen Anzeichen der Erkrankung v.a. auf die Einschränkung des Luftstroms in der IRT zurückzuführen sind.

Diese Technik ist zwar für wissenschaftliche Zwecke nützlich, kann aber nicht in einen standardisierten und leicht wiederholbaren Test außerhalb des universitären Rahmens integriert werden.

4. Kortisol

In der vorliegenden Studie (Kähler et al., 2024) wurde Kortisol im Speichel gemessen, da die Speichelprobenahme weniger invasiv ist als eine Blutentnahme und die Werte mit denen des Serumkortisol korrelieren (Bergeron et al., 2002; Di Nardo et al., 2016). Eine wiederholte

Blutentnahme zur Messung des Serumkortisol hätte einen zusätzlichen Stressfaktor für die Hunde dargestellt (Kobelt et al., 2003).

Die Messung von Kortisol als Indikator für akuten körperlichen Stress wurde bereits in früheren Studien angewendet und validiert (Durocher et al., 2007; Fergestad et al., 2015; Huntingford et al., 2014; Royer et al., 2005).

Speziell Speichelkortisol, als Alternative zur Messung von Serumkortisol, wurde schon früher als Parameter zur Beurteilung von Stress bei Hunden untersucht (Bergeron et al., 2002; Chmelíková et al., 2020; Cobb et al., 2016; Csoltova et al., 2017; Shin & Shin, 2016; Svobodová et al., 2014). Speichelkortisol bei brachyzephalen Hunden bei körperlicher Belastung wurde bisher nicht untersucht.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass verschiedene Rassen unterschiedliche Kortisolkurven in einem standardisierten Stresstest aufwiesen. Betrachtete man nur die Hunde ohne BOAS, so zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Kortisolspiegels etwa 15 Minuten nach Ende der Belastung bei Mops-Hunden, während Französische Bulldoggen einen signifikanten Abfall des Kortisolspiegels aufwiesen. In Bezug auf den Anstieg des Kortisolspiegels erreichten die Mops-Hunde mit BOAS(-) nach der Belastung Kortisol-Spitzenwerte, die von den anderen Hundegruppen nie erreicht wurde (Kähler et al., 2024).

Man könnte spekulieren, dass der Testreiz für die Mops-Hunde, die als die weniger gesunden der beiden brachyzephalen Rassen gelten (O'Neill et al., 2021; O'Neill et al., 2022), ausreichend sein könnte, jedoch nicht für die Französischen Bulldoggen. Die Geschwindigkeit, mit der die Hunde laufen sollten, wurde individuell festgelegt, d.h. es wurde die Geschwindigkeit gewählt, bei der die Hunde vom Schritt in den Trab fielen. Bei einigen Probanden war dieser Stimulus jedoch möglicherweise nicht intensiv genug, um einen Anstieg des Kortisol zu bewirken (Kähler et al., 2024).

In der Studie von Fergestad et al. (2015) zeigten die Ergebnisse einen signifikanten Anstieg des Serumkortisol bei allen Hunden nach körperlicher Belastung, die das Rennen absolvierten. Dabei handelte es sich jedoch um ein Schlittenhunderennen mit einer Strecke von 600 Kilometern, also um eine intensive und lange Anstrengung für Hunde, die für das Laufen trainiert sind. Ähnliche Ergebnisse wurden in früheren Studien erzielt, in denen der körperliche Stimulus deutlich

intensiver und länger war als bei einem 15-minütigen Lauf auf dem Laufband (Durocher et al., 2007; Huntingford et al., 2014; Royer et al., 2005).

Es konnte festgestellt werden, dass die Kortisolwerte in der Ruhephase vor dem Test sowohl bei den Kontrollhunden als auch bei den Französischen Bulldoggen statistisch signifikant höher waren als nach dem Test. Diese Probenentnahmen wurden vor der klinischen Allgemeinuntersuchung durchgeführt, um einen zusätzlichen Stressfaktor zu vermeiden (Kähler et al., 2024). In einer Studie zum Stress bei Hunden während einer tierärztlichen Untersuchung konnten keine signifikanten Kortisolsschwankungen im Speichel festgestellt werden (Csoltova et al., 2017). Dabei wurden zwei Messungen vor und nach dem Tierarztbesuch im Abstand von etwa 12-13 Minuten durchgeführt. In der vorliegenden Studie (Kähler et al., 2024) wurden serielle Messungen durchgeführt, um die Fluktuation des Kortisolspiegels auch in einem größeren zeitlichen Abstand zum Stimulus zu bewerten, wie dies bereits in der Humanliteratur (Arent et al., 2010; Di Luigi et al., 2003; Webb et al., 2008) und in der Veterinärmedizin (Beerda et al., 1999; Bengoa et al., 2018; Kobelt et al., 2003; Vincent & Michell, 1992) vorgeschlagen wurde.

In der vorliegenden Studie sollte der akute Stress der Hunde beurteilt werden. Dabei wurde angenommen, dass der Hauptstressfaktor für brachyzephale Hunde die Atemnot sei und dass diese durch einen Belastungstest verschlimmert werden könne. Es liegen jedoch keine Informationen über chronischen Stress und seinen Einfluss auf die erzielten Ergebnisse vor. Generell ist bemerkenswert, dass nur die als gesund eingestuften Hunde signifikante Schwankungen im Kortisolspiegel zeigten. Es könnte daher die Hypothese aufgestellt werden, dass Hunde, die von einer Atemwegsobstruktion betroffen sind, aufgrund des chronischen Stresses eine verminderte Responsivität der HPA-Achse aufweisen (Kähler et al., 2024).

Frühere Studien haben gezeigt, dass eine anhaltende Stimulation der HPA, wie sie bei chronischen Schmerzen und Stress, z.B. bei OSAS, stattfindet, zu einer Abnahme der Kortisolsekretion bei Menschen und Tieren führt (Fries et al., 2005; Muhtz et al., 2013; Rijnberk & Kooistra, 2010; Tennant, 2013).

Die Kortisolsekretion wird durch negative Rückkopplung vom paraventrikulären Hypothalamuskern über das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), das Adrenocorticotropin-Hormon (ACTH) und die sekretorischen Zellen der Nebennierenrinde reguliert (Hennessy et al., 2011). Anhaltend hohe Kortisolspiegel haben eine hemmende Wirkung auf die zentralen und

hypophysären Spiegel der HPA-Achse, wodurch die Hypophyse zunehmend resistent gegen CRH und ACTH werden kann (Feldman et al., 1995; Mastorakos & Pavlatou, 2005; Tizabi & Aguilera, 1992). Wie in früheren Studien berichtet, stellen brachyzephale Hunde ein Modell für das menschliche Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) dar, bei dem die Patienten aufgrund von Atemnot einen Zustand nächtlicher Hypoxie erleben (Amis & Kurpershoek, 1986). Hypoxie beim OSAS ist wie beim chronischen Erschöpfungssyndrom (Van Den Eede et al., 2007; Van Houdenhove et al., 2000) ein Stresszustand, der bei längerer Dauer die Funktion der HPA-Achse und den zirkadianen Kortisolrhythmus verändern kann (Beerda et al., 1999; Guilliams & Edwards, 2010; Park et al., 2013).

