

# **Untersuchungen zur Histaminkonzentration im Plasma als Stressindikator bei Hunden**

Konstanze Knies

Aus dem Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. M. H. Erhard

Angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. M. H. Erhard

**Untersuchungen zur Histaminkonzentration im Plasma als  
Stressindikator bei Hunden**

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

von  
Konstanze Knies  
aus  
Saarbrücken

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. M. H. Erhard

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

**Für meine Eltern**

## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	III
1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATURÜBERSICHT .....	3
2.1 Histamin – Stoffwechsel und Funktionen.....	3
2.1.1 Histaminstoffwechsel.....	3
2.1.1.1 Stoffklasse und Synthese.....	3
2.1.1.2 Speicherung und Freisetzung.....	3
2.1.1.3 Abbau .....	4
2.1.2 Histaminrezeptoren.....	5
2.1.3 Funktionen von Histamin im Organismus .....	6
2.1.3.1 Allgemeine Funktionen von Histamin .....	6
2.1.3.2 Funktionen von Histamin im zentralen Nervensystem .....	7
2.1.3.3 Funktionen von Histamin im peripheren Nervensystem.....	8
2.1.4 Histaminkonzentration im Plasma.....	8
2.2 Mastzellen – Funktionen und Aktivierung .....	9
2.2.1 Vorkommen, Einteilung und Funktionen von Mastzellen .....	9
2.2.2 Aktivierung von Mastzellen .....	12
2.2.2.1 Immunologische Aktivierung von Mastzellen.....	12
2.2.2.2 Nicht immunologische Aktivierung von Mastzellen .....	12
2.3 Interaktionen zwischen Nerv und Mastzelle.....	13
2.3.1 Interaktionen zwischen Nerv und Mastzelle im peripheren Nervensystem.....	13
2.3.2 Interaktionen zwischen Nerv und Mastzelle im zentralen Nervensystem .....	17
2.4 Stressbedingte Mastzellaktivierung.....	18
2.4.1 Definitionen für Stress .....	18
2.4.2 Definitionen für Stressoren .....	18
2.4.3 Stressbedingte Histaminausschüttung.....	19
2.4.3.1 Hungerstress .....	21
2.4.3.2 Auswirkungen von Stress auf den Magen-Darmtrakt.....	22
2.4.3.3 Histaminfreisetzung bei körperlicher Arbeit .....	24
2.4.3.4 Histaminfreisetzung durch Umwelteinflüsse.....	26
2.5 Kortisol als Stresshormon .....	26
2.6 Weitere hormonelle Auswirkungen von Stress.....	27

2.7 Zusammenhang zwischen Histamin und Kortisol.....	28
2.8 Bedeutung der Literatur für die eigenen Untersuchungen.....	29
3 PUBLIKATIONEN.....	30
3.1 Seite 31-36.....	
Knies K, Erhard MH, Ahrens F. ....	
Effect of moderate stress on plasma histamine concentration in laboratory dogs. ....	
Inflammation Research 2005; accepted.....	
3.2 Seite 37-42.....	
Ahrens F, Knies K, Schneider M, Köhler F, Erhard MH. ....	
Influence of different training and outdoor conditions on plasma histamine and cortisol concentrations in search-and-rescue dogs. ....	
Inflammation Research 2005; accepted.....	
4 DISKUSSION.....	43
4.1 Blutentnahme als möglicher Auslöser für Stress bei Hunden.....	45
4.2 Histamin- und Kortisolkonzentration im Plasma von Laborhunden.....	47
4.2.1 Tagesprofil.....	47
4.2.2 Hungerstress.....	48
4.2.3 Umweltstress.....	49
4.3 Histamin- und Kortisolspiegel bei Rettungshunden im Training.....	50
4.4 Schlussbetrachtung.....	53
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	55
6 SUMMARY.....	57
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	59
DANKSAGUNG.....	

**VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN**

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
C	Komplement
Ca	Kalzium
CRF	Corticotropin Releasing Factor
CTMC	Connective Tissue Type Mast Cell
CGRP	Calcitonin Gene-Related Protein
DAO	Diaminoxidase
ECL	Enterochromaffin-like
FcεRI	tetramerer high-affinity Fc Rezeptor für IgE
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
H (X)	Histaminrezeptoren der Klasse X
HDC	Histidindecaboxylase
H-H-NNR-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HNMT	Histamin N-Methyltransferase
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
Mg	Magnesium
MMC	Mucosal Type Mast Cell
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium Chlorid
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Neurokinin
NT	Neurotensin
PAF	Platelet-Activating Faktor
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGD2	Prostaglandin D2
POMC	pro-Opiomelanocortin
RMCP II	Rat Mast Cell Protease II
SCF	Stem Cell Factor
SD	Standard Deviation
SEM	Standard Error of Means
SP	Substanz P

TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	Vasointestinal Peptide

## 1 EINLEITUNG

Um eine Stresssituation bei Tieren beurteilen zu können, sind objektive physiologische Parameter unabdingbar. Gerade bei der Versuchstierhaltung müssen die Haltungsbedingungen und der Umgang mit den Tieren so stressarm wie möglich gestaltet werden. Dies ist nicht nur aus Gründen des Tierschutzes ein wichtiges Anliegen. Stress beeinflusst physiologische Regelmechanismen und kann dadurch die Ergebnisse einer Studie verändern und ihren wissenschaftlichen Wert mindern.

Neben dieser Besonderheit, die sich bei der Haltung von Versuchstieren ergibt, stellt sich auch bei Gebrauchshunden die Frage, wann Stress die Leistungsfähigkeit der Tiere beeinflusst. Rettungshunde können nur dann ihre Aufgabe erfüllen, wenn sie optimal auf ihren Einsatz vorbereitet werden. Ein Training, das die Tiere überfordert, ist wenig effektiv und verringert in letzter Konsequenz die Überlebenschancen der vermissten Personen.

Es sind verschiedene Stressparameter bekannt, die durch klinische Untersuchungen oder aus biologischen Flüssigkeiten gemessen werden können. Herz- und Atemfrequenz, Körpertemperatur, Immunstatus, Blutbild und einige „Stresshormone“ wie Katecholamine und Glukokortikoide werden zu diesem Zweck herangezogen. Bei Hunden wird Kortisol in Schüben freigesetzt und unterliegt, zumindest in bestimmten Altersgruppen, zirkadianen Schwankungen. Die Nebennierenrinde reagiert zu verschiedenen Tageszeiten unterschiedlich sensibel auf eine Stresseinwirkung. Diese Umstände erschweren die Interpretation von Kortisolwerten bei Stressuntersuchungen.

Histamin ist als klassischer Entzündungsmediator bekannt, es übernimmt aber auch wesentliche regulative Funktionen im zentralen Nervensystem. In den letzten Jahren wurden immer mehr Beweise dafür gefunden, dass Histamin in Stresssituationen freigesetzt wird. Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, dass Mastzellen, die einer der größten Histaminspeicher im Körper sind, durch periphere Nerven aktiviert werden können. Eine psychische Stresssituation kann über die Interaktion zwischen Nerven- und Mastzelle zu einer Ausschüttung von Mastzellmediatoren führen. Dies ist Gegenstand der Forschung, weil zahlreichen Krankheitsbildern, wie z.B. Morbus Crohn, Asthma und Migräne, bei denen Mastzellen aktiviert werden, eine psychosomatische Komponente zugeschrieben wird.

Bei Ratten führt nicht nur massiver Stress, wie Immobilisierung, sondern auch moderater Stress wie „gentle handling“, zu einem signifikanten Anstieg der Histaminkonzentration im Plasma. Für Hunde sind in der Literatur keine entsprechenden Daten verfügbar. Daher sollte in der vorliegenden Studie der Einfluss moderater Stresssituationen im Alltag (3.1) sowie im Training von Rettungshunden (3.2) auf die Histaminkonzentration im Plasma untersucht werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Histamin – Stoffwechsel und Funktionen

#### 2.1.1 Histaminstoffwechsel

##### 2.1.1.1 Stoffklasse und Synthese

Histamin [2-(4-imidazolyl)ethylamin] wurde erstmals 1907 von Windaus und Vogt synthetisiert (MASLINSKI, 1975a). Im Körper entsteht Histamin, das zur Stoffklasse der biogenen Amine gehört, durch Decarboxylierung der Aminosäure L-Histidin. Dieser Vorgang wird durch die L-Histidindecarboxylase (HDC, EC 4.1.1.22), die von dem Kofaktor Pyridoxal-5'-phosphat abhängig ist, vermittelt (MASLINSKI, 1975a; BARNES, 2001). WERLE (1936) beschrieb als erster ein Enzym im Gewebe von Säugetieren mit der Fähigkeit, Histidin zu decarboxylieren. Die HDC ist im Organismus weit verbreitet, sie kommt in einer ganzen Reihe von Zellen vor, dazu gehören Mastzellen, Hautzellen, Thrombozyten, basophile Granulozyten und Tumorzellen (RANGACHARI, 1992).

L-Histidin ist die einzige Aminosäure, die einen Imidazolring enthält. Dieser Ring muss dem Organismus zugeführt werden, da tierische Gewebe nicht in der Lage sind, ihn selbst zu synthetisieren. Allerdings kann der Organismus andere Imidazolverbindungen verwerten, so dass zumindest beim ausgewachsenen Tier Histidin nicht als essentielle Aminosäure anzusehen ist (MASLINSKI, 1975a). L-Histidin kann außer von der Histidindecarboxylase auch von der L-dopa Decarboxylase umgesetzt werden (RANGACHARI, 1992). OHTSU et al. (2001) gelang es, HDC defiziente Mäuse zu züchten. Diese Tiere können kein Histamin aus Histidin synthetisieren, weisen einen Histaminmangel und weniger, sowie morphologisch veränderte, Mastzellen auf.

##### 2.1.1.2 Speicherung und Freisetzung

Synthese und Speicherung von Histamin finden vor allem in Mastzellen und basophilen Granulozyten (BARNES, 2001), enterochromaffinen Zellen (RANGACHARI, 1998) und histaminergen Neuronen (WATANABE et al., 1983, 1984; PANULA et al., 1984) statt.

Außerdem wird Histamin von eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten (MASLINSKI, 1975b) sowie von dendritischen Zellen und T-Zellen gespeichert (JUTEL et al., 2002).

Verschiedene immunologische und nicht immunologische Stimuli, wie z.B. Allergene, Immunglobulin E (IgE), Zytokine (Interleukin (IL) 1, IL 3, IL 8, Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)), Substanz P (SP), Komplement C3a und C5a, Platelet-Activating Factor (PAF), Hyperosmolarität, physikalische Stimuli (Vibration, Kälte, Hitze), induzieren die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und Basophilen (BACHERT, 2002). Das in den Mastzellgranula gespeicherte Histamin kann auf zwei Wegen freigesetzt werden: zytolytisch und nicht zytolytisch. Bei der zytolytischen Freisetzung wird die Plasmamembran zerstört, der Prozess ist energieunabhängig, benötigt kein intrazelluläres Kalzium, und wird von einem „Auslaufen“ der zytoplasmatischen Bestandteile begleitet. Im Gegensatz dazu ist die nicht-zytolytische oder sekretorische Freisetzung energieabhängig, benötigt intrazelluläres Kalzium und bedingt keinen Verlust von Zytoplasmabestandteilen (RANGACHARI, 1992).

### 2.1.1.3 Abbau

Die grundsätzlichen Vorgänge, die bei der Degradierung von Histamin eine Rolle spielen, wurden um 1950 vor allem durch die Arbeiten von Schayer aufgeklärt. Die Diaminoxidase (DAO, EC 1.4.3.6) katalysiert die Umsetzung von Histamin zu Imidazol-Essigsäure, die schließlich mit dem Urin ausgeschieden wird (MASLINSKI, 1975b; BARNES, 2001). Ein potenter Inhibitor des früher als Histaminase bezeichneten Enzyms ist die Verbindung Aminoguanidin (MASLINSKI, 1975b).

Die Diaminoxidase wird hauptsächlich von den Darmepithelien gebildet und kontinuierlich in die *Lamina propria* der Darmschleimhaut abgegeben. Dort bindet sie an die Basalmembranen der Kapillaren. Von hier aus erreicht die DAO den Blutstrom, um schließlich an Endothelzellen zu binden (WOLLIN et al., 1998). Heparin erhöht die Diaminoxidasekonzentration im Plasma erheblich, vermutlich indem es das Enzym von seinen extrazellulären Bindungsplätzen verdrängt (WOLLIN et al., 1998).

Schayer entdeckte in den fünfziger Jahren eine weitere Möglichkeit des Histaminabbaus, die Methylierung durch die Histamin N-Methyltransferase (HNMT, EC 2.1.1.8). Die HNMT ist hochspezifisch für Histamin (MASLINSKI, 1975b) und setzt den Großteil des freigesetzten

Histamins (50-80 %) zu N-Methylhistamin um, das seinerseits von Monoaminoxidasen zu N-Methylimidazol-Essigsäure, dem wichtigsten Histamin-Metaboliten im Urin, verstoffwechselt wird (BARNES, 2001). Der Abbau von Histamin durch die HNMT erfolgt in nahezu allen Geweben (MASLINSKI, 1975b).

Nur ein geringer Teil (2-3 %) des freigesetzten Histamins wird unverändert ausgeschieden. Es existieren aber noch einige andere Möglichkeiten des Histaminabbaus, z.B. Azetylierung, Inkorporation in Nukleotide und Fixierung an Blutproteine (MASLINSKI, 1975b).

### 2.1.2 Histaminrezeptoren

Vier Klassen von Histaminrezeptoren (H) sind heute bekannt: H1 (ASH und SCHILD, 1966), H2 (BLACK et al., 1972), H3 (ARRANG et al., 1983) und H4 (NAKAMURA et al., 2000). Bei allen handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. H1 und H2 werden von vielen Zellarten exprimiert, z.B. von Nervenzellen, von Zellen der glatten Muskulatur der Atemwege und der Gefäße, Hepatozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen sowie von T- und B-Zellen (JUTEL et al., 2002).

Histaminwirkung an H1 Rezeptoren vermittelt viele Effekte, die bei klassisch allergischen Geschehen eine Rolle spielen, so z.B. Vasodilatation, Hautrötung und Pruritus (BACHERT, 2002).

Über die Aktivierung von H2 Rezeptoren wird in erster Linie die Magensäureproduktion aus den Parietalzellen der Magenschleimhaut gesteigert. H2 Rezeptoren steuern aber auch die erhöhte Mukussekretion und die Relaxation der glatten Muskulatur in den Atemwegen (BACHERT, 2002).

H3 Rezeptoren konnten in fast allen Geweben nachgewiesen werden, u.a. auf Neuronen, enterischen Ganglien, parakrinen Zellen und Immunzellen (POLI et al., 2001). ARRANG et al. (1987) zeigten erstmals, dass Histamin im Gehirn nicht nur seine Freisetzung, sondern auch seine eigene Synthese über H3 Rezeptoren regulieren kann. Außerdem hemmt Histamin über die Aktivierung von H3 Rezeptoren die Azetylcholin-Freisetzung aus intestinalen cholinergen Nerven (POLI et al., 1991), und H3 Rezeptoren spielen eine Rolle in der Autoregulation der Histaminausschüttung in der *Medulla oblongata* (KANAMARU et al., 1998). OHKUBO et al.

(1994) stellen die These auf, dass Mastzellen H3-Rezeptoren besitzen könnten, über die Histamin seine eigene Freisetzung bei neurogenen Entzündungen beeinflusst.

H4 Rezeptoren sind zu ca. 40 % homolog mit H3 Rezeptoren, kommen allerdings nicht im Gehirn vor (NAKAMURA et al., 2000) und befinden sich vor allem auf hämatopoetischen Zellen, wie Neutrophilen, Eosinophilen und T-Helferzellen, Basophilen und Mastzellen (JUTEL et al., 2002). Über H4 Rezeptoren wird u.a. die Chemotaxis von Mastzellen zu Histamin vermittelt (HOFSTRA et al., 2003).

## **2.1.3 Funktionen von Histamin im Organismus**

### **2.1.3.1 Allgemeine Funktionen von Histamin**

Die Effekte von Histamin bei entzündlichen Vorgängen werden über Histaminrezeptoren auf Basophilen, Mastzellen, Neutrophilen, Eosinophilen, Lymphozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen vermittelt (BACHERT, 2002). Nach einer Mastzellaktivierung bewirkt das freigesetzte Histamin vor allem über H1 Rezeptoren eine Vasodilatation, sowie einen Anstieg der Gefäßpermeabilität (GOTTWALD et al., 1998). Über H1 Rezeptoren wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zu einer Kontraktion der F-aktin Fasern im Zytoskelett von Endothelzellen und damit zur Bildung von Spalten in den postkapillären Venulen und zum Austritt von Makromolekülen führt (BACHERT, 2002). In Abhängigkeit von seiner Konzentration und der Stimulation von H1 oder H2 Rezeptoren steigert oder reduziert Histamin verschiedene Entzündungsreaktionen (BACHERT, 2002). Die Aktivität von Eosinophilen, T-Helfer (Th)2 Lymphozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen wird von Histamin direkt gesteigert (BACHERT, 2002).

