

Uppsala 2012-09-27

## DELRAPPORT för 2012 (år 1 av 3)

# ”Fysiologiska mätvärden som indikatorer på hundars beteende och personlighet”

Eva Sandberg och Kenth Svartberg

Målet med detta forskningsprojekt är att studera om hundars mentalitet och personlighet säkrare kan bedömas genom att kombinera beteendetester med fysiologiska mätningar. Projektet är en fortsättning på det av SKK tidigare finansierade projektet ”Utvärdering och kvalitetssäkring av Beteende- och Personlighetsbeskrivning Hund (BPH)”.

I ansökan definierades tre delprojekt:

- 1) *Fysiologiska förändringar hos hundar av olika ras under BPH och andra testsituationer*
- 2) *Nya mätmetoder korrelerade till beteende finns hos människa - vad gäller för hund?*
- 3) *Kan fysiologiska mätningar hjälpa försvarsmakten att välja ut lämpliga tjänstehundar?*

Under år 2012 har följande arbete gjorts i de olika delprojekten:

- 1) *Fysiologiska förändringar hos hundar av olika ras under BPH och andra testsituationer*

I början av året analyserades urinprov tagna i hemmiljö från både tikar och hanhundar av olika raser. Preliminära resultat tyder på att tikar generellt har högre urinkoncentrationer av vissa hormoner jämfört med hanhundar. Genom att samla in ett större antal urinprover på både tikar och hanhundar av varierande raser i samband med BPH hoppas vi kunna få en bättre bild av hur hormonnivåerna varierar beroende på kön och ras och hur detta är korrelerat till hundarnas beteende och BPH-resultat.

Vi har under året arbetat med att ytterligare förbättra och validera metoden för mätning av serotonin i hundurin och dessutom jämfört olika analysmetoder mot varandra. Neurohormonet dopamin har på senare tid rapporterats vara intressant då koncentrationerna av dopamin liksom serotonin tycks vara kopplade till personlighet och beteende. Vi har därför validerat en ELISA-metod för mätning av dopamin i hundurin som nu är klar att användas. Övriga analysmetoder är sedan tidigare validerade för hund.

Under sommaren 2012 har kontakt tagits med Helen Häggström, ansvarig för BPH-testerna i Märsta. Helen är mycket positiv till samarbete och under hösten har vi fem inbokade BPH-tillfällen på Märsta-stationen (det första genomfördes 22/9-2012) där vi samlar in urinprov från hundar som genomgår

BPH. Hundägarna tillfrågas innan testet genom brevutskick och de hundägare som är positiva till att delta får provtagningsrör och instruktioner på posten för att sedan kunna ta de första proverna på sina hundar i hemmiljö. Dessutom tas urinprov på hundarna precis innan och efter BPH-testet. Under 2013 hoppas vi kunna fortsätta insamlingen av urinprov för att få tillräckligt stort antal hundar i varje ras. De fyra raser som är mest representerade på testerna kommer att sammanställas och urinproverna kommer att analyseras med avseende på kortisol, testosteron, adrenalin, noradrenalin, serotonin och dopamin. Vi hoppas få en generell bild av den fysiologiska ras- och könsvariation som föreligger i urinhormonkoncentrationer hos hund samt hur denna korrelerar med hundars beteende och testresultat på BPH.

## *2) Nya mätmetoder korrelerade till beteende finns hos människa - vad gäller för hund?*

Sedan april 2012 har vi i samarbete med MD professor Lars Orelund och kemist Sara-Lisa Eriksson vid Institutionen för Neurovetenskap, Farmakologi, Uppsala Universitet arbetat med att utveckla en metod för att kunna mäta MAO-A och MAO-B hos hund.

Människans aktivitet av monoaminoxidas (MAO) i blodplättar tycks utgöra den hittills starkaste stabila nedärvda biologiska markören för personlighet och det vore därför mycket intressant om motsvarande samband finns även hos hund. Låg aktivitet av MAO är hos människa starkt korrelerad till utåtriktad, impulsiv, och aggressiv personlighet. Hos människa finns två MAO enzym nämligen MAO-A och MAO-B och det sistnämnda finns i blodplättarna. Beträffande förekomsten av MAO-B i hundens blodplättar är litteraturen motstridig. I människans blod finns även ett annat enzym med kapacitet att metabolisera monoaminer. Detta enzym har en annan struktur än MAO-A och -B och hämmas selektivt av semikarbazid. Enzymet benämns därför semikarbazidkänsligt amin oxidas (SSAO). Även detta enzym är delvis genetiskt reglerat, men hos primater har koppling till personlighet inte konstaterats föreligga i samma utsträckning som för MAO-B i blodplättar.