Diese Hypothese ist jedoch rein spekulativ, da in der vorliegenden Studie Hormone wie z.B. endogenes ACTH oder CRH, die für eine konkrete Diagnose einer Hypofunktion der HPA-Achse notwendig sind, nicht gemessen wurden (Spindler et al., 2023), was in Folgestudien untersucht werden könnte. Auch weitere bildgebende Verfahren zur Beurteilung der Nebennieren oder der Hypophyse wurden in der vorliegenden Studie nicht angefertigt und wären eine Möglichkeit, die Funktion der HPA-Achse näher zu untersuchen.

Um das Vorhandensein anderer Stressfaktoren, die die Ergebnisse beeinflussen könnten, zu begrenzen, wurde beschlossen, den Test in Anwesenheit der Besitzer durchzuführen. Tatsächlich wurde in der Studie von Shin und Shin (2016) beobachtet, dass Hunde, die von ihren Besitzern getrennt wurden, nach 20 Minuten signifikant höhere Kortisol-Spitzenwerte im Speichel aufwiesen als Hunde, die ihre Besitzer riechen und hören konnten. Für einige Hunde kann eine ungewohnte Umgebung selbst ein Stressfaktor sein (Sandri et al., 2015). Da den Besitzern in der vorliegenden Studie nur eine begrenzte Zeit zur Verfügung stand, fiel die anfängliche Eingewöhnungsphase, in der die Hunde die Umgebung frei erkunden konnten, mit der Erhebung der Anamnese zusammen. Dieser Zeitraum war für einige der untersuchten Hunde möglicherweise zu kurz, um sich mit der Umgebung vertraut zu machen, was die Ergebnisse beeinflusst haben könnte (Kähler et al., 2024).

Auch das Temperament, das Alter, die Rasse und die individuellen Vorerfahrungen beeinflussen das Stressempfinden des Hundes und damit die Ausprägung des Stresses (Hiby et al., 2006; Rooney et al., 2007). Nach Cobb et al. (2016) sollten bei der Beurteilung des Kortisolspiegels bei Hunden individuelle Schwankungen des Kortisolspiegels mit Vorsicht interpretiert werden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden in einer unbekannten Umgebung, nämlich in einer Tierklinik, durchgeführt. Um den Stress für die Hunde so gering wie möglich zu halten, mussten sie nicht in einem Wartezimmer warten, sondern gelangten durch einen Seiteneingang direkt in das Ganglabor. Die Besitzer waren während des Tests immer anwesend und die Hunde wurden zunächst mit viel Zeit und Geduld an das Laufband gewöhnt. Außerdem wurden nur Hunde eingeschlossen, die das Traben auf dem Laufband gut tolerierten (Kähler et al., 2024).

Der Kortisolspiegel kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden, unter anderem durch den zirkadianen Rhythmus. Frühere Studien haben gezeigt, dass der Kortisolspiegel bei Hunden morgens am höchsten ist, im Laufe des Tages abnimmt und abends am niedrigsten ist (Beerda et al., 1996; Rijnberk et al., 1968). In anderen Studien wurde jedoch das Fehlen zirkadianer Schwankungen des Kortisolspiegels beschrieben (Bergeron et al., 2002; Johnston & Mather, 1978; Kemppainen & Sartin, 1984; Takahashi et al., 1981). Der Zeitfaktor wurde in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt, da der Zeitpunkt der Untersuchung anhand der Verfügbarkeit der Besitzer festgelegt wurde. Im Allgemeinen fanden alle Tests am späten Vormittag oder frühen Nachmittag statt, also nicht früh morgens oder spät abends.

Neben Kortisol können viele weitere Parameter zur Beurteilung einer Stresssituation herangezogen werden. Innerhalb des sympathikoadrenalen Systems werden zunächst das sympathische und das parasympathische Nervensystem aktiviert (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Die Freisetzung von Katecholaminen (Adrenalin und Noradrenalin) und die Aktivierung des sympathischen Nervensystems dienen der Blutdruckregulation durch Kontraktion der glatten Muskulatur der Blutgefäße. Katecholamine erhöhen die Kontraktilität des Herzmuskels und modulieren den Stoffwechsel, um den Blutzuckerspiegel zu erhöhen, indem sie die Glykogenolyse in der Leber stimulieren, die Glukagonsekretion erhöhen, die Insulinsekretion aus der Bauchspeicheldrüse verringern und die Lipolyse im Fettgewebe anregen (Paravati et al., 2022). Diese physiologischen Veränderungen werden mit „Kampf-Flucht-Reaktionen“ bei Hunden und Menschen in Verbindung gebracht (Hennessy, 2013; Whirledge & Cidlowski, 2013). Chromogranin A (CgA) wird bei akutem Stress zusammen mit Katecholaminen freigesetzt. Daher können CgA-Epitope, Catestatin und Vasostatin im Speichel von Hunden gemessen werden, um eine Stresssituation zu beurteilen (Srithunyarat et al., 2017). Dabei ist zu beachten, dass für die Messung der relevanten Parameter eine ausreichende Probenmenge zur Verfügung stehen muss. In der vorliegenden Studie konnte aufgrund der geringen gesammelten Speichelmenge nur ein

Parameter gemessen werden (Kähler et al., 2024). Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die Entnahme einer Speichelprobe für das Tier mit Stress verbunden sein kann (Kobelt et al., 2003; Oyama et al., 2014). Daher kann Kortisol nur bei Hunden sinnvoll beurteilt werden, die die Speichelprobeentnahme über den erforderlichen Zeitraum gut tolerieren. Auch dies war eine Voraussetzung für die Teilnahme an der vorliegenden Studie.

5. Zukunftsaussichten

Zusammenfassend kann die Beurteilung der Vitalfunktionen im Rahmen eines standardisierten Fitnesstests bei der Unterscheidung von Hunden mit BOAS von gesunden brachyzephalen Hunden sinnvoll sein. Allerdings sind auch betroffene Hunde in der Lage, einen 15-minütigen Trab zu absolvieren. Anzeichen von BOAS, wie z. B. Dyspnoe und Atemgeräusche, sollten daher von geschulten Untersuchern beurteilt werden. Ob und wie die Funktion der HPA-Achse bei Patienten mit chronischem BOAS eingeschränkt ist, muss in Folgestudien untersucht werden.

