



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens miljö och hälsa

En pilotstudie av trypsinhydrolyserat bovint α_{s1} - kaseins (Zylkene[®]) påverkan på beteende och fysiologi hos skotträdda hundar

Abtin Mojarrady

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:9*

En pilotstudie av trypsinhydrolyserat bovint α_{s1} -kaseins
(Zylkene[®]) påverkan på beteende och fysiologi hos
skotträdda hundar

A pilot study on the effects of tryptic hydrolysate from
bovine milk α_{s1} -casein (Zylkene[®]) on behaviour and
physiology of dogs fearful of gunshots

Abtin Mojarrady

Handledare: Lena Lidfors, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa
Biträdande handledare: Eva Sandberg, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi
Examinator: Linda Keeling, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens miljö och hälsa
Kurskod: EX0756, Nivå A2E, 30hp

Nyckelord: α_{s1} -kasein, Casozepine, Hund, Skotträdsåla, Stress, Zylkene.
Key words: α_{s1} -casein, Casozepine, Dog, Gun shy, Stress, Zylkene

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:9

INNEHÅLL

Sammanfattning	1
Summary	3
Inledning.....	5
Litteraturgenomgång	7
Zylkene®	7
Innehåll och verksamt ämne.....	7
Möjlighet för upptag och verkan.....	7
Effekt hos däggdjur	8
Effekt hos människor	9
Effekt hos hundar	9
Lactium™	9
Toxicitet och bieffekter	10
Fysiologi vid rädsla	10
Fysiologiska mätvärden.....	12
Beteenden vid rädsla	12
Syfte	14
Material och metoder	15
Tillstånd.....	15
Hundar	15
Hund A	15
Hund B	16
Försökspreparat	16
Försöksdagen.....	16
Provtagning	17
Blodprov.....	17
Urinprov	18
Beteendeanalys.....	19
Databearbetning	21
Beteende	21
Resultat.....	22
Kodlista	22

Djurägarens bedömning	22
Hematokrit.....	22
Kortisol i plasma	23
Kortisol i urin	24
Beteende	25
Momentanregistreringar.....	25
Frekvensregistreringar.....	27
Diskussion	33
Slutsats	39
Tack till	40
Litteraturförteckning	41

SAMMANFATTNING

Det finns en utbredd rädsla för skott och andra höga ljud, däribland fyrverkerier, hos våra hundar och många behandlar sina djur med receptbelagda läkemedel för att underlätta den stressfyllda situationen. Vid sidan av dessa läkemedel, med kända biverkningar, finns preparat som säljs receptfritt i handeln. Zylkene® är en produkt som utvecklats av företaget MSD Animal Health och innehåller trypsinhydrolyserat bovint α 1-kasein. Utvecklaren rekommenderar användning av Zylkene® vid situationer som upplevs som stress- och ångestfyllda för hundar och katter, däribland fyrverkerier. Tidigare forskning har visat på goda stresshämmande effekter av preparatet hos såväl människor, råttor, katter och i en beteendestudie på hundar. Forskningen på Zylkenes® effekt på hundar är knapphändig och ingen fysiologisk studie har ännu gjorts. Målet med denna pilotstudie är att undersöka om behandling med Zylkene® ger effekter på beteende och fysiologi, som kan sättas i relation till en lägre stressnivå, hos skotträdda hundar som utsatts för skott. Kan en sådan effekt påvisas så kan Zylkene® i högre grad rekommenderas till djurägare, som alternativ till receptbelagda läkemedel.

Vår studie innefattade 2 intakta hanhundar av rasen Collie. Hundarna var 4,5-6 år, vägde 27,5-28,0 kg och bedömdes vara skotträdda av sina ägare. Varje hund genomgick två försök, ett med Zylkene® och ett med Placebo (Maltodextrin). Studien var trippelblindad och randomiserad avseende vilken hund som började med vilken behandling. Hundarna intog 450 mg Zylkene® eller placebo kvällen innan försöksdagen, och ytterligare 450 mg Zylkene® eller placebo på morgonen på försöksdagen. Efter veterinärundersökning applicerades en permanentkanyl i frambenet och blodprov togs 30 min och 15 min innan skott. Ett skott avfyrades med signalpistol, 50 m från och utom synhåll från hunden. Nya blodprover togs 5, 15, 30, 45, 60, 90 och 120 min efter skott. Blodproverna analyserades avseende hematokrit och kortisol. Urinkortisol/kreatininkvot mättes från urinprov taget kvällen innan försök, morgonen på försöksdagen, innan skott och efter försökets avslut (ca 120 min efter skott). Momentan- och frekvensregistrering avseende ett flertal fördefinierade beteenden gjordes per minut, från 10 min innan skott och upp till 120 min efter skott.

Båda hundarna visade tydliga stressreaktioner efter att skott avfyrats i respektive försök. Hos Hund A registrerades något högre hematokrit, men en lägre kortisolhalt i plasma och lägre kortisol/kreatininkvot i urin, under försöket med Zylkene®, jämfört med Placebo. Hund A visade en högre andel stående efter skott, under behandling med Zylkene®, och en högre andel liggande under behandling med Placebo. Kontaktsökande hos ägarna och oralt beteende i form av slickning var högre hos Hund A under behandling med Zylkene®, jämfört med Placebo. Hos Hund B registrerades högre hematokrit, kortisolhalt i plasma och kortisol/kreatininkvot i urin, under försök med Zylkene®, jämfört med Placebo. Medan hematokriten, efter den initiala höjningen, sedan sakta sjönk, så fortsatte kortisolhalten i plasma vara kraftigt förhöjd under hela försöksperioden efter skott. Hund B visade en hög andel hässjning, och skakade i 100 % av registreringarna efter skott, under behandling med Zylkene®. Vidare sökte Hund B mer kontakt hos ägaren under behandling med Placebo, medan frekvensen orala beteenden i form av slickning var högre under behandling med

Zylkene®. Sammanvägs fysiologi och beteende blir slutsatsen att Hund A tenderade ha en högre stressnivå under behandling med Placebo, jämfört med Zylkene®, och Hund B tenderade ha en högre stressnivå under behandling med Zylkene®, jämfört med Placebo.

Den här studien visar ett resultat som stöder, och ett resultat som inte stöder den stresshämmande effekten av Zylkene® hos hund. På grund av det låga antalet deltagande hundar är det dock inte möjligt att dra generella slutsatser om effekten av Zylkene®. Hundarna som ingick i studien bedömdes båda vara mest stressade i det andra försöket de genomgick. Frågan är därför om försöksordningen hade större betydelse för resultaten än vilken behandling som hundarna tillskrevs. Den vetenskapliga litteraturen om Zylkenes® påverkan på hundar är dock inte tillräcklig för att veterinärer evidensbaserat ska kunna rekommendera dess användning till djurägare. Det krävs därför ytterligare studier på ett större antal hundar av fler raser för att klargöra huruvida Zylkene® besitter en faktisk stresshämmande effekt hos ljudrädda hundar eller ej.

SUMMARY

Fearfulness of gun shots and loud noises, including fireworks, in dogs is widely spread and a lot of owners treat their dogs with prescription drugs to ease the stressful situation. Alongside these drugs, with known side effects, are preparations that are sold without a prescription. Zylkene[®] is a product developed by the company MSD Animal Health and contains a tryptic hydrolysate from bovine α 1-casein. The developer recommends using Zylkene[®] in situations that are perceived as stressful and cause anxiety for dogs and cats, including fireworks. Previous research has shown good stress reducing effects in humans, rats, cats and in one behavioural study in dogs. Research on the effect of Zylkene[®] on dogs is scant and no physiological study has yet been made. The goal with this pilot study is to investigate whether treatment with Zylkene[®] produces effects on behaviour and physiology, which may be related to a lower stress level, in dogs fearful of gunshots when they are exposed to gunshots. If such an effect can be demonstrated, then Zylkene[®] can be recommended to owners, to a higher degree, as an alternative to prescription drugs.

Our study included two intact male dogs of the breed Collie. The dogs were 4.5-6 years, weighing 27.5-28.0 kilograms and were by their owners considered to be fearful of gunshots. Each dog underwent two trials, one with Zylkene[®] and one with Placebo (Maltodextrin). The study was triple blinded and randomized on which dog started with which treatment. The dogs were given 450 mg Zylkene[®] or Placebo the evening before the test day, and an additional 450 mg Zylkene[®] or Placebo in the morning on the day of the experiment. After a veterinary examination a permanent cannula was applied in the front leg of the dog, and blood samples were collected 30 minutes and 15 minutes before the shot was fired. A shot was fired with a signal pistol, 50 meters from, and out of sight of, the dog. New blood samples were taken 5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes after the shot. The blood samples were analyzed for hematocrit and cortisol. Urinary cortisol/creatinine ratios were measured from urine samples collected the night before the trial, the morning of the test day, before the shot and after the experiment finished (about 120 minutes after the shot). Instantaneous and frequency recording of a number of predefined behaviours were made per minute, 10 minutes before the shot and up to 120 minutes after the shot.

Both dogs showed clear stress reactions after the shot in each trial. For Dog A we recorded slightly higher hematocrit, but a lower cortisol level in plasma and a lower cortisol/creatinine ratio in urine, during treatment with Zylkene[®], compared with treatment with Placebo. Dog A showed a higher proportion of standing after the shot, while taking Zylkene[®], and a higher proportion of lying down during treatment with Placebo. Contact behaviour with the owner, and oral behaviour in the form of lip licking, was higher in Dog A during treatment with Zylkene[®], compared with treatment with Placebo. In Dog B we recorded a higher hematocrit, cortisol level in plasma and cortisol/creatinine ratio in urine, during treatment with Zylkene[®], compared to treatment with Placebo. While the hematocrit, after the initial rise, then slowly declined, the cortisol level in plasma continued to be elevated throughout the whole experimental period after the shot. Dog B showed a high percentage panting and shivered in 100 % of the recording after the shot, when taking Zylkene[®]. Furthermore Dog B searched

more contact with his owner during treatment with Placebo, while the frequency of oral behaviours in the form of lip licking was higher during treatment with Zylkene[®]. If we combine physiology and behaviour, we reach the conclusion that Dog A tended to have a higher stress level during treatment with Placebo, compared to treatment with Zylkene[®], and Dog B tended to have a higher stress level during treatment with Zylkene[®], compared to treatment with Placebo.

This study shows one result that support, and one result that does not support, the stress inhibitory effect of Zylkene[®] on dogs. Because of the low number of participating dogs, it is not possible to draw general conclusions about the effect of Zylkene[®]. The dogs in the study were both assessed to be most stressed in the second experiment they underwent. It could therefore be argued that the trial schedule had a greater impact on the results than the treatment that the dogs were given. The scientific literature on the effects of Zylkenes[®] on dogs is not sufficient for veterinarians to give owners an evidence-based recommendation whether they should use Zylkene[®] or not. It requires further studies on a larger number of dogs of several breeds to clarify whether Zylkene[®] possesses an actual stress inhibitory effect on dogs fearful of gunshots, or not.

INLEDNING

Rädsla för höga ljud hos hundar i samhället är ett utbrett och allvarligt problem. Blackwell et al. (2005) visade i en engelsk studie att 49 % av de tillfrågade djurägarna upplevde att höga ljud orsakade rädsla och obehag hos deras hund. Av dessa var 83 % rädda för fyrverkerier, 65 % för åska och 30 % för skott. I en internationell studie visade Limura et al (2007) att utav 3500 tillfrågade hundägare bedömde 2577 ägare (74 %) sin hund som ljudkänslig. Av dessa var 838 (33 %) hundar rädda för fyrverkerier, 817 (32 %) rädda för åska och 430 (17 %) rädda för skott. Gemensamt för båda studierna är att en stor del av de deltagande hundarna visade rädlereaktioner för ljud och att de vanligaste stimuliner var fyrverkerier, åska och skott i fallande omfattning.

I Sverige är det främst vid Nyårsafton som våra sällskapsdjur utsätts för en av de mest omdiskuterade potentiellt rädsleorsakande ljuden, dvs. ljud från fyrverkerier. Många djurägare söker sig till veterinärer för att få lugnande medel utskrivna till sina djur. På Universitetsdjursjukhusets (UDS) i Uppsala är policyn att lämna ut Nozinan (Levomepromazin) till djurägare som söker hjälp inför nyårsfirandet (Rohdin, 2012). Detta görs efter klinisk undersökning av djuret i fråga. Nozinan är avsett för humant bruk, men kan användas på djur för den ångestdämpande effekten. Enligt Sherman et al. (2008) kan även Diazepam (Stesolid) och Acepromazin (Plegicil) användas vid ljudrädsla hos hund. Detta är effektiva mediciner men för även med sig en hel del bieffekter och är även kontraindicerade att använda hos vissa djur. Människor behandlade med Nozinan kan erfaras yrsel, skakningar, blodtrycksfall, förstoppning, gulsot, blodproppar och det påverkar även blodsockret vilket innebär att människor med diabetes ej kan nyttja behandlingen (FASS, 2012a). Plegicil kan ge blodtrycksfall och är således inte ett alternativ för sällskapsdjur med hjärtproblematik (FASS, 2012b). Stesolid kan bland annat ge dåsighet, yrsel och huvudvärk, det interagerar med flera läkemedel och ska användas med försiktighet vid nedsatt lever- eller njurfunktion (FASS, 2012c).

Blackwell et al. (2005) visade att endast en minoritet av hundar som i tidig ålder varit rädda för fyrverkerier, i senare ålder inte längre var det. Av detta kan slutsatsen dras att problem med ljudrädsla inte är något som spontant försvinner hos djuret, utan att någon form av behandling krävs för att hjälpa hunden reducera sin rädsla. Av de rädda hundarna var det bara 29 % av djurägarna som hade sökt hjälp för hundens rädsla, majoriteten av dessa hade vänt sig till sin veterinär (Blackwell et al., 2005). Vilken behandling de rekommenderats framkommer ej i artikeln. Behandlingar mot ljudrädsla som finns att tillgå, bortsett från receptbelagda läkemedel, är bland annat habituering med hjälp av CD-skiva (Compact Disc) med inspelade fyrverkeri-, åsk- och skottljud. I handeln finns även ett receptfritt preparat som heter DAP (Dog Appeasing Pheromone) som är en syntetisk motsvarighet till ett lugnande feromon hos hundar (Sherman et al., 2008).

Mjölksärl är ett livsmedel som inte bara är näringsrikt, utan även innehåller bioaktiva proteiner som har en farmakologisk verkan på kroppen (Meisel, 1997; Silva et al., 2005; Rutherford-Markwick et al., 2005). Flera peptider som uppstår vid nedbrytning av mjölksärlproteiner är

bioaktiva och dessa har visat sig ha en mängd olika effekter såsom opioida agonister/antagonister, ACE-hämmare (Angiotensin Converting Enzyme), immunomodulerande, antimikrobiella, antitrombotiska och mineralbindande effekter (Meisel, 1997; Silva et al., 2005; Rutherford-Markwick et al., 2005). Zylkene[®] är en produkt som har utvecklats av företaget MSD Animal Health och distribueras i Sverige av Intervet AB. Det är ett kompletteringsfoder som innehåller trypsinhydrolyserat bovint α_{s1} -kasein, ett protein som utvinns ur komjölk. FDA (Food and Drug Administration) har klassificerat Zylkenes[®] motsvarighet för människor (LactiumTM) som GRAS (Generally Recognized As Safe) och kategoriserat det som mat (FDA 2004). Indikationer för Zylkenes[®] användande är enligt utvecklaren situationer för hundar och katter som upplevs som obehagliga, t.ex. nya miljöer, flytt, nya människor, fyrverkerier och transporter. Preparatet säljs receptfritt hos såväl veterinärer som apotek och djurbutiker.

Att använda sig av olika preparat för att behandla sin hunds rädsla kan hos vissa upplevas som fel väg att gå, eftersom man egentligen bara behandlar symtomen och inte själva problemet. Pga. problemets komplexitet kan detta dock i många fall vara det mest kostnadseffektiva för alla parter. Beaver (1999) skriver att 87 % av hundar med ljudfobi även hade separationsångest och att hundar med separationsångest till 63 % även hade generell ljudfobi och 52 % åskfobi. Vidare skriver Beaver (1999) att det är 90 % risk att en hund med åskfobi även är ljudfobisk, samt att en ljudfobisk hund till 76 % risk även har åskfobi. Sammantaget innebär detta att en hund som djurägaren tror endast är rädd för skott, t.ex., även kan ha en generell ljudrädsla eller rädsla för andra specifika ljud, samt separationsångest. Alla dessa enskilda, men samhörande, problem spelar in vid val och genomförande av behandling och det kan då vara väldigt energikrävande att genom beteendeterapi habituera t.ex. skott, när hunden även kan vara rädd för t.ex. åska och samtidigt lida av separationsångest.

Det har gjorts beteende- och fysiologiska studier på människa som visat på goda stresshämmande effekter hos Zylkene[®] (Kim et al., 2007; Messaoudi et al., 2004; Saint-Hilaire et al., 2009). Det har även gjorts beteendestudier på råttor (Miclo et al., 2001; Guesdon et al., 2005; Violle et al., 2006), katt (Beata et al., 2007b) och hund (Beata et al., 2007a), men ännu har det inte gjorts några studier som kartlagt vilka fysiologiska effekter preparatet orsakar i djurstudier.