KAHLSON und ROSENGREN (1968) mutmaßten, dass Histamin an Prozessen der Zellproliferation beteiligt sein könnte. Eine Funktion von Histamin bei Prozessen des Tumorwachstums wurde von RIVERA et al. (1993) vermutet. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse von WANG et al. (2000) untermauert. Diese Forschergruppe konnte zeigen, dass Histamin über H2 Rezeptoren MAP-Kinasen (MAP = Mitogen Activated Protein) aktiviert. Die MAP-Kinase-Signalketten sind in die Regulierung der Protoonkogene *c-fos* und *c-jun* involviert. BRANDES et al. (1998) wiesen nach, dass Histamin über Bindung an mikrosomales Zytochrom

P450 und die dadurch vermittelte Genmodulation in die Steuerung des Zellwachstums eingreifen kann.

Eine Beteiligung von Histamin an Zelldifferenzierung und Embryonalentwicklung wurde von NISSINEN und PANULA (1991) und von KARLSTEDT et al. (2001) postuliert. Weiterhin ist Histamin an der Wundheilung (BAIRY et al., 1991) und an der Hämatopoese beteiligt (DY et al., 1986).

### **2.1.3.2 Funktionen von Histamin im zentralen Nervensystem**

Seitdem sich herausgestellt hatte, dass klassische Antihistaminika, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, eine sedierende Komponente haben, war es naheliegend, dass Histamin wichtige Funktionen im zentralen Nervensystem (ZNS) haben müsste. Man ging zunächst davon aus, dass Histamin als eine Art Wachmacher fungiert (MONNIER et al., 1970). PANULA et al. (1984) gelang zeitgleich mit der japanischen Forschergruppe um WATANABE (1983,1984) der erste Nachweis eines histaminergen Neuronensystems im Gehirn.

Der tuberomamilläre Nukleus, der ein Bestandteil des Hypothalamus ist, wurde als der einzige Sitz von histaminergen Neuronen identifiziert (PANULA et al., 1984). Von dort aus ziehen histaminerge Projektionen in verschiedene Bereiche des ZNS. H1, H2 und H3 Rezeptoren konnten im Gehirn nachgewiesen werden (MARTINEZ-MIR et al., 1990). Dabei reguliert der H3 Rezeptor über einen Feedback-Mechanismus die Histaminbildung und Histaminausschüttung in den histaminergen Neuronen (MORISSET et al., 2000). H1 und H2 Rezeptoren haben eine exzitatorische Wirkung auf die Neuronen und damit auf die gesamte Hirnaktivität (HAAS und PANULA, 2003).

Da Histamin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann muss alles im Gehirn befindliche Histamin vor Ort synthetisiert worden sein (MASLINSKI, 1975a). Histamin übernimmt im ZNS wichtige regulative Funktionen, die das Verhalten betreffen. So wird das Schlaf-Wachverhalten, die Temperaturregulation, die Nahrungsaufnahme und das Gleichgewicht des Energiehaushaltes, das Trinkverhalten und die osmotische Homöostase, Lokomotion, Lernvorgänge und Gedächtnisbildung durch Histamin mitbeeinflusst (KRALY, 1983; ROSSI et al., 1998; MORIMOTO et al., 2001; HAAS und PANULA, 2003). Das histaminerge Neuronensystem im

ZNS moduliert den Grad des Schmerzempfindens (HOUGH et al., 2004) und greift regulativ in kardiovaskuläre Mechanismen ein (BEALER, 1999).

### **2.1.3.3 Funktionen von Histamin im peripheren Nervensystem**

Histamin stimuliert sympathische Ganglien (TRENDELENBURG, 1954; IORIO und MCISAAK, 1966; BREZENOFF und GERTNER, 1972), depolarisiert chromaffine Zellen der Nebenniere und setzt Katecholamine aus den chromaffinen Zellen frei (STASZEWSKA-BARCZAK und VANE, 1965; DOUGLAS et al., 1967). PANULA et al. (1985) konnten mit immunhistochemischen Verfahren zeigen, dass Histamin außer in Mastzellen auch in peripheren Nerven und endokrinen Zellen lokalisiert ist. Histamin enthaltende subepitheliale Nervenfasern konnten sowohl im Darm von Ratten als auch bei Meerschweinchen gefunden werden. Bei der Ratte konnten Histamin-immunoreaktive Zellen in den Drüsen des Ileums und Jejunums nachgewiesen werden (PANULA et al., 1985).

### **2.1.4 Histaminkonzentration im Plasma**

Im Blutplasma, bei einem pH von 7,4, liegt Histamin überwiegend in ionisierter Form vor (MASLINSKI, 1975a). Histamin ist im Blut größtenteils an zelluläre Elemente gebunden. Unter physiologischen Bedingungen enthält menschliches Plasma sehr geringe Histaminmengen. In der Literatur werden Werte zwischen 4,5 und 49,5 nmol/l genannt (MASLINSKI, 1975b). Basophile und eosinophile Granulozyten enthalten den Großteil des im Blut vorkommenden Histamins. Während beim Menschen die Basophilen das wichtigere Histamin-Depot darstellen, sind es beim Hund eher die Eosinophilen (MASLINSKI, 1975b). Auch Blutplättchen enthalten Histamin (MASLINSKI, 1975b).

LORENZ et al. (1974) ermittelten die Histaminkonzentration in caninem Plasma. Dabei wurden mediane Werte von 1,8 nmol/l gemessen. Mehr als 50 % der gemessenen Werte lagen unter der Sensitivitätsgrenze der Methode, die bei 0,9 nmol/l lag. In der Literatur werden außerdem für canines Plasma Werte von  $3,6 \pm 2,7$  nmol/l (LORENZ et al., 1973),  $45,0 \pm 3,6$  nmol/l (MULDOON et al., 1984),  $9,9 \pm 0,9$  nmol/l (SILVERMAN et al., 1986) und  $2,7 \pm 1,8$  nmol/l (KITOH et al., 2001) genannt (alle Werte: MW  $\pm$  SEM).

Die spontane Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten liegt bei gesunden Menschen bei höchstens 10 % der gesamten Histaminfreisetzung (AKAGI und TOWNLEY, 1989). Es konnte keine Beziehung zwischen der spontanen Histaminfreisetzung und Zellzerstörung oder Zelltod hergestellt werden (AKAGI und TOWNLEY, 1989).

## **2.2 Mastzellen – Funktionen und Aktivierung**

### **2.2.1 Vorkommen, Einteilung und Funktionen von Mastzellen**

Vor über 100 Jahren entdeckte Paul Ehrlich die Mastzellen (EHRlich, 1879). Da sich diese Zellen mikroskopisch durch zahlreiche metachromatisch anfärbbare Granula auszeichnen, und es sich nach Ehrlichs Meinung um „gemästete“ Bindegewebszellen handelte, nannte er sie Mastzellen. In ihren Granula enthalten Mastzellen eine ganze Reihe präformierter Mediatoren wie Histamin, Heparin und Proteasen, die infolge einer Mastzellaktivierung freigesetzt werden (ROBBIE-RYAN und BROWN, 2002).

Mastzellen kommen ubiquitär im Bindegewebe und in den Schleimhäuten vor, besonders an inneren und äußeren Grenzflächen, z.B. Haut, Atmungs- und Gastrointestinaltrakt (KUBE et al., 1998). Im ZNS sind sie in den Leptomeningen, dem Hypothalamus, dem Thalamus und den Habenula ebenso präsent wie in der *Dura mater* des Rückenmarks (JOHNSON und KRENGER, 1992).

Im Gegensatz zu anderen granulierten Zellen entwickeln sich Mastzellen erst nach der Auswanderung ins Gewebe aus zirkulierenden CD 34+ Vorläuferzellen (hämatopoetische Stammzellen, die durch das CD 34 Antigen identifiziert werden). Das erklärt auch, weshalb sich bei gesunden Individuen keine Mastzellen in der Zirkulation befinden, obwohl Mastzellen aus dem Knochenmark stammen und zu ihren Zielorten in allen gesunden, vaskularisierten Geweben wandern müssen (BOYCE, 2004). Entwicklung, Überleben, Proliferation und funktionelle Charakteristika der Mastzelle werden durch spezifische Faktoren aus Zellen des umgebenden Gewebes (Stem Cell Factor, Nerve Growth Factor, Th2 -Zytokine wie IL 3 und IL 4) beeinflusst (KITAMURA et al., 1978; KITAMURA und GO, 1979; MATSUDA et al., 1991).

Bei Nagern werden die Mastzellen in zwei Haupttypen, Bindegewebsmastzellen (Connective Tissue Type Mast Cell, CTMC) und Mukosamastzellen (Mucosal Type Mast Cell, MMC)

eingeteilt (ENERBÄCK, 1966a, 1966b). Die Unterscheidung wird aufgrund der Art der möglichen Fixierung, der Lokalisation, der spezifischen Proteasen und Proteoglykane und des Verhaltens während parasitärer und allergischer Erkrankungen durchgeführt (NOLI und MIOLO, 2001).

Beim Mensch werden drei Formen von Mastzellen unterschieden: Mastzellen, die nur Tryptase enthalten (MCT) und den MMC entsprechen; Mastzellen, die Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase und Cathepsin G enthalten (MCTC) und den CTMC entsprechen; und Mastzellen, die in unterschiedlichen Geweben vorkommen und Chymase und Carboxypeptidase enthalten (MCC; NOLI und MIOLO, 2001). Diese Heterogenität wurde auch bei caninen und felines Mastzellen festgestellt (NOLI und MIOLO, 2001). Die zur Differenzierung herangezogenen proteolytischen Enzyme Tryptase und Chymase ähneln den beim Mensch isolierten Enzymen (KUBE et al., 1998). Allerdings ist die Typisierung von Mastzellen anhand ihrer spezifischen Ausstattung mit Proteoglykanen und Proteasen kritisch zu betrachten, da nachgewiesen werden konnte, dass diese Profile präzise reguliert werden und sich schnell verändern können (BAUER und RAZIN, 2000).

Bei Hunden und Katzen wurde die Mastzellmorphologie am besten an Hautmastzellen untersucht. Beide Spezies haben eine große Population von Mastzellen in der Haut, bei denen es sich zu 70 % um MCTC handelt (COLBATZKY et al., 1991). Diese befinden sich vor allem in der Dermis und sind, wie bei anderen Spezies auch, anatomisch eng an Nervenendigungen und Gefäße gebunden (NOLI und MIOLO, 2001).

Die sezernierten Mediatoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Amine und proteolytische Enzyme) können nicht nur nah am Ort ihrer Freisetzung sondern auch an entfernteren Zellen, wie zirkulierenden Leukozyten oder angrenzenden Keratinozyten, wirken (NOLI und MIOLO, 2001).

Das Peptid Laminin könnte dafür verantwortlich sein, dass CTMC häufig in enger Nachbarschaft zur Basalmembran von Endothelzellen und Nerven, die Laminin exprimieren, anzutreffen sind. Mastzellen besitzen Laminin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, was nahe legt, dass dieses Peptid die Bewegungsrichtung von Mastzellen beeinflusst (GOTTWALD et al., 1998). Außerdem bewirken Stem Cell Factor, IL 1, IL 4 und IL 10 und Stoffe aus der Familie der Chemokine eine chemotaktische Anziehung von Mastzellen (GOTTWALD et al., 1998).

Das Vorkommen von Histamin in Mastzellen ist seit den Untersuchungen von RILEY und WEST (1953) bekannt. Mastzellen geben ihre gespeicherten Mediatoren nicht nur vollständig durch Degranulation und Exozytose ab, sie können auch definierte Mengen durch Sekretion freisetzen (BAUER und RAZIN, 2000). Die Regeneration der entleerten Granula erfolgt sowohl durch Endozytose der abgegebenen Mediatoren, als auch durch Synthese neuer Mediatoren (DVORAK, 1997).

Die Anzahl der Mastzellen pro Gramm Haut beim Hund wird von DE MORA et al. (1993) mit  $2,31 \pm 0,21 \times 10^5$  angegeben, was 1 % aller kutanen Zellen entspricht. Der absolute Histamingehalt pro Mastzelle betrug  $4,93 \pm 0,39$  pg. LORENZ et al. (1969) fanden die höchsten Histaminkonzentrationen entlang des Verdauungstraktes des Hundes in Magen, Duodenum und Gaumenmandeln, die niedrigsten in Pankreas, Schilddrüse, Gallenblase, Schleimhaut des harten Gaumens und der Maulhöhle. Die höchste Mastzellendichte lag ebenfalls in der Magenschleimhaut vor. Aus der signifikanten Korrelation zwischen Histamingehalt und Mastzellendichte schlossen LORENZ und Kollegen, dass Histamin nahezu ausschließlich in Mastzellen vorkommt. Als errechneter Histamingehalt pro Mastzelle wurde in dieser Studie ein Wert von  $3,7 \pm 0,8$  pg genannt.

Zu den klassischen immunologischen Funktionen der Mastzellen zählen ihre Beteiligung an der allergischen Sofortreaktion und an IgE vermittelten allergischen Reaktionen (GOTTWALD et al., 1998). Mastzellen übernehmen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität gegen Bakterien (ECHTENACHER et al., 1996; MALAVIYA et al., 1996) und der erworbenen Immunität gegen Parasiten (RUITENBERG und ELGERSMA, 1976). Weiterhin können Mastzellen über parakrine Sekretion zur lokalen Regulation vieler endokriner Drüsen, wie z.B. Ovar und Nebenniere beitragen (HINSON et al., 1989; KRISHNA et al., 1989).

## **2.2.2 Aktivierung von Mastzellen**

### **2.2.2.1 Immunologische Aktivierung von Mastzellen**

Die klassische IgE abhängige Mastzellaktivierung beginnt mit der Bindung eines Allergens an membrangebundenes Immunglobulin E (IgE), das an den tetrameren high-affinity Fc Rezeptor für IgE (FcεRI), der auf Mastzellen exprimiert wird, gebunden ist (BOYCE, 2004). Cross-linkage der FcεRI führt über eine Kaskade von Reaktionen zur Aktivierung der Mastzellen, die daraufhin zwei unterschiedliche Klassen von Mediatoren freisetzen: präformierte Mediatoren, die in Granula gespeichert sind, wie Tumor Nekrose Faktor-α, IL 4, Histamin, Heparin, Serotonin, Kinine und Proteasen, sowie neu synthetisierte Mediatoren wie IL 1-8, 12, 13, 15, 16, Chemokine, Wachstums- und Angiogenesefaktoren, darunter Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Prostaglandine und Leukotriene (BAUER und RAZIN, 2000; ROBBIE-RYAN und BROWN, 2002).

### **2.2.2.2 Nicht immunologische Aktivierung von Mastzellen**

Mastzellen können durch Komplementfaktoren, Mikroben, Leukotriene sowie durch verschiedene Neuropeptide aktiviert werden (BAUER und RAZIN, 2000; BOYCE, 2004). Weitere Stimuli sind zahlreiche physikalische, chemische und mechanische Einwirkungen (z.B. Trauma, Sonnenlicht, Kälte, Hitze; SOTER und WASSERMAN, 1980; NOLI und MIOLO, 2001). Diese Reize agieren durch eine direkte Beeinflussung der Mastzellmembran oder indirekt über die Stimulation lokaler sensorischer Nervenendigungen (NOLI und MIOLO, 2001). Neuropeptide wie SP, NGF (Nerve Growth Factor), CGRP (Calcitonin Gene-Related Protein) können eine Degranulation der Mastzellen bewirken (NOLI und MIOLO, 2001).

## **2.3 Interaktionen zwischen Nerv und Mastzelle**

### **2.3.1 Interaktionen zwischen Nerv und Mastzelle im peripheren Nervensystem**

Periphere Nerven müssen bestimmte anatomische und funktionelle Voraussetzungen erfüllen, um eine Interaktion mit Zielzellen zu ermöglichen. Die Nervenendigungen müssen sich in nächster Nähe der Zielzellen befinden, Botenstoffe müssen als Folge einer Stimulation des Nerven freigesetzt werden, und auf den Zielzellen müssen spezifische Rezeptoren vorhanden sein, die ihre Wirkung über second messenger Systeme entfalten (GOTTWALD et al., 1998). Dabei werden nicht zwingend klassische Synapsen oder Membrankontakte zwischen Nerv und Zielzelle ausgebildet. Statt dessen werden Neurotransmitter in sekretorischen Vesikeln gespeichert und aus ihnen freigesetzt. Diese sekretorischen Vesikel befinden sich in Varikositäten der präterminalen Axone von sensorischen und autonomen Nerven. Sie enthalten eine ganze Reihe von Neuropeptiden wie, z.B. SP, Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), Somatostatin, CGRP (GOTTWALD et al., 1998).

Eine Interaktion zwischen Mastzellen und Nerven wurde in den letzten Jahren nachgewiesen. So werden z.B. nach einer Gewebsverletzung afferente Nerven stimuliert und setzen ihre Mediatoren frei, um benachbarte Zellen zu beeinflussen (GOTTWALD et al., 1998), aber auch ein emotionaler Reiz bedingt einen Stimulus, der durch autonome Nerven an primäre afferente sensorische Nerven weitergeleitet wird. Diese geben den Reiz weiter, so dass es zu einer Freisetzung verschiedener Neurotransmitter aus den sensorischen Nervenendigungen kommt, die eine Mastzelldegranulation auslösen (BLACK und GARBUTT, 2002).