Weitere Studien in der Veterinärmedizin sind erforderlich, um die Speichelsammlung bei Hunden zu optimieren. Folgestudien sollten immer von geschultem Personal in einer vertrauten Umgebung durchgeführt werden, um zusätzliche Stressfaktoren zu reduzieren.

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine Pilotstudie. In Folgestudien könnte eine größere Anzahl von Probanden aus jeder BOAS-Gruppe einbezogen werden.

In zukünftigen Studien könnten wiederholte Tests am selben Hund in regelmäßigen Abständen erfolgen, um mögliche Ergebnisvariationen zu analysieren.

Um den basalen Kortisolspiegel jedes einzelnen Hundes in einem nicht gestressten Umfeld zu bestimmen, müssten mehrere Messungen über einen Zeitraum von 24 Stunden in einem gewohnten Umfeld durchgeführt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das brachyzephale obstruktive Atemwegssyndrom (BOAS) ist eine häufige Erkrankung bei brachyzephalen Hunden, wobei Mops-Hunde und Französische Bulldoggen besonders betroffen zu sein scheinen. In der zugänglichen Literatur wurden brachyzephale Hunde bereits mit kurzen submaximalen Belastungstests untersucht und dabei wurden gute Ergebnisse erzielt. Die gleichzeitige Messung weiterer Parameter könnte jedoch die Sensitivität eines solchen Tests erhöhen. Objektive und einfach durchzuführende Tests sind erforderlich, um die Krankheit frühzeitig zu erkennen und Hunde mit BOAS von der Zucht auszuschließen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, zu überprüfen, ob man anhand der Messung von Vitalparametern und von Speichelkortisolkonzentrationen im Rahmen eines standardisierten Belastungstests zwischen gesunden Hunden und an BOAS erkrankten Hunden unterscheiden kann.

Zu diesem Zweck wurden 57 Mops-Hunde, 56 Französische Bulldoggen und 27 meso- und dolichozephale Hunde verschiedener Rassen in eine prospektive In-vivo Studie einbezogen. 28% der Mops-Hunde (n=16) und 11% der Französischen Bulldoggen (n=6) wurden ausgeschlossen, weil sie aus gesundheitlichen Gründen (n=16) oder wegen mangelnder Kooperation (n=6) nicht in der Lage waren, den Belastungstest durchzuführen bzw. zu beenden.

Die Vitalparameter und die Speichelkortisolkonzentrationen wurden vor, während und nach dem Belastungstest sowie in der Erholungsphase gemessen. Speichelproben wurden mit handelsüblichen Tupfern unmittelbar vor und direkt nach dem Test sowie 15, 30 und 60 Minuten nach dem Belastungstest entnommen.

Die Mops-Hunde mit BOAS(+) erholten sich nach dem Belastungstest deutlich langsamer als die Französischen Bulldoggen mit BOAS(+). Bei beiden brachyzephalen Rassen wurde bei den Hunden mit BOAS(+) eine statistisch signifikant höhere Herzfrequenz ($p < 0,05$) beobachtet als bei den BOAS(-)-Hunden.

Die Speichelkortisolspiegel der Mops-Hunde zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen BOAS(+) und BOAS(-) und zwar unmittelbar vor dem Test, unmittelbar danach und nach einer Stunde Ruhe ($p < 0,05$).

Die Speichelkortisolspiegel bei den nicht von BOAS (BOAS(-)) betroffenen Mops-Hunden stiegen nach dem Test signifikant an und nahmen dann wieder ab, während sie bei den nicht betroffenen Französischen Bulldoggen (BOAS(-)) während des Tests signifikant abnahmen. Es konnte festgestellt werden, dass die Speichelkortisolspiegel in der Ruhephase vor dem Test sowohl bei den Kontrollhunden als auch bei den Französischen Bulldoggen statistisch signifikant höher waren als nach dem Test. Es konnte festgestellt werden, dass die Speichelkortisolspiegel in der Ruhephase vor dem Test sowohl bei den Kontrollhunden als auch bei den Französischen Bulldoggen statistisch signifikant höher waren als nach dem Test. Die Speichelkortisolspiegel blieben bei Hunden beider Rassen mit BOAS(+) jedoch unerwartet konstant.

Die berechnete Probabilität, dass ein BOAS(-)-Hund den Belastungstest nicht besteht, betrug 10,5%, während die Wahrscheinlichkeit, dass ein BOAS(+)-Hund den Belastungstest nicht besteht, lag bei 37,8%.

Die vorliegende Studie zeigt, dass ein standardisierter Fitnesstest geeignet sein kann, Hunde mit schweren BOAS (Grad 2 und Grad 3) von leicht betroffenen (Grad 1) oder gesunden brachyzephalen Hunden zu unterscheiden.

VI. SUMMARY

The Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome (BOAS) is a common disease in brachycephalic dogs, with Pugs and French Bulldogs appearing to be particularly affected. In the accessible literature, brachycephalic dogs have already been examined using short submaximal exercise tests, and good results were achieved. However, the simultaneous measurement of further parameters could increase the sensitivity of such a test. Objective and easily executable tests are necessary to detect the disease early and to exclude dogs with BOAS from breeding.

The aim of the present study was to verify whether it is possible to differentiate between healthy dogs and dogs suffering from BOAS based on the measurement of vital parameters and salivary cortisol concentrations within a standardized exercise test.

For this purpose, 57 Pugs, 56 French Bulldogs, and 27 meso- and dolichocephalic dogs of various breeds were included in a prospective in-vivo study. 28% of the Pugs (n=16) and 11% of the French Bulldogs (n=6) were excluded because they were unable to perform or complete the exercise test due to health reasons (n=16) or lack of cooperation (n=6).

Vital parameters and salivary cortisol concentrations were measured before, during, and after the exercise test, as well as during the recovery phase. Saliva samples were collected using commercially available swabs immediately before and directly after the test, as well as 15, 30, and 60 minutes after the exercise test.

BOAS(+) Pugs recovered significantly slower after the exercise test than BOAS(+) French Bulldogs. In both brachycephalic breeds with BOAS(+), a statistically significantly higher heart rate ($p < 0.05$) was observed compared to the BOAS(-) dogs.

The salivary cortisol levels in Pugs showed a significant difference between BOAS(+) and BOAS(-) immediately before the test, immediately after, and after one hour of rest ($p < 0.05$).

Salivary cortisol levels in Pugs not affected by BOAS (BOAS(-)) increased significantly after the test and then decreased, while they decreased significantly in non-affected French Bulldogs (BOAS(-)) during the test. It was determined that salivary cortisol levels in the resting phase before the

test were statistically significantly higher in both control dogs and French Bulldogs than after the test. Salivary cortisol levels, however, remained unexpectedly constant in dogs of both breeds with BOAS(+).