LITTERATURGENOMGÅNG

Zylkene®

Innehåll och verksamt ämne

Att det bovina α_{s1} -kaseinet i Zylkene® är trypsinhydrolyserat innebär att produkten innehåller en mängd olika polypeptider, oligopeptider och aminosyror. *In vitro* har studier visat att det är aminosyrasekvens 91-100 (Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg) hos den längre peptiden α_{s1} -kasein som är den aktiva komponenten i peptonet, denna benämns α -casozepine eller α_{s1} -CN-(f91-100). Studier *in vivo* har visat samma grad av effekt på råttor som genomgick "Conditioned Defensive Burying test" (CBD) efter att antingen fått Diazepam (1 mg/kg), α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (3 mg/kg) eller rent α_{s1} -CN-(f91-100) (0,4 mg/kg) intraperitoneellt (*i.p.*). α_{s1} -CN-(f91-100) har vidare visat sig konkurrera med Flunitrazepam om GABAa-receptorns bindningsdel för bensodiazepiner vid biokemisk analys. Det var endast denna peptid i α_{s1} -kasein trypsinhydrolysatet som hade affinitet till GABAa-receptorn och affiniteten beräknades, *in vitro*, vara 10 000 gånger längre än den för Diazepam. Eftersom α_{s1} -CN-(f91-100) var den enda peptiden i hydrolysatet som hade affinitet till GABAa-receptorn, samt att behandling med rent α_{s1} -CN-(f91-100) jämfört med α_{s1} -kasein hydrolysat gav samma grad av effekt som Diazepam, drar författarna slutsatsen att α_{s1} -CN-(f91-100) står för hela hydrolysatets ångestdämpande effekt (Miclo et al., 2001). Den bensodiazepinliknande effekten hos α_{s1} -CN-(f91-100), och dess affinitet till GABAa-receptorn, stöds vidare av den molekylära strukturen hos α_{s1} -CN-(f91-100) som påminner om strukturen hos bensodiazepinagonister (Lecouvey et al., 1997). Att det är just GABAa-receptorn som α_{s1} -CN-(f91-100) utövar sin effekt på stärker vidare den påstådda stresshämmande effekt av Zylkene® då agonister till GABAa-receptorn förändrar djurets beteende och verkar ångestminskande och sederande i olika grad (Lüddens et al., 1995) och GABAa-receptor-komplexet spelar en stor roll vid farmakologin, neurokemin och fysiopatologin vid stress och ångest hos djur (Biggio et al., 1990).

Möjlighet för upptag och verkan

In vitro studier har visat att α_{s1} -CN-(f91-100) har motståndskraft mot den proteolytiska processen i magtarmkanalen hos människa (Cakir-Kiefer et al., 2011). Författarna använde sig av Pepsin, Chymotrypsin/trypsin och Corolase PP (extrakt av enzymer som liknar förhållanden av proteolytiska enzymer i magsäcken) i olika kombinationer och miljöförhållanden för att skapa effekten av normal digestion av α_{s1} -CN-(f91-100). I alla kombinationer återfanns fragment 91-97 av α_{s1} -kasein (α_{s1} -CN-(f91-97)) i signifikanta mängder. Effekten hos α_{s1} -CN-(f91-97) utvärderades sedan jämfört med α_{s1} -CN-(f91-100) och Diazepam hos råttor i olika stressmodeller och visade på en jämförbar effekt mellan de olika preparaten (Cakir-Kiefer et al., 2011). Hos människor har studier påvisat att personer som intagit mjölkprodukter har peptider, med ursprung från bland annat α_{s1} -kasein, på upp till 24 aminosyror i blodomloppet, vilket innebär att längre peptider kan ta sig över tarmväggen och vidare till blodet (Chabance et al., 1998). Glykopeptider på upp till 17 aminosyror har i *in vivo* studier på möss visat sig ta sig över blod-hjärn-barriären (Egleton et al., 2004). Sammantaget innebär detta att oralt intag av α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat har en möjlighet att

motstå nedbrytning i magtarmkanalen, transporteras över tarmväggen till blodet och sedan över blod-hjärn-barriären för att utöva sin effekt på GABA_A-receptorn.

Effekt hos däggdjur

Det har gjorts flera studier på råttor för att undersöka effekten av α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat. Violle et al. (2006) visade i ett försök att α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (15 mg/kg) oralt var den lägsta effektiva dosen av preparatet för att minska stressen hos försöksråttor i CBD. Vidare visade de att α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (15 mg/kg) oralt var jämförbart med Diazepam (3 mg/kg) oralt i flertalet parametrar som visade på mindre stress och ångest i CBD och "Elevated plus-maze" (EPM). Dock var det flera parametrar som α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat inte gav effekt på, medan Diazepam gjorde det. Av detta resultat drar författarna slutsatsen att behandling med α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat har samma potens som ångestdämpare som Diazepam, men att α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat har en annan beteende- och farmakologisk profil än Diazepam.

Miclo et al. (2001) visade att *i.p.* administration med Diazepam (2 mg/kg) hade jämförbara resultat med *i.p.* administration med α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (3 mg/kg) hos råttor i EPM. Miclo et al. (2001) visade även, som tidigare nämnts, med försök i CBD att *i.p.* administration med α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (3 mg/kg) och *i.p.* administration av rent α_{s1} -CN-(f91-100) (0.4 mg/kg) gav jämförbara resultat med *i.p.* administration med Diazepam (1 mg/kg) hos råttor. Vidare visade Miclo et al. (2001) att α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (3 mg/kg) *i.p.* hade en kramphämmande effekt när försöksråttor utsattes för neurologiska anfall med hjälp av Pentylenetetrazole. Guesdon et al. (2006) visade att råttor som utsattes för kronisk stress och samtidigt fick α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (15 mg/kg) oralt behöll sin normala sömn jämfört med kontrollgruppen som fick signifikant kortare total sömn tid samt kortare tid djupsömn (Slow Wave Sleep). Gruppen som fått α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat ökade dessutom sin REM-sömn (drömsömn) jämfört med kontrollgruppen. Sammantaget tyder detta på en förbättrad stresshantering hos den grupp som fått α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat.

I en studie på katter med social fobi visade att behandling med α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (15mg/kg) oralt intag dagligen i 56 dagar gjorde att katter som tidigare haft grava beteendeproblem sökte kontakt med båda kända och okända människor, och även visade förbättringar i beteenden associerade med fobin (Beata et al., 2007a). Författarna i denna studie definierade social fobi hos katt genom en situation där katten i fråga avlägsnar sig när en människa eller annan katt äntrar rummet där katten befinner sig, och katten uttrycker aggression eller "tecken som associeras med autonom aktivitet". Katterna i studien bedömdes enligt en skala som innefattade kontakttolerans och aggression mot kända och okända människor, samt andra rädslor och, som författarna formulerar det, stressrelaterade autonoma tecken.

α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (1000 mg dagligen) har även visat sig ge positiva effekter på hanterbarhet och träning hos shetlandspionyer som fötts och vuxit upp under flockliknande miljö och sociala förhållanden med begränsad mänsklig hantering (McDonnel et al., 2012).

Effekt hos människor

Hos människor har trypsinhydrolyserat α_{s1} -kasein undersökts genom att försökspersoner fått genomgå två olika stressmodeller för människor. De två modellerna som använts är ”Stroop test” (ST) där försökspersonen genomgår mental stress och ”Cold Pressor test” (CPT) där försökspersonen genomgår fysisk stress. I ST får försökspersonen sitta framför en datorskärm där ord i olika färger dök upp och där färgen ibland överensstämde med ordet. Försökspersonen skulle trycka på en knapp om färgen matchade ordet och på en annan knapp om färgen inte matchade ordet. Orden dök upp snabbare och snabbare på skärmen och vid fel tryck hördes en ljudsignal. I CPT fick försökspersonen hålla höger hand upp till handleden i 2-gradigt vatten i 5 minuter.

Människor som fått α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (200 mg/dag) oralt i 3 dagar och därefter fått genomgå först ST och efter 30 minuters vila CPT hade signifikant lägre blodtryck (systoliskt och diastoliskt) genom hela testperioden jämfört med kontrollgruppen (Messaoudi et al., 2004). Hjärtfrekvensen hos deltagarna i studien som fått α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat var inte lägre vid respektive test, men däremot i viloperioden mellan de båda testen. Även signifikant lägre kortisol i plasma uppmättes hos de deltagare som fått α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat jämfört med de som fått placebo. Kim et al. (2007) visade att kvinnor som led av stressrelaterade symtom och som behandlades med 150 mg α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat hade en signifikant minskning av stressrelaterade gastrointestinala, kardiovaskulära, intellektuella, emotionella och sociala problem. Människor med sömnproblem behandlades i en studie med 2,70 mg α_{s1} -CN-(f91-100) oralt en timme innan sänggående och förbättrade sin sömn signifikant jämfört med kontrollgruppen (Saint-Hilaire et al., 2009).

Effekt hos hundar

Hos hundar med ångestproblematik har dagligt oralt intag med α_{s1} -kasein trypsinhydrolysat (15 mg/kg) visat sig vara jämförbart med dagligt oralt intag av Selegiline Hydrochloride (0,5 mg/kg) när hundarnas ångestgrad bedömts med hjälp av EDED (Emotional Disorders Evaluation in Dogs) (Beata et al., 2007b). EDED är en bedömningskala där hundens ångestnivå bedöms utifrån födo- och vattenintagsbeteenden, sömn, komfortbeteende, undersökande, aggression, sociala beteenden och vissa specifika inlärdade beteenden, samt klinisk bedömning avseende bland annat diarré, kräkning, övervikt, polydypsi och polyuri. Selegiline Hydrochloride är registrerat för behandling av Parkinsons sjukdom, depression och senil demens hos människa men användes i detta försök på hund för sin ångestdämpande effekt.

LactiumTM

LactiumTM är Zylkenes[®] motsvarighet för människor som lider av stressrelaterade problem och det har gjorts flera studier på såväl effekt som bieffekt och toxikologi. Precis som hos Zylkene[®] är innehållet i LactiumTM polypeptider, oligopeptider och aminosyror som härstammar från bovint α_{s1} -kasein. Det minsta innehållet av den aktiva komponenten α_{s1} -CN-(f91-100) är 1,8 %. Bresson et al. (2000) visade att försökspersoner som intog 200 mg LactiumTM oralt och genomgick ST visade på mindre stresspåverkan i form av lägre systoliskt

och diastoliskt blodtryck. Vidare fick de lägre hjärtfrekvens under CPT och lägre blodtryck (dock ej signifikant), samt lägre kortisolnivåer genom både ST och CPT. ACTH (Adrenocorticotropic hormone) mättes även men skiljde sig inte mellan de olika grupperna. Bourdon et al. (2003) visade samma resultat gällande blodtryck hos försökspersoner som fick 150 mg LactiumTM varje kväll i en månad och som genomgick ST.

Toxicitet och bieffekter

Studier på råttor har visat att LD50 (Lethal Dose 50) för LactiumTM vid oral engångsdos är högre än 2000 mg/kg, vilket var högsta dosen som testades (Gomond et al., 2003), och vid upprepad oral dosering är NOAEL (No observed adverse effect level) 1000 mg/kg/dag, även detta högsta dos som testades (Dufour et al., 2003). Ingen gentoxicitet på cellkulturer sågs vid tillsats av LactiumTM 5000 ug/ml (Forichon et al., 2001). Författarna fann ingen utvecklingstoxicitet hos dräktiga råttor vid oral administration av 150 mg/kg LactiumTM per dag (Messaoudi et al., 2001) och inte heller någon teratogenicitet vid oral administration av 150 mg/kg LactiumTM per dag (Plenat 2001a; Plenat 2001b), dvs NOAEL för utvecklingstoxicitet bedömdes vara 150 mg/kg/dag. Råttor som fick 1 mg/kg α_{s1} -CN-(f91-100) *i.p.* visade inga tecken på beroende (Messaoudi et al., 1998a) och ingen tolerans utvecklades hos råttor som fick 12 mg/kg α_{s1} -CN-(f91-100) *i.p.* (Messaoudi et al., 1998b). Slutsatsen blir att LactiumTM visat sig vara väldigt säkert i de studier som gjorts och eftersom innehållet i LactiumTM är densamma som Zylkene[®] bör resultaten kunna extrapoleras från ovanstående studier på LactiumTM till Zylkene[®].

Fysiologi vid rädsla

Ett djur tar emot intryck från sin omgivning genom sinnen som t ex syn, hörsel och känsel och samlar all denna information i storhjärnan. Storhjärnan tar beslut om hur individen ska reagera och har nära kontakt med limbiska systemet och hypotalamus. I hypotalamus sker den huvudsakliga regleringen av det autonoma nervsystemet som består av det sympatiska nervsystemet och det parasympatiska nervsystemet. Det sympatiska nervsystemet aktiveras t.ex. vid rädsla, aggression, fysisk aktivitet och ger bland annat ökad hjärtfrekvens och blodtryck, medan det parasympatiska nervsystemet främst är aktivt vid vila och sänker hjärtfrekvensen men stimulerar digestionen. Hypotalamus nära kontakt med limbiska systemet och hjärnbarken gör att de autonoma funktionerna påverkas av tanke och känsla. Minnen från tidigare traumatiska händelser kan på nytt aktivera sympatiska nervsystemet vid samma eller liknande stimuli. Hypotalamus reglerar även hypofysen och dess effekt på kroppens inre organ, bland annat på binjurarna.

Vid sympatikuspåslag ökas aktiveringen av tyrosine hydroxylase i binjurmärgen som konverterar aminosyran tyrosin till dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) som är prekursor till adrenalin och noradrenalin. Adrenalin och noradrenalin är lika varandra sett till kemisk struktur och fysiologisk effekt. De binder till α - och β -adrenerga receptorer som är bundna till G-proteiner och ger intracellulära reaktioner på fosfolipas C, adenylyl cyclas eller olika jonkanaler. Produktionen av adrenalin i binjurarna är ofta betydligt högre än noradrenalin, men i plasma är den vilande koncentrationen av noradrenalin högre då det även är en

neurotransmittor i sympatiska postganglionära nervändar. Halveringstiden i plasma för katekolaminer är ca 10-15 sekunder. Små mängder adrenalin och noradrenalin utsöndras dock i urinen och urinutsöndringen används därför som ett indirekt mått på binjuremargens utsöndring.

Fight-or-flight responsen myntades av Walter Cannon (Cannon, 1929) och beskriver hur ett djur reagerar på en fysisk eller psykisk fara. Vid rädsla eller stress aktiveras mestadels det autonoma sympatiska nervsystemet som påverkar kroppens organ på ett sådant sätt så att kroppen är redo för att svara på den specifikt stressfyllda situationen. Katekolaminer aktiverar glukoneogenesen i levern och bryter ner glykogen, vilket ökar tillgängligt glukos i plasma. Även nedbrytningen av triglycerider i fettvävnaden ökar och ger ökad halt tillgängliga fettsyror. Katekolaminer ökar hjärtfrekvens, hjärtkontraktilitet och ger vasokonstriktion vilket ger ökat "cardiac output" och ökat blodtryck. Bronkiolerna dilateras vilket förbättrar syreupptaget och pupillerna dilateras. Hos vissa djurslag, t.ex. hund kontraheras mjälten och släpper ut lagrade röda blodkroppar i blodet (Reeve et al., 1953). Därmed ökar koncentrationen av syrebärande blodkroppar i blodet, samtidigt som blodet omdistribueras från inre organ till skelettmuskulatur. I hjärnstammen aktiveras adrenerga nervfibrer som ökar djurets medvetenhet och fokus. Alla nämnda reaktioner orsakas av sympatiska nervsystemets reaktion på rädsla/stress (fright) hos djuret och är till fördel för ett djur som måste hantera situationen genom att slåss (fight) eller fly från (flight) situationen.

Kortisol är ett av kroppens mest kända stresshormon och koncentrationen i plasma ökar ofta när ett djur utsätts för stress. Från hypotalamus frisätts ACTH-releasing hormone (även kallat Corticotropin-releasing hormone, CRH) som påverkar hypofysens framlob att frisätta ACTH. ACTH stimulerar i sin tur frisättning av kortisol från binjurebarken. Regleringsmekanismen för kortisol utövas genom negativ feedback mot hypotalamus och hypofysens framlob där ökade halter av kortisol inhiberar sekretion av både CRH och ACTH. Den normala frisättningen av ACTH hos hund, och därmed kortisol, följer en dygnsrytm där koncentrationen är högre på morgonen än på kvällen (Kolevská et al., 2003; Horváth et al., 2007). Kortisol tar längre tid att frisätta och längre tid att bryta ner än katekolaminer. I blodet transporteras kortisol bundet till Cortisol-binding globulin (även kallat transcortin, CBG) vilket ger kortisol betydligt längre halveringstid än det har i sin fria biologiskt aktiva form. Vid analys av kortisol analyseras antingen den totala kortisolkoncentrationen (bundet och fritt) eller endast den fria biologiskt aktiva formen.

Alla kärnförande celler i kroppen har receptorer där kortisol kan binda. Kortisol i fri form är fettlösligt och kan därför diffundera över cellmembran och binda till receptorer i cellens cytosol. Vid bindning av kortisol till nämnda receptorer transporteras komplexet till cellens kärna och utövar sin verkan genom att binda till DNA och aktivera eller inhibera vissa gener. Kortisol stimulerar glukoneogenesen och inhiberar upptag och användning av glukos i många av kroppens vävnader för att vävnader som i en stressorsakande situation är i större behov av rikliga mängder glukos, t.ex. hjärnan och skelettmuskulaturen, ska ha gott om tillgänglig energi. En hög koncentration av kortisol stimulerar nedbrytning av fett och proteiner och ökar

därmed koncentrationen av fettsyror och aminosyror i plasman. Fettsyror blir tillgängliga som energi i perifera vävnader medan glycerol och aminosyror kan äntra glukoneogenesisen.