STEAD et al. (1987) konnten zeigen, dass sich Mastzellen in der Darmschleimhaut von Ratten sehr häufig (67-87 %) in Kontakt oder enger Nachbarschaft mit peptidergen unmyelinisierten Nerven befinden. Bei 4-8 % dieser Assoziationen kommen wirkliche Membran-zu-Membran Kontakte vor, bei denen die Axone eine vesikuläre Struktur aufweisen, die für peptiderge Nerven typisch ist. In diesen Vesikeln sind Substanz P oder andere Neuropeptide gespeichert (STEAD et al., 1987).

Tabelle 1:

Hinweise für mögliche Mastzell-Nerv Interaktionen in verschiedenen Geweben. Gottwald et al. (1998) stellten entsprechende Hinweise aus der Literatur zusammen.

Gewebe	Spezies	Nerventyp/Neurotransmitter
Haut	Mensch Schwein	NF SP, CGRP
Darmschleimhaut	Mensch Ratte	Ach? Ach, SP, CGRP
Atemwege	Ratte	SP, CGRP, VIP, PHI, NPY, NSE
Leber	Ratte	unmyelinisiert
Tränendrüse	Ratte	SP, CGRP
Synovia	Ratte	adrenerg, peptiderg
Urether	Mensch	unmyelinisiert

(Ach: Acetylcholine; NF: Neurofilament; PHI: Peptide Histidine Isoleucine; NPY: Neuropeptide Y; NSE: Neuron-Specific Enolase)

Substanz P bewirkt *in vitro* eine Histaminfreisetzung aus peritonealen Mastzellen bei der Ratte (ERJAVEC et al., 1981). SUZUKI et al. konnten 1999 erstmals eine direkte Kommunikation zwischen Nerv und Mastzelle *in vitro* zeigen, und die Bedeutung von Substanz P als wichtigem Mediator in dieser Kommunikation nachweisen. Substanz P ist ein Dekapeptid, dass wie Neurokinin A und Neurokinin B zur Familie der Tachykinine gehört (CARRASCO und VAN DE KAR, 2003). Akuter Stress führt zu einer Freisetzung von Substanz P aus den Luftwegen von Meerschweinchen, chronischer Stress dagegen reduziert die Gewebespiegel von Substanz P (ABE et al., 1992). Mastzellen bilden Rezeptoren für Substanz P und andere Neuropeptide aus (BLACK und GARBUTT, 2002).

In peripheren Nerven sind Entzündungsmediatoren enthalten: Prostaglandine, vor allem Prostaglandin F<sub>2</sub>α, werden vermutlich in sympathischen Nervenendigungen als Reaktion auf adrenerge Stimulation synthetisiert; Corticotropin Releasing Factor (CRF) ist sowohl in

sympathischen als auch in sensorischen Nerven anzutreffen, Substanz P ist in autonomen Nerven und Ganglien präsent. Zytokine, v.a. IL 6, wurden in sensorischen und autonomen Nerven nachgewiesen (BLACK und GARBUTT, 2002).

In der Haut ist Substanz P der klassische Mediator der Abwehrtrias, die aus Ödem, Erythem und Juckreiz besteht. Substanz P wird aus sensorischen Neuronen freigesetzt und vermittelt ihre Wirkung über zwei verschiedene Ansätze. Erstens über einen mastzellabhängigen Weg, bei dem über die auf Mastzellen ausgebildeten NK1-Rezeptoren (Neurokinin-Rezeptoren) die Freisetzung von Histamin und TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ ) bewirkt wird. Durch Aktivierung von H1-Rezeptoren auf der glatten Muskulatur der Gefäße wird daraufhin eine Vasodilatation hervorgerufen. Auf dem zweiten, mastzellunabhängigen Weg, üben Substanz P oder Neurokinin A ihre vasodilatatorischen Effekte direkt über NK1-Rezeptoren auf Endothelzellen aus (BAUER und RAZIN, 2000).

Das Zusammenwirken zwischen Neuropeptiden und Mastzellen wird durch den Abbau der Neuropeptide beendet. Die Neuropeptide werden zwar durch Pinozytose und über rezeptorvermittelte Endozytose wieder aufgenommen, generell werden im Organismus Agonisten allerdings bevorzugt durch deren enzymatische Spaltung deaktiviert. Mastzell-Tryptase und -Chymase sind beide in der Lage, SP, Neurokinin A und B, CGRP und VIP effizient abzubauen (BAUER und RAZIN, 2000). Daher sind Spekulationen über eine Beteiligung von Mastzellproteasen an diesem Vorgang naheliegend.

Verschiedene Mastzellpopulationen zeigen offenbar eine differenzierte Sensitivität gegenüber Neuropeptiden. BISCHOFF et al. (2004) zeigten, dass humane Darmmastzellen *in vitro* weder auf Substanz P noch auf Neurokinin A und B, CGRP, VIP und Serotonin mit einer Mediatorfreisetzung reagieren. Die Forschergruppe um BISCHOFF (2004) konnte auch nachweisen, dass diese spezielle Mastzellpopulation keine Tachikinin Rezeptoren NK-1 und NK-2 exprimiert.

MCKAY und BIENENSTOCK (1994) stellten die Hypothese auf, dass das Zusammenwirken von Mastzellen und Nerven als „homöostatische Einheit“ eine wichtige Rolle in der Regulation der physiologischen Abläufe und der Reaktion auf Antigen im Darm spielt. Die enterischen Mastzellen agieren als Antigen- oder sensorische Rezeptoren, die Informationen aus ihrem direkten Umfeld an die umgebenden peripheren Nerven weitergeben. Das Ergebnis dieser

Kommunikation kann entweder eine Veränderung der Funktion des Nervs und die Induktion eines axonalen Reflexes als Reaktion auf das Antigen sein, oder eine Modifikation der Mastzellfunktion, oder eine Weitergabe dieser Information an das ZNS. Auch in der Haut werden Mastzellen als Bestandteil eines axonalen Reflexes gesehen (GOTTWALD et al., 1998). Die Tatsache, dass sowohl Mastzellen als auch Nervenzellen Substanz P und Histamin freisetzen können, wird von MCKAY und BIENENSTOCK (1994) als Indiz dafür gesehen, dass autokrine und parakrine Kontrollmechanismen zwischen diesen beiden Zellarten bestehen.

Neuere Untersuchungen erbrachten Beweise für eine bidirektionale Kommunikation zwischen Mastzelle und Nerv. In Lunge, Milz und in der *Dura mater* von Ratten konnte eine solche Kommunikation zwischen Mastzellen und primären sensorischen Nervenfasern nachgewiesen werden, und die Existenz einer lokalen Feedback-Schleife zwischen Neuron und Mastzelle über H3 Rezeptoren auf den Nervenfasern wurde aufgezeigt (DIMITRIADOU et al., 1994, 1997). Durch die Regulation der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wird das Ausmaß der Entzündungsreaktion kontrolliert. Während eines entzündlichen Prozesses kommt es zu einer Zunahme der Innervation und der Mastzellichte (STEAD, 1992). Dabei nähern sich Substanz P enthaltende primäre sensorische Neuronen räumlich an Mastzellen an (MCKAY und BIENENSTOCK, 1994).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit einer möglichen Wechselwirkung zwischen dem Neurotransmitter Azetylcholin und Mastzellaktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass Histamin im Ileum von Meerschweinchen eine Azetylcholinfreisetzung induziert (RUBINSTEIN und COHEN, 1985). BANI-SACCHI et al. (1986) vermuteten eine mögliche Wirkung von Azetylcholin auf Mastzellen, da eine elektrische Stimulierung von Mastzellen durch Atropin und Tetrodotoxin unterdrückt werden konnte. Sowohl die Zugabe von exogenem Histamin als auch eine Mastzellaktivierung durch ein elektrisches Feld bewirkten *in vitro* eine Azetylcholinfreisetzung aus dem Darm von Meerschweinchen (JAVED und COOKE, 1992). Humane und murine Mastzellen exprimieren verschiedene Isoformen des Enzyms Azetylcholinesterase, das durch den Abbau von Azetylcholin die Reizübertragung im synaptischen Spalt beendet. Dies weist auf eine weitere Kommunikationsmöglichkeit zwischen Mastzellen und Nervenzellen hin (NECHUSHTAN et al., 1996).

### 2.3.2 Interaktionen zwischen Nerv und Mastzelle im zentralen Nervensystem

Bilaterale elektrische Stimulation der zervikalen *Nn. vagi* bei Ratten führt zu einem gesteigerten Histamingehalt in MMCs im Jejunum. Die gemessenen Serum-Histaminwerte steigen insgesamt an. Diese Ergebnisse belegen, dass das ZNS an der Regulation der Funktionen der intestinalen MMCs beteiligt ist (GOTTWALD et al., 1995).

Die *Nn. vagi* führen parasympathische und afferente Anteile zwischen dem Hirnstamm und dem Gastrointestinaltrakt. Die afferenten Fasern sind zum Teil peptiderg. Da eine direkte Innervation der Jejunalschleimhaut durch afferente, nicht aber durch efferente Fasern nachgewiesen wurde, spekuliert die Forschergruppe um GOTTWALD, dass afferente Fasern für die Stimulation der MMCs zuständig sind. Allerdings schließen sie auch einen efferenten stimulierenden Effekt, der über post-ganglionäre parasympathische Neuronen in den enterischen Ganglien vermittelt sein könnte, nicht aus. Auch die Möglichkeit, dass afferente Fasern Mastzellen aktivieren und sympathische Nerven diesen Effekt hemmen, wird in Erwägung gezogen (GOTTWALD et al., 1995).

Einen Hinweis auf die Beteiligung des ZNS bei der Aktivierung von Mastzellen gibt eine Versuchsanordnung von SANCHEZ-LEDESMA et al. (1990). Bei Hunden wurde das Rückenmark im distalen Thoraxbereich elektrisch stimuliert. In den Hintergliedmaßen stieg die Konzentration des Neuropeptids VIP um durchschnittlich 33 % und die von Histamin um 26 % im arteriellen bzw. 29 % im venösen Blut an, verglichen mit den entsprechenden Konzentrationen in den Vordergliedmaßen, die von der Stimulation nicht betroffen waren (SANCHEZ-LEDESMA et al., 1990).

Eine durch Konditionierung erlernte Freisetzung von Histamin wurde von RUSSELL et al. (1984) gezeigt. Meerschweinchen wurden gleichzeitig mit einem immunologischen Reiz und einem bestimmten Geruch konfrontiert, um eine Konditionierung zu bewirken. Die konditionierten Tiere reagierten auf den Geruch allein mit einem Anstieg der Histaminkonzentration im Plasma. In dieser Versuchsanordnung wurde die zelluläre Quelle des freigesetzten Histamins nicht bestimmt. MAC QUEEN et al. (1989) wiesen nach, dass Mastzellen über einen klassisch konditionierten (Pawlov'schen) Stimulus zur Degranulation gebracht werden können. Zur Konditionierung wurde ein audiovisueller Reiz mit einem unkonditionierten immunologischen Stimulus gepaart. Die Mastzelldegranulation wurde

gemessen, indem das für MMC spezifische Enzym Rat Mast Cell Protease II (RMCP II) im Serum bestimmt wurde. Nach abgeschlossener Konditionierung zeigten die Tiere, die nur dem konditionierten Stimulus ausgesetzt wurden, einen Anstieg der RMCP II Konzentration, der sich nicht signifikant vom dem der Gruppe unterschied, die gleichzeitig dem konditionierten und dem unkonditionierten Stimulus ausgesetzt wurde.

## **2.4 Stressbedingte Mastzellaktivierung**

### **2.4.1 Definitionen für Stress**

Hans Selye definiert Stress als die unspezifische Antwort des Körpers auf jede Art von Bedrohung (SELYE, 1976). Die sogenannte Stressantwort besteht aus der Ausschüttung verschiedener Hormone wie Adrenokortikotropes Hormon (ACTH), Kortisol bzw. Kortikosteron, adrener Katecholamine, Oxytozin, Prolaktin und Renin (VAN DE KAR und BLAIR, 1999). Ziel der Stressantwort ist es, die Überlebenschancen des Organismus zu erhöhen. Stress kann auch als ein Zustand gefährdeter Homöostase definiert werden, der durch das Einwirken eines psychischen, umweltbedingten oder physiologischen Stressors entsteht (BLACK und GARBUTT, 2002). Stress ist ein interner oder externer Stimulus, der die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde Achse und das sympathische Nervensystem aktiviert und dadurch eine physiologische Veränderung oder Adaptation auslöst, so dass der Organismus die Gefahr bewältigen kann (MAIER und WATKINS, 1998).

### **2.4.2 Definitionen für Stressoren**

VAN DE KAR und BLAIR (1999) definieren Stressoren als Bedingungen, die das Überleben eines Individuums gefährden oder von denen das Individuum annimmt, dass sie es gefährden könnten. Die Autoren teilen Stressoren grob in drei Kategorien ein:

- Psychische Stressoren, die auf einer erlernten Reaktion auf eine bevorstehende unangenehme Situation basieren, wie z.B. Angst, oder ein neues und damit unkontrollierbares Umfeld.
- Stressoren, die aus einem physischen Stimulus bestehen und eine starke psychische Komponente enthalten (z.B. Schmerz, Immobilisierung).
- Stressoren, die das kardiovaskuläre Gleichgewicht bedrohen wie z.B. Blutverlust, Training, Hitze.

### 2.4.3 Stressbedingte Histaminausschüttung

Die japanische Forschergruppe HUANG et al. (1998, 1999a, 1999b) erforschte intensiv die Vorgänge der stressbedingten Histaminausschüttung. Sie beobachtete als Reaktion auf Stress (sogenannter „water immersion stress“: Ratten wurden in einem Stahlnetz fixiert, und bis zum Xiphoid für 6 Stunden in Wasser eingetaucht) einen zweiphasigen Histaminanstieg. Der Plasma-Histaminspiegel stieg in den ersten 15 min der Stresseinwirkung um das vierfache. Danach fiel er auf einen Level, der zweimal so hoch war wie der Histaminspiegel der Kontrollgruppe, und blieb während der gesamten Zeit der Stresseinwirkung auf diesem Niveau. Der Histamingehalt in der Haut sank nach 15 min Stress um 20 %, was auf eine Mastzelldegranulation in der Haut und den Übertritt des dabei freigesetzten Histamins ins Blut hinweist (HUANG et al., 1998). Durch den Einsatz mastzelldefizienter Mäuse (Ws/Ws Mäuse die keine CTMC ausbilden) konnten HUANG et al. (1998) nachweisen, dass das bei Stress freigesetzte Histamin überwiegend aus Mastzellen stammt.

Um die Beteiligung sensorischer Nerven an der stressbedingten Histaminausschüttung nachzuweisen, wurde neugeborenen Ratten Capsaicin injiziert. Als ausgewachsene Tiere weisen diese Ratten einen deutlich verringerten Substanz P Gehalt in sensorischen Nerven auf. Nach Stress durch Immobilisierung zeigten die mit Capsaicin vorbehandelten Tiere einen deutlich geringeren Anstieg des Plasma-Histaminspiegels als die Kontrollgruppe (HUANG et al., 1999b). In einer weiteren Versuchsanordnung wurde die Histaminkonzentration in einem aus der Rattenpfote gewonnenen Mikrodialysat gemessen. Elektrische Stimulation des Ischiasnerves erhöhte die Histaminfreisetzung im subkutanen Gewebe der Pfote signifikant, Vorbehandlung mit Capsaicin verhinderte diesen Anstieg (HUANG et al., 1999b). Eine Capsaicin-Injektion in die Pfote führte zu einer lokalen, dosisabhängigen Histaminfreisetzung ins subkutane Gewebe (HUANG et al., 1999b). Da Capsaicin die Freisetzung von Substanz P, nicht aber von Histamin auslöst, postulierten HUANG et al. (1999b), dass Stress über eine Aktivierung von sensorischen Nerven zu einer Substanz P Freisetzung aus diesen Nerven führt, und darüber die Histaminfreisetzung aus Mastzellen veranlasst wird.

Ein häufig verwendetes Stressmodell ist die Immobilisierung der Tiere. Dabei werden die Versuchstiere in unterschiedlichen Vorrichtungen (Plexiglas, Drahtgitter) zwangsweise fixiert. Immobilisierung führt bei Ratten zu einem maximalen Histaminanstieg im Plasma auf das 2.6-fache nach 5-minütiger Stresseinwirkung (HUANG et al., 1999a). Stress durch zwangsweise

Fixierung steigert bei Ratten den Histaminspiegel im Serum und führt zu einer Degranulation von Mastzellen im Herzen (HUANG et al., 2002). EUTAMENE et al. (2003) beobachteten bei diesem Stressmodell bei Ratten eine Zunahme des Histamingehalts in Kolonmastzellen ohne Anzeichen einer Degranulation. Weiterhin stellten LYTINAS et al. (2003) fest, dass diese Art von Stress den CRF Gehalt und die Gefäßdurchlässigkeit der Haut von Ratten erhöht und zu einer Degranulation von Hautmastzellen führt. Akuter und chronischer Immobilisierungsstress bei Ratten führte nach Zugabe von Substanz P zu einer verstärkten Histaminausschüttung aus Kolonepithelien *in vitro*. Die Menge der Histaminausschüttung zeigte dabei keinen Unterschied zwischen akutem und chronischem Stress (BRADESI et al., 2002a).