The calculated probability that a BOAS(-) dog would fail the exercise test was 10.5%, while the probability that a BOAS(+) dog would fail the exercise test was 37.8%.

The present study shows that a standardized fitness test can be suitable for differentiating dogs with severe BOAS (Grade 2 and 3) from mildly affected (Grade 1) or healthy brachycephalic dogs.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Amis, T. C., & Kurpershoek, C. (1986). Pattern of breathing in brachycephalic dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 47(10), 2200–2204.
- Angle, C. T., Wakshlag, J. J., Gillette, R. L., Stokol, T., Geske, S., 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(3), 370–374.
- Arent, S. M., Senso, M., Golem, D. L., & McKeever, K. H. (2010). The effects of theaflavin-enriched black tea extract on muscle soreness, oxidative stress, inflammation, and endocrine responses to acute anaerobic interval training: A randomized, double-blind, crossover study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 7(1), 11.
- Aromaa, M., Lilja-Maula, L., & Rajamäki, M. (2019). Assessment of welfare and brachycephalic obstructive airway syndrome signs in young, breeding age French Bulldogs and Pugs, using owner questionnaire, physical examination and walk tests. *Animal Welfare*, 28(3), 287–298.
- Aron, D. N., & Crowe, D. T. (1985). Upper Airway Obstruction General Principles and Selected Conditions in the Dog and Cat. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 15(5), 891–917.
- Balli, A. (2004). *Teil A: Radiologische Methode zur Klassifizierung der Schädeltypen und Beurteilung des Brachycephaliegrades beim Hund, Teil B: Rhinomanometrische Parameter bei gesunden Hunden mit unterschiedlichem Brachycephaliegrad*, (Dissertation). Universität Zürich.
- Bannasch, D., Young, A., Myers, J., Truvé, K., Dickinson, P., Gregg, J., Davis, R., Bongcam-Rudloff, E., Webster, M. T., Lindblad-Toh, K., & Pedersen, N. (2010). Localization of canine brachycephaly using an across breed mapping approach. *PLoS ONE*, 5(3), e9632.
- Barker, D. A., Tovey, E., Jeffery, A., Blackwell, E., & Tivers, M. S. (2021). Owner reported breathing scores, accelerometry and sleep disturbances in brachycephalic and control dogs: A pilot study. *Veterinary Record*, 189(4), e135.
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., Janssen, N. S. C. R. M., & Mol, J. A. (1996). The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and cateholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behavior*, 30(3), 272-279.

- Beerda, B., Schilder, M. B. H., Van Hooff, J. A. R. A. M., De Vries, H. W., & Mol, J. A. (1999). Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. I. Behavioral Responses. *Physiology & Behavior*, 66(2), 233–242.
- Bengoa, L., Martínez, S., Fumagalli, F., Damián, J. P., & Pessina, P. (2018). Serial collection method of dog saliva: Effects of different chemical stimulants on behavior, volume and saliva composition. *Open Veterinary Journal*, 8(3), 229.
- Bergeron, R., Scott, S. L., Emond, J. P., Mercier, F., Cook, N. J., & Schaefer, A. L. (2002). Physiology and behavior of dogs during air transport. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(3), 211–216.
- Bernaerts, F., Talavera, J., Leemans, J., Hamaide, A., Claeys, S., Kirschvink, N., & Clercx, C. (2010). Description of original endoscopic findings and respiratory functional assessment using barometric whole-body plethysmography in dogs suffering from brachycephalic airway obstruction syndrome. *The Veterinary Journal*, 183(1), 95–102.
- Beverland, M. B., Farrelly, F., & Ching Lim, E. A. (2008). Exploring the dark side of pet ownership: Status- and control-based pet consumption. *Journal of business research*, 61(5), 490–496.
- Black, P. H. (2002). Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(6), 622–653.
- Brehm, H., Loeffler, K., & Komeyli, H. (1985). Schädelformen beim Hund. Anatomia, Histologia, Embryologia, 5(14), 324–331.
- Broux, O., Clercx, C., Etienne, A. L., Busoni, V., Claeys, S., Hamaide, A., & Billen, F. (2018). Effects of manipulations to detect sliding hiatal hernia in dogs with brachycephalic airway obstructive syndrome. *Veterinary Surgery*, 47(2), 243–251.
- Cannon, W. B. (1935). Stresses and strains of homeostasis. *The American Journal of the Medical Sciences*, 189(1), 13–14.
- Chapman, C. R., Tuckett, R. P., & Song, C. W. (2008). Pain and Stress in a Systems Perspective: Reciprocal Neural, Endocrine, and Immune Interactions. *Journal of Pain*, 9(2), 122–145.
- 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.
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Journal of the American Medical Association*, 267(9), 1244–1252.

- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374–381.
- Cobb, M. L., Iskandarani, K., Chinchilli, V. M., & Dreschel, N. A. (2016). A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domestic Animal Endocrinology*, 57, 31–42.
- 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 and Behavior*, 1(177), 270–281.
- De Lorenzi, D., Bertoncello, D., & Drigo, M. (2009). Bronchial abnormalities found in a consecutive series of 40 brachycephalic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(7), 835–840.
- Deutscher Mopsclub e.V. (www.mopsclub.de). Zugriffsdatum: 6.8.2024
- Di Luigi, L., Romanelli, F., Sgrò, P., & Lenzi, A. (2012). Andrological aspects of physical exercise and sport medicine. *Endocrine*, 42(2), 278–284.
- Di Luigi, L., Guidetti, L., Baldari, C., & Romanelli, F. (2003). Heredity and Pituitary Response to Exercise-Related Stress in Trained Men. *International Journal of Sports Medicine*, 24(8), 551–558.
- Di Nardo, F., Anfossi, L., Ozella, L., Saccani, A., Giovannoli, C., Spano, G., & Baggiani, C. (2016). Validation of a qualitative immunochromatographic test for the noninvasive assessment of stress in dogs. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1028, 192–198.
- Drake, A. G., & Klingenberg, C. P. (2008). The pace of morphological change: Historical transformation of skull shape in St Bernard dogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1630), 71–76.
- Drake, A. G., & Klingenberg, C. P. (2010). Large-scale diversification of skull shape in domestic dogs: Disparity and modularity. *American Naturalist*, 175(3), 289–301.
- Durocher, L. L., Hinchcliff, K. W., Williamson, K. K., Mckenzie, E. C., Holbrook, T. C., Willard, M., Royer, C. M., & Davis, M. S. (2007). Effect of strenuous exercise on urine concentrations of homovanillic acid, cortisol, and vanillylmandelic Acid in Sled Dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 68(1), 107–111.