Vid höga koncentrationer kortisol under en längre tid, t.ex. vid långvarig stress, kommer storleken av binjurebarken att öka och en höggradig frisättning av glukokortikoider bibehålls. Tillväxt hos det långvarigt stressade djuret inhiberas eftersom kortisol inhiberar DNA-syntes i flera vävnader och pga. dess katabola effekt hos protein. Kortisol verkar även immunhämmande vilket gör att ett långvarigt stressat djur är mer mottagligt för infektioner och andra sjukdomar.

Vid analys av kortisol i urin bör koncentrationen sättas i förhållande till kreatininkoncentrationen, för att djurets hydreringsgrad eller urinkoncentration inte ska inverka på resultatet och för att resultat från olika tillfällen och djur ska kunna jämföras med varandra.

Fysiologiska mätvärden

Att stress påverkar fysiologin hos hundar har visats i ett flertal studier. Hydbring-Sandberg et al. (2004) visade att skotträdda hundar som utsattes för skott hade högre hjärtfrekvens och hematokrit samt högre koncentration i plasma av kortisol, progesteron, vasopressin och β -endorfiner, jämfört med hundar som ej var rädda för skott. Att ökningarna i kortisol och hjärtfrekvens uppstår vid stress orsakad av ljud har även tidigare visats av Engeland et al (1990). Andra studier har också visat att hundar som utsattes för stressorsakande stimuli i form av ljud fick koncentrationsökningar av kortisol i saliv (Beerda et al., 1997; Beerda et al., 1998). I ett försök ökade halten av kortisol i saliven med i genomsnitt 207 % hos försökshundar som utsattes för inspelade ljud av åskoväder (Dreschel et al., 2005). Enligt Beaver (1999) stiger kortisol över 200 % och sjunker sedan långsamt vid stressorsakande ljud hos hundar. Kortisol har även använts vid bedömning av andra stresstillstånd hos hundar, t.ex. kronisk stress (Beerda et al., 1999) och stress orsakat av transport med flyg (Bergeron et al., 2002) och bil (Frank et al., 2006).

Vid stress, orsakat av t.ex. rädsla, aktiveras HPA-axeln (Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis) (Beaver, 1999; Beerda et al., 1997; Beerda et al., 1998; Beerda et al., 1999; Bergeron et al., 2002; Dreschel et al., 2005; Engeland et al., 1990; Frank et al., 2006; Hydbring-Sandberg et al., 2004) och SAM (Sympathetic Adreno Medullary System) (Engeland et al., 1990; Hydbring-Sandberg et al., 2004) i olika utsträckning hos olika individer. Aktivering av HPA leder bland annat till frisättning av kortisol medan SAM bland annat ökar blodtryck och hjärtfrekvens och leder till ökad frisättning av katekolaminerna adrenalin och noradrenalin. I vår studie valde vi att analysera kortisol i plasma och urin som ett mått på aktiveringen av HPA, och hematokrit som ett mått på aktiveringen av SAM.

Beteenden vid rädsla

Det finns flera beteenden som kan associeras med stress och rädsla hos hundar. I en studie visade hundar som blev stressade/rädda beteenden såsom flämtning, skakning, dilaterade

pupiller, ofrivillig urinering och defekering, salivering och destruktivitet (McCobb et al., 2001). Hundarna sprang runt frenetiskt och sökte djurägarkontakt genom att hoppa upp på, lägga upp tasserna på och följa efter hundägaren. Flera hundar gömde sig även (McCobb et al., 2001). Beerda et al. (1998) visade att ytterligare stress-associerade beteenden var ihopkrypning, nosning, tecken på rastlöshet, gäspning och orala beteenden såsom slickning runt munnen, utsträckning av tungan, sväljning och smackning. Stress har även visat sig hos hundar genom generaliserade muskelkontraktioner, piloerektion (Engeland et al., 1990) och vokalisering (Frank et al., 2006) såsom t ex gnällande (Dreschel et al., 2005) och skall (McCobb et al., 2001). Beaver (1999) skriver att 97 % av rädda hundar flämtar, skakar och rör sig rastlöst fram och tillbaka. 90 % stannar hos ägaren, 86 % gömmer sig, 72 % saliverar, 59 % visar destruktivitet och 55 % vokaliserar. Blackwell et al (2005) visade att 42% av de ljudrädda hundarna skakade, 37% skällde, 34% sökte människokontakt, 31% gömde sig och 17% flydde. Låg hållning hos stressade hundar ses som en intensiv och akut stressrespons enligt vissa författare (Beerda et al., 1997; Beerda et al., 1998).

Slutsatsen av redovisade siffror och beteenden blir att stressade hundar kan visa upp en mängd olika beteenden, vissa är vanligare än andra, men olika studier har gett skilda resultat både sett till specifika beteenden och omfattning av olika beteenden. Flera av nämnda beteenden är dessutom inte unika för stressade hundar, utan kan uppvisas hos ostressade individer. Det är därför viktigt att sätta fysiologimätningar (t.ex. kortisolhalt) i relation till olika typer av stressbeteenden vid bedömning av en hund med misstänkt stressproblematik, för att förvissa sig om att stress faktiskt föreligger hos djuret i fråga, och ej dra slutsatser baserat på endast en parameter, t.ex. beteenden som kan förekomma hos såväl stressade som lugna hundar (Beerda et al., 2000).

SYFTE

Detta examensarbete undersökte om behandling med Zylkene[®] hos hundar med skotträds-
gav förändringar i fysiologiska stressparametrar och beteenden. Kan fysiologiska och
beteendemässiga effekter påvisaas kan veterinärer i högre utsträckning rekommendera
Zylkene[®] vid t.ex. Nyårsafton, som alternativ till receptbelagda läkemedel vilka även för med
sig bieffekter. Vid en konstaterad positiv fysiologisk och beteendemässig effekt kan även
djurägare känna sig tryggare med att använda Zylkene[®] vid tillfällena då deras sällskapsdjur
känner stress och oro.

Följande frågeställningar undersöktes i studien:

1. Ger behandling med Zylkene[®] skillnader i beteende jämfört med behandling med Placebo hos skotträdda hundar som utsätts för skott, och kan denna skillnad antas bero på minskad stress hos djuret?
2. Ger behandling med Zylkene[®] skillnader i fysiologi jämfört med behandling med Placebo hos skotträdda hundar som utsätts för skott, och kan denna skillnad antas bero på minskad stress hos djuret?
3. Kan en potentiell skillnad i beteende sättas i relation till en potentiell skillnad i fysiologi avseende en bedömning om djurets stressnivå och en eventuell skillnad i denna beroende på om djuret behandlats med Zylkene[®] eller Placebo?

MATERIAL OCH METODER

Tillstånd

Till studien har *Djurförsöksetisk ansökan* från Uppsala djurförsöksetiska nämnd (diarienummer C 122/12 och C 123/10) beviljats. Även tillstånd för *Dispens från krav på destinationsuppfödning* har beviljats från Jordbruksverket (diarienummer 31-5396/12 och 31-3616/10). Vi har även sökt och fått Svenska Collieklubbens stöd bakom studien. Efter kontakt med Merck bestämdes att inget avtal gällande studien behövde upprättas mellan SLU och Merck eftersom Merck inte bidrog till studien ekonomiskt. Ultuna Skytteförening gav sitt tillstånd för att försöken genomfördes på Ultuna Skyttebana. Respektive djurägare skrev innan försöket på en djurägarförsäkran att de frivilligt deltog i studien och hade rätten att avbryta sitt och sin hunds deltagande när som helst under studiens gång.

Hundar

Till studien söktes 10 friska intakta hanhundar av rasen långhårig collie som var 2-6 år och på MH-test (Mentalbeskrivning Hund) ansetts vara skottberörda och/eller ansågs vara skottberörda av sina ägare. Orsaken till att vi endast valde att ha med en ras och endast hanhundar var att det föreligger stora basala ras- och könsskillnader i fysiologi och beteende och att vi därför ville ha en så homogen hundgrupp som möjligt. En konsekvens av detta val är dock att man genom denna studie inte kan dra några slutsatser om den möjliga effekten hos andra raser. Potentiella hundar söktes med hjälp av Svenska Colliklubben, SKKs (Svenska Kennel Klubbens) register Hunddata samt via UDSs register. Endast 2 djurägare med hundar med rätt specifikationer var intresserade av att delta i studien. Denna studie får därför ses som en pilotstudie av preparates effekt. De deltagande hundarna var 4,5-6 år gamla och vägde 27,5-28,0 kg.

Hund A

Hund A var en intakt hane av rasen Collie som var 4,5 år gammal, vägde 27,5 kg och var frisk i övrigt. Han fick inga mediciner eller kosttillskott. Djurägaren bedömde att han hade varit skottträdd i ca 3 år. Hans rädsla uppkom efter att han som unghund fick en raket skjuten mot sig som small av bara någon meter ifrån honom. Detta skedde på en dag då raketer normalt inte avfyras och det var mitt på dagen. Hans ljudrädsla yttrar sig vid skott och när han hör melodin från glassbilen. Befinner hunden sig inomhus så hanterar han sin rädsla relativt bra. Djurägaren kan ibland bryta rädslan med godis och lek, men ibland inte. Hur lång tid hunden är rädd är väldigt olika. Oftast kort tid men om smällandet håller på en längre tid, så fortsätter rädlereaktionen hos hunden. Beteenden som hunden uppvisar är skakning, salivation, hässjning, flykt och kontaktsökande hos djurägaren. Eftersom reaktionerna är hanterbara inomhus har djurägaren valt att inte behandla hundens rädsla med t.ex. receptbelagda mediciner, receptfria produkter eller beteendeterapi.

Hund B

Hund B var en intakt hane av rasen Collie som var 6 år gammal, vägde 28 kg och var frisk i övrigt. Han fick inga mediciner eller kosttillskott. Djurägaren bedömde att han hade varit skotträdd i ca 4,5 år. Hans rädsla uppkom efter att han utsatts för upprepade smällar från en dörr när familjen befann sig på en camping. Hans ljudrädsla yttrar sig vid nyårsafton, åska och vid militära skjutövningar som utförs i området där djurägaren bor. Djurägaren kan inte bryta rädslan omedelbart med godis och lek och hur lång tid det tar innan hunden slutar vara rädd är väldigt varierat. Beteenden som hunden uppvisar är skakning, flykt och kontaktsökande hos djurägaren. Djurägaren har inte behandlat hundens rädsla med t.ex. receptbelagda mediciner, receptfria produkter eller beteendeterapi. Djurägaren berättade att pga. hundens ljudrädsla så stannar familjen hemma på nyårsafton för hundens skull. Med högt ljud på tv och radio tar de sig igenom kvällen och natten.

Försökspreparat

Varje hund genomgick två försök, ett försök under behandling med Zylkene[®] och ett försök under behandling med Placebo. Placebo bestod av ordinarie Zylkene[®]-kapslar där det verksamma ämnet tömmts ut och ersatts med Maltodextrin. Vilken hund som började med vilket försök randomiserades av en utomstående person så varken djurägare, försökspersonal eller labbpersonal kände till vilken hund som fått vilken behandling under de olika försöken och analyserna (s.k. trippel blint försök). När alla försök var gjorda och all databearbetning var klar bröts kodlistan.

Efter kontakt med Merck rekommenderade företaget att 1-2 timmar innan förväntad händelse administreras 1 kapsel 450 mg Zylkene[®] oralt till en hund som väger 20-30 kg. Merck ansåg även att det kan vara en fördel att ge samma dos kvällen innan förväntad händelse. Djurägaren instruerades därför skriftligen att kvällen innan försöksdagen ge 1 kapsel 450 mg Zylkene[®] oralt klockan 20:00, samt 1 kapsel 450 mg Zylkene[®] oralt klockan 07:00 på försöksdagen. Under försök med placebo gavs samma dosering, men med kapslar innehållandes Maltodextrin.

Försöksdagen

Djurägaren ombesörjde transport av sig och sin hund till UDS, Uppsala, där hund och djurägare togs in i ett undersökningsrum direkt från parkeringen för att slippa stresspåverkan från väntrummet. Hunden rakades på ett av frambenen och EMLA-krem ströks på och tilläts verka i 60 min. En legitimerad veterinär gjorde en klinisk undersökning av hunden för att säkerhetsställa att hunden var klinisk frisk och att det inte förelåg en fara för hunden att delta i försöket. Djurägaren fyllde i en enkät för att beskriva sin hunds rädsla samt om djurägaren hade försökt behandla rädslan på något sätt och om detta hade haft effekt. En timme efter applicering av EMLA-krem tvättade och anlade en legitimerad djursjukvårdare en permanentkanyl i *vena cephalica* på det tidigare rakade benet. Permanentkanylen fästes med tejp och skyddades med Vetrap (3 M Animal Care Products, St Paul, MN, USA).

Djurägare, hund och försökspersonal (3 personer) promenerade ca 600 m till Ultuna Skjutbana där hunden fick lugna ner sig och acklimatisera sig till omgivningen, ca 15 min innan första blodprovet togs. Försökspersonalen var densamma under samtliga försöksdagar. Hunden bar en sele som fästes i en långlina (15 m) för att hunden skulle kunna röra sig fritt utan risk att fly från platsen. Ett skott (Knall S K .380) avfyrades med signalpistol utom synhåll och 50 m från hunden. Djurägaren ombads att endast finnas där som mentalt stöd och inte interagera med hunden på något sätt.

Provtagning

Blodprov

Blodprov #1 togs 30 min efter att permanentkanylen applicerats. Blodprov togs genom att frambenet stasades, 0,5 ml NaCl (Natriumklorid) spolades in i permanentkanylen för att lösa eventuella koagel och 1 ml blod aspirerades ur samma spruta och kastades. Med hjälp av en ny spruta aspirerades 4 ml blod som överfördes till blodprovsvrör med tillsatt EDTA (etylendiamintetraättiksyra). Blodprovsvrören sattes omedelbart på is i en kylväska för att förhindra nedbrytning av substanser i provet. Blodprov #2 togs 45 min efter att permanentkanyl applicerats. Skott avfyrades 10 min senare och blodprov #3, #4, #5, #6, #7, #8 och #9 togs 5, 15, 30, 45, 60, 90 respektive 120 min efter att skott avfyrats.

Vid blodprovstagning i försök 2 hos Hund A upplevdes blodet tjockt och det var svårt att aspirera blod ur permanentkanylen, och även att föra över det till blodprovsvrör. Vid blodprov #3 krävdes flera omspolningar, med tillhörande slask, för att få ut tillräcklig blodmängd. Vid blodprov #4 var det ännu svårare att få ut tillräcklig blodmängd. Det gick bra att spola kanylen med NaCl och inga tecken på att kanylen skulle sitta extravasalt sågs. Vid blodprov #5 erhöles endast 1 ml blod och trots spolning och multipla försök gick det ej att få ut mer blod. Tejpen runt kanylen klipptes bort för att säkerhetsställa att denna ej satt för hårt och strypte blodtillförseln. Det gick fortfarande bra att spola, men inget återflöde uppstod. Kanylen avlägsnades och en ny permanentkanyl applicerades i *vena cephalica* på hundens andra framben. Kanylen låg uppenbart i och spolning med NaCl gick utan problem, men inget återflöde erhöles. Det beslutades att inte utsätta hunden för ytterligare en kanylsättning eftersom chansen att fler blodprov skulle kunna fås var liten.

De samlade blodproverna analyserades direkt efter försökets slut avseende hematokrit genom centrifugering av kapillärrör i 6000 x g i 1 min med okulär avläsning. Hos Hund A visade prov #7 och #9 i försök 1, samt prov #2 och #5 i försök 2, tecken på koagulering. Hos Hund B visade prov #4, #5 och #6 i försök 2 tecken på koagulering. Provsvaren avseende hematokrit i dessa prov bör därför ses som falskt låga.

Återstående mängd av blodproverna kylcentrifugerades vid 4° C i 1500 x g i 20 min, plasma pipetterades och överfördes till nya provrör som därefter lagrades i -70° C tills en erfaren biomedicinsk analytiker analyserade proverna avseende kortisol. Plasman från samtliga prover visade tecken på hemolys, men detta ska inte påverka kortisolresultaten enligt vår ansvarige biomedicinska analytiker.

Plasmakortisol (fri form) analyserades genom Cortisol ELISA (IBL GESELLSCHAFT FUR IMMUNCHEMIE UND IMMUNBIOLOGIE MBH, Flughafenstrasse 52a, D.22335 Hamburg, Germany, Ref RE52061), med en lägsta känslighet för kortisol på 11,55 nmol/l. Produkten är avsedd för analys av humant kortisol men är validerad för plasmakortisol hos hund (recovery 124,4% - 2012-02-20). Resultatvariationen inom en analysplatta (Intra Assay) var <10 % mellan 29,2 – 1011 nmol/l. 20 µL av standard, kontroll och plasma tillsattes till analysplattans brunnar (2 brunnar per prov). 200 µl enzymkonjugat tillsattes till respektive brunn och lösningarna blandades genom att plattan stöttes till på varje sida. De enzymkopplade antigenen i enzymkonjugaten och det fria kortisolet i den tillsatta plasman konkurrerar nu om bindning till kortisol-antikropparna i botten av brunnarna. Plattan inkuberades i rumstemperatur i 60 min och brunnarna maskintvättades sedan med destillerat vatten (3 gånger) och tömdes sedan på lösning. 100 µl TMB-lösning tillsattes till respektive brunn och plattan inkuberades i rumstemperatur i 15 min. Reaktionen stoppades genom tillsats av 100 µL TMB-stopp-lösning till respektive brunn och den optiska densiteten avlästes vid 450 nm.