In der Harnblase von Ratten bewirkt Stress durch Immobilisierung eine signifikante Zunahme der Mastzelldegranulation und einen signifikanten Anstieg des Histaminspiegels im Urin. (ALEXACOS et al., 1999; BOUCHER et al., 2002). Dieser Vorgang wird durch das Neuropeptid Neurotensin (NT) vermittelt. In der Harnblase kann ebenso wie in Darm und Haut ein enger anatomischer Zusammenhang zwischen Mastzellen und Nerven beobachtet werden (ALEXACOS et al., 1999).

Der oben beschriebene Immobilisierungsstress, gerade auch in Kombination mit der Einwirkung von Wasser oder Kälte, ist ein sehr potenter Stressor. Solche Versuchsanordnungen werden u.a. zur experimentellen Genese von Magenulzera verwendet. Aber auch subtilerer Stress wie „gentle handling“ über eine Minute führt zu einem signifikanten Anstieg des Plasma-Histaminspiegels um das 1,9-fache nach 15 Minuten (HUANG et al., 1999a). Handling-Stress, der erzeugt wird, indem die Ratte für 15 Minuten leicht in der Hand gehalten wird, führt zu einem etwa 300-fachen Anstieg der extrazellulären Histaminkonzentration in der Hirnrinde von Ratten, gemessen durch Mikrodialyse. Dieses Histamin ist zu 80 % neuronalen Ursprungs (WESTERINK et al., 2002). Auch milder Umweltstress (Unterbringung in einem Raum, der regelmäßig von vielen Personen betreten wird) bewirkt bei Ratten eine Degranulation von MMC in der Darmschleimhaut (WILSON und BALDWIN, 1999).

$\beta$ -Endorphin könnte ein verantwortlicher Mediator für die stressbedingte Degranulation von Mastzellen sein. Stress führt zu einem Anstieg der Plasmaspiegel der endogenen Opiate, besonders von  $\beta$ -Endorphin, das an die Opiodrezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen binden und eine Degranulation auslösen kann (CASALE et al., 1984). Im testikulären Interstitium und in der Haut von Ratten, die Kälte ausgesetzt wurden, zeigt sich eine

Mastzelldegranulation. Behandlung mit  $\beta$ -Endorphin führt ebenfalls zu einer Einwanderung von Mastzellen ins Hodengewebe und zu ihrer Degranulation, allerdings weniger ausgeprägt als nach der Stresseinwirkung (TUNCEL et al., 1996). Aus dem veränderten Färbeverhalten der Mastzellgranula konnte geschlossen werden, dass Stress den Histamingehalt in den Mastzellgranula erhöht und den Heparin Gehalt verringert (TUNCEL et al., 1996).

Bei miteinander kämpfenden männlichen Mäusen wird Histamin freigesetzt (DE SIMONE et al., 1990). Nerve Growth Factor (NGF), der in den Speicheldrüsen adulter männlicher Mäuse gespeichert ist, wird in den Blutkreislauf freigesetzt und bewirkt eine Degranulation von peritonealen Mastzellen und dadurch einen Anstieg der Histaminkonzentration in der peritonealen Flüssigkeit (DE SIMONE et al., 1990). Dekapitation führt bei Ratten zu einem maximalen Histaminanstieg im Plasma um das zehnfache (HUANG et al., 1999a).

Auch dem sympathischen Nervensystem wird eine Rolle bei der Freisetzung von Histamin zugeschrieben. Offensichtlich sind noradrenerge und histaminhaltende Neuronen an der Ausbildung einer peripheren Reflexschleife beteiligt, bei der neuronales Histamin hemmend auf die sympathische Aktivität einwirkt (CAMPOS und DOMINGUEZ, 1995). Außerdem wird eine gesteigerte sympathische Aktivität infolge von Stress („footshock stress“) von einem Anstieg des Histaminspiegels im Blut begleitet, der wiederum von der Aktivierung postganglionärer sympathischer Neuronen abhängt (CAMPOS und MONTENEGRO, 1998). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass als ein generelles kompensatorisches Phänomen neuronales Histamin reflexbedingt während gesteigerter sympathischer Aktivität freigesetzt zu werden scheint (CAMPOS und DOMINGUEZ, 1995; CAMPOS und MONTENEGRO, 1998).

#### **2.4.3.1 Hungerstress**

Bei Meerschweinchen konnte nachgewiesen werden, dass Stress durch Hungern und durch das Beobachten der Fütterung von Nachbartieren den Histaminanstieg als Reaktion auf einen konditionierten Stimulus (Schwefelgeruch) signifikant verstärkt (IRIE et al., 2002). Der Hungerstress wirkte hier in der Phase der Konditionierung ein. Die Tiere erhielten im Gegensatz zur Kontrollgruppe nach der Inhalation des unkonditionierten Stimulus (Ovalbumin), der massive Atembeschwerden auslöste, kein Futter als Belohnung und mussten der zweiten Gruppe beim Fressen zusehen. Der Schwefelgeruch erzeugte bei allen Tieren nach Abschluss der

Konditionierung einen signifikanten Histaminanstieg. Dieser fiel bei der Hungergruppe signifikant höher aus als bei der Kontrollgruppe (IRIE et al., 2002).

#### 2.4.3.2 Auswirkungen von Stress auf den Magen-Darmtrakt

Akute Stresseinwirkung ruft Abnormalitäten der Sekretions- und Transportvorgänge im Dünndarm von Mensch und Ratte hervor (BARCLAY und TURNBERG, 1987; KILIAAN et al., 1998). Mehrere Studien bei Ratten haben gezeigt, dass Stress die Magenentleerung verlangsamt, die Motilität des distalen Kolons erhöht und die Passage durch den Dünndarm reduziert (BRADESI et al., 2002a).

In der Literatur gibt es einige Hinweise darauf, dass Mediatorfreisetzung aus Mastzellen eine wichtige Rolle bei der Reaktion der Darmepithelien auf akute Stresseinwirkung spielt. Der transepitheliale Transport von Makromolekülen und die sekretorische Aktivität im Jejunum werden unter Stresseinwirkung gesteigert (KILIAAN et al., 1998; SANTOS et al., 2000). Diese Effekte sind vermutlich mastzellvermittelt, da sie bei mastzelldefizienten Ratten nicht beobachtet werden können (SANTOS et al., 2000).

Mastzellen kommen im Magen-Darm-Trakt vor allem in der *Lamina propria* der Mukosa und in der Submukosa vor (YU und PERDUE, 2001). Sie befinden sich in engem Kontakt mit den intrinsischen (enterischen) und extrinsischen Nervenfasern der verzweigten Plexus, die die Darmschleimhaut innervieren (STEAD et al., 1987). Verschiedene Beobachtungen geben Hinweise auf eine Beteiligung von Mastzellen an den durch Stress ausgelösten pathophysiologischen Vorgängen in der Darmschleimhaut. Eine Stimulation des *N. vagus* führt zur Histaminausschüttung aus Mastzellen im Ileum von Ratten (BANI-SACCHI et al., 1986). Es wird heute angenommen, dass Histamin normale Verdauungs- und Transportprozesse des Darms unterdrückt (MCKAY und BIENENSTOCK, 1994). Außerdem scheint es zu einer erhöhten Wassersekretion im Darm zu führen, und dadurch die Auswaschung eines Antigens aus dem Darmlumen zu ermöglichen (MCKAY und BIENENSTOCK, 1994). Die Wirkung von Histamin auf die glatte Muskulatur im Darm hängt von der Spezies und der Darmregion ab, der generelle Effekt ist aber eine Kontraktion (PANULA et al., 1985).

Für bestimmte Stressmodelle („water avoidance stress“) konnte nachgewiesen werden, dass CRF im Gehirn freigesetzt wird (BONAZ und TACHE, 1994). Dieses Neuropeptid ist in der Lage,

unidirektional die Blut-Hirn-Schranke vom Hirn in die Peripherie zu passieren und dort einzuwirken (MARTINS et al., 1997). Weitere Studien zeigten, dass peripher appliziertes CRF eine sehr ähnliche Reaktion wie akuter Stress an der Kolonschleimhaut hervorruft. Diese Reaktion ist mastzellvermittelt (SANTOS et al., 1999). Mastzellen besitzen CRF-Rezeptoren und können durch Zugabe von exogenem CRF zur Degranulation gebracht werden (THEOHARIDES et al., 1995). Deshalb stellten SANTOS et al. (2000) die Hypothese auf, dass MMC entweder direkt über CRF oder indirekt über Neuropeptide aktiviert werden, die wiederum als Folge CRF-vermittelter Prozesse freigesetzt werden.

Zunehmend werden Beweise dafür erbracht, dass das ZNS über ein komplexes Zusammenspiel zwischen dem enterischen Nervensystem und dem Immunsystem Einfluss auf die Darmfunktion nimmt (BRADESI et al., 2002a). Stress durch Immobilisierung aktiviert via CRF Mastzellen im Ileum und in der Kolonschleimhaut von Ratten und bewirkt so eine gesteigerte Muzinsekretion (CASTAGLIUOLO et al., 1996; THEOHARIDES et al., 1999). WILSON und BALDWIN (1999) konnten nachweisen, dass auch milder Umweltstress eine Degranulation von MMC in der Darmschleimhaut bewirkt.

Kälteschmerz, ausgelöst durch das Eintauchen der menschlichen Hand in 4 °C kaltes Wasser, ruft *in vivo* einen signifikanten Anstieg der luminalen Freisetzung von Mastzellmediatoren (Histamin, Tryptase, Prostaglandin D<sub>2</sub>) und der Wassersekretion im menschlichen Jejunum hervor. Dieser Anstieg tritt in den ersten 15 min der Stresseinwirkung ein, hält die gesamten 30 min der Stresseinwirkung an und geht innerhalb der ersten 15 min nach Ende der Stresseinwirkung auf das ursprüngliche Niveau zurück (SANTOS et al., 1998). Physische und psychische Stressoren verändern bei Mensch und Tier die jejunale Wasser- und Ionenabsorption, was vermuten lässt, dass es sich um eine allgemeine Folge von verschiedenen Arten von Stress handelt (BARCLAY und TURNBERG, 1987; BARCLAY und TURNBERG, 1988; EMPEY und FEDORAK, 1989; SAUNDERS et al., 1994). Studien an mastzelldefizienten Mäusen haben eindeutig belegt, dass Mastzellen zu den neuronal bedingten sekretorischen Reaktionen des Darms beitragen (PERDUE, 1991). Daraus kann geschlossen werden, dass das ZNS über nervale Beeinflussung von Mastzellen den intestinalen Wassertransport regeln kann (SANTOS et al., 1998).

KREIS et al. (1998) untersuchten die Histaminempfindlichkeit afferenter Nerven im Darm von Ratten. Eine Applikation von Histamin bewirkte einen biphasischen Anstieg der nervalen

Aktivität, der von einem Abfall des arteriellen Blutdrucks und einem Anstieg des Drucks im Darm begleitet wurde. Diese Ergebnisse dienen als Anhaltspunkt dafür, dass Histamin über H1 Rezeptoren an der Kommunikation zwischen Mastzellen und afferenten Nerven im Dünndarm beteiligt sein könnte.

Endogene Opiate sind ebenfalls an der Pathogenese stressbedingter Dysfunktionen des Darms beteiligt. Während der Einwirkung von Kälteschmerz wurden erhöhte  $\beta$ -Endorphinspiegel gemessen (STANGHELLINI et al., 1984). Der hemmende Effekt von Kälteschmerz auf die Motilität des Magen-Antrums lässt sich durch Naloxon antagonisieren (STANGHELLINI et al., 1983). Endogene Opiate lösen eine Histaminfreisetzung aus isolierten Mastzellen aus dem Peritoneum von Ratten aus (YAMASAKI et al., 1982).

TACHE et al. (1999) formulierten die These, dass ein Stresssignal vom Gehirn zum Darm über den Parasympathikus weitergeleitet werden kann. Die stressbedingte Ausbildung von Magengeschwüren wird durch den *N. vagus* vermittelt (YANG et al., 1994), und Kältestress aktiviert den *N. vagus* (CHO et al., 1996). Bei gesunden Menschen löst psychischer Stress eine verringerte Wasserabsorption aus dem Jejunum aus und bewirkt eine Umkehr der netto NaCl-Absorption in eine Sekretion. Eine Beteiligung cholinerg parasymphischer Mechanismen ist wahrscheinlich, da eine vorrausgegangene Atropin-Infusion diesen Effekt verhindert (BARCLAY und TURNBERG, 1987).

BRADESI et al. (2002b) konnten nachweisen, dass Stress die Ausbildung von NK-1 Rezeptoren im Kolon induziert, und dass Steroide aus den Eierstöcken (Östrogen und Progesteron) an diesem Effekt beteiligt sind.

#### **2.4.3.3 Histaminfreisetzung bei körperlicher Arbeit**

Bei harter Arbeit kommt es beim Menschen zu einem Anstieg des Blut-Histaminspiegels (DUNER und PERNOW, 1958). Es wurde angenommen, dass Histamin aus Mastzellen bei Muskelschäden freigesetzt wird, und dass dieses Histamin Schmerz und Vasodilatation im Muskel auslösen könnte (MORGANROTH et al., 1977).

Elektrische Stimulation des Massetermuskels bei Mäusen resultiert in einer deutlich erhöhten HDC Aktivität (ENDO et al., 1998). Auch im *M. quadriceps* steigt die HDC Aktivität nach

elektrischer Stimulation an, wobei der Anstieg abhängig von der Stärke und Dauer der Muskelstimulation verläuft. Bei mastzelldefizienten Mäusen kommt es zu einem ähnlichen Anstieg der HDC Aktivität. Erzwungenes längeres Laufen führt zu einem Anstieg der HDC Aktivität, bei mehrmaligem vorangegangenen Training verringert sich der Anstieg (ENDO et al., 1998). Die HDC Aktivität stieg in der Studie von AYADA et al. (2000) in fast allen Teilen der Skelettmuskulatur an, und zwar sowohl nach erzwungenem längeren Laufen, als auch, nachdem die Mäuse 4 h relativ bewegungslos bei 4 °C verbringen mussten. In einer weiteren Versuchsanordnung verbrachten die Tiere 4 h in einem Wasserbad. Als Reaktion auf diesen starken Stress wurde die HDC in der Magenschleimhaut aktiviert, und es kam zu deutlichen Blutungen in der Magenschleimhaut. Obwohl also von einer Stresssituation auszugehen war, stieg beim Wasserbaden die HDC-Aktivität in der untersuchten Skelettmuskulatur nicht. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der bei Muskelarbeit stattfindende HDC Aktivitätsanstieg unabhängig von einer stressbedingten HDC Aktivierung zu sehen ist.

DANIEL und HONIG (1980) konnten an isolierten caninen Muskeln zeigen, dass die anstrengungsbedingte Vasodilatation und reaktive Hyperämie in der Skelettmuskulatur nicht durch Histamin bedingt wird.

Während physischer Anstrengung („treadmill exercise“) erhöht sich bei Menschen die sympathische Aktivität, die anhand eines Anstiegs des arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz bestimmt wird. Der Histaminspiegel im Blut steigt während der Anstrengung an und sinkt nach einer Erholungspause wieder auf das ursprüngliche Niveau ab. Dabei reichen relativ kurze Trainingsintervalle (3-6 min) aus, um einen Histaminanstieg zu verursachen (CAMPOS et al., 1999).

#### 2.4.3.4 Histaminfreisetzung durch Umwelteinflüsse

Klimatische Bedingungen können zu einer Mastzellaktivierung führen. Beispielsweise bewirkt lokale Einwirkung von Kälte einen Histaminanstieg in der Haut (ANDERSSON et al., 1995). AYADA et al. (2000) beobachteten nach Kälteeinwirkung bei Mäusen in fast allen untersuchten Skelettmuskeln einen Anstieg der HDC Aktivität, der auf Muskelarbeit durch Zittern zurückgeführt wird. Im testikulären Interstitium und in der Haut von Ratten, die Kälte ausgesetzt wurden, zeigte sich eine Mastzelldegranulation. SANTOS et al. (1998) wiesen nach, dass Kälteschmerz einen Anstieg der Histaminkonzentration im Darm bewirkt.

Sonnenlicht, Kälte und Hitze können eine Mastzelldegranulation auslösen (SOTER und WASSERMAN, 1980; NOLI und MIOLO, 2001). UV-Strahlung ruft eine Mastzelldegranulation und einen Anstieg des Plasma-Histamins hervor (KEAHEY et al., 1984).

