

Bovine milk peptides are efficacious in reducing anxiety and stress in humans and companion animals

Kania B.F., Wrońska D., University Center of Veterinary Medicine of Jagiellonian University and Agricultural University in Cracow¹, Faculty of Animal Sciences, Agricultural University in Cracow²

Here we aimed at the presentation of bovine milk as a source of compounds that calm or quiet an anxious patient. Bovine milk has long been considered a beverage with natural tranquillizing properties. Some of the peptides present in milk do have a calming effect. One of them is α_1 -caseozepine, a tryptic bovine α_{s1} -casein hydrolysate. α_1 -caseozepine, a non-pharmaceutical milk compound is very effective in treating anxiety in cats, dogs and other species suffering from anxiety-related conditions. In the blinded study, the effects of α_1 -caseozepine (Zylkene) given *per os* in the dose 15 mg/kg B.W./24h and selegiline in the dose 0,5 mg/kg B.W./24h were shown to be equally effective in companion animals long term treatment. In the clinical study, α_1 -caseozepine had no adverse effect that is consistent with toxicology data.

Keywords: α_1 -caseozepine, anxiolytic effects, companion animals.

Wprawdzie minął już okres największego zainteresowania endogennymi opioidami (endogenous opioid peptides – EOP), to dalsze dociekania teoretyczne i możliwości ich klinicznego zastosowania się nie zmniejszają. Zwłaszcza że zidentyfikowano ich obecność w mleku, jako bioaktywnych peptydów. Chodzi szczególnie o te, które stanowią peptydy będące fragmentami β -kazeiny mleka, czyli kazomorfiny. Jako opioidy endogenne są również składnikami pożywienia, będąc jednocześnie opioidami egzogennymi, zwanymi egzorfinami. Beta-kazomorfina-11 oraz α_{s1} -kazeinofosfopeptyd-9 są produktami trawienia kazeiny. Wykazują działania analityczne, wpływając na zachowania społeczne, a przedłużając czas przechodzenia treści w przewodzie pokarmowym, działają

Peptydy mleka skutecznymi lekami w tłumieniu lęku i stresu u ludzi i zwierząt towarzyszących

Bogdan F. Kania¹, Danuta Wrońska²

z Uniwersyteckiego Centrum Weterynarii Uniwersytetu Jagiellońskiego i Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie¹ oraz Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie²

przeciwbiegunkowo. Egzorfiny zwiększają wchłanianie wolnej wody i elektrolitów w jelitach cienkim i grubym, hamują motorykę przedłożdków u przeżuwaczy i powodują katalapsję na drodze odmiennego mechanizmu działania niż czynią to neuroleptyki. Są ambireceptorowymi agonistami receptorów μ - oraz δ -opioidergicznych. Pobudzanie pierwszych wiąże się z efektem analitycznym, a stymulacja drugich z działaniem psychotropowym egzorfin (1)

Zdumiewa ciągle fakt, że noworodki reagujące płaczem i krzykiem na niepokojące je sytuacje zapominają o tym już po pierwszych porcjach spożytego matczyne mleka. Już 25 lat temu wykazano istnienie trzech głównych grup endogennych opioidów, po czym wkrótce wykazano obecność kazomorfiny. Jest ona peptydem egzogennym, będącym równocześnie substancją endogennego pochodzenia wydzielaną do mleka, czyli peptydem o działaniu opioidu, a jego działanie łączono z przeciwstresowym i uspokajającym wpływem na oseski. Badania własne wykazały, że kazomorfina wydzielana w mleku ma również uspokajające działanie ośrodkowe. Infundowana do komory bocznej mózgu owiec powodowała ich uspokojenie oraz hamowanie motoryki przedłożdków. Może to znajdować odniesienie do skutecznego uspokojenia zaburzeń motoryki przewodu pokarmowego w warunkach stresu (2). Białka mleka zawierają też inne potencjalnie aktywne peptydy, będące składnikami żywności funkcjonalnej, warunkujące

bardzo istotną rolę w regulacji i modulacji procesów metabolicznych organizmu (3).

Biorąc powyższe pod uwagę, podjęto opracowanie pierwszej krajowej monografii α_1 -kazeozepiny – substancji pochodzącej z kazeiny mleka krowiego, a stanowiącej główny składnik preparatu firmowego o nazwie „Zylkene” do stosowania anksjolitycznego (uspokajającego) i przeciwstresowego u małych zwierząt.