- Eivers, C., Chicon Rueda, R., Liuti, T., & Salavati Schmitz, S. (2019). Retrospective analysis of esophageal imaging features in brachycephalic versus non-brachycephalic dogs based on videofluoroscopic swallowing studies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(4), 1740–1746.
- Ekenstedt, K. J., Crosse, K. R., & Risselada, M. (2020). Canine Brachycephaly: Anatomy, Pathology, Genetics and Welfare. *Journal of Comparative Pathology*, 176, 109–115.
- Ellenberger, W., Baum, H., & Grau, H. (1977). Kopf der Fleischfresser. In *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*, 18. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 117-119.
- Emmerson, T. (2014). Brachycephalic obstructive airway syndrome: A growing problem. *Journal of Small Animal Practice*, 55(11), 543–544.
- Evans, H. E. (1993). *Millers' anatomy of the dog*. 3.Auflage, WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.
- Facin, A. C., Uscategui, R. A. R., Maronezi, M. C., Pavan, L., Menezes, M. P., Montanhim, G. L., Camacho, A. A., Feliciano, M. A. R., & Moraes, P. C. (2020). Liver and spleen elastography of dogs affected by brachycephalic obstructive airway syndrome and its correlation with clinical biomarkers. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10.
- Feldman, S., Conforti, N., & Weidenfeld, J. (1995). Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 19(2), 235–240.
- Fergestad, M. E., Jahr, T. H., Krontveit, R. I., & Skancke, E. (2015). Serum concentration of gastrin, cortisol and C-reactive protein in a group of Norwegian sled dogs during training and after endurance racing: a prospective cohort study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1), 24.
- Fournier, P. F. (2002). The Lorenz theory of beauty. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1(3), 131–136.
- Freiche, V., & German, A. J. (2021). Digestive Diseases in Brachycephalic Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 51(1), 61–78.
- Fries, E., Hesse, J., Hellhammer, J., & Hellhammer, D. H. (2005). A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology*, 30(10), 1010–1016.

- Gallman, J., Lee-Fowler, T., Clark-Price, S., & Grobman, M. (2023). Evaluation of infrared thermography and 6- minute walk tests to assess air flow limitation, impaired thermoregulation, and exercise intolerance in dogs with brachycephalic obstructive airway syndrome. *PLoS ONE*, 18(3), 1–15.
- Geiger, M., Schoenebeck, J. J., Schneider, R. A., Schmidt, M. J., Fischer, M. S., & Sánchez-Villagra, M. R. (2021). Exceptional Changes in Skeletal Anatomy under Domestication: The Case of Brachycephaly. *Integrative Organismal Biology*, 3(1), 1-31.
- Ghirlanda, S., Acerbi, A., & Herzog, H. (2014). Dog movie stars and dog breed popularity: a case study in media influence on choice. *PLoS ONE*, 9(9), e106565.
- Gianella, P., Caccamo, R., Bellino, C., Bottero, E., Fietta, F., Roncone, S., Ostanello, F., Pietra, M., & Buracco, P. (2019). Evaluation of metabolic profile and C-reactive protein concentrations in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(5), 2183–2192.
- Goldberg, M. B., Langman, V. A., & Richard Taylor, C. (1981). Panting in dogs: Paths of air flow in response to heat and exercise. *Respiration Physiology*, 43(3), 327–338.
- Grobman, M. (2021). Aerodigestive disease in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 51(1), 17–32.
- Gruenheid, M., Simpson, E. M., Aarnes, T. K., Mathys, D. A., McLoughlin, M. A., Mollenkopf, D. F., & Wittum, T. E. (2018). Risk of anesthesia related complications in brachycephalic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 253(3), 301–306.
- Guillem, J. S., Schiborra, F., Rossanese, M., Maddox, T. W., & Mortier, J. R. (2022). Prevalence of bronchial wall thickening and collapse in brachycephalic dogs with and without brachycephalic obstructive airway syndrome and in non-brachycephalic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 261(1), 1–8.
- Guilliams, T. G., & Edwards, L. (2010). Chronic stress and the HPA axis: Clinical assessment and therapeutic considerations. *The Standard*, 9(2), 1–12.
- Harvey, C. E. (1982). Upper airway obstruction surgery. 2. Soft palate resection in brachycephalic dogs. *Journal American Animal Hospital Association*, 18(4), 538–544.
- Harvey, N. D., Oxley, J. A., Miguel-Pacheco, G., Gosling, E. M., & Farnworth, M. (2019). What makes a rabbit cute? Preference for rabbit faces differs according to skull morphology and demographic factors. *Animals*, 9(10), 728.

- Haverbeke, A., Diederich, C., Depiereux, E., & Giffroy, J. M. (2008). Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiology and Behavior*, 93(1–2), 59–67.
- Hendricks, J. C., Kline, L. R., Kovalski, R. J., O'Brien, J. A., Morrison, A. R., & Pack, A. I. (1987). The English bulldog: a natural model of sleep disordered breathing. *Journal of Applied Physiology*, 63(4), 1344–1350.
- 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(1–4), 1–12.
- Hennessy, M. B., Paik, K. D., Caraway, J. D., Schiml, P. A., & Deak, T. (2011). Proinflammatory activity and the sensitization of depressive-like behavior during maternal separation. *Behavioral Neuroscience*, 125(3), 426–433.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., & Herman, J. P. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends Neuroscience*, 20, 78–84.
- Hiby, E., Rooney, N., & Bradshaw, J. (2006). Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. *Physiology & Behavior*, 89(3), 385–391.
- Hoareau, G. L., Jourdan, G., Mellema, M., & Verwaerde, P. (2012). Evaluation of Arterial Blood Gases and Arterial Blood Pressures in Brachycephalic Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(4), 897–904.
- Hoareau, G., & Mellema, M. (2015). Pro-coagulant thromboelastographic features in the bulldog. *Journal of Small Animal Practice*, 56(2), 103–107.
- Holt, D. (1998). Surgery of the upper airway in the brachycephalic dog. *Proceedings of the ACVS Symposium*, 1, 25–31.
- Huntingford, J. L., Levine, C. B., Mustacich, D. J., Corrigan, D., Downey, R. L., & Wakshlag, J. J. (2014). The effects of low intensity endurance activity on various physiological parameters and exercise induced oxidative stress in dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 4(7), 134–144.
- Jarnalo, M., Vardasca, R., Mendes, J. G., & Drummond, M. (2018). Antero-cervical thermophysiological characterization of obstructive sleep apnea patients. *Sleep and Breathing*, 22(4), 1111–1116.