Urinprov

På kvällen (20:00) innan försöksdagen och morgonen (07:00) på försöksdagen tog djurägaren ett spontankastat urinprov (uppsamlat med plastkärl när hunden kissade frivilligt) från kvällsrastningen respektive morgonrastningen från sin hund inför varje försök, enligt skriftliga instruktioner. Djurägaren ombads förvara proverna i kylan efter att provmängden överförts till smårör. På väg till UDS på försöksdagen förvarades provrören i ett skyddande plasthölje för att behålla kylan. Vid ankomst förvarades provrören i kylskåp till dess att hund, djurägare och försökspersonal lämnade undersökningsrummet. Provrören överfördes då till kylväska med is. Efter kanylapplicering och veterinärundersökning togs nästa urinprov på vägen till skyttebanan. Provrören lades direkt på is i kylväskan. Efter försökets slut togs ytterligare ett urinprov enligt samma provhantering. Urinproven förvarades sedan i -70° C till dess att de analyserades av en erfaren biomedicinsk analytiker avseende kortisol/kreatininkvot.

Urinkreatinin analyserades genom Colorimetric Detection Kit (Enzo Life Sciences Inc. 10 Executive Blvd, Farmingdale, NY 11735, Cat no. 907-030), med en lägsta känslighet för kreatinin på 12,72 µmol/l. Metoden är sedan tidigare validerad för analys av hundurin avseende kreatinin. Urinproverna centrifugerades i 5 min i 4300 x g och späddes sedan 20 gånger genom att tillsätta 20µl urinprov till 380 µl destillerat vatten. 50 µl från varje spädning pipetterades till respektive brunn på analysplattan. 100 µl kreatinin-detektionsreagent tillsattes till respektive brunn. Analysplattan stöttes till på varje sida för att lösningarna ska blanda sig ordentligt. Analysplattan inkuberades sedan i rumstemperatur i 30 min och därefter lästes den optiska densiteten av vid 490 nm.

Urinkortisol (fri form) analyserades genom Cortisol (Urine) ELISA (IBL GESELLSCHAFT FUR IMMUNCHEMIE UND IMMUNBIOLOGIE MBH, Flughafenstrasse 52a, D.22335 Hamburg, Germany, Ref RE52241), med en lägsta känslighet för kortisol på 0,34 nmol/l.

Produkten är avsedd för analys av humant urinkortisol men är tidigare validerad för urinkortisol hos hund. Variationen för analys inom en analysplatta (Intra Assay) var <10 % CV 0,69-110 nmol/l med en Recovery på 93,0 %. Respektive urinprov centrifugerades i 5 min i 4300 x g och späddes sedan 4 gånger genom tillsats av 50 µl urinprov till 150 µl destillerat vatten. 100 µl urinprovslösning blandas med 100 µl inkubationsbuffert och 10 µl av respektive blandning samt 300 µl utspätt enzymkonjugat tillsattes i respektive 2 brunnar per urinprov. 10 µl av standardlösningar (S0-S4) samt 300 µl utspätt enzymkonjugat tillsattes i sina utmärkta brunnar (2 brunnar per standardlösning). En brunn lämnades tom som kontroll. Lösningarna i brunnarna blandades noga och plattan inkuberades i 60 min i 37° C. Det fria kortisolet i urinprovslösningen konkurrerar nu med det enzymbundna kortisolet i enzymkonjugatet avseende bindning till kortisolantikropparna i analysplattans brunnar. Överbliven lösning och enzymkonjugat avlägsnades genom automatisk maskintvätt (3 gånger) med destillerat vatten. Vid sista tvättens avslut suges brunnarna torra och till brunnarnas botten är nu urinkortisol och enzymbundet kortisol inbundet. 100 µl TMB-substrat tillsattes till varje brunn vilket ger infärgning av det enzymbundna antigenet. Plattan inkuberas i 15 min i rumstempuratur och reaktionen avbryts sedan genom att tillsätta 100 µl stopp-lösning. Den optiska densiteten avlästes vid 450 nm.

Beteendeanalys

Beteendeobservation påbörjades ca 45 min efter att permanentkanyl satts och hunden hade lämnat djursjukhuset. Totalt 16 förutvalda och definierade beteenden inom 4 huvudsakliga kategorier registrerades på hundarna från 10 min innan skott till 120 min efter skott. Momentana registreringar gjordes av nio beteenden (Tabell 1) utfördes eller inte med 1 minuters intervall från 10 min före till 30 min efter skott, och därefter var 5:e min upp till 120 min efter skott. Frekvens per minut registrerades för sju beteenden (Tabell 2) från 10 min före till 30 min efter skott, varefter frekvens per minut registrerades var 5:e min (35-36 min, 40-41 min etc.) upp till 120 min efter skott. Försöket filmades av försökspersonal för att i efterhand kontrollera att inga beteendenoteringar missats.

Eftersom blodprovstagningen för försök 2 för Hund A avbröts efter prov #5, avbröts även beteendeobservationerna eftersom det inte längre var möjligt att sätta beteende i relation till fysiologi.

Tabell 1. Beteendeen och deras definitioner vid momentan registrering i 1 eller 5 minuters intervall

Beteende	Definition
<u>Kroppsposition</u>	
Ligger ner	Hunden ligger ned på bröst eller sida med alla fyra benen under sig eller utslagna bakåt, framåt eller åt sidan. Huvudets position spelar ingen roll.
Står upprätt	Hunden står upp i en position med alla fyra tassar i marken, ingen del av undersidan (bröst, buk, könsorgan) nuddar marken
Sitter	Hunden sitter ned med upprättade framben och tassar i marken och med bakdel och bakben i marken.

Går omkring	Hunden rör sig framåt eller åt sidan i skritt med alla fyra tassar i marken, ingen del av undersidan (bröst, buk, könsorgan) nuddar marken.
Flyr	Hunden skrittat eller travar bort från djurägare tills dess att långlinan är helt utlöpt och hunden inte kan ta sig vidare bortåt. Hunden försöker ändå ta sig längre bort trots att det tar stopp, genom att dra i långlinan (antingen framåt eller åt sidorna).
<u>Svansposition</u>	
Mellan benen	Hundens svans befinner sig mellan hundens bakben när den ligger, sitter eller står.
Hängande	Hundens svans hänger nedåt med svanstippen riktad ut från bakdelen och hålls stilla, när hunden ligger, sitter eller står.
Viftandes	Hundens svans hålls en bit utanför kroppen och viftar från vänster till höger, höger till vänster eller både och, när hunden står.
<u>Övrigt</u>	
Hässjar	Hundens mun är öppen, tungan är ute och hunden andas snabbt genom att flämta/flåsa.
Skakar	Hunden har multipla varaktiga muskelkontraktioner vilket gör att hunden skakar/darrar.

Tabell 2. Beteenden och deras definitioner vid frekvensregistrering inom 1 minut i 1 eller 5 minuters intervall

Beteende	Definition
<u>Ägarkontakt</u>	
Nosar på	Hunden går till, springer till eller befinner sig hos sin ägare och låter nosen ta kontakt med dennes kropp.
Lägger tassens på	Hunden går till, springer till eller befinner sig hos sin ägare och lägger upp en framtass på dennes kropp.
Hoppar upp med framben	Hunden går till, springer till eller befinner sig hos sin ägare och lägger upp båda framtassarna på dennes kropp och har därmed bara baktassarna i marken.
Hoppar upp i knät	Hunden går till, springer till eller befinner sig hos sin ägare och försöker ta sig upp i dennes knä genom att klättra upp med fram och bakben så att hela hunden befinner sig i djurägarens knä.
<u>Vokalisering</u>	
Skäller	Hunden vokaliserar genom att ge ifrån sig ett högt läte.
Gnyr	Hunden vokaliserar genom att ge ifrån sig multipla svaga högtoniga läten.
<u>Övrigt</u>	
Slickar	Hunden slickar sig om munnen, läpparna eller nosen med hjälp av tungan

Databearbetning

Beteende

För beteendeanalysen delades försöksperioden upp i 10 min innan skott fram till 0 min (skott) (period 1), 1 min efter skott till 15 min efter skott (period 2), 16 min efter skott till 60 min efter skott (period 3) och 61 min efter skott till 120 min efter skott (period 4). Data från momentanregistreringarna räknades om i procentuell andel av totalantal registreringar för respektive period, medan det för frekvensregistreringarna räknades om till medelvärde per registrering för respektive period. För frekvensregistreringarna räknades ytterligare en period ut som innefattar beteende från 1 min till 120 min efter skott. Frekvensregistrering avseende kontaktsökande och vokalisering för period 3 och period 4 gav ingen nämnvärd data och redovisas därmed ej. Försökshundarnas svansposition förändrades inte nämnvärt mellan de olika försöken och därför stryks den parametern och inga resultat redovisas.

RESULTAT

Kodlista

Kodlistan bröts när alla försök och analyser var gjorda. Hund A behandlades med Zylkene® i försök 1 (Z1) och med Placebo i försök 2 (P2). Hund B behandlades med Placebo i försök 1 (P1) och med Zylkene® i försök 2 (Z2).

Djurägarens bedömning

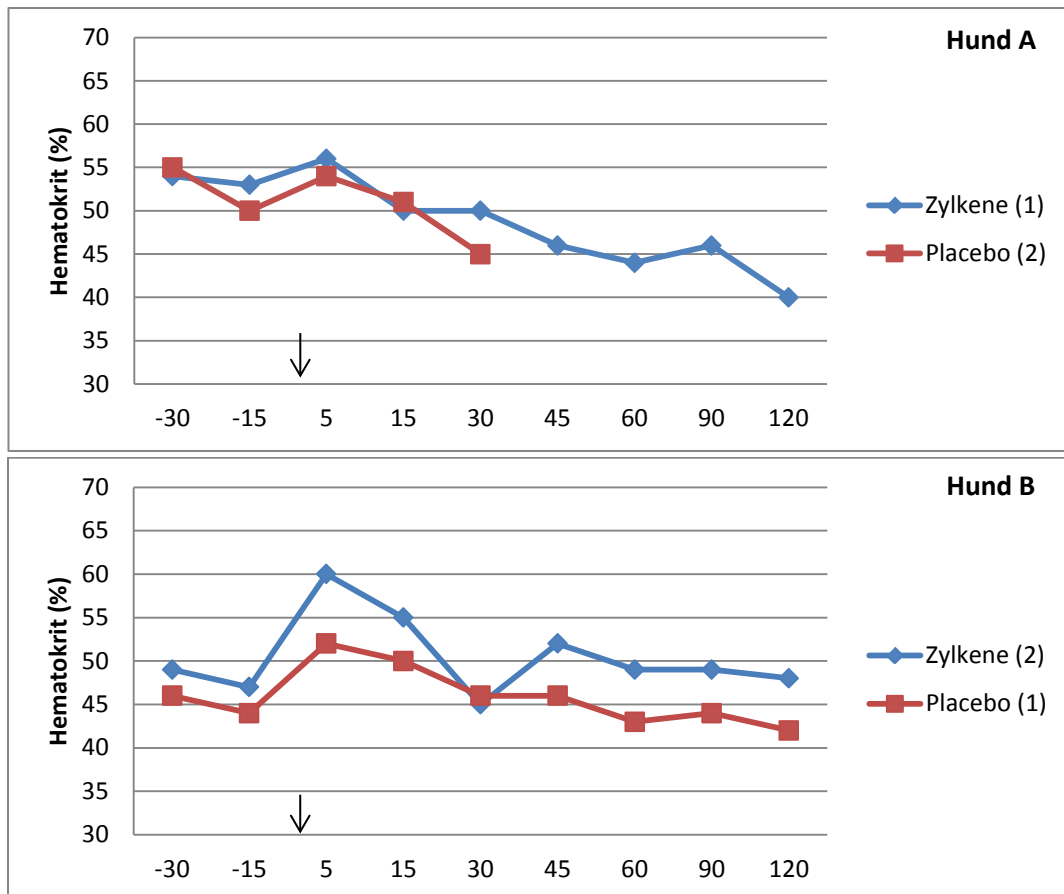
Djurägare till Hund A bedömde att dennes hund var mindre påverkad i Z1 än i P2 och gissade därför att hunden blivit behandlad med Zylkene® i Z1 och med Placebo i P2.

Djurägare till Hund B bedömde att dennes hund var mindre påverkad i P1 än i Z2 och gissade därför att hunden blivit behandlad med Zylkene® i P1 och med Placebo i Z2.

Hematokrit

En hög hematokrit sågs hos Hund A i båda försöken vid prov #1 (-30 min) och det sjönk vid prov #2 (-15 min) och ökade vid prov #3 (5 min) (Figur 1). Hematokriten sjönk sedan stadigt sakta fram till prov #9 (120 min) i Z1 och fram till prov #5 (30 min) i P2 (Figur 1). Eftersom P2 avbröts efter blodprov #5 (30 min) finns inga fler analyserade värden därefter. Z1 hade något högre högsta värde efter skott än P2 (Figur 1). Den procentuella ökningen i provet strax innan skott (prov #2) till provet strax efter skott (prov #3) var högre i P2 än i Z1 (Figur 1).

Hematokriten hos Hund B var något högre vid prov #1 (-30 min) än vid prov #2 (-15 min) och ökade kraftigt vid prov #3 (5 min) i båda försöken (Figur 1). Hematokriten sjönk sedan stadigt sakta fram till prov #9 (120 min) i båda försöken, men var fortfarande högre i Z2 än P1. Hematokriten för Z2, jämfört med P1, var högre genom hela försöket (Figur 1). Den procentuella ökningen i provet strax innan skott (prov #2) till provet strax efter skott (prov #3) var högre i Z2 än i P1 (Figur 1).

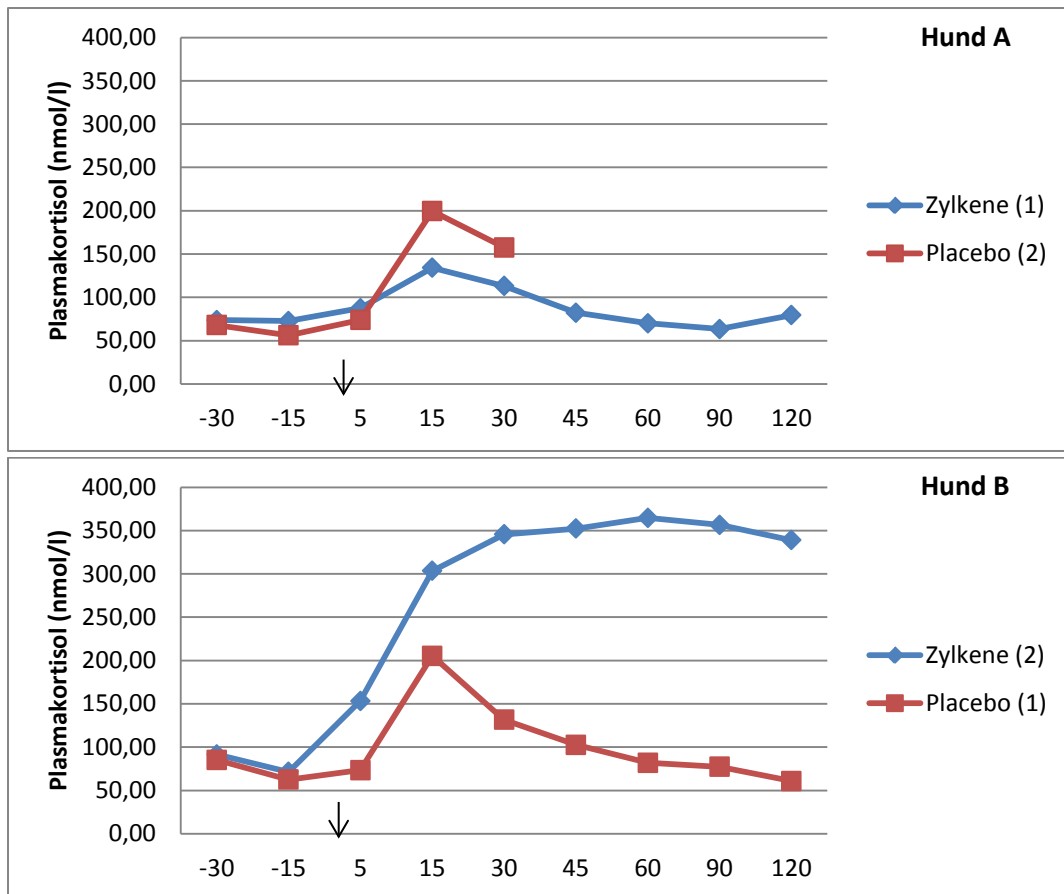


Figur 1. Hematokrit (%) hos Hund A i Z1 och P2 och Hund B i Z2 och P1, vid 30 min innan skott till 120 min efter skott. X-axeln visar tid innan och efter skott där pilen markerar skott (0 min). Koagulation sågs i blodprov #7 (60 min) och #9 (120 min) i Z1 och #2 (-15 min) och #5 (30 min) i P2 hos Hund A och blodprov #4 (15 min), #5 (30 min) och #6 (45 min) i Z2 hos Hund B. Alla prover visade tecken på hemolys.