Charakterystyka α_1 -kazeozepiny

Mleku krowiemu przypisuje się wiele atrybutów korzystnych fizjologicznie. Należy do nich działanie gastroprotekcyjne u szczerów z owrzodzeniem wywołanym stosowaniem różnych innych produktów mlecznych, w tym śmietany z pełnego mleka czy śmietanki zebranej z mleka (4). Według mądrości ludowej spożywanie mleka ułatwia zasypianie i działa uspokajająco. Już ponad 60 lat temu opisano, że dorośli wykazywali większą tendencję do nieprzerwanego snu po spożyciu mleka z płatkami kukurydzianymi (5). Elektroencefalograficznie stwierdzono, że sen starych ludzi jest dłuższy i rzadziej przerywany po spożyciu kaszy z mlekiem przed snem, a działanie mleka jest skuteczniejsze po jego każdym kolejnym stosowaniu. Ten wynik mógłby być związany z reakcją warunkową na mleko, która u ludzi utrzymuje się od dzieciństwa (6).

Białka mleka są syntetyzowane przez samice ssaków dla karmienia potomstwa.

Działanie kazein, oprócz tego że są źródłem azotu dla noworodków, są ciągle dyskutowane, ponieważ wiele prac z ostatnich 15 lat wykazało, że ich hydroliza enzymatyczna uwalnia peptydy aktywne o różnych właściwościach biologicznych (7, 8). Główne peptydy to opioidy peptydowe i ich antagoniści, inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro), kazeinofosfopeptydy (CPP) transportujące jony metali (Ca^{2+} , Mg^{2+} i Fe^{2+}) i mikroelementów (Zn, Se), peptydy mitogenne, peptydy przeciwbakteryjne oraz inhibitory proteaz pozostające jako motywy strukturalne w nieaktywnych sekwencjach białek macierzystych mleka (3, 4).

Ich role fizjologiczne są często domniemane i jak większość tych właściwości określono je w eksperymentach *in vitro*. Tym niemniej, peptydy opioidowe zidentyfikowano *in vivo* w dwunastnicy świnki morskiej po spożyciu mleka krowy (7), w przewodzie pokarmowym dorosłego człowieka po spożyciu mleka (9), w osoczu nowo narodzonych cieląt po pierwszym przyjęciu mleka matki (10) oraz w osoczu ciężarnych lub karmiących matek (11). Zwiększoną aktywność inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę stwierdzono po spożyciu sfermentowanego mleka zawierającego te peptydy, co skutkowało zmniejszeniem ciśnienia krwi u szczurów dotkniętych genetycznym nadciśnieniem (12). Podanie 95 ml mleka sfermentowanego, zawierającego około 1,2 do 1,6 mg tych peptydów, w ciągu doby zmniejszyło ciśnienie skurczowe chorego z nadciśnieniem o 14,9 mmHg, a rozkurczowego o 8,8 mmHg (13).

Dane te pozwoliły na określenie tego, czy właściwości uspokajające i przeciwlękowe mleka powodowane są właśnie przez te peptydy. Z drugiej strony związki hamujące funkcję receptora kwasu gamma-aminomasłowego (GABA_{A} -ergicznego) związanego z kanałem chlorkowym struktur nerwowych, takie jak pochodne β -karboliny, powodują takie efekty farmakologiczne, jak: lęk i drgawki (14, 15). Benzodiazepiny (BDA) lub barbiturany nasilające przekąźnictwo GABA_{A} -ergicznego tych samych struktur nerwowych działają z kolei przeciwlękowo i przeciwdrgawkowo. Zatem, kompleks receptora GABA_{A} pełni ważną rolę w farmakologii, neurochemii oraz patofizjologii lęku i strachu (16, 17). Hamowanie przewodnictwa GABA_{A} -ergicznego wiąże się często z pojawieniem się objawów padaczki, gdyż hamowanie ekspresji podjednostki γ receptora GABA_{A} -ergicznego przez przeciwciała oligonukleotydowe powoduje drgawki rejestrowane elektrograficznie (18). Wykryto też drugie miejsca wiązania benzodiazepin na receptorze GABA_{A} -ergicznym, głównie zlokalizowane w mitochondrium i nazwano je

„obwodowymi miejscami wychwytu BDA”, chociaż stwierdzane są we wszystkich tkankach, w tym również w ośrodkowym układzie nerwowym.