- Jawa, H. A., Khatib, H., Alzahrani, N., Alawi, A., AL-Gamdi, M., Abuljadayel, A., Altayyari, S., Alhejaili, F., Mosli, M., & Wali, S. O. (2021). Nonalcoholic fatty liver disease and fibrosis risk in patients with obstructive sleep apnea: a retrospective analysis. *Cureus*, 4(2), 4–9.
- Jessen, C. (2000). Wärmebilanz und Thermoregulation. In Breves, G., Von Engelhardt, W. (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart, 446–460.
- Johnston, S. D., & Mather, E. C. (1978). Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay: Clinical absence of diurnal variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests. *American Journal of Veterinary Research*, 39(11), 1766–1770.
- Kähler, E., Meyer-Lindenberg, A., Zablotski, Y., & Schroers, M. (2024). Salivary cortisol measurements in brachycephalic dog breeds as part of a standardized stress test. *Frontiers in Veterinary Science*, 11:1351225.
- Kemppainen, R. J., & Sartin, J. L. (1984). Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *Journal of Endocrinology*, 103(2), 219–226.
- Kobelt, A., Hemsworth, P., Barnett, J., & Butler, K. (2003). Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science*, 75(2), 157–161.
- Koch, D. A., Arnold, S., Hubler, M., & Montavon, P. (2003). Brachycephalic syndrome in dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian -North American Edition*, 55(1), 48–55.
- Koch, D. A., Rosaspina, M., Wiestner, T., Arnold, S., & Montavon, P. M. (2014). Comparative investigations on the upper respiratory tract in Norwich terriers, brachycephalic and mesaticephalic dogs. *Schweizer Archiv Für Tierheilkunde*, 156(3), 119–124.
- Koch, D. A., Wiestner, T., Balli, A., Montavon, P. M., Michel, E., Scharf, G., & Arnold, S. (2012). Proposal for a new radiological index to determine skull conformation in the dog. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 154(5), 217–220.
- Lilja-Maula, L. I. O., Laurila, H. P., Syrjä, P., Lappalainen, A. K., Krafft, E., Clercx, C., & Rajamäki, M. M. (2014). Long-term outcome and use of 6-minute walk test in west highland white terriers with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), 379–385.

- Lilja-Maula, L. I. O., Lappalainen, A. K., Hyytiäinen, H. K., Kuusela, E., Kaimio, M., Schildt, K., Mölsä, S., Morelius, M., & Rajamäki, M. M. (2017). Comparison of submaximal exercise test results and severity of brachycephalic obstructive airway syndrome in English bulldogs. *The Veterinary Journal*, 219, 22–26.
- Lilja-Maula, L. I. O., Mäki, K. H., Aromaa, M. K., & Rajamäki, M. M. (2024). Evaluation of brachycephalic obstructive airway syndrome breeding test results in Finland from 2017 to 2022. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 66(1), 1–11.
- Liu, N. C., Sargan, D. R., Adams, V. J., & Ladlow, J. F. (2015). Characterisation of Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome in French Bulldogs Using Whole-Body Barometric Plethysmography. *PLoS ONE*, 10(6), e0130741.
- Liu, N. C., Troconis, E. L., Kalmar, L., Price, D. J., Wright, H. E., Adams, V. J., Sargan, D. R., & Ladlow, J. F. (2017a). Conformational risk factors of brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS) in pugs, French bulldogs, and bulldogs. *PLoS ONE*, 12(8), e0181928.
- Liu, N. C., Oechtering, G. U., Adams, V. J., Kalmar, L., Sargan, D. R., & Ladlow, J. F. (2017b). Outcomes and prognostic factors of surgical treatments for brachycephalic obstructive airway syndrome in 3 breeds. *Veterinary Surgery*, 46(2), 271–280.
- Lorenz, K. (1943). Die angeborenen Formen möglicher Erfahrung. *Zeitschrift Für Tierpsychologie*, 5(2), 235–409.
- Lorison, D., Bright, R. M., & White, R. A. S. (1997). Brachycephalic airway obstruction syndrome - a review of 118 cases. *Canine Practice*, 22(5/6), 18–21.
- Luciani, E., Reinero, C., & Grobman, M. (2022). Evaluation of aerodigestive disease and diagnosis of sliding hiatal hernia in brachycephalic and nonbrachycephalic dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36(4), 1229–1236.
- Mach, R., Wiegel, P. S., Bach, J. P., Beyerbach, M., Kreienbrock, L., & Nolte, I. (2022). Evaluation of a treadmill-based submaximal fitness test in pugs and collecting breed-specific information on brachycephalic obstructive airway syndrome. *Animals*, 12(12), 1585.
- Manens, J., Ricci, R., Damoiseaux, C., Gault, S., Contiero, B., Diez, M., & Clercx, C. (2014). Effect of body weight loss on cardiopulmonary function assessed by 6-minute walk test and arterial blood gas analysis in obese dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), 371–378.

- Marchant, T. W., Johnson, E. J., McTeir, L., Johnson, C. I., Gow, A., Liuti, T., Kuehn, D., Svenson, K., Birmingham, M. L., Drögemüller, M., Nussbaumer, M., Davey, M. G., Argyle, D. J., Powell, R. M., Guilherme, S., Lang, J., Ter Haar, G., Leeb, T., Schwarz, T., Mellanby, R. J., Clements, D. N., Schoenebeck, J. J. (2017). Canine brachycephaly is associated with a retrotransposon-mediated missplicing of SMOC2. *Current Biology*, 27(11), 1573-1584.
- Martin, V. M. (2012). *Aussagekraft eines Belastungstests für Mopse bezüglich mit dem brachyzephalen Atemnotsyndrom assoziierter Probleme*, (Dissertation). Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Mastorakos, G., & Pavlatou, M. (2005). Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. *Hormone and Metabolic Research*, 37(9), 577–584.
- Mayhew, P. D., Balsa, I. M., Marks, S. L., Pollard, R. E., Case, J. B., Culp, W. T. N., & Giuffrida, M. A. (2021). Clinical and videofluoroscopic outcomes of laparoscopic treatment for sliding hiatal hernia and associated gastroesophageal reflux in brachycephalic dogs. *Veterinary Surgery*, 50(1), 067–077.
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiological Reviews*, 87(3), 873–904.
- Mellema, M. S., & Hoareau, G. L. (2014). Hypomagnesemia in brachycephalic dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(5), 1418–1423.
- Meola, S. D. (2013). Brachycephalic Airway Syndrome. *Topics in Companion Animal Medicine*, 28(3), 91–96.
- Mortier, J. R., Mesquita, L., Ferrandis, I., McConnell, J. F., & Maddox, T. W. (2018). Accuracy of and interobserver agreement regarding thoracic computed tomography for the diagnosis of chronic bronchitis in dogs Jeremy. *Small Animals*, 253(6), 757–762.
- Muhtz, C., Rodriguez-Raecke, R., Hinkelmann, K., Moeller-Bertram, T., Kiefer, F., Wiedemann, K., May, A., & Otte, C. (2013). Cortisol response to experimental pain in patients with chronic low back pain and patients with major depression. *Pain Medicine*, 14(4), 498–503.
- Nöller, C., Hueber, J., Aupperle, H., Seeger, J., Oechtering, T. H., Niestrock, C., & Oechtering, G. U. (2002). New aspects of brachycephalia in dogs & cats basics: insights into embryology, anatomy & pathophysiology, Granada, Spain.