Kortisol i plasma

Koncentrationen kortisol i plasma (fri form, nmol/l) hos Hund A var något lägre i prov #1 (-30 min), #2 (-15 min) och #3 (5 min) i P2 jämfört med Z1 (Figur 2). Koncentrationen ökade kraftigt i båda försöken vid prov #4 (15 min) och sjönk sedan stadigt (Figur 2). Ökningen i prov #4 (15 min) var högre i P2 jämfört med Z1 (Figur 2). Eftersom P2 avbröts efter blodprov #5 (30 min) finns inga fler analyserade värden därefter.

Koncentrationen kortisol i plasma (fri form, nmol/l) hos Hund B var något lägre i prov #1 (-30 min) och #2 (-15 min) i P1 jämfört med Z2 (Figur 2). Koncentrationen ökade kraftigt i Z2 vid prov #3 (5 min) och ytterligare en kraftig ökning sågs i prov #4 (15 min) (Figur 2). En lindrigare ökning sågs från prov #4 (15 min) till #5 (30 min) och den förhöjda koncentrationen i Z2 höll sig sedan stabilt kraftigt förhöjd fram till sista provtagningen (prov #9 – 120 min) (Figur 2). I P1 sågs en lindrig ökning från prov #2 (-15 min) till #3 (5 min), en kraftigare ökning till prov #4 (15 min) och sedan en stabil långsam sänkning av koncentrationen till prov #9 (120 min) (Figur 2).

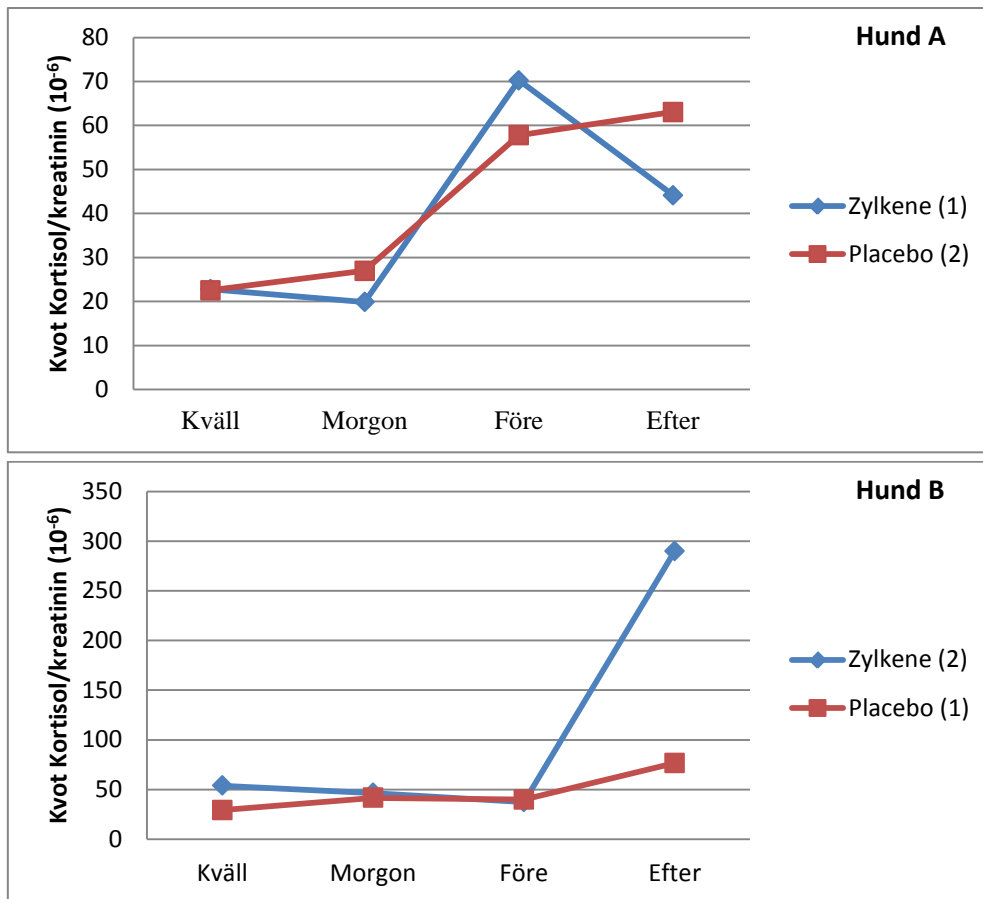


Figur 2. Kortisol (nmol/l) i plasma hos Hund A i Z1 och P2 och Hund B i Z2 och P1, vid 30 min innan skott till 120 min efter skott. X-axeln visar tid innan och efter skott där pilen markerar skott (0 min).

Kortisol i urin

Urinkortisol/kreatininkvoten (10^{-6}) hos Hund A var på kvällen (20:00) innan försöksdagen för båda försöken låga och jämnliska (Figur 3). På morgonen (07:00) av försöksdagen var kvoten vid P2 högre än vid Z1 (Figur 3). Urinprovet som togs strax efter veterinärundersökning och kanylapplicering, och ca 1 timme före skott, hade kraftigt förhöjd kvot för båda försöken jämfört med hemmaproven (Figur 3). Urinprovet som togs strax efter att sista blodprovet tagits och beteendenoteringarna avslutats visade på kraftigt förhöjda kortisol/kreatininkvoter i båda försöken (Figur 3). Kvoten var högre vid P2 än vid Z1 (Figur 3).

Urinkortisol/kreatininkvot (10^{-6}) hos Hund B var på kvällen (20:00) innan försöksdagen, morgonen (07:00) på försöksdagen och strax efter veterinärundersökning och kanylapplicering (ca 1 timme innan avfyring av skott) låga och jämnliska mellan de båda försöken (Figur 3). Urinprovet som togs strax efter att sista blodprovet tagits och beteendenoteringarna avslutats visade på kraftigt förhöjd kortisol/kreatininkvot vid Z2 och lindrigt förhöjd kvot vid P1 (Figur 3).



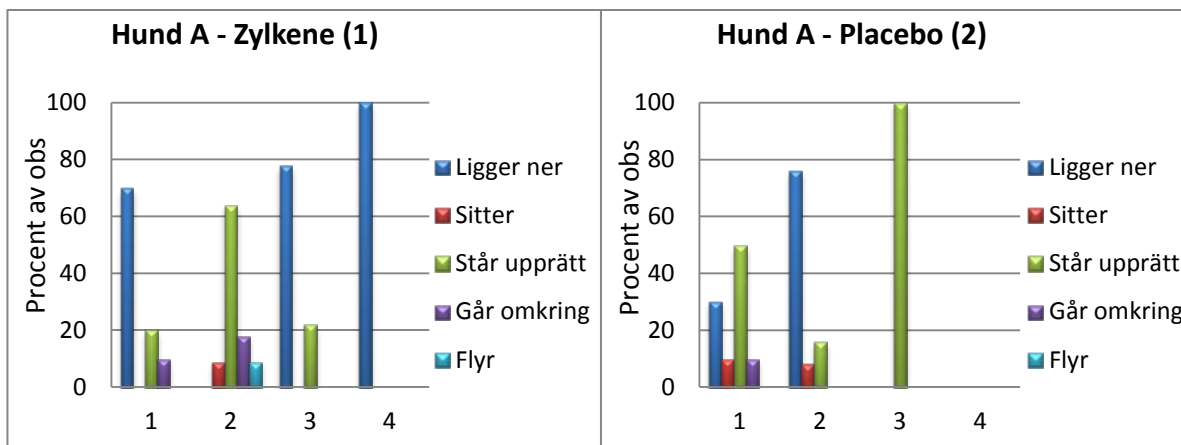
Figur 3. Kortisol/kreatininkvot (10^{-6}) hos Hund A i Z1 och P2 och Hund B i Z2 och P1, 20:00 kvällen innan försöksdagen (Kväll), 07:00 på försöksdagen (Morgon), på vägen till försöksområdet efter kanylsättning (Före) och 120 min efter skott i slutet av försöket (Efter).

Beteende

Momentanregistreringar.

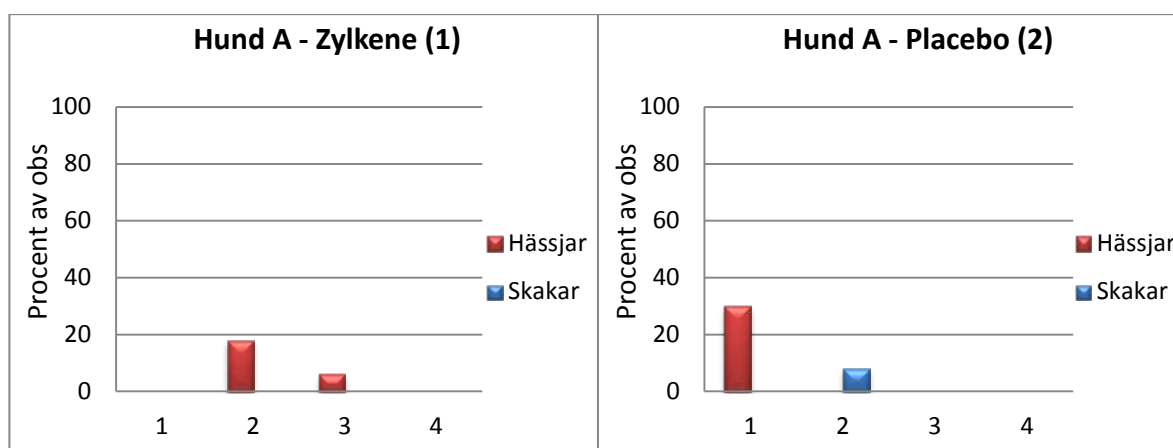
Hund A

I Z1 period 1 låg Hund A ner majoriteten av registreringarna (70 %) medan den i perioden efter skott (period 2) hade en stående position i majoriteten av registreringarna (Figur 4.1). I period 2 registrerades även gående, flykt och sittande position (Figur 4.1). I period 3 låg hunden främst ner och i period 4 låg den ner i 100 % av registreringarna (Figur 4.1). I P2 period 1 stod hunden upp i majoriteten av registreringarna, medan den i perioden efter skott (period 2) låg ner i majoriteten av registreringarna (Figur 4.1). I period 2 registrerades även stående position och sittande position och i period 3 stod hunden upp i 100 % av registreringarna (Figur 4.1).



Figur 4.1. Momentanregistreringar gällande position (%) hos Hund A i perioderna -10-0 min (1), 1-15 min (2), 16-60 min (3) och 61-120 min (4), vid behandling med Zylkene (försök 1) eller Placebo (försök 2). Försök 2 avbröts 30 min efter skott och således finns inga analyserade beteendedata för period 4 i detta försök.

I Z1 hässjade hund A i 18 % av registreringarna i period 2 och 9 % av registreringarna i period 3 (Figur 4.2). I P2 hässjade hunden i 30 % av registreringarna i period 1 och skakade i 8 % av registreringarna i period 2 (Figur 4.2).

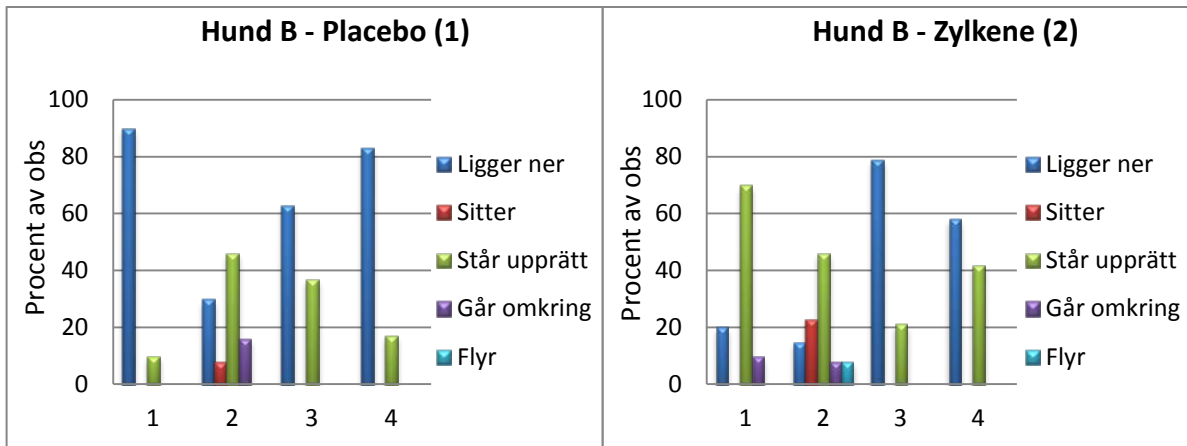


Figur 4.2. Momentanregistreringar gällande övrigt (håssjar och skakar) (%) hos Hund A i perioderna -10-0 min (1), 1-15 min (2), 16-60 min (3) och 61-120 min (4), vid behandling med Zylkene (försök 1) eller Placebo (försök 2). Försök 2 avbröts 30 min efter skott och således finns inga analyserade beteendedata för period 4 i detta försök.

Hund B

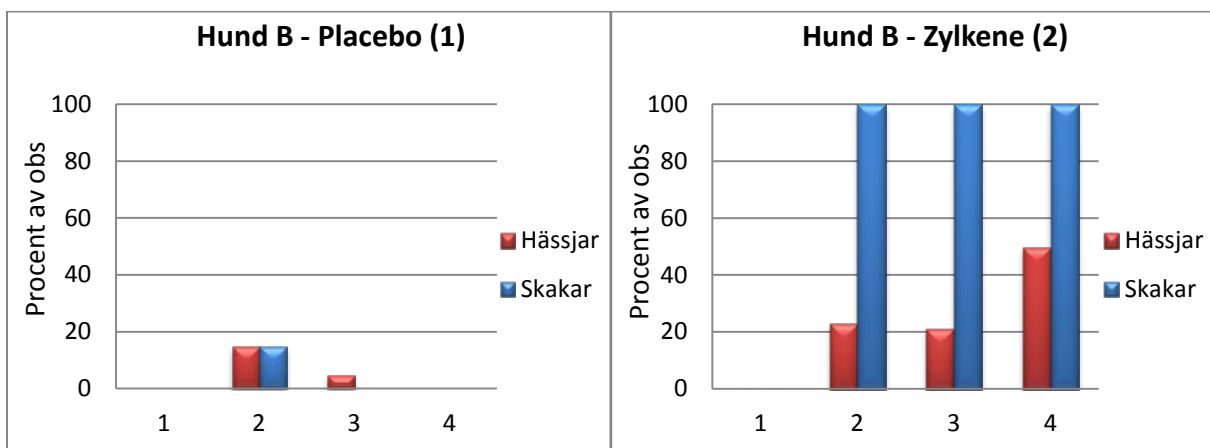
I P1 period 1 låg Hund B ner majoriteten av registreringarna medan den i perioden efter skott (period 2) hade en stående position i majoriteten av registreringarna (Figur 5.2). I period 2 registrerades även liggande position, gående och sittande position (Figur 5.2). I period 3 och period 4 låg hunden främst ner (Figur 5.2). I Z2 period 1 stod hunden upp i majoriteten av registreringarna och i perioden efter skott (period 2) fortsatte hunden stå i majoriteten av registreringarna (Figur 5.2). I period 2 registrerades även sittande position, liggande position

och flykt (Figur 5.2). I period 3 och period 4 låg hunden ner i majoriteten av registreringarna (Figur 5.2).



Figur 5.1. Momentanregistreringar gällande position (%) hos Hund B i perioderna -10-0 min (1), 1-15 min (2), 16-60 min (3) och 61-120 min (4), vid behandling med Zylkene (försök 2) eller Placebo (försök 1).

I P1 hässjade Hund B i 15 %, och skakade i 15 %, av registreringarna i perioden efter skott (period 2) (Figur 5.2). I period 3 hässjade hunden i 5 % av registreringarna (Figur 5.2). I Z2 hässjade hunden i 23 % av registreringarna i period efter skott (period 2), 21 % av registreringarna i period 3 och 50 % av registreringarna i period 4 (Figur 5.2). Hunden skakade i 100 % av registreringarna efter skott (period 2, 3 och 4) (Figur 5.2).



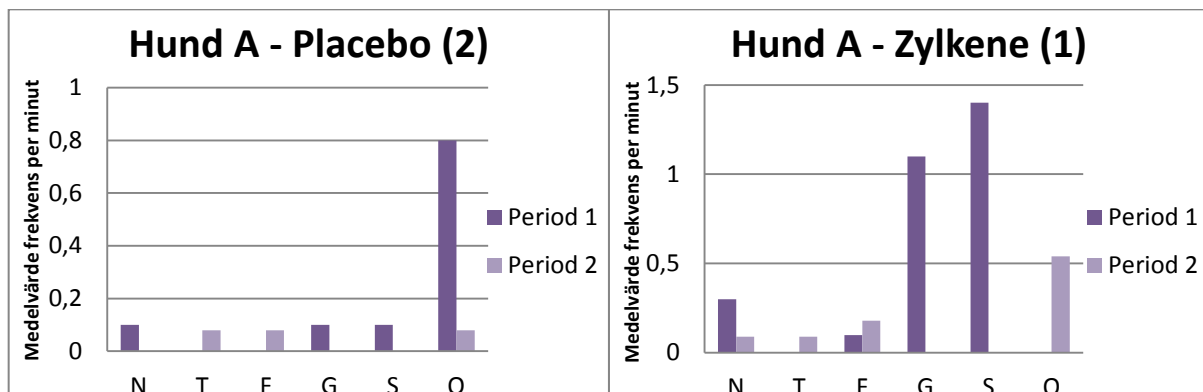
Figur 5.2. Momentanregistreringar gällande övrigt (hässjar och skakar) (%) hos Hund B i perioderna -10-0 min (1), 1-15 min (2), 16-60 min (3) och 61-120 min (4), vid behandling med Zylkene (försök 2) eller Placebo (försök 1).