Obwodowe miejsca wychwytu są zaangażowane u samców w steroidogenezę w komórkach Leydiga (18). Leki wiążące się z obwodowymi miejscami wychwytu benzodiazepin w mózgu mogą regulować syntezę neurosteroidów przez komórki glonowe, co z kolei może działać na receptory neuronalne GABA_{A} , modulować aktywność i neuronów i funkcje mózgu (19, 20). Niektóre benzodiazepiny, takie jak 4'-chlorodiazepam (Ro5-4864), wykazują duże powinowactwo do receptorów obwodowych BDA oraz izochinolin, które nie są benzodiazepinami, cechuje wysokiego stopnia wybiórczość do tych receptorów.

Kazeiny jako źródło aktywnych biologicznie peptydów, w tym trypsynowy hydrolizat alfa₁-kazeiny bydlęcej wykazał się nieznaną aktywnością anksjolityczną. Podany doustnie w dawce 3 mg/kg m.c. hamował istotnie występowanie drgawek pokardiazolowych u szczurów (21). Stwierdzono też hamowanie lęku przez hydrolizat, zarówno na modelu testu labiryntowego, jak i na modelu warunkowanego zachowania lękowego (defensywnego) u szczurów. Testowano też powinowactwo izolowanych peptydów z hydrolizatu do receptora typu GABA_{A} . Jedynie jeden peptyd nazwany α -kazozepliną, będący decapeptydem fragmentu 91–100 alfa₁-kazeiny mleka bydlęcej wykazywał powinowactwo do receptora GABA_{A} . *In vitro* peptyd ten wykazał 10 000 razy słabsze powinowactwo do miejsca wiązania benzodiazepiny na receptorze GABA_{A} niż diazepam (Relanium). Chociaż w teście ucieczki przed czynnikiem awersyjnym był on tylko 10-krotnie skuteczniejszym od diazepam. Różnice stwierdzone między aktywnością alfa-kazozepliny *in vitro* a *in vivo* nie mogą być wyjaśnione przez jej działanie na obwodowy typ receptora benzodiazepiny, gdyż alfa-kazozeplina nie ma powinowactwa do tego typu receptora (GABA_{B}). Sekwencja aminokwasów alfa-kazozepliny mogłaby być podobna do sekwencji końcowego węgla polipeptydowego inhibitora wychwytu diazepam, endogennego ligandu, zarówno ośrodkowych GABA_{A} , jak też obwodowych receptorów typu benzodiazepin (21).

Działanie hydrolizatu trypsynowego alfa-kazeiny sprawdzano po stosowaniu go u kotów ze stanami lękowymi. Produkt ten znany jest jako alfa-kazozeplina i opatentowany pod nazwą Zylkene (Ingredia, Arras, Francja). Wykazano, że 56-dniowe stosowanie preparatu u 34 kotów spowodowało statystycznie korzystne zmiany w terapii stanów lękowych, takich jak fobia socjalna. Stosowanie tego decapeptydu istotnie zmniejszyło różne stany lękowe,

takie jak: strach przed nieznanymi, kontakt z osobnikami znanymi, strach ogólny, strach towarzyszący agresji czy zaburzenia autonomiczne (1).

Zaburzenia behawioralne u kotów stają się coraz bardziej zrozumiałe dzięki rozwojowi medycyny. Czasem gatunek ten opisuje się jako bardziej terytorialny niż socjalny. Inni uważają, że koty wykazują złożone interakcje socjalne. Za klasyczny czynnik stresu dla tego gatunku uważa się nieufność do obcych ludzi i niekontrolowaną obecność innych, nieznanych wcześniej kotów.

Koty mogą wykazywać wiele różnych objawów związanych z ich stanem lękowym. Znakowanie terenu moczem, lizanie przymusowe (kompulsywne) i zachowania agresywne są jednymi z najliczniej spotykanych objawów stresu i lęku u kotów. Właściciele kotów są często bardzo wrażliwi na te zachowania i mogą chcieć je leczyć, ale z drugiej strony nie są skłonni do stosowania leków psychotropowych. Wobec tego liczni właściciele preferują niefarmaceutyczne związki biologiczne pochodzenia naturalnego.