#### 2.5 Kortisol als Stresshormon

Glukokortikoide übernehmen im Körper zahlreiche wichtige Funktionen, z.B. im Energiehaushalt, bei Wachstumsprozessen und im Immunsystem (CARRASCO und VAN DE KAR, 2003). Außerdem beeinflussen sie die Hirnfunktion inklusive der Lern- und Erinnerungsprozesse, die einer Verhaltensanpassung zu Grunde liegen (CARRASCO und VAN DE KAR, 2003).

Glukokortikoide, vor allem Kortisol und Kortikosteron, werden bei allen Säugetieren in Stresssituationen vermehrt ausgeschüttet und spielen offenbar eine wichtige Rolle in der Stressreaktion des Organismus (GARCIA et al., 2000). Über die genauen Mechanismen ihrer Wirkung ist wenig bekannt. Stress hemmt über Glukokortikoide die zelluläre Immunantwort und verstärkt die humorale Immunantwort. Glukokortikoide unterdrücken über ihre klassischen zytoplasmatisch-nukleären Rezeptoren bei Antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen, andere Phagozyten) die Produktion von IL 12, dem Hauptauslöser einer Th 1 Antwort, *in vitro* und *in vivo* (ELENKOV und CHROUSOS, 1999). Dadurch wird die Th 1/Th 2 Balance zugunsten der Th 2 verschoben und die humorale Immunantwort mit B-Zellen, Eosinophilen und Mastzellen verstärkt (ELENKOV und CHROUSOS, 1999). GARCIA et al. (2000) vermuten, dass Glukokortikoide ihre hauptsächliche Wirkung erst nach der Stresssituation entfalten. Die Autoren sehen die Aufgabe der Glukokortikoide vor allem in der

Wiederherstellung stressbedingt veränderter Funktionen, z.B. des Immunsystems und des Energiehaushaltes.

Der aus dem Hypothalamus freigesetzte Corticotropin Releasing Factor ist der wichtigste, aber nicht der einzige Faktor, der die ACTH Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen steuert (LEVENS, 1990). Das in die Blutbahn abgegebene ACTH bewirkt an der Nebenniere die Freisetzung von Glukokortikoiden aus der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde (AGUILERA et al., 2001).

Für eine stressbedingte Kortisolfreisetzung bei Hunden finden sich in der Literatur zahlreiche Quellen. Die Plasma-Kortisolkonzentration bei Hunden steigt signifikant an z.B. bei Transportstress (BERGERON et al., 2002), akustischem Stress (GUE et al., 1987) Elektroschocks (DESS et al., 1983), physischer Anstrengung (WAKSHLAG et al., 2004) und bei Verbringen in eine unbekante Umgebung (HENNESSY et al., 2002).

KNOL et al. (1992) geben als normalen Kortisolwert in caninem Plasma  $68 \pm 10$  nmol/l an. Über 24 Stunden maßen KEMPPAINEN und SARTIN (1984) bei Hunden Kortisolwerte im Bereich von  $58,5 \pm 16,0$  nmol/l (MW  $\pm$  SD). Unter Stresseinfluss stiegen die Kortisolwerte in der Untersuchung von BERGERON und Kollegen (2002) bis auf 225,5 nmol/l an ( $134,5$  nmol/l Basalwert vs.  $225,3$  nmol/l nach Stress).

## **2.6 Weitere hormonelle Auswirkungen von Stress**

Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (H-H-NNR-Achse) und der Sympathikus-Nebennierenmark-Achse und die dadurch bedingte Freisetzung von Katecholaminen und Glukokortikoiden in den Blutkreislauf werden als die typische Stressantwort bei Säugetieren gesehen (GARCIA et al., 2000).

Nach Einwirkung eines Stressors auf den Organismus werden im Gehirn Mediatoren wie z.B. Norepinephrin, Serotonin und Azetylcholin freigesetzt; sie aktivieren die parvizellulären Neuronen des paraventriculären Nukleus des Hypothalamus, die daraufhin CRF produzieren (BLACK und GARBUTT, 2002; PENALVA et al., 2002; CARRASCO und VAN DE KAR, 2003). Über das Portalvenensystem gelangt CRF in den Hypophysenvorderlappen, in dem es kortikotrophe Zellen zur Synthese von POMC (pro-Opiomelanocortin) stimuliert. Das

Polyprotein POMC ist der Vorläufer für ACTH,  $\beta$ -Endorphin und  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon (BLACK und GARBUTT, 2002). CRF stimuliert außerdem den *Locus coeruleus*, Norepinephrin an sympathischen Nervenendigungen zu sezernieren (CARRASCO und VAN DE KAR, 2003). Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt weiterhin zu einer Stimulation des Nebennierenmarks, in dem daraufhin Epinephrin produziert wird (CARRASCO und VAN DE KAR, 2003). Außer den Glukokortikoiden und Katecholaminen werden auch Glukagon und Wachstumshormon und das Renin-Angiotensin System, das letztlich zur Ausschüttung von Angiotensin II führt, einem Vasokonstriktor, der den Blutdruck steigert und die Herzrate beschleunigt, zu den Stresshormonen gerechnet (BLACK und GARBUTT, 2002).

## **2.7 Zusammenhang zwischen Histamin und Kortisol**

Es wird vermutet, dass hypothalamisches Histamin und Histaminrezeptoren im ZNS an der Aktivierung der H-H-NNR-Achse beteiligt sind (BUGAJSKI et al., 1994). Die Sekretion von ACTH und damit auch von Kortikosteron scheint bei Ratten durch eine histaminbedingte CRF-Freisetzung aus dem paraventriculären Nucleus des Hypothalamus beeinflusst zu werden (ITOWI et al., 1989). Abnehmende zerebrale Histaminspiegel (ausgelöst durch die Verabreichung von alpha-Fluoromethylhistidin, einem Inhibitor der HDC) verändern den zirkadianen Rhythmus der Kortikosteronkonzentration im Plasma von Ratten signifikant (ITOWI et al., 1989).

Intrazerebroventrikuläre Injektion von Histamin verursacht über H1 Rezeptoren einen Anstieg der Plasma-ACTH-Konzentration und der Kortisolspiegel beim Hund, und es wird vermutet, dass ein Teil der Kortisolfreisetzung unabhängig von ACTH erfolgt (TSUJIMOTO et al., 1993). Eine Histaminfreisetzung aus Mastzellen im Gehirn aktiviert bei Hunden die H-H-NNR-Achse und bewirkt so eine gesteigerte adrenale Kortisolfreisetzung (MATSUMOTO et al., 2004).

Peripheres CRF scheint Mastzellen zur Abgabe von Mediatoren zu stimulieren. Unter Immun- oder peripherem CRF versteht man CRF, das peripher an Entzündungsherden sezerniert wird und das Immunsystem lokal beeinflusst (ELENKOV und CHROUSOS, 1999). Anscheinend sind Mastzellen das Hauptziel des Immun-CRF. Dies legt auch die enge anatomische Nachbarschaft zwischen Mastzellen und Nervenendigungen sowohl in perivaskulären Regionen als auch in lymphatischen Geweben nahe (ELENKOV und CHROUSOS, 1999).

Milder Immobilisierungsstress erhöht die Serum-Kortikosteronspiegel bei Ratten. Eine vorrausgegangene intravenöse Histamininjektion verstärkt die stressbedingte Kortisolfreisetzung (BUGAJSKI und GADEK, 1981). Histamin kann bei Hunden über H1 Rezeptoren die Freisetzung von Kortisol aus der Nebennierenrinde bewirken (AIKAWA et al., 1986).

## **2.8 Bedeutung der Literatur für die eigenen Untersuchungen**

In der Literatur sind zahlreiche Anhaltspunkte dafür zu finden, dass Histamin im Plasma aufgrund von psychischem Stress ansteigt. Für Ratten und Mäuse wurde diese Hypothese bestätigt. Für ein entsprechendes Geschehen bei Hunden sind keine Literaturquellen verfügbar. Eine eventuelle zirkadiane Rhythmik oder episodische Freisetzung von Histamin wurde ebenfalls nicht untersucht. Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Tagesprofil der Histaminwerte im Plasma erstellt. Weiterhin wurden die Hunde mit moderaten Stresssituationen (Umweltstress) konfrontiert, da vorhandene Studien sich überwiegend mit der Einwirkung sehr starker Stressoren, wie z.B. Immobilisierung, befassen.

Da sich in der Darmschleimhaut besonders viele Mastzellen befinden, und in der Literatur zahlreiche Quellen für stressbedingte Veränderungen der Darmfunktion und für die Aktivierung von Mastzellen im Darm infolge von Stress existieren, sollte speziell der Darm einer Stresseinwirkung ausgesetzt werden. Dazu wurde den Tieren über eine gewisse, den physiologischen Rahmen nicht überschreitende Zeit das Futter vorenthalten. Der psychische Aspekt, dass Hunger und das Beobachten der Fütterung von Nachbartieren Stress auslöst, sollte ebenfalls ausgenutzt werden.

Physische Anstrengung wirkt sich bei Menschen und Nagern auf den Histaminstoffwechsel aus. Für Hunde liegen keine entsprechenden Untersuchungen vor. Deshalb wurde bei einer Gruppe von Rettungshunden unter verschiedenen Trainingsbedingungen der Histaminspiegel gemessen. Neben dem zu erwartenden physischen Stress durch die Anstrengung sollte auch hier der psychische Stress, den der Einsatz bei den Hunden auslöst, einbezogen werden.

Kortisol ist als Stressparameter etabliert und wurde als Referenzwert aus dem Plasma bestimmt, um das Bestehen einer Stressantwort belegen zu können. Außerdem sollte eine eventuelle Korrelation zwischen Histamin und Kortisol untersucht werden.

### **3 PUBLIKATIONEN**

#### **3.1 Seite 31-36**

**Knies K, Erhard MH, Ahrens F.**

**Effect of moderate stress on plasma histamine concentration in laboratory dogs.**

**Inflammation Research 2005; accepted.**

#### **3.2 Seite 37-42**

**Ahrens F, Knies K, Schneider M, Köhler F, Erhard MH.**

**Influence of different training and outdoor conditions on plasma histamine and cortisol concentrations in search-and-rescue dogs.**

**Inflammation Research 2005; accepted.**

## **Effect of moderate stress on plasma histamine concentration in laboratory dogs**

**K. Knies, M. H. Erhard and F. Ahrens**

Institute of Animal Welfare, Ethology and Animal Hygiene,  
Ludwig-Maximilians-University, Schwere-Reiter-Strasse 9,  
D-80797 Munich, Germany

*Correspondence to:* F. Ahrens

Institute of Animal Welfare, Ethology and Animal Hygiene  
Ludwig-Maximilians-University  
Schwere-Reiter-Strasse 9  
D-80797 Munich, Germany

Phone: +49/89/15927836

Fax: +49/89/1578277

E-mail: [f.ahrens@tierhyg.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:f.ahrens@tierhyg.vetmed.uni-muenchen.de)

## Introduction

Reliable stress parameters are needed to evaluate housing and handling conditions of laboratory animals. This is not only important concerning animal welfare but stress responses can also interfere with experimental procedures. Cortisol is commonly used to detect stress responses in animals but interpretation is not always easy because the adrenocortical sensitivity to stressful events depends on the time of day [1]. In dogs, further difficulties arise as the circadian rhythm of blood cortisol concentration is influenced by age [2] and varies due to episodic secretion [3]. Plasma histamine has been shown to increase in rats not only due to strong stressors, such as immobilization, but also during mild stress like gentle handling [4]. Therefore, the aim here was to determine if plasma histamine concentration could be used as an indicator for stress in laboratory dogs.

## Materials and methods

Laboratory dogs (Foxhound-Boxer-Labrador Retriever mix, two years of age, five females, one male), were thoroughly acclimatised over a 12 week period to blood sampling procedures to reduce stress-related effects associated with such sampling. Initially, blood was taken seven times over 24 h to determine if circadian rhythm could be seen in cortisol or histamine concentrations. Then, dogs were exposed to two potentially stressful situations represented by fasting and an unfamiliar environment. First, the dogs were not fed for two days. Blood samples were taken at their usual feeding time, when they were expecting food and could watch neighbouring dogs eat, and 30 min afterwards. Second, dogs were taken to unfamiliar surroundings (a busy crossroad where a multitude of threatening stimuli affected them over 30 min). Blood was sampled before and after the walk. Experimental procedures were approved by the Government of Upperbavaria (AZ 209.1/211-2531.2-24/02 and -32/02).

Plasma cortisol was measured by luminescence immunoassay (IBL, Hamburg, Germany). After ion-pair extraction with bis(2-ethyl-hexyl)phosphoric acid, plasma histamine was determined by HPLC using a precolumn derivatisation with *o*-phthaldialdehyde as the fluorescent agent.

## Results and discussion

Although a circadian rhythm of cortisol levels in adult dogs (not in puppies and in aged dogs) has been reported in literature [2], our results indicated no distinct rhythm in plasma cortisol (Fig. 1A). Individual cortisol concentrations of the six dogs showed peaks at different times (data not shown), leading to high variances in the cortisol values (Fig. 1A). This might be due to episodic cortisol secretion [3]. In contrast, plasma histamine concentration showed less variance and remained stable throughout the day (Fig. 1A), suggesting an equilibrium between release of histamine into the circulatory system and its clearance.

Fasting has been shown to be stressful for humans [5] but not for dogs [6]. We investigated if fasting while watching food preparation induced a stress response in the dogs, but there was no significant alteration in plasma cortisol concentration (Fig. 1B). Large amounts of mast cells are present in the bowel. Eating as well as fasting should significantly change intestinal motility and, thereby, intestinal mast cell activity. Moreover, stress is able to evoke a significant release of mast cell mediators into the human jejunal lumen [7]. Nevertheless in this study, neither feeding, hunger or food expectation caused significant variations in plasma histamine concentration (Fig. 1B). This could be due to unchanged stress levels, unchanged histamine release from intestinal mast cells or efficient catabolism of released histamine.

Plasma cortisol concentration in the dogs increased significantly after a walk of 30 min to unfamiliar surroundings (Fig. 1B), indicating once again that dogs are susceptible to environmental stress [8]. Although mild stress caused elevated plasma histamine concentration in rats [4], histamine concentration in the dogs showed no significant alteration after the walk (Fig. 1B). This might be due to a lack of mast cell degranulation or rapid metabolism of histamine after release.

In conclusion, plasma histamine concentration is not a suitable indicator for canine stress responses. However, whether histamine metabolites or non-degraded mast cell mediators could be used for stress evaluation should still be investigated.

*Acknowledgements:* We thank Dr. B. Dobenecker (Institute of Physiology, Physiological Chemistry and Animal Nutrition, LMU Munich) for kindly providing the laboratory dogs.

**Fig. 1:** Plasma concentrations of histamine and cortisol in laboratory dogs over 24 h (A) and under environmental and fasting stress (B). After thorough acclimatisation to blood sampling procedures, dogs were subjected to the following situations. Panel A: Blood samples were taken every 4 h over a 24 h period. Panel B: Blood samples were drawn before and after a 30 min walk to unfamiliar surroundings. In the investigation on fasting stress, blood samples were taken on day one before (Sample 1) and 30 min after feeding (Sample 2). On day two and three, the dogs were not fed but could watch food preparation and the feeding of kennel neighbours. Blood was sampled before (Sample 1) and 30 min after feeding procedures (Sample 2). Values represent means  $\pm$  SEM; \*:  $P < 0.05$  by paired t-test.

## References

- [1] Engeland WC, Byrnes GJ, Gann DS. The pituitary-adrenocortical response to hemorrhage depends on the time of day. *Endocrinology* 1982; 110(6): 1856-60.
- [2] Palazzolo DL, Quadri SK. The effects of aging on the circadian rhythm of serum cortisol in the dog. *Exp Gerontol* 1987; 22(6): 379-87.
- [3] Kemppainen RJ, Sartin JL. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *J Endocrinol* 1984; 103(2): 219-26.
- [4] Huang ZL, Mochizuki T, Watanabe H, Maeyama K. Histamine release induced by immobilization, gentle handling and decapitation from mast cells and its inhibition by nedocromil in rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 80(3): 255-62.
- [5] Bergendahl M, Vance ML, Iranmanesh A, Thorner MO, Veldhuis JD. Fasting as a metabolic stress paradigm selectively amplifies cortisol secretory burst mass and delays the time of maximal nyctohemeral cortisol concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(2): 692-9.
- [6] Reimers TJ, McGarrity MS, Strickland D. Effect of fasting on thyroxine, 3,5,3'-triiodothyronine, and cortisol concentrations in serum of dogs. *Am J Vet Res* 1986; 47(12): 2485-90.
- [7] Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolin M, Cadahia A, Malagelada JR. Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology* 1998; 114(4): 640-8.
- [8] Garnier F, Benoit E, Virat M, Ochoa R, Delatour P. Adrenal cortical response in clinically normal dogs before and after adaptation to a housing environment. *Lab Anim* 1990; 24(1): 40-3.