Frekvensregistreringar

Hund A

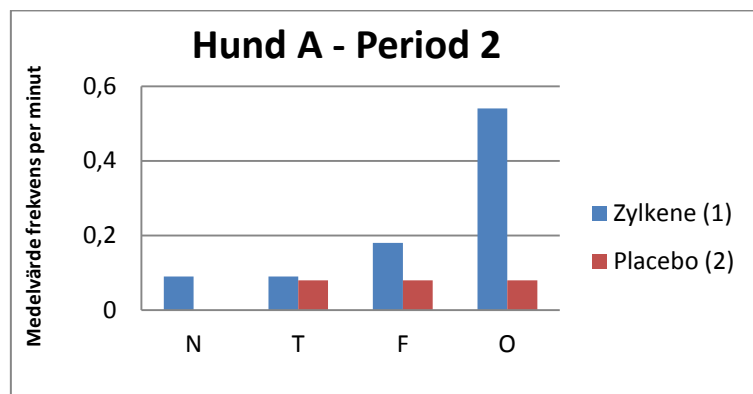
I perioden efter skott (1-15 min) i Z1, jämfört med perioden innan skott (-10-0 min), registrerades en minskad frekvens av skall och kontaktsökande genom nosning men en ökning av upphopp och tasspåläggning, samt en ökning av oralt beteende i form av slickning (Figur

6.1). I en liknande jämförelse i P2 registrerades en utebliven frekvens nosning, en ökad frekvens tasspåläggnings och upphopp, samt en minskad frekvens skall och oralt beteende genom slickning (Figur 6.1).



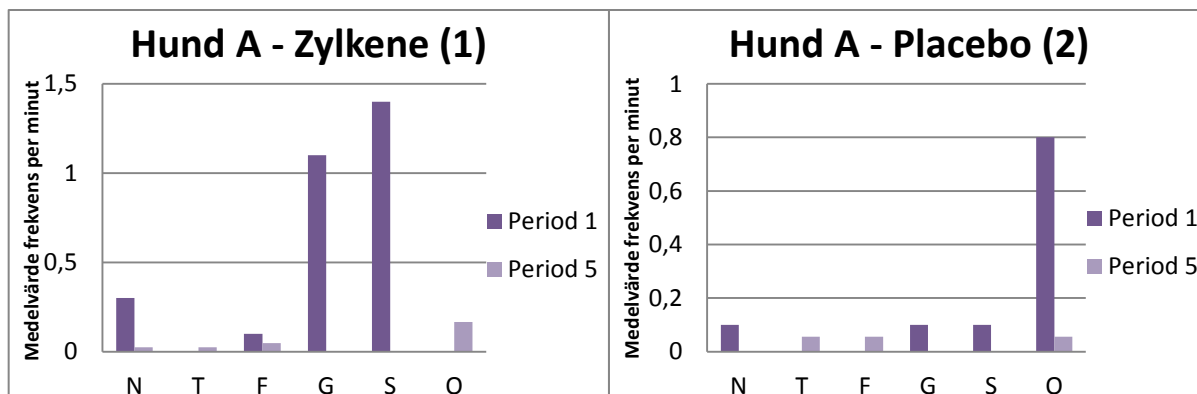
Figur 6.1. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande kontaktsökande genom nosning (N), tasspåläggnings (T), upphopp med framben (F), vokalisering genom gnäll (G) och skall (S), samt oralt beteende genom slickning (O). Figuren visar data för Hund A under behandling med Zylkene (försök 1) och Placebo (försök 2), i Period 1 (-10-0 min) och Period 2 (1-15 min).

Jämför man perioden 1-15 min efter skott hos Z1 med P2 registrerades en högre frekvens kontaktsökande genom såväl nosning, tasspåläggnings och upphopp i Z1 (Figur 6.2). Det registrerades även en högre frekvens oralt beteende i form av slickning i Z1 (Figur 6.2).



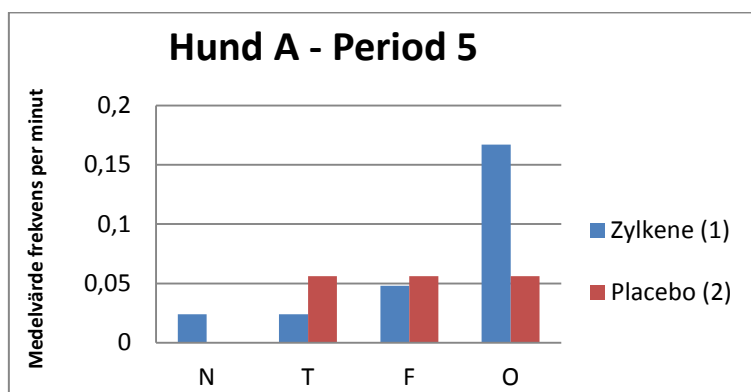
Figur 6.2. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande kontaktsökande genom nosning (N), tasspåläggnings (T), upphopp med framben (F) och oralt beteende genom slickning (O). Figuren visar data för Hund A under behandling med Zylkene (försök 1) och Placebo (försök 2) i Period 2 (1-15 min).

I den totala perioden efter skott (1-120 min), jämfört med perioden innan skott (-10-0 min), registrerades i Z1 en minskad frekvens kontaktsökande i form av nosning och upphopp, och en ökad frekvens tasspåläggnings (Figur 6.3). Det registrerades även en kraftig minskning av vokaliseringar i form av och gnäll och skall, samt en kraftig ökning av slickning i Z1 (Figur 6.3). I P2 registrerades en minskad frekvens nosning, en ökad frekvens tasspåläggnings och upphopp, en minskad frekvens gnäll och skall, samt en minskad frekvens slickning (Figur 6.3).



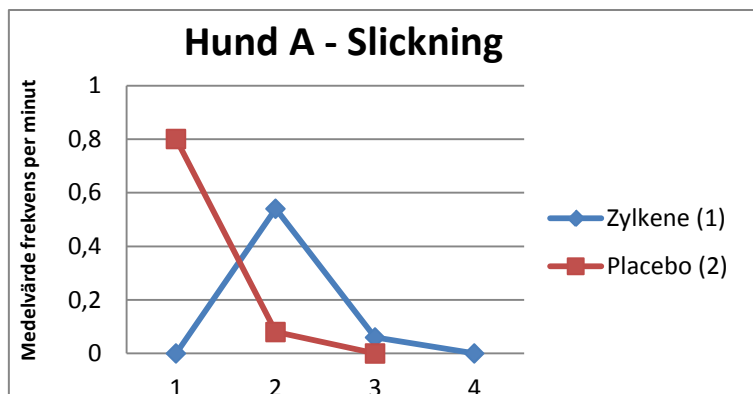
Figur 6.3. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande kontaktsökande genom nosning (N), tasspåläggning (T), upphopp med framben (F), vokalisering genom gnäll (G) och skall (S), samt oralt beteende genom slickning (O). Figuren visar data för Hund A under behandling med Zylkene (försök 1) och Placebo (försök 2), i Period 1 (-10-0 min) och Period 5 (1-120 min).

Jämför man perioden 1-120 min efter skott hos Z1 med P2 registrerades en större frekvens nosning, en mindre frekvens tasspåläggning och upphopp i Z1 (Figur 6.4). Det registrerade även en kraftigt högre frekvens oralt beteende i form av slickning i Z1 jämfört med P2 (Figur 6.4).



Figur 6.4. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande kontaktsökande genom nosning (N), tasspåläggning (T), upphopp med framben (F) och oralt beteende genom slickning (O). Figuren visar data för Hund A under behandling med Zylkene (försök 1) och Placebo (försök 2) i Period 5 (1-120 min).

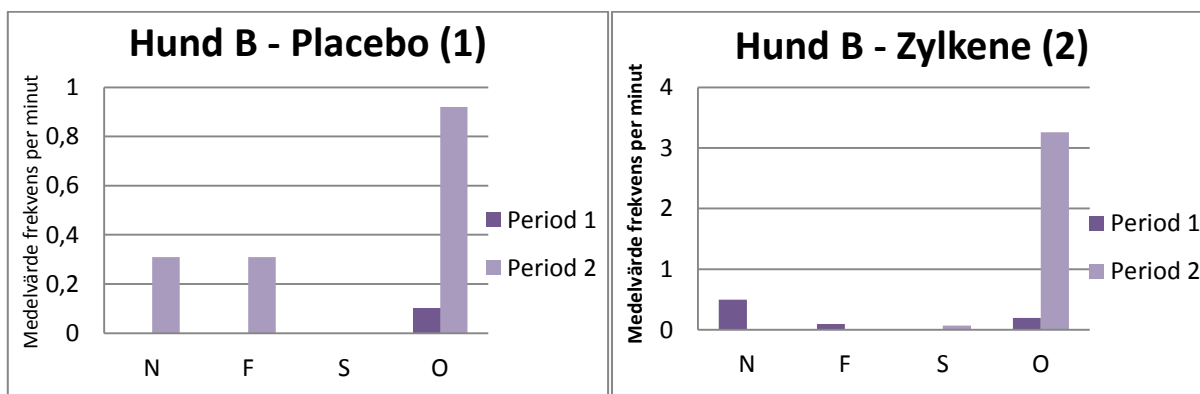
Oralt beteende genom slickning var ett beteende som visade en tydlig trend genom de olika perioderna. I Z1 period 2 ökade frekvensen kraftigt, jämfört med period 1, för att sedan minska till period 3 och ytterligare i period 4 (Figur 6.5). I P2 period 2 sjönk frekvensen kraftigt, jämfört med period 1, och ytterligare en sänkning sågs i period 3 (Figur 6.5).



Figur 6.5. Frekvensregistreringar gällande slickning (medelvärde antal per registrering) i perioderna -10-0 min (1), 1-15 min (2), 16-60 min (3) och 61-120 min (4), hos Hund A vid behandling med Zylkene (försök 1) eller Placebo (försök 2). Försök 2 avbröts 30 min efter skott och således finns inga analyserade beteendedata för period 4 i detta försök.

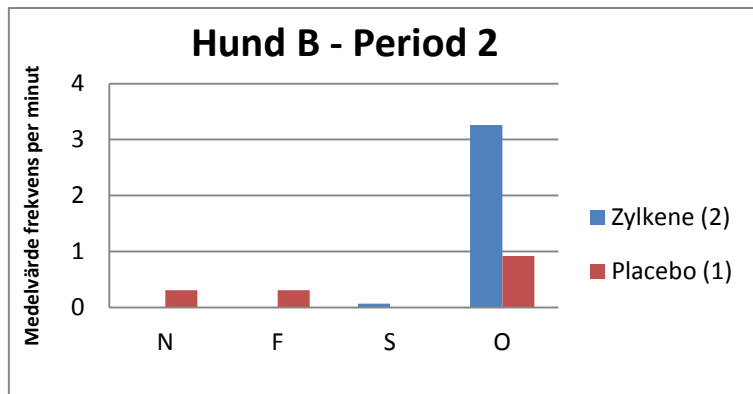
Hund B

I perioden efter skott (1-15 min) i Z2, jämfört med perioden innan skott (-10-0 min), registrerades en minskad frekvens kontaktsökande genom nosning och upphopp, samt en högre frekvens vokalisering i form av skall och kraftigt ökat oralt beteende i form av slickning (Figur 6.6). I en liknande jämförelse i P1 registrerades en högre frekvens kontaktsökande genom nosning och upphopp samt en ökad frekvens oralt beteende genom slickning (Figur 6.6).



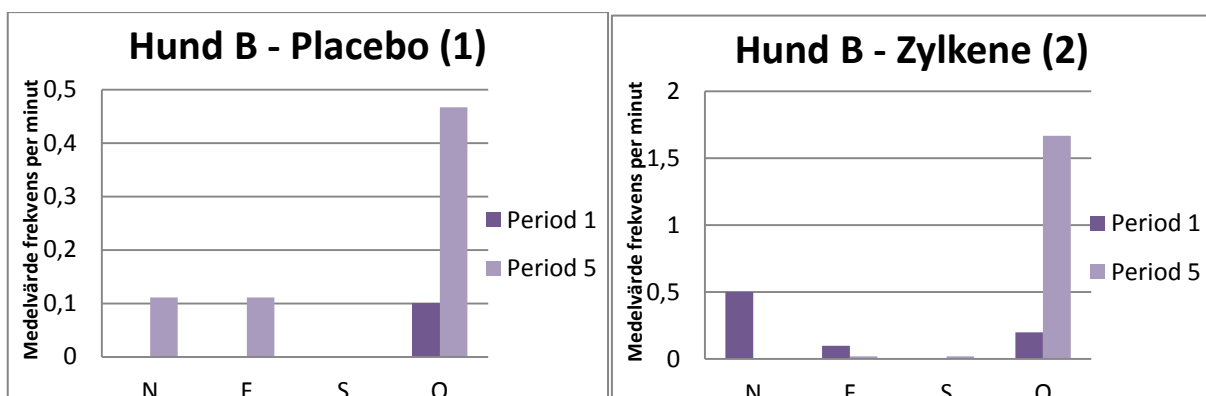
Figur 6.6. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande kontaktsökande genom nosning (N), upphopp med framben (F), vokalisering genom skall (S), samt oralt beteende genom slickning (O). Figuren visar data för Hund B under behandling med Zylkene (försök 2) och Placebo (försök 1), i Period 1 (-10-0 min) och Period 2 (1-15 min).

Jämför man perioden 1-15 min efter skott hos Z2 med P1 registrerades en mindre frekvens kontaktsökande genom såväl nosning som upphopp i Z2 (Figur 6.7). Det registrerades även en högre frekvens vokalisering i form av skall och mycket högre frekvens oralt beteende i form av slickning i Z2 (Figur 6.7).



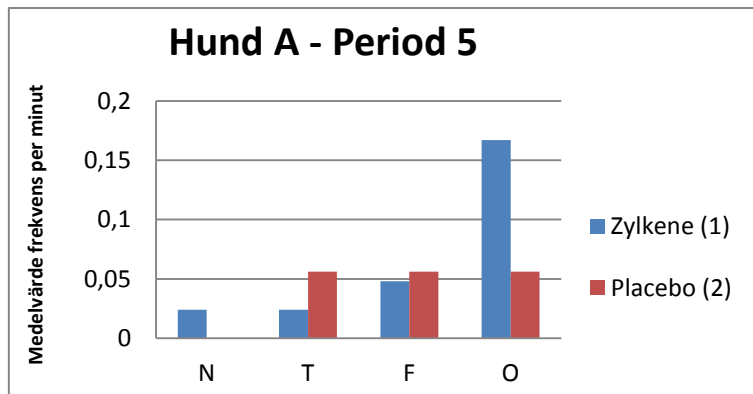
Figur 6.7. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande kontaktsökande genom nosning (N), upphopp med framben (F), vokalisering genom skall (S) och oralt beteende genom slickning (O). Figuren visar data för Hund B under behandling med Zylkene (försök 2) och Placebo (försök 1) i Period 2 (1-15 min).

I den totala perioden efter skott (1-120 min), jämfört med perioden innan skott (-10-0 min), registrerades i Z2 en minskad frekvens kontaktsökande i form av nosning och upphopp i den totala perioden efter skott (Figur 6.8). I den totala perioden efter skott registrerades även en ökning av vokaliseringar i form av skall, samt en kraftig ökning av slickning (Figur 6.8). I P1 registrerades en ökad frekvens nosning, en ökad frekvens upphopp, samt en ökad frekvens oralt beteende i form av slickning (Figur 6.8).



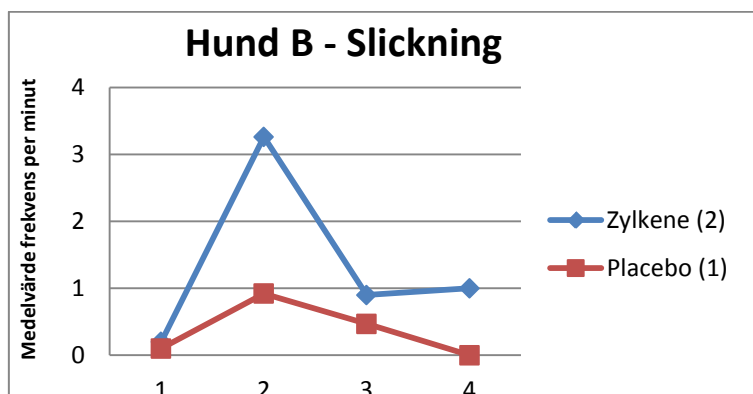
Figur 6.8. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande kontaktsökande genom nosning (N), upphopp med framben (F), vokalisering genom kall (S), samt oralt beteende genom slickning (O). Figuren visar data för Hund B under behandling med Zylkene (försök 2) och Placebo (försök 1), i Period 1 (-10-0 min) och Period 5 (1-120 min).