Mleko krowie od dawna uznawano za napój o naturalnych właściwościach trankwilizujących. Badania wykazały, że niektóre z peptydów obecnych w mleku mogą mieć działania uspokajające (6). Te uspokajające działania obserwowano u kotów-osesków i sądzono, że mogą być związane ze sposobem trawienia mleka przez noworodki. Wiadomo bowiem, że trypsyna u dzieci jest głównym enzymem trawionym, podczas gdy pepsyna jest bardziej aktywna u dorosłych.

Alfa₁-kazeina jest jednym z ważniejszych białek krowiego mleka. Doświadczenia wstępne wskazały, że wiele peptydów które wchodzi w skład tego białka cechują silne właściwości biologiczne, włączając w nie działania na układy opioidowy i immunologiczny (22).

Hydroliza trypsynowa alfa₁-kazeiny uwalnia decapeptyd, którego budowa strukturalna jest znana. To ukształtowanie pozwala peptydowi na wiązanie się z segmentem receptora typu GABA_{B} , uważanego za odpowiedzialnego za działania anksjolityczne substancji (23).

Pierwsze dowody działania anksjolitycznego alfa-kazozepliny

Klasycznym testem na określanie działania anksjolitycznego u gryzoni jest warunkowane czynnikiem lękowym lub stresowym obronne zagrzebywanie się (CDB). U szczurów unikanie bodźców awersyjnych i czynność zagrzebywania mogą być związane z ich reakcją przeciwlękową. Tym bardziej że zastosowanie anksjolityków znosi ten sposób zachowania zwierząt. Test ten

jest czuły i uważany za różnicujący między działaniami anksjolitycznymi a wpływem na zachowanie ogólne testowanego osobnika. Alfa-kazozepinę zastosowano po raz pierwszy na modelu CDB szczurów i okazało się że jest skuteczniejsza w porównaniu z diazepamem, typowym środkiem przeciwłękowym z grupy benzodiazepin (BDA). Nie zwiększała ona agresywności w odniesieniu do innych osobników w klatce i nie powodowała utraty pamięci czynnej. Takie działania obserwowano po stosowaniu typowych benzodiazepin (24). Podobne wyniki uzyskano u gryzoni w teście labiryntowym, służącym również do oceny domniemanych działań przeciwłękowych środka (25).

Alfa-kazozepinę stosowano u ludzi na modelu lęku ostrego i przewlekłego. Wszystkie obserwacje prowadzono zgodnie z dobrą praktyką lekarską oraz za odpowiednim pozwoleniem komisji etycznej, tak jak tego wymaga postępowanie w ocenie nowego leku. W obu przypadkach test uciskowy zimna i test Stroopa, dwóch dawnych, ale pewnych testów lękowych, stosowanie α -kazozepiny wykazało korzystne, statystycznie istotne działania (26, 27). W oparciu o te wyniki wydaje się logiczne, że zdecydowano badać ten produkt na zwierzętach towarzyszących (psach i kotach), doświadczających często działania różnych czynników powodujących stres.

Działania uspokajające i przeciwstresowe alfa₁-kazozepiny u kotów

Pojawienie się objawów lęku w zaburzeniach behawioralnych u kotów było już dyskutowane (28). Skład grup socjalnych jest dla tego gatunku w danym środowisku bardzo istotny. Zarówno modyfikacje ich obszarów/pól życiowych, jak też środowiska socjalnego mogą być dla nich stresujące i mogą powodować różne stany lękowe, w tym zaburzenia obsesyjno-kompulsywne. Koty wyrażają silne związki z człowiekiem i może u nich występować sam samoistny lęk (29).

Fobia socjalna u kotów jest definiowana jako sytuacja, w której zwierzę ucieka, kiedy człowiek lub inny kot wchodzi na teren zajęty wcześniej przez niego, jest agresywny albo wykazuje objawy związane z pobudzeniem autonomicznym. Fobia socjalna jest jedną z głównych dolegliwości dla właścicieli kotów.