I vårt valideringsarbete under året har vi funnit en varierande svårighet att separera blodplättarna från blodet hos olika hundar. Anledningen är att det tycks finnas en stor individuell variation i blodplättarnas mängd och egenskaper hos hund. Vi har därför utgått från en fluorimetrisk metod som används för fryst helblod från människa. Då denna metod först inte gav utslag vid användandet av hundblod har vi ökat metodens känslighet. Detta har inneburit att metoden nu har ca 50-faldigt ökad känslighet och att enzymaktivitet intressant nog har kunnat uppmätas i hundblod.

Nedanstående metodbeskrivningen visar den optimerade metoden för bestämning av monoamin enzymaktivitets-mätning hos hund. Under utveckling av metoden har samtliga parametrar studerats för att uppnå en så hög känslighet som möjligt. Kynuramin är ett icke selektivt substrat för både MAO-A och B som har använts på helblod, där den resulterande produkten 4-hydroxyquinolin (4-HQ) mäts med fluorescence. Aktiviteten anges i  $\mu\text{Mh}^{-1}$ .

*200  $\mu\text{l}$  helblod, 1290  $\mu\text{l}$  boratbuffert (pH 8.3), samt 10  $\mu\text{l}$  kynuramin (2500  $\mu\text{g/ml}$ ) inkuberas i 37 °C i 2.5 h. Reaktionen stoppas med 1000  $\mu\text{l}$  metanol i kombination med upphettning. Blandningen har då fått en mörkbrun färg (ca 20 s). Provet får stå i rumstemperatur (RT) i ca 10 min för att sedan centrifugeras (2000 g, 20 min). 500  $\mu\text{l}$  överförs till en eppendorftub där 100  $\mu\text{l}$  av 5 M NaOH tillsätts.*

*Aktivitetsmätning har även gjorts med tillsats av hämmare. Reaktionsmixen med hämmare har då fått stå i ca 20 min i RT innan substratet tillsätts. Följande hämmare har använts: MAO-A hämmare*

*(Clorgyline, 0.025 mM), MAO-B hämmare: (Deprenyl,  $10^{-4}$  mM) samt SSAO hämmare: (Hydralazine 0.2 mM). De angivna koncentrationerna är slutkoncentrationen i reaktionsmixen.*

*200  $\mu$ l av varje prov appliceras på en mikroplatta anpassad för fluorescencemätning. De våglängder som användes för excitation och emission var följande,  $\lambda_{ex} = 330$  nm och  $\lambda_{em} = 380$  nm. Den uppmätta fluorescensen interpoleras mot en matrismatchad standardkurva.*

Våra preliminära resultat tolkas som att den aktivitet som nu har detekterats i hundblod kommer från SSAO och inte från MAO-B. Det finns därför en möjlighet att det förekommer artskillnader hos SSAO och att det faktiskt är SSAO som metaboliserar monoaminer hos hund, dvs. att hundens SSAO motsvarar människans MAO-A. Eftersom serotonin är det huvudsakliga substratet för MAO-A hos människa vill vi nu gå vidare med att undersöka om SSAO hos hundar metaboliserar serotonin. Skulle detta vara fallet vore det synnerligen intressant eftersom variationer hos MAO-A genen hos människa har stor betydelse för personlighet och beteende och att denna skillnad sannolikt beror på MAO-A:s betydelse för serotoninomsättningen. Då vi redan har upptäckt betydande variationer i serotoninivåer i hundars urin som tycks vara kopplade till personlighet och hur de presterar på BPH (se ansökan) vill vi därför under 2013-2014 kombinera mätningar av SSAO med mätningar av serotonin i blod och urin hos hund. Finns det ett samband mellan SSAO-aktivitet och koncentrationerna av serotonin och är detta kopplat till hundens beteende, personlighet och testresultat på BPH?

### ***3) Kan fysiologiska mätningar hjälpa försvarsmakten att välja ut lämpliga tjänstehundar?***

Under våren 2012 har studiebesök gjorts på Försvarsmaktens Hundtjänstenhet (FHTE) i Märsta i samband med lämplighetstester av presumtiva tjänstehundar. Fil Dr Erik Wilsson, avelsansvarig FHTE, är mycket positiv till vidare samarbete under 2013-2014.