Jämför man perioden 1-120 min efter skott hos Z2 med P1 registrerades en lägre frekvens nosning och en lägre frekvens upphopp i Z2 (Figur 6.9). Det registrerades även högre frekvens vokalisering i form av skall och en mycket högre frekvens oralt beteende i form av slickning i Z2 jämfört med P1 (Figur 6.9).



Figur 6.9. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande kontaktsökande genom nosning (N), tasspåläggning (T), upphopp med framben (F), och oralt beteende genom slickning (O). Figuren visar data för Hund B under behandling med Zylkene (försök 2) och Placebo (försök 1) i Period 5 (1-120 min).

Oralt beteende genom slickning var ett beteende som visade en tydlig trend genom de olika perioderna. I Z2 period 2 ökade frekvensen kraftigt, jämfört med period 1, för att sedan minska till period 3, men fortfarande ha en förhöjd frekvens i både period 3 och period 4, jämfört med period 1 (Figur 6.10). I P1 period 2 ökade frekvensen något, jämfört med period 1, för att sedan sjunka i period 3 och ytterligare i period 4 (Figur 6.10).



Figur 6.10. Frekvensregistreringar (medelvärde antal per registrering) gällande oralt beteende genom slickning (Slickar). Figuren visar data för Hund B under behandling med Zylkene (försök 2) och Placebo (försök 1) i -10-0 min (1), 1-15 min (2), 16-60 min (3) och 61-120 min (4).

DISKUSSION

I denna pilotstudie på två hundar visade hundarna tydliga reaktioner på skott, men det var mer otydligt hur Zylkene[®] påverkade nivån på deras respons. Endast en studie om Zylkenes[®] potentiellt stresshämmande effekt på hund har hittats, men denna visade på jämförbara ångestdämpande effekter mellan Zylkene[®] och Selegiline Hydrochloride vid beteendeanalys (Beata et al., 2007b). Enligt Beerda et al. (2000) är det viktigt att sätta fysiologi i relation till beteende för att säkerhetsställa att faktisk stress, eller avsaknad av stress, hos djuret föreligger. Det hade därför varit mycket intressant om Beata et al. (2007b) även hade analyserat vissa fysiologiska parametrar (t.ex. kortisol) så att dessa parametrar hade kunnat sättas i relation till beteendeanalysen. Eftersom Beata et al. (2007b) är den enda studien som är gjord på hund hade man kunnat tänka sig att använda av samma utvärderingsmetod för stressbeteenden (EDED) för att kunna jämföra våra studieresultat med Beata et al. (2007b), men eftersom Beata et al. (2007b) undersökte en generell ångestproblematik och vi undersöker en mer akut och intensiv ångestproblematik, så hade det inte varit lämpligt. En mängd olika beteenden som registreras med hjälp av EDED är dessutom inte sådana beteenden som vi hade möjlighet att registrera i vår studie, t.ex. födo- och vattenintagningsbeteenden, sömn samt klinisk bedömning avseende t.ex. diarré och kräkning.

Hos hundar finns en omfattande utbredning av rädsla för olika sorters ljud (Blackwell et al., 2005; Limura et al., 2007). Nåmna studier visar att de vanligaste rädsleorsakande ljuden är ljud från fyrverkerier, åska och skott i den ordningen. Vissa ljud och situationer, t.ex. skyttebanor eller skogsområden vid jaktsäsong, kan djurägare aktivt försöka undvika för att underlätta för sin hund, medan andra ljud som fyrverkerier och åska är svårare att undkomma. Tyvärr är det även så att praktiskt taget vilka ljud som helst kan vara orsaken till rädsla hos hund. Detta visade sig i vår studie där en av hundarna visade sig ha en rädsla för melodin från Hemglassbilen, en melodi som för människor innebär något positivt. Den andra hunden utvecklade sin rädsla efter att upprepade gånger ha utsatts för ljudet av en stängande dörr. Misslin (2003) argumenterar för att rädsla och beteenden uppkomna av rädsla är evolutionärt utvecklade som försvar för individen och är nödvändiga för individens överlevnad. Denna teori kan stämma för vilda djur, men hos våra domesticerade djur är många situationer (t.ex. glassbilen, dörrar som stängs) ofarliga, även om de ger upphov till rädsla hos djuret i fråga. Det finns därför en nödvändighet hos oss människor, som djurägare, att behandla för att lindra djurets rädsla.

Hundarna som ingick i studien bedömdes av sina ägare som skotträdda. Det planerade stressmomentet för att utvärdera effekten av Zylkene[®] var därför avfyrning av en signalpistol. Dock får man inte glömma att andra moment innan själva skottet avfyrades högst troligen också påverkade de deltagande hundarna, och att alla dessa moment influeras under behandling med Zylkene[®]. Litteraturen visar på ökad stressnivå hos hundar vid biltransport (Frank et al., 2006) och vid besök på veterinärklinik (Hewson, 2008; Kallet et al., 1997), två moment som ingick i vår studie. Våra hundar utsattes även för hantering genom veterinärundersökning och kanylapplicering, vilket rimligen kan påverka hundarnas stressnivåer. Att andra moment i försöksproceduren verkade stressande på hundarna ses

tydligt i urinkortisol/kreatininkvoten hos Hund A. När Hund A skulle gå in i undersökningsrummet reagerade han kraftigt genom att backa ifrån dörröppningen och dra bakåt i kopplet. I båda försöken fick djurägaren bära in honom. Han blev uppenbart stressad av att gå in i rummet och detta återspeglade sig i det tredje urinprovet som togs mellan kliniken och skjutbanan, där kraftigt förhöjd kortisol/kreatininkvot sågs. Hundarna träffade även okända människor i form av försökspersonal på en ny plats och all hantering i form av blodprover och dylikt får även ses som potentiellt stressande moment.

En av de mer betydelsefulla felkällorna i studien var att varje hund genomgick två försök som utformats på samma sätt och att de då kan ha associerat specifika moment från försök 2 med reaktionerna från försök 1. Man kan tänka sig att redan då respektive hund anlände till kliniken, vid försök 2, så uppstod en stressreaktion pga. minnet från försök 1. Vi försökte undkomma denna påverkan på studiens slutresultat genom att låta hundarna genomgå försök med olika preparat i olika försöksordning, men en viss påverkan bör ändå förväntas även om hundarna inte tycktes speciellt påverkade när de kom till försöket andra gången. En annan tänkbar möjlighet är att hos en hund som finner nya situationer stressande, är försök 1 mer stressande för hunden och att man då får en lindrigare stressreaktion i försök 2. Detta gör att resultaten inte blir helt lätta att tolka eftersom varje individ reagerar annorlunda. Genom att låta samma hund genomgå de olika behandlingarna flera gånger skulle denna felkälla kunna utredas. Dock är ett sådant upplägg etiskt tveksamt då den individuella hunden får utsättas för rädsla och lidande ett flertal gånger. Det är troligen också ännu svårare att rekrytera hundar vid ett sådant försöksupplägg. Ett annat alternativ hade varit att inte låta hundarna vara sina egna kontroller, utan låta varje hund genomgå endast ett försök, antingen med Placebo eller med Zylkene[®]. Då hade man undvikit nämnda felkälla, men hade samtidigt behövt ha minst dubbelt så många deltagande hundar. Frågan är om detta är etiskt försvarbart eftersom man alltid bör eftersträva att utsätta så få individer för så lite lidande och påfrestningar som möjligt.

Vår studiedesign begränsas framförallt av antalet hundar som deltog i studien. Vi sökte 10 hundar, men endast 2 valde att delta. Orsaken till det låga antalet deltagande beror troligen såväl på att vi hade en begränsad tid för rekrytering, samt att skotträdda hundar är ett känsligt ämne för såväl djurägare som uppfödare. Det är inte alla djurägare som vill utsätta sin hund för en situation där målet är att utlösa en rädsla som hunden har. Eftersom det dessutom är förbjudet att kompensera djurägarna ekonomiskt för deras deltagande, så får inte djurägaren tillbaka något konkret genom att delta i studien. Det låga antalet deltagande hundar innebär att även små faktorer och olikheter mellan de olika försöken kan ge stor påverkan på resultatet. Genom att utforma de olika försöken på samma sätt, med samma försökspersonal, samma hantering, samma tid på dygnet osv, så undkommer man många av eventuella faktorer som kan påverka resultatet. Vi slumpade även försöken mellan hundarna, blindade alla försök och använde oss av tydliga instruktioner för både djurägare och försökspersonal. Dock är det svårt att dra generella slutsatser om Zylkene[®], baserat på vår studie, då denna studie endast visar hur Zylkene[®] påverkar två enskilda individer.

För att få en bättre bild av den specifika hundens rädsla fick djurägaren, innan försöksstart, fylla i en enkät om sin hunds bekymmer. Rädslan hos Hund A uppkom efter att det smällde en raket bara någon meter från honom när han var unghund. Hos Hund B uppkom rädslan efter att denne hade hört upprepade smällar från en dörr. Reaktionen hos Hund A känns mer normal, än hos Hund B, då Hund A utsatts för en situation med en faktisk fara. Hos Hund B har en egentlig ofarlig situation påverkat hunden så pass att en rädsla för höga ljud uppstått. Gemensamma beteenden som djurägarna angav att deras hundar uppvisade vid sina rädlereaktioner var skakning, flykt och kontaktsökande. Hund A uppvisade också salivering och hässjning. Samtliga angivna beteenden överensstämmer med beteenden associerade med stress hos hundar (Beaver, 1999; Beerda et al., 1998; Blackwell et al., 2005; Engeland et al., 1990; McCobb et al., 2001). Ägaren till Hund B berättade även att de i och med hundens rädsla stannade hemma på nyårsafton och underlättade för hunden genom att öka volymen på tv och radio. Detta är ett exempel på att livet med en ljudrädd hund till viss del är begränsande och påverkar livet för hundägarna, och att behandling av hundens rädsla därmed även kan påverka ägarnas tillvaro positivt.

Vi fann att kortisol/kreatininkvoten i det tredje urinprovet hos Hund A ökade kraftigt. Kvoten ökade i båda försöken men var lite högre i Z1. I det sista urinprovet, som togs efter skott, sågs en relativt stor sänkning i Z1, medan kvoten ökade ytterligare i P2. Denna utveckling kan förklaras med resultaten för plasmakortisol där en större ökning sågs i P2 än Z1. Eftersom det sista urinprovet återspeglar utsöndringen av kortisol under det planerade stressmomenten förefaller det naturligt att en ökning av plasmakortisol ger en ökning av urinkortisol/kreatininkvoten, och vice versa, förutsatt att stresspåverkan hos hunden är större efter skott än innan urinprovet taget efter klinikbesöket. Hund B reagerade annorlunda i de båda försöken jämfört med Hund A. Hund B visade en mycket kraftig stressreaktion i både resultaten för plasmakortisol och urinkortisol/kreatininkvot efter skott i Z2, jämfört med P1. Båda försöken gav en höjning av plasmakortisol i blodproverna tagna efter skott, men medan koncentrationen sjönk sakta efter prov #4 i P1, så fortsatte den öka och höll sig stadigt kraftigt förhöjd i Z2. De kraftigt förhöjda kortisolnivåerna under behandling i Z2 visar att hunden inte kunde ta sig ur sin initiala stressreaktion utan hade fortsatt hög stressnivå genom hela försöksperioden. Resultaten visar även att Zylkene® inte sänkte basalnivåerna nämnvärt i de första proverna tagna gällande kortisol i plasma och kortisol/kreatininkvot i urin, för varken Hund A eller Hund B.

Eftersom hela studien var trippelblindad så bedömde all inblandad personal hundarnas reaktioner endast efter deras beteenden och fysiologiska resultat. Fram till att koden för blindningen bröts var alla säkra på att försök 2 för Hund B måste ha varit under behandling med Placebo. Det var mycket förvånande att en sådan hög stressnivå kunde ses vid behandling med Zylkene®, men man får inte glömma att behandling med Zylkene® var under hundens andra försök och att detta kan ha varit orsaken till den kraftiga reaktionen eftersom hunden kan ha relaterat till minnet av sitt tidigare försök. Man kan även tänka sig att det finns individskillnader som gör att olika individer reagerar olika på Zylkene®. Det är svårt att, med hänvisning till tillgänglig litteratur kring den stresshämmande effekten hos Zylkene®, tro att Zylkene® kan öka stresskänsligheten hos djur. Eftersom skotträdsla är en sån kraftig rädsla

hos drabbade hundar kan eventuellt en lindrigare typ av rädsla ha reducerats med Zylkene®. En annan felkälla till resultaten för detta försök är risken att hunden inte har fått i sig hela kapselns innehåll, eller att kapslarna blandats ihop vid blindning av försöken. Risken för dessa felkällor har dock minimerats i och med att djurägaren inför varje försök fick tydliga skriftliga instruktioner om hur och när kapslarna skulle intas av hunden, samt frågades på försöksdagen om det gått bra att ge hunden kapslarna, och att personen som skötte kapselhantering och blindning av försöken fick utförliga instruktioner om hur detta skulle gå till.

Hematokriten ses följa liknande trend som plasmakortisolen hos Hund B i båda försöken. Efter skott ses en stor ökning i båda försöken, men en större ökning under behandling med Zylkene®. Medan hematokriten i båda försöken, och plasmakortisolen i P1, sedan sjunker sakta, så fortsätter plasmakortisolen höjas och vara fortsatt kraftigt förhöjd i Z2. Detta visar att i Z2 minskande SAM i aktivitet, efter den initiala ökade aktiviteten, medan HPA fortsätter vara högaktivt. Dock får hänsyn också tas till att kortisol har en relativt lång halveringstid och vid en längre period av frisättning ackumuleras kortisol i plasman. Hos Hund A sågs en större ökning av plasmakortisol i P2 än Z1, men samtidigt sågs en större ökning av hematokriten i Z1 än P2. En tänkbar slutsats som kan dras av dessa skilda resultat för denna specifika hund är att Hund A aktiverar SAM i en högre utsträckning i Z1 och HPA i P2. Ska man extrapolera resultaten hos denna enskilda individ till en möjlig generell teori om Zylkene®, så kan man tänka sig att Zylkene® påverkar stresshanteringen hos hundar genom att förskjuta aktiviteten från HPA till SAM. En annan tänkbar effekt av Zylkene® kunde vara att det påskyndar återhämtningen från en initial förhöjd stressnivå. Tar man hänsyn till att vissa blodprover visade tecken på koagulation, och därmed falsk låg hematokrit, så sågs inte en snabbare sänkning av aktiviteten hos SAM under behandling med Zylkene jämfört med Placebo hos någon av hundarna. Hos Hund A finns dock bara två analyserade prover efter den initiala höjningen under behandling med Placebo vilket innebär att en kraftigare sänkning efter prov #5 inte går att utesluta. Vi kan inte uttala oss om HPA eftersom P2 avbröts efter prov #5 hos Hund A, vilket bara ger ett analyserat resultat av plasmakortisolen efter den initiala höjningen, och Hund B hade kraftigt höjt plasmakortisol, efter skott, genom hela Z2.

I beteendeanalysen ser vi att de höga kortisolnivåerna och den höga hematokriten för Hund B efter skott i Z2 åtföljs av en kraftigt ökad frekvens oralt beteende i form av slickande, både jämfört med normalbeteendet innan skott och jämfört med P1. Man kan därför rimligen anta att slickande runt munnen är en bra parameter för stress hos denna hund. Detta överensstämmer med resultaten från tidigare studier (Beerda et al., 1998). I teorin borde dock slickandet ha minskat i frekvens när stressnivån ökar eftersom en aktivering av SAM ger en mindre och mer viskös salivsekretion. Om den ökade frekvensen slickning beror på ökad salivsekretion så borde det snarare innebära en större aktivering av det parasympatiska nervsystemet. Även hos Hund A ses en ökad frekvens av slickande i perioden efter skott i Z1 jämfört med perioden innan skott, och med P2. Medan frekvens slickande ökade i både Z2 och P1 hos Hund B, jämfört med innan skott, sågs en kraftig sänkning av frekvensen i perioden efter skott, jämfört med innan, hos Hund A i P2. Detta är mer i linje med vad som förväntades om man ser till att SAM ökar i aktivitet vid förhöjd stressnivå.

I Z2 hos Hund B sågs även en kraftig ökning av såväl hässjning som skakning under hela perioden efter skott, medan hässjning och skakning bara noterades i en liten procentandel av perioden 1-15 min efter skott i P1. Även dessa stressassocierade beteenden finns beskrivna i litteraturen (Beaver, 1999; Engeland et al., 1990; McCobb et al., 2001) och kan sättas i korrelation med de fysiologiska resultaten. För Hund A var det inte lika uppenbart som för Hund B, utan endast en liten procentandel skakning sågs i perioden 1-15 min efter skott i Z1 och hässjande i perioden 1-60 min efter skott i P2.