Figure 1A

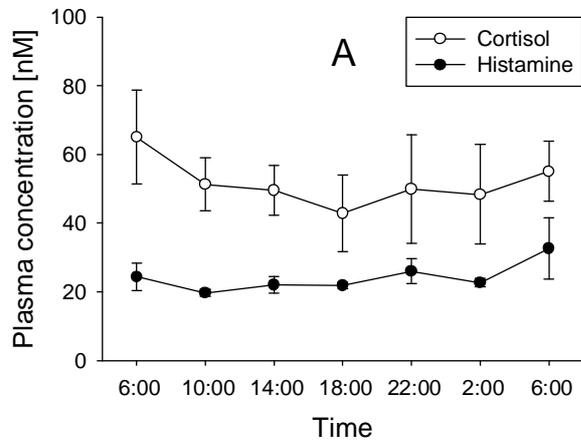
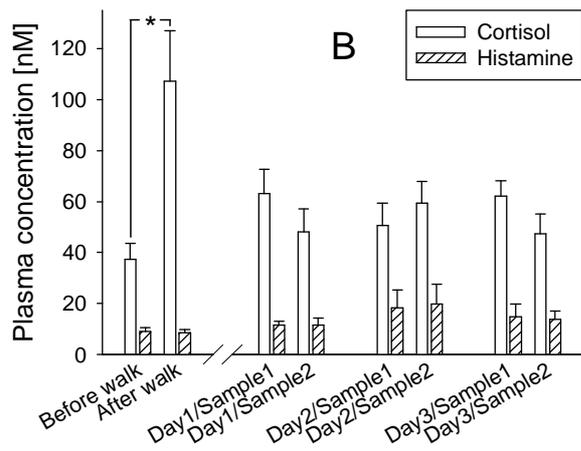


Figure 1B



**Influence of different training and outdoor conditions on plasma histamine and cortisol concentrations in search-and-rescue dogs**

**F. Ahrens, K. Knies, M. Schneider, F. Köhler and M. H. Erhard**

Institute of Animal Welfare, Ethology and Animal Hygiene,

Ludwig-Maximilians-University, Schwere-Reiter-Strasse 9,

D-80797 Munich, Germany

*Correspondence to:* F. Ahrens

Institute of Animal Welfare, Ethology and Animal Hygiene

Ludwig-Maximilians-University

Schwere-Reiter-Strasse 9

D-80797 Munich, Germany

Phone: +49/89/15927836

Fax: +49/89/1578277

E-mail: [f.ahrens@tierhyg.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:f.ahrens@tierhyg.vetmed.uni-muenchen.de)

## Introduction

An effective training of search-and-rescue dogs is the basis for a successful search for missing people, e.g., in avalanches. To evaluate different training methods and influential factors like outdoor conditions, markers such as histamine are needed to assess fitness and constitution of the dogs. Mast cell histamine is released by immunological and by physical stimuli like cold, heat or pressure [1]. Low temperature evoked histamine release can be due to both direct activation of skin mast cells [2] and neural modulation of intestinal mast cells [3]. A stress response may indicate an overloaded and, thereby, ineffective training of the dogs. Plasma cortisol concentration in dogs increases during cold stress [4], during heat stress [5] and after exercise [6]. Therefore, we investigated concentrations of plasma histamine and cortisol in search-and-rescue dogs under different training conditions.

## Materials and methods

16 rescue dogs (age: 1 – 11 years), trained in avalanche search, underwent four different types of strain. Two training types, running and searching, were carried out in summer and winter. Summer part was executed at an altitude of 700 metres and winter part at an altitude of 2,600 metres. Strains had duration of 2 x 20 min each and a 20 min break in between. Blood samples were taken before strain (T0), after two strain cycles (T60) and after a resting period of two hours (T180). Corresponding body temperature and outdoor temperature were measured. Plasma was analysed for histamine by ELISA and for cortisol by LIA (both assays: IBL, Hamburg, Germany). Data was analysed for differences between four strain types (ANOVA), influences by season and training type (Two Way ANOVA), time-dependent changes (paired *t*-test) and relationship between histamine, cortisol, outdoor and body temperature (linear regression model). Experimental procedures were approved by the Government of Upperbavaria (AZ 209.1/211-2531.2-7/02).

## Results and discussion

Although training types were executed under different conditions (altitude, outdoor temperature: summer: 9 to 26 °C; winter: -18 to -3 °C), no significant changes in histamine concentration were found during course of four strain types (Table 1). Cortisol concentration did not increase but it decreased significantly after search strain (T60) in winter and returned ( $P < 0.05$ ) after (T180) to basal level (Table 1). At three different sample times (T0, T60 or T180), no differences in histamine and cortisol concentrations were observed between four strain types (Table 1). Analysing influence of season (summer/winter) and training type (running/searching), a higher histamine concentration was obtained before any strain (T0) in summer vs. winter ( $8.7 \pm 1.1$  vs.  $5.4 \pm 1.1$  nmol/l plasma; means  $\pm$  SEM;  $P < 0.05$ ; Two Way ANOVA and Student-Newman-Keuls procedure). Moreover, cortisol concentration tended ( $P = 0.09$ ) to be higher in winter (T0). However, an influence of training type was not obvious. These results indicate that none of the four strain types leads to a distinct stress response in rescue dogs. This might be explained by a different stress response in young, adult and old dogs [4]. The tendency to higher cortisol concentration in winter leads to the assumption that the preparations for training in winter (equipment, cable car ride) represent stress, which is reduced by work, i.e., search training.

Histamine tended to correlate with cortisol concentration after running strain in summer ( $R = 0.50$ ;  $P = 0.10$ ) but the expected relationship between cortisol and histamine concentration in plasma was not observed. This could be due to the unchanged stress levels, an unchanged histamine release from mast cells or an efficient catabolism of released histamine. No correlation was obtained between histamine concentration and body temperature. However, histamine correlated with outdoor temperature before any strain, but only in winter part of this investigation (Fig. 1). This could be a sign for increased histamine release from skin mast cells and/or a decreased catabolism of histamine due to low outdoor temperatures.

*Acknowledgements:* The Avalanche Rescue Dog Unit of Bavarian Mountain Rescue is thanked for their cooperation. This work was supported by the Ernst Wippenbeck Stiftung, Bayerische Zugspitzbahn and Environmental-Research-Station Schneefernerhaus.

**Fig. 1.** Correlation between plasma histamine (H) concentration of rescue dogs and outdoor temperature in winter. Blood samples were taken before strains (running/searching; T0) and outdoor temperatures (OT) were measured. Values represent corresponding histamine concentration and outdoor temperature; regression estimate was:  $H \text{ [nmol/l plasma]} = (1.58 \pm 1.44) - (0.37 \pm 0.16) \cdot OT$  (means  $\pm$  SEM;  $n = 29$ ).

**Table 1.** Plasma histamine and cortisol concentrations in rescue dogs under different training conditions (running and searching, each in summer and winter). Blood samples were taken before the strain (T0), after two strain cycles (T60) and after a resting period of two hours (T180). Values represent means  $\pm$  SEM; Asterisks indicate an increase or decrease ( $P < 0.05$ ) relative to value before by paired  $t$ -test.

## References

- [1] Soter NA, Wasserman SI. Physical urticaria/angioedema: an experimental model of mast cell activation in humans. *J Allergy Clin Immunol* 1980; 66(5): 358-65.
- [2] Andersson T, Wardell K, Anderson C. Human in vivo cutaneous microdialysis: estimation of histamine release in cold urticaria. *Acta Derm Venereol.* 1995; 75(5): 343-7.
- [3] Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolin M, Cadahia A, Malagelada JR. Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology* 1998; 114(4): 640-8.
- [4] Palazzolo DL, Quadri SK. Plasma thyroxine and cortisol under basal conditions and during cold stress in the aging dog. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987; 185(3): 305-11.
- [5] Assia E, Epstein Y, Magazanik A, Shapiro Y, Sohar E. Plasma-cortisol levels in experimental heatstroke in dogs. *Int J Biometeorol* 1989; 33(2): 85-8.
- [6] Wasserman DH, Williams PE, Lacy DB, Goldstein RE, Cherrington AD. Exercise-induced fall in insulin and hepatic carbohydrate metabolism during muscular work. *Am J Physiol* 1989; 256(4 Pt 1): E500-9.

Figure 1

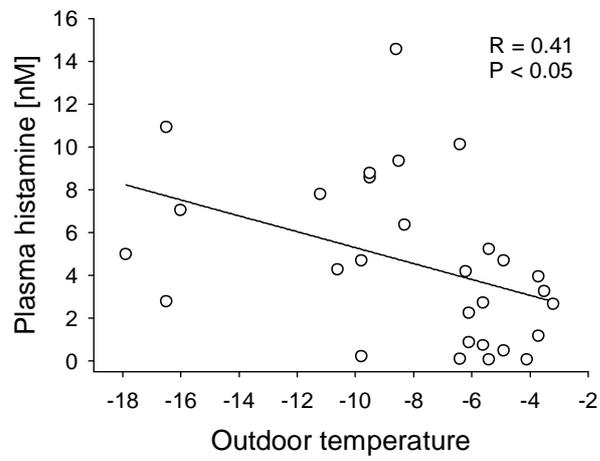


Table 1

	n	Histamine [nmol/l plasma]			Cortisol [nmol/l plasma]		
		T0	T60	T180	T0	T60	T180
Summer run	16	10.5 ± 1.4	6.2 ± 1.5	6.1 ± 1.4	41.0 ± 10.5	46.2 ± 6.4	45.5 ± 5.4
Summer search	13	6.9 ± 1.7	6.9 ± 1.7	5.1 ± 1.4	27.7 ± 12.3	34.6 ± 7.2	31.6 ± 5.4
Winter run	15	6.0 ± 1.6	5.7 ± 1.7	5.9 ± 1.4	51.0 ± 11.8	36.9 ± 7.2	38.4 ± 5.4
Winter search	14	4.8 ± 1.6	5.9 ± 1.7	6.5 ± 1.6	58.6 ± 12.3	26.7 ± 7.5*	46.4 ± 5.9*

## 4 DISKUSSION

Kortisol ist bei den meisten Säugetieren ein etablierter Stressparameter (KIRSCHBAUM und HELHAMMER, 1989). Die bei Hunden im Blut gemessenen Kortisolwerte sind allerdings verschiedenen Einflüssen unterworfen. ACTH und Kortisol werden bei Hunden episodisch ausgeschüttet, so dass es im Tagesverlauf zu mehreren ACTH- und Kortisolpeaks kommt (KEMPPAINEN und SARTIN, 1984). Bei Hunden ist die Sensitivität der Nebennierenrinde gegenüber ACTH von der Tageszeit abhängig. ENGELAND et al. (1981) konnten zeigen, dass eine definierte ACTH Stimulation vormittags zu einer stärkeren Kortisolfreisetzung aus der Nebennierenrinde führt als nachmittags. In einer weiteren Untersuchung wiesen ENGELAND et al. (1982) nach, dass auch die Amplitude der stressbedingten Kortisolfreisetzung bei Hunden von der Tageszeit abhängt. Stress durch Blutverlust führte morgens und abends zu ähnlichen ACTH-Spiegeln, dagegen waren die Kortisolspiegel morgens signifikant höher als abends. Kortisolwerte im Plasma können außerdem starke Varianzen im Verlauf einer Studie zeigen, sowohl bei einzelnen Hunden als auch im Vergleich zwischen den Tieren (KUHN et al., 1991; CLARK et al., 1997; HENNESSY et al., 1997).

Aus der Literatur ist ein Anstieg der Plasma-Histaminspiegel bei Ratten und Mäusen infolge einer Stresseinwirkung bekannt (HUANG et al., 1998, 1999a). Dabei bewirken nicht nur starke Stressoren wie Immobilisierung, sondern auch milderer Stress, wie „gentle handling“ oder Umweltstress, einen Anstieg der Histaminkonzentration (HUANG et al., 1999a) bzw. eine Degranulation von Mastzellen (WILSON und BALDWIN, 1999). Für Hunde sind keine entsprechenden Studien in der Literatur zu finden. In der vorliegenden Untersuchung führte keine der gewählten Stressbelastungen zu einem Anstieg der Histaminkonzentration im Plasma. Es sind verschiedene Gründe für das Ausbleiben eines Histaminanstiegs denkbar:

- 1) Die gewählten Versuchsanordnungen könnten ungeeignet gewesen sein, Stress auszulösen. Nachdem die Laborhunde Umweltstress ausgesetzt worden waren, stiegen ihre Kortisolspiegel signifikant an. Obwohl eindeutig eine Stressreaktion vorlag, stieg der Plasma-Histaminspiegel nicht an (siehe Publikation unter 3.1; Figure 1B). Möglicherweise könnte die Stressbelastung der Tiere zu moderat gewesen sein, und ein Anstieg der Histaminspiegel erst bei massiverem Stress stattfinden. Dem stehen allerdings die Ergebnisse der Studie von HUANG et al. (1999a) entgegen. Hier führte

auch milder Stress wie „gentle handling“ zu einem Histaminanstieg im Plasma von Ratten.

- 2) Trotz einer Stressantwort könnte eine Mastzellaktivierung mit Histaminfreisetzung ausgeblieben sein. Der Anstieg von Histamin in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten als Reaktion auf Stress wird auf eine nervale Aktivierung von Mastzellen zurückgeführt (HUANG et al., 1998, 1999b; SANTOS et al., 1998, ALEXACOS et al., 1999). Diese Erkenntnis stützt sich zum einen auf die enge anatomische Nachbarschaft zwischen Mastzellen und Nervenendigungen (STEAD et al., 1987), zum anderen darauf, dass verschiedene Neuropeptide, wie z.B. Substanz P, eine Mastzelldegranulation auslösen können (GOTTWALD et al., 1998; SUZUKI et al., 1999). In der vorliegenden Studie wurde nicht untersucht, ob eine Aktivierung von Mastzellen stattgefunden hat. Die signifikant höheren Histaminspiegel bei den Rettungshunden im Sommer im Vergleich zum Winter könnten auf eine Mastzellaktivierung durch hohe Temperaturen hindeuten. Eine Aktivierung von Mastzellen durch Stress muss nicht zwingend mit einer Histaminfreisetzung einhergehen. EUTAMENE et al. (2003) beobachteten an Mastzellen im Kolon von Ratten nach Stresseinwirkung eine Zunahme des Histamingehaltes ohne Anzeichen einer Degranulation.
- 3) Aus Mastzellen freigesetztes Histamin könnte schon am Ort der Freisetzung verstoffwechselt worden sein, so dass es nicht in die Blutbahn gelangen, und deshalb in den Blutproben nicht nachgewiesen werden konnte. Histamin kann durch die Diaminoxidase (DAO) oder durch die Histamin N-Methyltransferase (HNMT) abgebaut werden (MASLINSKI, 1975b). Die intrazellulär lokalisierte HNMT, die in nahezu allen Geweben vorkommt, baut den Großteil (50-80 %) des Histamins ab (MASLINSKI, 1975b). Die DAO wird an den basolateralen Membranen der Darmepithelien in den Blutstrom abgegeben und bindet an Endothelzellen. Von diesen Bindungsplätzen kann die DAO z.B. durch Heparin verdrängt werden, so dass die DAO Konzentration erheblich steigt (WOLLIN et al., 1998). Heparin kann ebenso wie Histamin aus Mastzellen freigesetzt werden. Durch Stress freigesetztes Histamin könnte also entweder direkt am Ort seiner Freisetzung durch die HNMT oder in der Zirkulation durch die DAO abgebaut worden sein.

- 4) Histamin könnte im Probenmaterial verloren gegangen sein. CAMPOS et al. (1999) untersuchten in menschlichem Blut, ob Histamin *in vitro* in Blutzellen aufgenommen wird. Das zu den Blutproben gegebene Histamin wurde tatsächlich von den zellulären Elementen aufgenommen. Die Proben wurden bei 37 °C für 5 min inkubiert. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Ratten und anderen Säugetieren erzielt (ANREP et al., 1939; JOHNSON et al., 1966). CAMPOS und Kollegen sehen in ihren Ergebnissen eine Erklärung dafür, dass bei Ratten erhöhte Histaminspiegel zwar in Vollblut, nicht aber in Plasma messbar waren (IZUMI et al., 1984), da das von Blutzellen aufgenommene Histamin in Plasma nicht mehr enthalten ist. In den eigenen Untersuchungen wurde das entnommene Blut sofort nach der Entnahme auf 4 °C gekühlt und anschließend bei 4 °C zentrifugiert. Dies macht eine Aufnahme von Histamin durch Blutzellen unwahrscheinlich. Als Gerinnungshemmer wurde in der vorliegenden Studie Lithium-Heparin verwendet. Heparin ist *in vivo* der stärkste bekannte DAO-Freisetzer (WOLLIN et al., 1998). Im Organismus steigert Heparin daher die histaminolytische Aktivität (MASLINSKI, 1975b). *In vitro* bindet Heparin an die Diaminoxidase und reduziert dadurch die DAO Aktivität (WILFLINGSEDER et al., 2000). Die sofortige Kühlung der Proben sollte außerdem die Enzymaktivität deutlich heruntersetzen. Daher erscheint ein enzymatischer Histaminabbau im Probenmaterial wenig wahrscheinlich.

Die oben angeführten möglichen Ursachen für das Ausbleiben eines Histaminanstiegs nach Stressbelastung bei Hunden liegen auch der weiteren Darstellung zu Grunde. Sie werden in der folgenden Diskussion der einzelnen Ergebnisse nicht jedes Mal erneut aufgeführt.