- O'Neill, D. G., Packer, R. M. A., Francis, P., Church, D. B., Brodbelt, D. C., & Pegram, C. (2021). French Bulldogs differ to other dogs in the UK in propensity for many common disorders: a VetCompass study. *Canine Medicine and Genetics*, 8(1), 1–14.
- O'Neill, D. G., Sahota, J., Brodbelt, D. C., Church, D. B., Packer, R. M. A., & Pegram, C. (2022). Health of Pug dogs in the UK: disorder predispositions and protections. *Canine Medicine and Genetics*, 9(1), 1–11.
- Oechtering, G. U. (2010). Brachycephalic syndrome - new information on an old congenital disease. *Veterinary Focus*, 20(2), 2–9.
- Oechtering, T. H., Oechtering, G. U., & Nöller, C. (2007). Strukturelle Besonderheiten der Nase brachyzephaler Hunderassen. *Tierärztliche Praxis*, 35(K), 177–187.
- Open Registry for Brachycephalic Airway Syndrome (www.orfa.org). Zugriffsdatum: 20.4.2025
- Oyama, D., Hyodo, M., Doi, H., Kurachi, T., Takata, M., Koyama, S., Satoh, T., & Watanabe, G. (2014). Saliva collection by using filter paper for measuring cortisol levels in dogs. *Domestic Animal Endocrinology*, 46(1), 20–25.
- Packer, R. M. A., Hendricks, A., & Burn, C. (2012). Do dog owners perceive the clinical signs related to conformational inherited disorders as 'normal' for the breed? A potential constraint to improving canine welfare. *Animal Welfare*, 21(1), 81–93.
- Packer, R. M. A., & Tivers, M. S. (2015). Strategies for the management and prevention of conformation-related respiratory disorders in brachycephalic dogs. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 6, 219–232.
- Paravati, S., Rosani, A., & Warrington, S. J. (2022). *Physiology, Catecholamines*. StatPearls Publishing Verlag, Treasure Island, Florida.
- Park, C. S., Guilleminault, C., Hwang, S. H., Jeong, J. H., Park, D. S., & Maeng, J. H. (2013). Correlation of salivary cortisol level with obstructive sleep apnea syndrome in pediatric subjects. *Sleep Medicine*, 14(10), 978–984.
- Preiser, J. C., Ichai, C., Orban, J. C., & Groeneveld, A. B. J. (2014). Metabolic response to the stress of critical illness. *British Journal of Anaesthesia*, 113(6), 945–954.
- Reeve, E. J., Sutton, D., Friend, E. J., & Warren-Smith, C. M. R. (2017). Documenting the prevalence of hiatal hernia and oesophageal abnormalities in brachycephalic dogs using fluoroscopy. *Journal of Small Animal Practice*, 58, 703–708.

- Riecks, T.W., Birchard, S.J., & Stephens, J. A. (2007). Surgical correction of brachycephalic syndrome in dogs: 62 cases (1991–2004). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 230(9), 1324–1328.
- Riggs, J., Liu, N., Sutton, D. R., Sagan, D., & Ladlow, J. F. (2019). Validation of exercise testing and laryngeal auscultation for grading brachycephalic obstructive airway syndrome in pugs, French bulldogs, and English bulldogs by using whole-body barometric plethysmography. *Veterinary Surgery*, 48(4), 488–496.
- Rijnberk, A., der Kinderen, P. J., & Thijssen, J. H. H. (1968). Investigations on the adrenocortical function of normal dogs. *Journal of Endocrinology*, 41(3), 387–395.
- Rijnberk, A., & Kooistra, H. S. (2010) Hypothalamus-Pituitary System. In Rijnberk, A., & Kooistra, H. S. (Hrsg.), *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats: An Illustrated Text*, 2. Auflage. Schlütersche Verlag. Hannover, Deutschland, 13–54.
- Roedler, F. S., Pohl, S., & Oechtering, G. U. (2013). How does severe brachycephaly affect dog's lives? Results of a structured preoperative owner questionnaire. *Veterinary Journal*, 198(3), 606–610.
- Rooney, N. J., Gaines, S. A., & Bradshaw, J. W. S. (2007). Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiology & Behavior*, 92(5), 847–854.
- Rosaspina, M. (2005). *Beobachtungen am oberen Atemapparat bei einer Population von Norwich-Terriern*, (Dissertation). Universität Zürich.
- Royer, C. M., Willard, M., Williamson, K., Steiner, J. M., Williams, D. A., & David, M. (2005). Exercise stress, intestinal permeability and gastric ulceration in racing Alaskan sled dogs. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 2(1), 53–59.
- Russell, G., & Lightman, S. (2019). The human stress response. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(9), 525–534.
- Sandri, M., Colussi, A., Perrotta, M. G., & Stefanon, B. (2015). Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context. *Journal of Veterinary Behavior*, 10(4), 302–306.
- 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.

- Sarıman, N., Levent, E., Çubuk, R., Yurtlu, Ş., & Benli Aksungar, F. (2011). Bronchial hyperreactivity and airway wall thickening in obstructive sleep apnea patients. *Sleep and Breathing*, 15(3), 341–350.
- Schmidt-Nielsen, K., Bretz, W. L., & Taylor, C. R. (1970). Panting in dogs: Unidirectional air flow over evaporative surfaces. *Science*, 169(3950), 1102–1104.
- Schoenebeck, J. J., Hutchinson, S. A., Byers, A., Beale, H. C., Carrington, B., Faden, D. L., Rimbault, M., Decker, B., Kidd, J. M., Sood, R., Boyko, A. R., Fondon, J. W., Wayne, R. K., Bustamante, C. D., Ciruna, B., & Ostrander, E. A. (2012). Variation of BMP3 contributes to dog breed skull diversity. *PLoS Genetics*, 8(8), 1–11.
- Schroers, M., & Meyer-Lindenberg, A. (2022). Einschätzung von Symptomen des brachyzephalen obstruktiven Atemwegssyndroms und anderen rassetypischen Erkrankungen bei Mops-Hunden – eine Online-Umfrage. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*, 50(04), 261–268.
- Selye, H., & Fortier, C. (1950). Adaptive reaction to stress. *Psychosomatic Medicine*, 12(3), 149–157.
- Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1(4667), 1383–1392.
- Serpell, J. A. (2003). Anthropomorphism and anthropomorphic selection - Beyond the “cute response.” *Society and Animals*, 11(1), 83–100.
- Shin, Y. J., & Shin, N. S. (2016). Evaluation of effects of olfactory and auditory stimulation on separation anxiety by salivary cortisol measurement in dogs. *Journal of Veterinary Science*, 17(2), 153.
- Siedenburg, J. S., & Dupré, G. (2021). Tongue and Upper Airway Dimensions: A Comparative Study between Three Popular Brachycephalic Breeds. *Animals*, 11(3), 662.
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamicpituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), 383–395.
- Sneddon, J. C., Minnaar, P. P., Grosskopf, J. F., & Groeneveld, H. T. (1989). Physiological and blood biochemical responses to submaximal treadmill exercise in Canaan dogs before, during and after training. *Journal of the South African Veterinary Association*, 60(2), 87–91.