Hos Hund A sågs en tydlig skillnad avseende registreringen av kroppsposition i perioden 1-15 min efter skott där en huvudandel stående visades i Z1, och en huvudandel liggande visades i P2. Liggande skulle kunna innebära att hunden slappnar av bättre medan stående uppvisas hos en mer orolig hund som inte riktigt finner ro, men vissa författare anser att låg hållning ses som en mer intensiv och akut stressrespons (Beerda et al., 1997; Beerda et al., 1998). Denna teori överensstämmer med redovisade resultat för position hos Hund A i Z1 och P2, sett till övriga resultat avseende beteende och fysiologi. I P2 gjorde både ägare och försökspersonal bedömningen att hunden var mer introvert och påverkad när den låg ner. Detta var orsaken till att djurägaren i sin subjektiva bedömning gissade att Hund A behandlades med Placebo i försök 2. I frekvensregistreringen avseende kontaktsökande ser vi även att hunden sökte mer kontakt hos djurägaren efter skott i Z1 jämfört P2. Hos Hund B var skillnaden för resultaten avseende kroppsposition inte lika tydlig mellan de olika försöken, men en ökad frekvens kontaktsökande sågs i P1 jämfört med Z2. Intressant är även att beteendet flykt endast registrerades hos de båda hundarna under behandling med Zylkene®. Det var även högre förekomst av kontaktsökandet hos respektive hund i det försöket som de bedömds vara minst stressade i. Det skulle kunna vara så att en viss stressnivå ger hög frekvens kontaktsökande, men när stressnivån passerar en viss tröskel så uppstår mindre kontaktsökande och hunden blir mer introvert. Hos båda hundarna hölls svansen i en neutral hängande position genom praktiskt taget hela försöken och oavsett behandling. Man kan därför anta att svansposition inte är en bra stressmarkör hos rasen collie.

En felkälla som vi inte berört än är den oundvikliga hanteringen av hundarna under försöken och dess påverkan på både beteende och fysiologi. Även om blodproverna togs ur permanentkanyl så innebar varje provtagningstillfälle en viss hantering av hunden. Man kan därför rimligen anta att en viss förhöjning av respektive stressparameter ses pga. detta. Denna eventuella ökning bör dock vara jämförbar mellan olika provtillfällen eftersom hundarna hanterades exakt likadant vid varje enskild provtagning. I P2 hos Hund A hanterades dock hunden mycket under försöket eftersom det var svårt att få ut tillräckligt med blod. Försökspersonal var även tvungen att applicera en ny kanyl. Frågan är om all denna extra hantering har något samröre med den extra höjningen i urinkortisol i provet som togs efter avslutat försök, jämfört med Z1.

Även beteendet påverkades av provtagningarna eftersom vissa provtagningar endast tog enstaka minuter, medan andra tog upp till 8-9 min, vilket innebär det att det inom vissa perioder registrerades fler momentan- och frekvensregistreringar, och i andra perioder registrerades färre. Vid datahanteringen blir beteendefrekvens per tidsenhet densamma, men i

vissa perioder saknas det registreringar för vissa minuter som hunden kunde ha utfört beteende på. Registreras t.ex. ett sällsynt beteende i en period med färre registreringar så kommer detta sällsynta beteende redovisas som en större procentuell andel av totalantalet registreringar, än om beteendet registrerats i en period med fler totalantal registreringar. Det får till följd att beteendet upplevs vara ett mer förekommande beteende än det egentligen är. Beteendet i de närmaste registreringarna efter varje provtagning blev även påverkade eftersom det tar en viss tid för hunden att normalisera sitt beteende efter hantering.

Sett till såväl fysiologi- som beteenderesultat står det klart att djurägarna är duktiga på att bedöma stressnivån hos sina hundar. Djurägarna fick utifrån sina hundaras reaktioner från de båda försöken uttala sig om vilket försök de trodde var under behandling med Zylkene[®], med antagandet att Zylkene[®] hade den förväntade stressminskande effekten. Djurägare till Hund A gissade rätt angående vilket försök som var under behandling med Placebo och vilket som var under behandling med Zylkene[®]. Djurägare till Hund B bedömde sin hund vara mest stresspåverkad i försök 2 och trodde därför att försök 2 var under behandling med Placebo. Detta visade sig inte stämma när kodlistan bröts, men sett till hundens stressnivå fysiologiskt och beteendemässigt gissade djurägaren helt korrekt. Vi ser även i djurägarenkäten att båda ägarna angav beteenden som deras hundar visade i de olika försöken.

SLUTSATS

Sammanvägs beteende och fysiologi står det klart att Hund A bedömdes vara mest stresspåverkad när den fick placebo (P2), och Hund B mest påverkad när den fick Zylkene® (Z2). Vi har därmed ett försök som stödjer och ett som inte stödjer hypotesen att Zylkene® leder till minskad stressreaktion hos hund efter skott. Eftersom det var i försök 2 som hundarna bedömdes vara mest stresspåverkade kan det vara så att detta är en viktigare faktor för resultaten än vilken behandling hundarna fick. Återigen är det viktigt att påpeka att pga. få deltagande individer är alla slutsatser som dras i detta arbete ej generella utan endast teorier vid en tolkning av resultaten för respektive hund. Det har i denna studie presenterats många teorier om hur Zylkene® påverkar stresshantering, men för att kunna bekräfta teorierna krävs fler studier, med fler hundar ur olika raser, för att reda ut huruvida Zylkene® har stresshämmande effekt eller ej.

TACK TILL

Lena Lidfors och Eva Sandberg, mina handledare som hjälpt och stöttat mig med arbetet från start till slut.

Ägare till Hund A och Hund B som ställde upp och möjliggjorde denna studie.

Åsa Eriksson som hjälpt till praktiskt vid alla genomförda försök.

Gunilla Drugge som analyserat alla prover och hjälpt mig med beskrivningen av genomförda analysmetoder.

Veterinärmedicinska fakultetens stipendiesamfund som ekonomiskt bidragit till studien i form av ett stipendium.

Merck och specifikt Lena Malmgren som visat samarbetsvillighet inför studien och även svarat på frågor och hjälpt till att finna information och vetenskaplig litteratur.

Uppsala Brukshundsklubb som lånade ut en signalpistol till studien.

Svenska Collieklubben som hjälpte oss sprida information om studien till sina medlemmar och även gav sitt stöd till studien.

Svenska Kennelklubben som lät oss ta del av deras register för att söka potentiella deltagare till studien.

Universitetsdjursjukhuset i Uppsala som lät oss söka i deras patientregister efter potentiella deltagare till studien.

De veterinärer och djursjukskötare som hjälpt till med kliniska undersökningar och kanylappliceringar innan respektive försök.

LITTERATURFÖRTECKNING

Beata, C., Beaumont-Graff, E., Diaz, C., Marion, M., Massal, N., Marlois, N., Muller, G. & Lefranc, C. (2007a) Effects of alpha-casozepine (Zylkene) versus selegiline hydrochloride (Selgian, Anipryl) on anxiety disorders in dogs. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 2, 175–183.

Beata, C., Beaumont-Graff, E., Coll, V., Cordel, J., Marion, M., Massal, N., Marlois, N. & Tausin, J. (2007b) Effect of alpha-casozepine (Zylkene) on anxiety in cats. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 2, 40–46.

Beaver B.V. (1999) *Canine behavior: a guide for veterinarians*. Philadelphia: Saunders Elsevier

Beerda, B., Schilder, M.B.H., van Hooff, J.A.R.A.M., Vries, D. & W, H. (1997) Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 52, 307–319.

Beerda, B., Schilder, M.B.H., Hooff, V., A.r.a.m, J., Vries, D., W, H. & Mol, J.A. (1998) Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365–381.

Beerda, B., Schilder, M.B., Bernadina, W., van Hooff, J.A., de Vries, H.W. & Mol, J.A. (1999) Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. *Physiology & Behavior*, 66, 243–254.

Beerda, B., Schilder, M.B.H., van Hooff, J.A.R.A.M., de Vries, H.W. & Mol, J.A. (2000) Behavioural and Hormonal Indicators of Enduring Environmental Stress in Dogs. *Animal Welfare*, 9, 49–62.

Bergeron, R., Scott, S.L., Émond, 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, 211–216.

Biggio, G., Concas, A., Corda, M.G., Giorgi, O., Sanna, E. & Serra, M. (1990) GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 48, 121–142.

Blackwell, E., Casey, R. & Bradshaw, J. (2008) Firework fears and phobias in the domestic dog. [online] Available from:
<http://www.rspca.org.uk/ImageLocator/LocateAsset?asset=document&assetId=1232713012401&mode=prd>

- Bourdon, L., Canini, F., Lanoir, D., Martin, S., Fidier, N., d'Aleo, P., Roux, A., Denis, J., Chapotot, F. & Becq, G. (2003) Analysis of the chronic psychophysiological effects of ING 911. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-20-Appendix-16-GB-vol177.pdf>
- Bresson, J.L., Elghozi, J.L., Desor, D. & Messaoudi, M. (2000) Study of the effects of ING 911 product, milk protein hydrolysate, on a moderate stress in healthy volunteer. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-17-Appendix-15-GB-vol177.pdf>
- Cakir-Kiefer, C., Le Roux, Y., Balandras, F., Trabalon, M., Dary, A., Laurent, F., Gaillard, J.-L. & Miclo, L. (2011) In vitro digestibility of α -casozepine, a benzodiazepine-like peptide from bovine casein, and biological activity of its main proteolytic fragment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4464–4472.
- Cannon, W.B. (1929) Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J.C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollès, P. & Fiat, A.M. (1998) Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*, 80, 155–165.
- Dreschel, N.A. & Granger, D.A. (2005) Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. *Applied Animal Behaviour Science*, 95, 153–168.
- Dufour, P., Miermon, M. & Urbaniak, R. (2003) Oral Toxicity Test After 28-Day Repeated Administration in the Rat of a Food Supplement ING 911. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-13-Appendix-05-vol176.pdf>
- Egleton, R.D., Bilsky, E.J., Tollin, G., Dhanasekaran, M., Lowery, J., Alves, I., Davis, P., Porreca, F., Yamamura, H.I., Yeomans, L., Keyari, C.M. & Polt, R. (2004) Biousian glycopeptides penetrate the blood-brain barrier. *Tetrahedron : asymmetry*, 16.
- Engeland, W.C., Miller, P. & Gann, D.S. (1990) Pituitary-adrenal and adrenomedullary responses to noise in awake dogs. *American Journal of Physiology.*, 258, R672–677.
- FASS. (2012a) [online] Available from: http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk.t.jsp?NplID=19601227000026&DocTypeID=3&UserTypeID=0

FASS. (2012b) [online] Available from:

http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk_t.jsp?NplID=19571206000029&DocTypeID=4&UserTypeID=1

FASS. (2012c) [online] Available from:

http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk_t.jsp?NplID=19670228000014&DocTypeID=3&UserTypeID=0

FDA. (2004) NEW DIETARY INGREDIENT NOTIFICATION FOR Iactium™. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-08-vol1176.pdf>

Forichon, A., Aujoulat, M., Withers, P. & Demagny, B. (2001) ING 911 - In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test on L5178Y Mouse Lymphoma Cells TK+/- (Microtitre Method). [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-14-Appendix-06-vol1176.pdf>

Frank, D., Gauthier, A. & Bergeron, R. (2006) Placebo-controlled double-blind clomipramine trial for the treatment of anxiety or fear in beagles during ground transport. *Canadian Veterinary Journal*, 47, 1102–1108.

Gomond, P. & Miermon, M. (2003) Acute Oral Toxicity Test in the Rat. Acute Toxic Class Method: Test Substance: ING 911. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-11-Appendix-03-vol1176.pdf>

Guesdon, B., Messaoudi, M., Lefranc-Millot, C., Fromentin, G., Tomé, D. & Even, P.C. (2006) A tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress. *Peptides*, 27, 1476–1482.

Hewson, C. (2008) Stress in small animal patients: why it matters and what to do about it. *Irish Veterinary Journal*, 61(4), 249-254

Horváth, Z., Igyártó, B-Z., Magyar, A. & Miklósi, Á. (2007) Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. *Hormones and Behavior*, 52, 621-630

Hydbring-Sandberg, E., Walter, L. von, Hoglund, K., Svartberg, K., Swenson, L. & Forkman, B. (2004) Physiological reactions to fear provocation in dogs. *Journal of Endocrinology*, 180, 439–448.

- Kallet, A., Cowgill, L. & Kass, P. (1997) Comparison of blood pressure measurements obtained in dogs by use of indirect oscillometry in a veterinary clinic versus at home. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 210(5), 651-654.
- Kim, J.H., Desor, D., Kim, Y.T., Yoon, W.J., Kim, K.S., Jun, J.S., Pyun, K.H. & Shim, I. (2007) Efficacy of alphas1-casein hydrolysate on stress-related symptoms in women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 536-541.
- Kolevskà, J., Brunclik, V. & Svoboda, M. (2003) Circadian rhythm of cortisol secretion in dogs of different daily activities. *Acta Veterinaria Brno*, 75, 599-605.
- Lecouvey, M., Frochot, C., Miclo, L., Orlewski, P., Driou, A., Linden, G., Gaillard, J.-L., Marraud, M., Cung, M.T. & Vanderesse, R. (1997) Two-Dimensional 1H-NMR and CD Structural Analysis in a Micellar Medium of a Bovine α 1-Casein Fragment having Benzodiazepine-Like Properties. *European Journal of Biochemistry*, 248, 872-878.
- Limura, K., Mills, D.S. & Levine, E. (2007) An analysis of the relationship between the history of development of sensitivity to loud noises and behavioural signs in domestic dogs. *Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting and European College of Veterinary Behavioural Medicine-Companion Animals and European Society of Veterinary Behavioural Ethology*, 70-71.
- Lüddens, H. & Korpi, E.R. (1995) Biological function of GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity. *Journal of Psychiatric Research*, 29, 77-94.
- McCobb, E.C., Brown, E.A., Damiani, K. & Dodman, N.H. (2001) Thunderstorm phobia in dogs: an Internet survey of 69 cases. *Journal of the American Hospital Association*, 37, 319-324.
- McDonnell, S.M., Miller, J. & Vaala, W. (2012) Calming Benefit of Short-term Alpha-Casozepine Supplementation during Acclimation to Domestic Environment and Basic Ground Training of Adult Semi-Feral Ponies. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1-6
- Meisel, H. (1997) Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science*, 50, 125-138.
- Messaoudi, M., Jung, P., Grasmuck, V., Desor, F. & Desor, D. (1998a) Addictive effect of the product "ING 912 1" intraperitoneally administered in the Conditioned Place Reference in the male Wistar Rat. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-11-Appendix-12-vol177.pdf>

Messaoudi, M., Grasmuck, V., Desor, F. & Desor, D. (1998b) Tolerance to the anxiolytic effect of the product “ING 913” intraperitoneally administered on conditioned defensive burying in the male Wistar Rat. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-15-Appendix-14-vol177.pdf>

Messaoudi, M., Nejdi, A. & Marchand, T. (2001) Study Report Version 1 .O. Study of the Effects of “ING 911” Hydrolysate, Given at a 150 mg/kg Daily Dose Throughout Pregnancy, on the Maternal Behaviour and the Physical, Neumotor and Behavioural Development of Youngs Between Birth and Adulthood in Wistar Rat. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-02-Appendix-08-GB-vol177.pdf>

Messaoudi, M., Lefranc-Millot, C., Desor, D., Demagny, B. & Bourdon, L. (2004) Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situations. *European Journal of Nutrition*, 44, 128–132.

Miclo, L., Perrin, E., Driou, A., Papadopoulos, V., Boujrad, N., Vanderesse, R., Boudier, J.F., Desor, D., Linden, G. & Gaillard, J.L. (2001) Characterization of alpha-casozepine, a tryptic peptide from bovine alpha(s1)-casein with benzodiazepine-like activity. *The FASEB Journal*, 15, 1780–1782.

Misslin, R. (2003) The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiologie Clinique*, 33, 55–66.

Plenat, F. (2001a) Study Report: Study of the Effects of the “ING 911” Hydrolysate, Given Orally to Wistar Mother Rats Throughout Pregnancy. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-04-Appendix-09-GB-vol177.pdf>

Plenat, F. (2001 b) Study Report: Study of the Effects of the “ING 911” Hydrolysate, Given to Female Rats Throughout Pregnancy, on Internal and External Malformations in Young Second-Generation Wistar Rats. [online] Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0242-08-Appendix-10-GB-vol177.pdf>

Reeve, EB., Gregerson, MI., Allen, TH. & Sear, H. (1953) Distribution of cells and plasma in the normal and splenectomised dog and its influence on blood volume with P32 and T-1824. *American Journal of Physiology*, 175, 195–203.

- Rohdin, Cecilia; Leg vet, Specialist i hundens och kattens sjukdomar, specialist i neurologi, DEVCN, Universitetsdjursjukhuset i Uppsala. (2012) Mailkontakt 2012-12-17.
- Rutherford-Markwick, K.J. & Moughan, P.J. (2005) Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 88, 955–966.
- Saint-Hilaire, D.Z., Messaoudi, M., Desor, D. & Kobayashi, T. (2009) Effects of a Bovine Alpha S1-Casein Tryptic Hydrolysate (CTH) on Sleep Disorder in Japanese General Population. *The Open Sleep Journal*, 2, 26-32.
- Sherman, B.L. & Mills, D.S. (2008) Canine anxieties and phobias: an update on separation anxiety and noise aversions. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 38, 1081–1106.
- Silva, S.V. & Malcata, F.X. (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1–15.
- Violle, N., Messaoudi, M., Lefranc-Millot, C., Desor, D., Nejdj, A., Demagny, B. & Schroeder, H. (2006) Ethological comparison of the effects of a bovine alpha s1-casein tryptic hydrolysate and diazepam on the behaviour of rats in two models of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 84, 517–523.