Alfa₁-kazozepina okazała się skuteczna w leczeniu kotów wykazujących lęk w warunkach socjalnego stresu. Koty nią leczone szukały kontaktu zarówno z ludźmi z rodziny właściciela, jak i z osobami obcymi i wykazywały poprawę zarówno w bojaźliwych zachowaniach, jak i towarzyszących im objawach autonomicznych.

Nie zauważono różnic w zachowaniach agresywnych, ale były one niewielkie i materiał doświadczalny zbyt mało liczny. Zmiany w zachowaniu wydawały się pomagać w lepszym opanowaniu lub unikaniu agresji.

Alfa₁-kazozepina jest składnikiem mleka wolnym od laktozy. Stosowanie jej było bezpieczne. Jako produkt pochodzenia naturalnego nie była znana jako lek w Europie. Jej działania stanowią korzystny profil leku dla wielu właścicieli zwierząt. Nie opisano żadnych działań niepożądanych α -kazozepiny towarzyszących stosowaniu benzodiazepin, takich np. jak desinhibicja agresji (1).

Działania przeciwłękowe alfa-kazozepiny u psów

Zaburzenia lękowe u psów stanowią poważny problem kliniczny w weterynaryjnej medycynie behawioralnej. Proponowano różne definicje tych zaburzeń. Ich autoryzują, że zależą one od tego, czy występują one jako jednostka chorobowa, taka jak lęk samoistny (normalny; 30), czy nie (31). Panuje jednak ogólna zgoda co do tego, że stany lękowe są jedną z głównych grup zaburzeń behawioralnych występujących u psów.

Główne przyczyny stanów lękowych u psów mogą być pochodzenia wewnętrznego, jak nierównowaga hormonalna lub predyspozycje genetyczne (32), albo pochodzenia zewnętrznego, takie jak nieodpowiednie warunki bytowania, niezrozumiałe relacje socjalne i niewłaściwe lub niesprawiedliwe kary wymierzane zwierzętom (1).

Opanowywanie lęku, strachu i fobii może wymagać wprowadzenia korekty (zmian) w zachowaniu oraz programu zmniejszającego stres w celu zwiększenia możliwości psów do przeciwstawienia się sytuacjom stresowym. Oprócz terapii behawioralnej w arsenale możliwości zwalczania lęku stosowane są leki, które ułatwiają i przyspieszają wyjście zwierząt z tych stanów. Aktualnie stosowane są liczne anksjolityki należące do różnych grup farmakologicznych leków:

- 1) anksjolityki – β -blokery adrenergiczne, agoniści receptorów α 2-adrenergicznych, morfoliny, benzodiazepiny (BDA);
- 2) środki przeciwdepresyjne – trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TCA), inhibitory specyficzne hamujące wchłanianie zwrotne serotoniny (SSRI), inhibitory oksydazy monoaminowej (MAOI).

Oprócz przedstawicieli typowych grup leków stosuje się substancje, które nie są zaliczane do leków *par excellence*. Stanowią je:

- 1) feromony – związki uspokajające psy, stosowane dla poprawy stanów lękowych głównie w trakcie rozwoju choroby (33);
- 2) suplementy diety (nutraceutyki) zwane przez niektórych żywnością funkcjonalną, łączące w swoim działaniu wartości odżywcze oraz cechy środków farmaceutycznych. Są one skuteczne zwłaszcza w stanach przewlekłych i stosowane przez około 60 dni.

Alfa-kazozepina została przetestowana w laboratoriach naukowych na modelach klasycznych lęku u szczurów (test warunkowanej ucieczki, testy labiryntowe; 25) oraz w różnych warunkach wywołujących stres u człowieka (27). Związek ten okazał się już bardzo skuteczny w znoszeniu lęku u kotów chorych na fobie socjalne (1).