- Spindler, M., Palombo, M., Zhang, H., & Thiel, C. M. (2023). Dysfunction of the hypothalamic-pituitary adrenal axis and its influence on aging: the role of the hypothalamus. *Scientific Reports*, 13(1), 1–11.
- Sripathyarat, T., Hagman, R., Höglund, O. V., Olsson, U., Stridsberg, M., Jitpean, S., Lagerstedt, A.-S., & Pettersson, A. (2017). Catestatin and vasostatin concentrations in healthy dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 1.
- Svobodová, I., Chaloupková, H., Končel, R., Bartoš, L., Hradecká, L., & Jebavý, L. (2014). Cortisol and secretory immunoglobulin a response to stress in german shepherd dogs. *PLoS ONE*, 9(3), e90820.
- Swimmer, R. A., & Rozanski, E. A. (2011). Evaluation of the 6-Minute Walk Test in pet dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 405–406.
- Szabo, D., Sutherland-Smith, J., Barton, B., Rozanski, E. A., & Taeymans, O. (2015). Accuracy of a computed tomography bronchial wall thickness to pulmonary artery diameter ratio for assessing bronchial wall thickening in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 56(3), 264–271.
- Takahashi, Y., Ebihara, S., Nakamura, Y., & Takahashi, K. (1981). A model of human sleep-related growth hormone secretion in dogs: effects of 3, 6, and 12 hours of forced wakefulness on plasma growth hormone, cortisol, and sleep stages. *Endocrinology*, 109(1), 262–272.
- Tan, S. Y., & Yip, A. (2018). Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. *Singapore Medical Journal*, 59(4), 170–171.
- Tennant, F. (2013). The Physiologic Effects of Pain on the Endocrine System. *Pain and Therapy*, 2(2), 75–86.
- The Kennel Club. Respiratory Function Grading Scheme (www.thekennelclub.org.uk/rfgs).
- Zugriffsdatum: 6.8.2024
- Tipton, C. M., Carey, R. A., Eastin, W. C., & Erickson, H. H. (1974). A submaximal test for dogs: evaluation of effects of training, detraining, and cage confinement. *Journal of Applied Physiology*, 37(2), 271–275.
- Tizabi, Y., & Aguilera, G. (1992). Desensitization of the HypothalamicPituitary-Adrenal Axis following Prolonged Administration of Corticotropin-Releasing Hormone or Vasopressin. *Neuroendocrinology*, 56(5), 611–618.
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 397–409.

- Usamentiaga, R., Venegas, P., Guerediaga, J., Vega, L., Molleda, J., & Bulnes, F. G. (2014). Infrared thermography for temperature measurement and non-destructive testing. *Sensors (Switzerland)*, 14(7), 12305–12348.
- Vainionpää, M. (2014). *Thermographic Imaging in Cats and Dogs Usability as a Clinical Method* (Dissertation). Universtät Elsinki.
- Van Den Eede, F., Moorkens, G., Van Houdenhove, B., Cosyns, P., & Claes, S. J. (2007). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Chronic Fatigue Syndrome. *Neuropsychobiology*, 55(2), 112–120.
- Van Houdenhove, B., Vanthuyne, S., & Neerinckx, E. (2000). Chronic fatigue syndrome. *The American Journal of Medicine*, 109(3), 257– 258.
- Veasey, S. C., Fenik, P., Panckeri, K., Pack, A. I., & Hendricks, J. C. (1999). The effects of trazodone with L-tryptophan on sleep-disordered breathing in the English bulldog. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(5 I), 1659–1667.
- Verband für das Deutsche Hundewesen (www.vdh.de). Zugriffsdatum: 5.8.2022.
- Vincent, I. C., & Michell, A. R. (1992). Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science*, 53(3), 342–345.
- Webb, H. E., Weldy, M. L., Fabianke-Kadue, E. C., Orndorff, G. R., Kamimori, G. H., & Acevedo, E. O. (2008). Psychological stress during exercise: cardiorespiratory and hormonal responses. *European Journal of Applied Physiology*, 104(6), 973–981.
- Whirledge, S., & Cidlowski, J. A. (2013). A Role for Glucocorticoids in Stress-Impaired Reproduction: Beyond the Hypothalamus and Pituitary. *Endocrinology*, 154(12), 4450–4468.
- Wykes, P. M. (1991). Brachycephalic airway obstructive syndrome. *Problems in Veterinary Medicine*, 3(2), 188–197.

VIII. DANKSAGUNG

Mein aufrichtiger Dank gilt zunächst meiner Betreuerin, Frau Prof. Meyer-Lindenberg, für ihre wertvolle Unterstützung und Beratung während des gesamten Forschungsprozesses. Ich danke Ihnen, dass Sie mir ein so herausforderndes Thema gestellt und mich mit Ihrer Erfahrung und Ihrem Fachwissen durch den gesamten Forschungsprozess begleitet haben.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Zwischenbetreuerin, Dr. Maike Schroers, bedanken. Ihre umfassende Unterstützung, ihr kompetenter Rat und ihre stete Ermutigung waren für den Fortgang und die Fertigstellung meiner Dissertation von unschätzbarem Wert.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Ammer und seinem Team bedanken, die mir großzügig das Pharmakologielabor zur Verfügung stellten und mich bei der Analyse der Proben und der Auswertung der Ergebnisse tatkräftig unterstützten. Ihr Fachwissen und ihre Hilfsbereitschaft haben wesentlich zur Qualität meiner Forschungsarbeit beigetragen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden herzlich bedanken. Ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Verständnis und ihr Zuspruch haben es mir ermöglicht, alle Höhen und Tiefen des Promotionsprozesses zu meistern. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.