#### **4.1 Blutentnahme als möglicher Auslöser für Stress bei Hunden**

Da in der vorliegenden Studie eine Stressantwort untersucht werden sollte, war eine möglichst stressfreie Gewinnung des Probenmaterials von höchster Wichtigkeit. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der *V. cephalica antebrachii*. Es ist unwahrscheinlich, dass eine direkte traumatische Aktivierung von Mastzellen durch das Einstechen der Nadel die Histaminspiegel im Plasma erhöht. Eine Gewebsverletzung führt zwar zur Aktivierung von Mastzellen (NOLI und MIOLO, 2001; BAUER und RAZIN, 2000), allerdings wird dabei eher ein Anstieg des subkutanen Histaminspiegels ausgelöst. GUO et al. (1997) zeigten, dass das Einstechen von Injektionsnadeln und die Infusion von NaCl den subkutanen Histaminspiegel erhöhten.

Die für die Blutentnahme notwendigen Zwangsmaßnahmen können ihrerseits als Stressfaktor wirken und so die Ergebnisse verfälschen (BEERDA et al., 1996). SLAUGHTER et al. (2002) schlagen eine mindestens vierwöchige Gewöhnungsphase an den Vorgang der Blutentnahme vor. Deshalb wurden die Laborhunde über 3 Monate an die Vorgänge bei der Blutentnahme und an die beteiligten Personen gewöhnt. Ein Anstieg der Plasma-Kortisolkonzentration im Zusammenhang mit den Vorgängen der Blutentnahme findet im Allgemeinen 3 Minuten nach Beginn des Handlings statt (TUBER et al., 1996).

Um den Stress bei der Blutentnahme zu minimieren, wurde die Blutentnahme bei den Laborhunden im Bereich der Zwingeranlage durchgeführt. Hunde, bei denen die Blutproben in ihrer gewohnten Umgebung genommen wurden, haben deutlich geringere Kortisolspiegel als Tiere, denen in einer ungewohnten Umgebung Blut entnommen wird (HENNESSY et al., 1997). Eine Blutentnahme über Verweilkatheter war nicht angedacht, da die Hunde tagsüber in Gruppen gehalten werden, und eine Beschädigung der Verweilkatheter zu befürchten war. Eine vorübergehende Einzelhaltung wurde als zu stressintensiv für die Tiere verworfen. KNOL et al. (1992) untersuchten, ob eine Venenpunktion im Vergleich mit einer Blutentnahme aus einem Venenverweilkatheter eine gesteigerte Kortisolkonzentration im Plasma zur Folge hat, konnten aber keine signifikanten Unterschiede entdecken (KNOL et al., 1992). VAN HEERDEN und BERTSCHINGER (1982) fanden heraus, dass wiederholte Venenpunktion bei Hunden nicht zu einem Kortisolanstieg führt, wohl aber das Verbringen der Hunde in eine unbekannte Umgebung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass weniger die Art der Blutentnahme als die Gewöhnung der Tiere an das Handling und die Umgebung zur Reduzierung stressbedingter Veränderungen beitragen.

Bei der Gruppe der Rettungshunde war eine Gewöhnung an die Blutentnahme leider nicht möglich. Allerdings handelt es sich um Hunde, die sehr viel „gehandelt“ werden und durch das Training einen sehr engen Bezug zu ihren Hundeführern haben. Die Anwesenheit der Bezugsperson kann eine Stressreaktion verhindern (TUBER et al., 1996). Es ist aber nicht zu erwarten, dass Hunde mit engem Kontakt zu Menschen niedrigere basale Kortisolspiegel aufweisen als Tiere mit wenig Kontakt zu Menschen. Nach den Untersuchungen von ODENDAAL und MEINTJES (2003) sinken bei regelmäßiger Interaktion zwischen Hunden und Menschen die Kortisolspiegel nur bei den Menschen, nicht aber bei den Hunden.

Die in der vorliegenden Untersuchung gemessenen basalen Plasma-Kortisolwerte weisen nicht auf eine Stressreaktion durch die Blutentnahme hin. Dies stimmt mit den Ergebnissen von EIKNES und SAMUELS (1958) überein. Auch in dieser Untersuchung führte eine häufige Blutentnahme (5 x über 4-6 h) bei Hunden, die über einen längeren Zeitraum an das Blutentnehmen gewöhnt waren, zu keiner Zunahme des Plasma-Kortisolspiegels.

## **4.2 Histamin- und Kortisolkonzentration im Plasma von Laborhunden**

### **4.2.1 Tagesprofil**

Histamin wird vor allem von Mastzellen, ECL-Zellen (enterochromaffin-like) und Neuronen freigesetzt (BARNES, 2001; RANGACHARI, 1998; PANULA et al., 1984). Neben der klassisch immunologischen Aktivierung von Mastzellen können diese Zellen auch durch nervale Einflüsse aktiviert werden (HUANG et al., 1998, 1999b; SANTOS et al., 1998, ALEXACOS et al., 1999). Sonnenlicht, Kälte und Hitze können zu einer Mastzelldegranulation führen (SOTER und WASSERMAN, 1980; NOLI und MIOLO, 2001). Im Ruhezustand ist bei gesunden Hunden nur ein niedriger Histaminspiegel im Plasma messbar. LORENZ et al. (1973) geben  $3,6 \pm 2,7$  nmol/l an (MW  $\pm$  SD). Über die Frage, ob der basale Histaminspiegel im Plasma im Tagesverlauf variiert, sind in der Literatur weder für Hunde noch für andere Spezies Angaben zu finden.

Daher wurde in der vorliegenden Studie ein 24 h-Profil der Plasmawerte von Histamin und Kortisol bei einer Gruppe von Laborhunden erstellt. Es wurde alle 4 h eine Blutprobe entnommen, der normale Tagesablauf der Tiere blieb ansonsten unverändert. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Plasmaspiegel von Histamin und Kortisol festgestellt werden. Weder die Histamin- noch die Kortisolkonzentration im Plasma zeigte Veränderungen, die für eine zirkadiane Rhythmik sprechen würden. In den eigenen Untersuchungen wurde bei Laborhunden über 24 h ein Histamin-Ruhewert von  $24,2 \pm 1,6$  nmol/l gemessen (MW  $\pm$  SEM). An den einzelnen Entnahmezeitpunkten wiesen die Kortisolwerte der Tiere eine größere Varianz auf als die Histaminwerte, was sich an dem höheren Standardfehler der jeweiligen Mittelwerte zeigt (siehe Publikation unter 3.1; Figure 1A).

Bei der getrennten Auswertung der einzelnen Tagesprofile zeigten die Kortisolwerte Peaks zu verschiedenen Tageszeiten. Dies könnte Ausdruck einer episodischen Kortisolfreisetzung sein.

KEMPPAINEN und SARTIN (1984) fanden Hinweise für eine episodische Ausschüttung von ACTH und Kortisol, nicht aber für eine zirkadiane Rhythmik dieser beiden Hormone bei Hunden. Sie beobachteten im Schnitt 9 ACTH und 10 Kortisolpeaks über 24 h. Die ACTH und Kortisolspiegel korrelierten meistens miteinander.

Beim Menschen ist bekannt, dass die Ausschüttung von Kortisol einer zirkadianen Rhythmik folgt. In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen darüber, ob es bei Hunden einen zirkadianen Rhythmus der Kortisolwerte im Plasma gibt. Während PALAZZOLO und QUADRI (1987) zwar nicht bei Welpen (8 Wochen), aber bei adulten Hunden (3 Jahre) einen Tagesrhythmus nachweisen konnten, fanden andere Autoren keine Hinweise auf einen zirkadianen Rhythmus (JOHNSTON und MATHER, 1978; GORDON und LAVIE, 1985; MIZOBUCHI et al., 1993).

#### **4.2.2 Hungerstress**

Stress bewirkt deutliche Veränderungen der Motilität und der physiologischen Vorgänge an Magen und Darm (BARCLAY und TURNBERG, 1987; KILIAAN et al., 1998; BRADESI et al., 2002a). Die Darmschleimhaut enthält besonders viele Mastzellen. Bei Stress wird Histamin aus den Mastzellen des menschlichen Darms freigesetzt (SANTOS et al., 1998). Daher sollte in der vorliegenden Untersuchung durch Hungerstress speziell der Darm angesprochen werden, um eine Mastzelldegranulation zu bewirken. Die Hunde erhielten über zwei Tage kein Futter und mussten die Fütterung der Nachbartiere beobachten. Stress durch Hungern und das Beobachten der Fütterung der Nachbartiere verstärkt bei Meerschweinchen den Histaminanstieg als Reaktion auf einen konditionierten Stimulus signifikant (IRIE et al., 2002).

Seit den Versuchen von Pawlov ist bekannt, dass konditionierte Reize zu einer bestimmten physiologischen Reaktion führen. Für die in der vorliegenden Studie untersuchten Hunde sind die immer gleich ablaufenden Vorgänge bei der Fütterung fest mit den physiologischen Vorgängen der Nahrungsaufnahme und Verdauung verknüpft. RUSSELL et al. (1984) und MAC QUEEN et al. (1989) konnten eine erlernte Histaminfreisetzung und einen Anstieg der Konzentration spezifischer Mastzellmediatoren im Plasma von Ratten als Reaktion auf einen konditionierten Stimulus feststellen. Die in der vorliegenden Untersuchung bei Hunden gemessenen Histaminwerte deuten allerdings nicht auf eine Mastzelldegranulation und

Histaminfreisetzung hin. Möglicherweise spielen dabei auch tierartliche Unterschiede zwischen Fleischfresser und Nagetier eine Rolle.

Kortisol spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der energetischen Homöostase des Organismus. Außerdem wird Kortisol bei Hunden infolge von psychischem Stress ausgeschüttet (GUE et al., 1987; BERGERON et al., 2002). Bei Ratten stiegen die Kortikosteronspiegel nach einem Tag ohne Futter an (MURPHY und WIDEMAN, 1992). Der in der vorliegenden Untersuchung durchgeführte Futterentzug über zwei Tage bewirkte bei Hunden keinen signifikanten Kortisolanstieg. Der vor der Fütterung gemessene Histaminspiegel unterschied sich nicht signifikant von dem nach der Fütterung gemessenen Wert. Ebenso verhielt es sich bei den Kortisolwerten (siehe Publikation unter 3.1; Figure 1B).

Hunger kann die Neubildung von Histamin verringern. In der vorliegenden Studie konnte allerdings kein Abfall der Histaminspiegel festgestellt werden. Fasten über 48 h reduziert progressiv die Menge an HDC messenger RNA in den enterochromaffinen Zellen im Magenfundus von Ratten um das 3 bis 4-fache. Nach anschließender Fütterung war ein deutlicher Anstieg der HDC messenger RNA nach 30 min messbar (DIMALINE et al., 1993). Außerdem sinken durch Hunger die Spiegel an freiem Histidin (CHAVEZ und BAYLEY, 1976; ZICKER und ROGERS, 1994).

#### **4.2.3 Umweltstress**

Für Laborhunde, die ihre Zwinger nur sporadisch verlassen, stellt die gewählte Umweltbelastung einen erheblichen Stress dar. Die Hunde wurden für 30 min an eine belebte Straßenkreuzung geführt. Auch die Tatsache, dass die Tiere alleine dorthin verbracht wurden, während sie normalerweise immer zumindest Sichtkontakt zu ihrem Rudel haben, könnte eine zusätzliche Belastung für die Tiere gewesen sein. Der signifikante Anstieg der Plasma-Kortisolspiegel zeigt eindeutig, dass die Hunde auf den Stress reagieren. Bei den Plasma-Histaminspiegeln konnte trotzdem keine signifikante Veränderung festgestellt werden (siehe Publikation unter 3.1; Figure 1B).

Aus der Literatur ist bekannt, dass Stress durch Verbringen in eine unbekannte Umgebung die Kortisolspiegel erhöht ist (VIAL et al., 1979; TUBER et al., 1996; HENNESSY et al., 1997). Umweltstress ist ein starker psychischer Stress und führt bei verschiedenen Versuchstierspezies

zuverlässig zu einer Aktivierung der H-H-NNR-Achse (HENNESSY et al., 1997). Umweltstress wirkt sich auch auf die Mastzell-Aktivität aus. WILSON und BALDWIN (1999) konnten nachweisen, dass auch milder Umweltstress eine Degranulation von MMC in der Darmschleimhaut bewirkt. Ob bei den Laborhunden eine Mastzellaktivierung stattgefunden hat, wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

#### **4.3 Histamin- und Kortisolspiegel bei Rettungshunden im Training**

Rettungshunde absolvieren im Training anspruchsvolle und körperlich anstrengende Aufgaben. Um eine zufriedenstellende Leistung von Arbeitshunden zu gewährleisten ist es sehr wichtig, die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit bestimmen und erkennen zu können. In der vorliegenden Untersuchung wurden Blutproben von sechzehn Rettungshunden entnommen, die zur Lawinensuche eingesetzt werden. Die Probenentnahme erfolgte während der normalen Trainingsbedingungen. Dabei handelte es sich zum einen um ein Lauftraining, das im Winter neben Skiern absolviert und im Sommer als Laufen neben dem Fahrrad durchgeführt wurde. Die zweite Trainingsform war das Suchtraining, das im Winter auf der Lawine und im Sommer als Flächensuche auf einem Geröllfeld absolviert wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass körperliche Anstrengung den Plasma-Histaminspiegel erhöhen kann (DUNER und PERNOW, 1958). Dabei wird der beobachtete Anstieg der Histaminwerte auf eine Steigerung der HDC-Aktivität in der Muskulatur und nicht auf eine Mastzellaktivierung zurückgeführt (ENDO et al., 1998; AYADA et al., 2000). Auch für Plasma-Kortisol ist bekannt, dass sich dieser Parameter bei körperlicher Belastung verändert (FOSS et al., 1971). Bei Schlittenhunden steigt die Plasma-Kortisolkonzentration nach dem Rennen signifikant an (WAKSHLAG et al., 2004). Langanhaltende, moderate körperliche Anstrengung bewirkt bei Hunden einen Anstieg der Plasma-Kortisolspiegel, der durch eine Glukoseinfusion verhindert werden kann (NAZAR, 1971). Daraus schloss die Autorin, dass der Kortisolanstieg seinen Grund vor allem in der Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels hat (NAZAR, 1971).

Bei einer realen Trainingssituation ist es nicht möglich, die Einflüsse von körperlicher Belastung und von psychischem Stress auf die gemessenen Parameter zu trennen. Es war zu erwarten, dass für die Hunde schon die Vorbereitungen auf den Einsatz (Fahrt mit der Seilbahn etc.) eine erhebliche Stressbelastung bedeuten würden. Verschiedene Autoren wiesen nach, dass Stress durch einen längeren Transport die Kortisolwerte im Plasma von Hunden erhöht (KUHN et al.,

1991; LEADON und MULLINS, 1991; BERGERON et al., 2002). In der Studie von BERGERON et al. (2002) stiegen die Kortisolwerte von 134,5 nmol/l (Basalwert) auf 225,3 nmol/l nach Stress. Auch der Einfluss einer neuen, unbekanntenen Umgebung lässt die Kortisolspiegel signifikant ansteigen (VIAL et al., 1979; HENNESSY et al., 1997). In der vorliegenden Untersuchung wurden diese Ergebnisse nicht bestätigt. Die basalen Kortisolspiegel der Rettungshunde, die am Einsatzort vor Beginn des Trainings gemessen wurden, zeigten keine Stressbelastung der Tiere an (siehe Publikation unter 3.2; Table 1).

Für Ratten und Mäuse wurde ein Anstieg der Histaminspiegel im Plasma bei Stressbelastung beschrieben (HUANG et al., 1998, 1999a; WILSON und BALDWIN, 1999). Die eigenen Untersuchungen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Histaminkonzentration bei Rettungshunden im Verlauf der einzelnen Belastungsarten auf. Die Plasma-Kortisolkonzentration stieg während keiner Belastungssituation an, sondern sie sank nach der Sucharbeit im Winter, um anschließend zum Basalspiegel zurückzukehren (siehe Publikation unter 3.1; Table 1). Weiterhin konnte weder bei den Histamin- noch bei den Kortisolwerten ein Einfluss der verschiedenen Belastungsarten an den drei Entnahmezeitpunkten erkannt werden (siehe Publikation unter 3.1; Table 1). Im Winter tendierte ( $P = 0,09$ ) der Kortisolspiegel vor Belastung dazu, höher zu sein als der entsprechende Wert im Sommer (Daten von Lauf- und Suchtraining zusammen genommen).

Die eher höheren Kortisolwerte im Winter und der Abfall der Kortisolkonzentration während der Sucharbeit im Winter könnten sich dadurch erklären lassen, dass die Trainingsvorbereitungen speziell für diese Belastungen sehr aufwändig waren (die Hunde wurden mit der Seilbahn auf das Zugspitzplateau gebracht), und dass die Tiere diesen Stress durch die Arbeit eher abbauten. Auch die teilweise extremen Temperaturen könnten ein Grund für die erhöhten Kortisolwerte sein. Kälte ( $-4$  bis  $+4$  °C) führte in der Studie von SADOWSKI et al. (1975) zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-Kortisolkonzentration bei Hunden. PALAZZOLO und QUADRI (1987) konnten zeigen, dass Stress durch Kälte ( $-5$  °C) bei erwachsenen Hunden, nicht aber bei jungen oder alten Hunden, die Plasma-Kortisolspiegel erhöht. Temperaturen von 22 °C, 10 °C, 4 °C veränderten die Kortisolspiegel dagegen nicht.