Alfa-kazozepina pochodzi z alfa_{-s1}-kazeiny mleka. Budową przestrzenną przypomina GABA. Jest decapeptydem otrzymanym z α -s₁-kazeiny mleka na drodze hydrolizy trypsynowej. Cechuje się wysokim powinowactwem do receptorów benzodiazepinowych, będących fragmentem większej całości receptorów GABA-ergicznych, zwłaszcza do podgrupy receptora GABA_A (1). Wielu właścicieli zwierząt jest niechętnych stosowaniu u swych pupilów leków psychotropowych. Obawiają się uzależnienia od tych leków, mimo że niewiele z omawianych farmaceutyków ma właściwości potencjalnie uzależniające, a prawie żaden z nich, jeśli jest stosowany w dawkach terapeutycznych. Właściciele często wołają, gdy lekarz proponuje substancje pochodzenia naturalnego. Substancje te muszą być tak samo skuteczne. Dane co do skuteczności alfa-kazozepiny (Zylkene) oparte są na dowiadzeniach klinicznych i dają podstawę praktykującemu lekarzowi do stosowania jej w leczeniu lęku u zwierząt towarzyszących.

Beata ze wsp. (1) opisali skuteczność alfa-kazozepiny w leczeniu stanów lękowych u kotów, w badaniach w których porównywano jej skuteczność w porównaniu do placebo. Wyniki te można transponować na psy. Wstępne prace wykazały obiecujące działania alfa-kazozepiny w znoszeniu lęku u psów. Ze względów etycznych zastosowano model porównawczego przez 56 dni w dawce 15 mg/kg m.c./24 h *per os* z działaniami leku kontrolnego, jakim była selegilina stosowana *per os* w dawce 0,5 mg/kg m.c./24 h również przez 56 dni, na grupie 38 psów z zaburzeniami lękowymi. Stwierdzono tak samo skuteczne działanie przeciw lękowe stosowanej alfa-kazozepiny, jak i selegiliny. Ocena pozytywnego działania leku przez właścicieli leczonych zwierząt była statystycznie istotna. Biorąc pod uwagę skuteczność leku w postaci preparatu Zylkene, bezpieczeństwo jego stosowania i brak działań niepożądanych, można go

polecić jako alternatywny lek do leczenia stanów lękowych u psów i kotów. Należy jednakże pamiętać o równoległym prowadzeniu modyfikacji zachowania zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Beata C., Beaumont-Graff E., Coll V., Cordel J., Marion M., Massal N., Marlois N., Tauzin J.: Effect of alpha-casozepine (Zylkene) on anxiety in cats. *J. Vet. Behav.* 2007, **2**, 40–46.
2. Dial E.J., Romero J.J., Lichtenberger L.M.: Gastroprotection by dairy foods against stress induced ulcerogenesis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 1995, **40**, 2295–2299.
3. Darewicz M., Iwaniak A., Minkiewicz P.: Biologicznie aktywne peptydy pochodzące z białek mleka. *Med. Weter.* 2014, **70**, 348–352.
4. Meisel H.: Chemical characterization and opioid activity of an orxorphin isolated from *in vivo* digest of casein. *FEBS Lett.* 1986, **196**, 223–227.
5. Clare D.A., Swaisgood H.E.: Bioactive milk peptides: a prospectus. *J. Dairy Sci.* 2000, **83**, 1187–1195.
6. Brezinowa V., Oswald L.: Sleep after a bedtime beverage. *Br. Med. J.* 1972, **811**, 431–433.
7. Meisel H.: Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 1997, **43**, 119–128.
8. Udenigwe C.C., Aluko R.E.: Food-protein derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.* 2012, **71**, R11–R24.
9. Svedberg J., De Haas J., Leimenstoll P., Paul F., Teschemacher H.: Demonstration of β -casomorphins immunoreactive materials in *in vivo* digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adults humans. *Peptides* 1985, **6**, 825–830.
10. Umbach M., Teschemacher H., Praetorius K., Hirschhäuser R., Bostedt H.: Demonstration of a β -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regul. Pept.* 1985, **12**, 223–230.
11. Koch G., Wiedermann K., Drebes E., Zimmermann W., Think G., Teschemacher H.: Human β -casomorphin-8 immunoreactive materials in the plasma of women during pregnancy and after delivery. *Regul. Pept.* 1988, **20**, 107–117.
12. Yamamoto N., Akino A., Takano T.: Antihypertensive effect of peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 1994, **77**, 917–922.
13. Bütikofer U., Meyer J., Sieber R., Wlather B., Wechsler D.: Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptide Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *J. Dairy Sci.* 2008, **91**, 29–38.
14. File S., Lister R.G., Nutt D.J.: The anxiogenic action of benzodiazepine antagonists. *Neuropharmacol.* 1982, **21**, 1033–1037.
15. Dorow R., Horowski R., Paschelke G., Amin M.: Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* 1983, **2**, 98–99.
16. Biggio G., Concas A., Corda M.G., Giorgio O., Sanna E., Serra M.: GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacol. Ther.* 1990, **48**, 121–142.
17. Luddens H., Korpi E.R.: Biological function of GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity. *J. Psychiatr. Res.* 1995, **29**, 77–94.
18. Papadopoulos V., Mukhin A.G., Costa E., Krueger K.E.: The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**, 3772–3779.
19. Papadopoulos V., Guarneri P., Krueger K.E., Guidotti A., Costa E.: Pregnenolone biosynthesis in C6 glioma cell mitochondria: regulation by a diazepam binding inhibitor mitochondrial receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, **89**, 5113–5117.
20. Papadopoulos V.: Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr. Rev.* 1993, **14**, 222–240.
21. Miclo L., Perrin E., Driou A., Papadopoulos V., Boujard N., Vanderesse R., Boudier J.F., Desor D., Linden G., Gaillard J.L.: Characterization of α -casozepine, a tryptic peptide from bovine α_s -casein with benzodiazepine-like activity. *FASEB J.* doi: 10.1096/fj.00–0685fj. Publ. online June 8, 2001
22. Sakaguchi M., Koseki M., Wakamatsu M., Matsumura E.: Effects of beta-casomorphin-5 on passive avoidance response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003, **67**, 2501–2504.
23. Lecouvey M., Frochet C., Miclo L., Orlewski P., Driou A., Linden G., Gaillard J.L., Marraud M., Cung M., Vanderesse R.: Two-dimensional H-NMR and CD structural analysis in a micellar medium of a bovine alpha-s1 casein fragment having benzodiazepine-like properties. *Eur. J. Biochem.* 1997, **248**, 872–878.
24. Schroeder H., Violle N., Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Nejdí A., Demagny B., Desor D.: Effects of ING-911, a tryptic hydrolysate from bovine milk alpha-S1 casein on anxiety of Wistar male rats measured in the conditioned defensive burying (CDB) paradigm and the elevated plus maze test. *Behav. Pharmacol.* 2003, **14**, S1–S31.
25. Violle N., Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Desor D., Nejdí A., Demagny B., Schroeder H.: Ethological comparison of the effects of a bovine alpha(s1)-casein tryptic hydrolysate and diazepam on the behavior of rats in two models of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006, **84**, 517–523.
26. Lanoir D., Canini F., Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Demagny B., Martin S., Bourdon L.: Long term effects of a bovine milk alpha-s1 casein hydroxylate on healthy low and high stress responders. *Stress* 2002, **5**, 124.
27. Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Desor D., Demagny B., Boudron L.: Effects of a tryptic hydroxylate from bovine milk alpha(S1)-casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situation. *Eur. J. Nutr.* 2005, **44**, 128–132.
28. Kania B.F.: *Fizjologia i farmakoterapia zaburzeń behawioralnych u psów i kotów*. Wyd. Wieś Jutra, Warszawa 2005, s. 137–148.
29. Schwartz S.: Separation anxiety syndrome in dogs and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003, **222**, 1028–1033.
30. Overall K.L.: *Clinical behavioral medicine for small animals*. Mosby, St. Louis, MO 1997, s. 209–212.
31. Mege C., Beata C., Beaumont-Graff E., Diaz C., Habran T., Marlois N., Muller G.: *Pathologie comportementale du chien*. Masson-Pmca, Paris, France 2003, s. 277–279.
32. Tancer M.E., Stein M.B., Bessette B.B., Uhde T.W.: Behavioral effects of chronic imipramine treatment in genetically nervous pointer dogs. *Physiol. Behav.* 1990, **1**, 179–181.
33. Vienet-Legue D.: *Evaluation de l'effet d'un collier DAP sur le comportements de chiots (Canis familiaris) lors de leur séjour en animalerie et après adoption. Etude randomisée en groupes parallèles contre placebo*. Unpublished Memoire pour le diploma de veterinaire comportementaliste: Ecole Nat. Vet. D'Alfort, 2006, s. 30.