Die untersuchte Gruppe von Rettungshunden war in ihrer Zusammensetzung recht heterogen. Das Alter der Tiere lag zwischen einem und elf Jahren. Es ist bekannt, dass sich die Stressreaktion bei Hunden mit dem Lebensalter verändert (PALAZZOLO und QUADRI, 1987;

REUL et al., 1991). Außerdem nahmen sowohl Hündinnen als auch Rüden an den Übungen teil. CARRASCO und VAN DE KAR (2003) vermuten, dass Östrogen einen verstärkenden Effekt auf die Stressantwort hat. Hündinnen weisen im Vergleich zu Rüden eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Stress auf (GARNIER et al., 1990). Die Kortisolwerte von Hündinnen, die in eine neue Umgebung verbracht worden waren ( $77 \text{ nmol/l}$ ), liegen signifikant höher als die Kortisolwerte von Rüden ( $43 \text{ nmol/l}$ ). Bei ACTH konnte ebenfalls ein geschlechtsspezifischer Unterschied beobachtet werden. Hündinnen hatten im Vergleich zu Rüden höhere basale ACTH-Spiegel und eine höhere Frequenz und Amplitude der Peaks (KEMPPAINEN und SARTIN, 1984). HENNESSY et al. (1997) fanden hingegen keinen Einfluss des Geschlechts der Tiere auf die Plasma-Kortisolkonzentration, auch Alter und Größe der Tiere beeinflussten diesen Parameter nicht.

Verschiedene Autoren beschreiben die physiologischen Anpassungen der Stressantwort infolge einer Gewöhnung an den Stressor (SAPOLSKY et al., 1984, SLAUGHTER et al., 2002). Bei den teilnehmenden Hunden handelte es sich sowohl um Tiere, die mit dem Ablauf des Trainings vertraut waren, als auch um Tiere, die zum ersten Mal ein solches Training absolvierten. Alle diese Faktoren erschweren es, signifikante Veränderungen nachzuweisen.

Der Histaminspiegel lag im Sommer höher als im Winter ( $8,7 \pm 1,1$  vs.  $5,4 \pm 1,1 \text{ nmol/l}$  Plasma MW  $\pm$  SEM,  $P < 0,05$ ). Ein möglicher Grund dafür könnte die vermehrte Histaminfreisetzung aus Mastzellen durch Hitze sein (SOTER und WASSERMAN, 1980). Eine Mastzellaktivierung durch UV-Strahlung scheint eher unwahrscheinlich, da die UV-Belastung beim Wintertraining auf dem Zugspitzplateau höher sein dürfte als im Sommer auf 700 m.

Allerdings gab es bei den im Winter durchgeführten Belastungen eine Korrelation zwischen Histamin und der Außentemperatur (siehe Publikation unter 3.2; Figure 1). Dies könnte ein Hinweis auf eine verstärkte Mastzelldegranulation in Folge der niedrigen Außentemperaturen sein. Eine Mastzellaktivierung durch Kälte wird in der Literatur beschrieben (SOTER und WASSERMAN, 1980). Dabei sind zum einen Mastzellen betroffen, die direkt durch Kälte beeinflusst werden, wie Zellen in der Haut und im testikulären Interstitium (TUNCEL et al., 1996). Auch der psychische Stress durch den Kälteschmerz kann zu einer Mastzellaktivierung führen, wie es die Forschergruppe um SANTOS (1998) am menschlichen Darm nachweisen konnte.

Zwischen der Histaminkonzentration im Plasma und der Körpertemperatur der Rettungshunde konnte keine Korrelation aufgezeigt werden. Auch zwischen Histamin und Kortisol besteht in der vorliegenden Studie keine Korrelation. Dass unter den beschriebenen Bedingungen kein Histaminanstieg erfolgte, kann daran liegen, dass für die Tiere keine Stresssituation bestanden hat. Dies legen auch die unveränderten Kortisolwerte nahe. Leider fehlen Vergleichswerte der Tiere aus ihrer gewohnten häuslichen Umgebung, um beurteilen zu können, ob es sich bei den unmittelbar vor der Belastung gemessenen Werten (T0) um die physiologischen Werte der Tiere handelt. In der Literatur sind Hinweise darauf zu finden, dass die Kortisolkonzentration erst einige Zeit (20 - 30 min) nach der Belastung ansteigt (GARCIA et al., 2000). Einige Autoren sehen die Wirkung von Glukokortikoiden auch eher in einer Unterdrückung überschießender Stressreaktionen und einer Wiederherstellung der physiologischen Bedingungen (MUNK und GUYRE, 1986). Der Aufbau der Trainingseinheiten (2 x 20 Minuten Belastung, dazwischen 20 Minuten Pause) und die gewählten Entnahmezeitpunkte (nach 0, 60, 180 min) hätten allerdings einen Kortisolanstieg aufdecken müssen.

#### **4.4 Schlussbetrachtung**

Aus den vorliegenden Ergebnissen ergibt sich, dass Histamin im Plasma kein geeigneter Stressparameter bei Hunden zu sein scheint. Es wäre von Interesse, ob die angewandten Stresssituationen zu einer Mastzellaktivierung geführt haben. Zum einen könnten Biopsien aus mastzellreichen Geweben wie Haut und Darmschleimhaut entnommen werden. Eine histologische Untersuchung könnte Aufschluss darüber geben, ob Mastzellen zwar aktiviert wurden, aber nicht degranulierten und keine Mediatoren freisetzten. Für ein Standardverfahren zum Nachweis von Stress bei Hunden ist diese Methode allerdings nicht geeignet.

Histamin unterliegt sowohl am Ort der Freisetzung durch die HNMT, als auch im Blutkreislauf durch die DAO einem effizienten Katabolismus, und war möglicherweise deshalb im Probenmaterial nicht nachweisbar. Der Nachweis von Histaminmetaboliten, wie N-tele-Methylhistamin im Blut, könnte daher eine gute Möglichkeit sein, einen vorausgegangenen stressbedingten Histaminanstieg nachzuweisen. Es bestünde auch die Möglichkeit, Histaminabbauprodukte im Urin zu bestimmen (Imidazol-Essigsäure, N-Methylimidazol-Essigsäure). Ein anderer Weg wäre der Nachweis spezifischer Stoffe, die nur bei einer Degranulation von Mastzellen freigesetzt werden, wie der Mastzell-Tryptase. Außerdem könnte die Aktivität der histaminabbauenden Enzyme DAO und HNMT vor der Probennahme gehemmt

werden. Diese Methode, die mit einer Injektion der Hemmstoffe (z.B. Aminoguanidin als Inhibitor der DAO) einhergeht, erscheint für ein Standardverfahren zum Nachweis von Stress ungeeignet.

Da Histamin auch im Probenmaterial durch die DAO abgebaut worden sein könnte, und die Aktivität der DAO durch Heparin beeinflusst wird, wäre in weiteren Untersuchungen ein Vergleich der Histaminwerte bei Blutentnahme mit verschiedenen Antikoagulantien sowie eine Bestimmung der Aktivität der DAO im entnommenen Plasma interessant. Eine andere Möglichkeit wäre die Hemmung der DAO im Probenmaterial. Dazu könnte Aminoguanidin während der Blutentnahme zur Probe gegeben werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Um in der Versuchstierhaltung die Haltungsbedingungen und den Umgang mit den Tieren möglichst stressarm gestalten zu können, sind verlässliche Stressparameter notwendig. Bei Arbeitshunden werden Stressparameter benötigt, um ein möglichst effektives Trainingsprogramm, das die Tiere nicht überfordert, zu erstellen. Kortisol wird häufig verwendet, um eine Stressreaktion bei Tieren zu messen, aber die Interpretation der Ergebnisse kann schwierig sein. Bei Ratten steigt Histamin im Plasma auch nach einer milden Stressbelastung an. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich die Histaminkonzentration im Plasma als Stressparameter bei Hunden eignet.

Zwei verschiedene Gruppen von Hunden wurden für den Versuch verwendet. Laborhunde (n=6) wurden mit verschiedenen Situationen konfrontiert, von denen vermutet wurde, dass sie Stress bei den Tieren auslösen könnten. Die Plasma-Histaminkonzentration von Rettungshunden (n=16) im normalen Training wurde gemessen, um einen möglichen Einfluss von körperlicher Anstrengung auf die Histaminkonzentration bestimmen zu können.

Zunächst wurden alle 4 Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden Blutproben von Laborhunden entnommen, um ein 24 h-Profil der Histamin- und der Kortisolkonzentration im Plasma erstellen zu können. Als nächstes wurde versucht, bei den Hunden durch Futterentzug und durch das Verbringen in eine unbekannte Umgebung Stress zu erzeugen. Bei sechzehn Lawinen-Rettungshunden wurden während vier verschiedener Belastungsarten Proben entnommen. Dabei handelte es sich entweder um Lauf- oder um Suchtraining, das jeweils im Sommer und im Winter durchgeführt wurde. Die Blutproben wurden vor Belastung, nach zwei Belastungsphasen und nach einer 2-stündigen Pause entnommen. Gleichzeitig wurden Körper- und Außentemperatur gemessen.

Die Histaminwerte der Laborhunde wurden mit einer neu entwickelten High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Methode bestimmt. Bei den Rettungshunden wurde ein kommerzieller, auf Hundeplasmaproben neu kalibrierter, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Histaminbestimmung verwendet. Die Kortisolkonzentration im Plasma wurde bei beiden Gruppen durch einen kommerziellen Luminescence Immunoassay (LIA) ermittelt, der ebenfalls neu auf Hundeplasma kalibriert wurde.

Bei den Laborhunden zeigten weder die Histamin- noch die Kortisolkonzentration über 24 Stunden signifikante Veränderungen. Bei der einzelnen Auswertung der Tagesprofile der Tiere konnten Kortisol-Peaks zu unterschiedlichen Tageszeiten und dadurch große Varianzen der Kortisolwerte beobachtet werden. Die Histaminkonzentration im Plasma wies eine geringere Varianz auf und veränderte sich im Tagesverlauf wenig. Futtererwartung und zweitägiger Futterentzug wirkten sich ebenso wie Fütterung nicht auf die Histamin- und Kortisolspiegel im Plasma der Hunde aus. Nachdem die Hunde für 30 Minuten in eine unbekannte Umgebung verbracht worden waren, stiegen die Kortisolwerte im Plasma signifikant an ( $37,3 \pm 5,7$  vs.  $107,2 \pm 18,1$  nmol/l Plasma; MW  $\pm$  SEM,  $P < 0,05$ ), die Histaminwerte zeigten dagegen keine signifikanten Veränderungen ( $9,0 \pm 1,3$  vs.  $8,5 \pm 1,2$  nmol/l Plasma; MW  $\pm$  SEM).

Bei den Rettungshunden konnten keine signifikanten Veränderungen der Histamin- und Kortisolwerte im Verlauf der vier verschiedenen Belastungsarten festgestellt werden. Der Vergleich der unter verschiedenen Belastungssituationen an den drei Entnahmezeitpunkten (T0, T60, T180) gemessenen Histamin- und Kortisolwerte zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Kortisolkonzentration im Plasma fiel nach der Suche im Winter signifikant ab und erreichte nach der Ruhepause wieder den basalen Spiegel ( $58,6 \pm 12,3$  (T0) vs.  $26,7 \pm 7,5$  (T60) vs.  $46,4 \pm 5,9$  (T180) nmol/l Plasma; MW  $\pm$  SEM,  $P < 0,05$ ). Im Sommer war die Histaminkonzentration vor Belastung signifikant höher als im Winter ( $8,7 \pm 1,1$  vs.  $5,4 \pm 1,1$  nmol/l Plasma; MW  $\pm$  SEM,  $P < 0,05$ ) während die Kortisolkonzentration dazu tendierte ( $P = 0,09$ ), im Winter höher zu sein als im Sommer. Eine Korrelation zwischen der Histaminkonzentration vor Belastung und der Außentemperatur konnte nur im Winter beobachtet werden.

Es sind mehrere Gründe für den fehlenden Histaminanstieg im Plasma denkbar. Die gewählten Belastungen könnten nicht zu einer Stressreaktion geführt haben. Möglicherweise wurden Mastzellen zwar aktiviert, aber eine Degranulation mit Histaminfreisetzung könnte ausgeblieben sein. Auch ein effizienter Abbau von Histamin am Ort der Freisetzung oder in der Zirkulation kommt in Frage. Histamin scheint kein geeigneter Parameter für die untersuchten Stresssituationen bei Hunden zu sein. Ob Histaminmetaboliten oder spezifische Mastzellmediatoren zu diesem Zweck herangezogen werden können, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

## 6 SUMMARY

### **Plasma histamine concentration as a possible indicator for stress responses in dogs**

Reliable stress parameters are needed to evaluate housing and handling conditions of laboratory animals. In working dogs, stress parameters are needed to indicate an overloaded and, thereby, ineffective training of the dogs. Cortisol is commonly used to detect stress responses in animals, but interpretation is not always easy. Plasma histamine has been shown to increase in rats not only due to strong stressors, but also during mild stress. Therefore, the aim of this study was to determine if plasma histamine concentration could be used as an indicator for stress in dogs.

Two different groups of dogs were used. Laboratory dogs were exposed to different conditions that were objected to cause a stress response in the dogs. Rescue dogs were monitored under their normal training conditions to evaluate the influence of physical exercise on plasma histamine levels. Blood was taken from Laboratory dogs seven times over 24 h to determine if circadian rhythm could be seen in cortisol or histamine concentrations. Then, dogs were exposed to two potentially stressful situations represented by fasting and an unfamiliar environment. Sixteen rescue dogs (age: 1 – 11 years), trained in avalanche search, underwent four different types of strain. Two training types, running and searching, were each carried out in summer and winter. Blood samples were taken before strain, after two strain cycles and after a resting period of two hours. Corresponding body temperature and outdoor temperature were measured.

Plasma was analysed for histamine by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in laboratory dogs and by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in rescue dogs. Cortisol concentration was measured by Luminescence Immunoassay (LIA).

In laboratory dogs, our results indicated no distinct rhythm in plasma cortisol concentration over 24 hours. Individual cortisol concentrations of the six dogs showed peaks at different times of day leading to high variances in the cortisol values. Plasma histamine concentration showed less variance and remained stable throughout the day. Fasting while watching food preparation induced no significant alteration in plasma cortisol concentration. Neither feeding, hunger or food expectation caused significant variations in plasma histamine concentration. Plasma cortisol

concentration in the dogs increased significantly after a walk of 30 min to unfamiliar surroundings. Histamine concentration in the dogs showed no significant alteration after the walk.

In rescue dogs, no significant changes in histamine concentration were found during course of four strain types. Cortisol concentration decreased significantly after search strain in winter. At three different sampling times no differences in histamine and cortisol concentrations were observed between four strain types. A significantly higher histamine concentration was obtained before any strain in summer vs. winter. Cortisol concentration before strain tended to be higher in winter. Histamine correlated with outdoor temperature before any strain, but only in winter part of this investigation.

The expected rise in histamine concentration in plasma could not be observed. This could be due to the unchanged stress levels, a lack of mast cell degranulation or rapid metabolism of histamine after release. In conclusion, plasma histamine concentration is not a suitable indicator for canine stress responses. However, whether histamine metabolites or non-degraded mast cell mediators could be used for stress evaluation should still be investigated.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- ABE T, YOSHIHARA S, ANDO T, ICHIMURA T (1992).  
The influence of frequency of cold water bathing on the substance P content of the airways in the guinea pigs.  
Regul Pept. 1992; 1 Suppl: S29
- AGUILERA G, RABADAN-DIEHL C, NIKODEMOVA M (2001).  
Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors.  
Peptides. 2001 May; 22(5): 769-74.
- AIKAWA T, MATSUMOTO I, HIROSE T, MORIKAWA T, TSUJIMOTO Y (1986).  
H1 action of histamine on aldosterone and cortisol secretion by perfused dog adrenal.  
Am J Physiol. 1986 May; 250(5 Pt 1): E523-9.
- AKAGI K, TOWNLEY RG (1989).  
Spontaneous histamine release and histamine content in normal subjects and subjects with asthma.  
J Allergy Clin Immunol. 1989 Apr; 83(4): 742-9.
- ALEXACOS N, PANG X, BOUCHER W, COCHRANE DE, SANT GR, THEOHARIDES TC (1999).  
Neurotensin mediates rat bladder mast cell degranulation triggered by acute psychological stress.  
Urology. 1999 May; 53(5): 1035-40.
- ANDERSSON T, WARDELL K, ANDERSON C (1995).  
Human in vivo cutaneous microdialysis: estimation of histamine release in cold urticaria.  
Acta Derm Venereol. 1995 Sep; 75(5): 343-7.
- ANREP GV, BARSOUM GS, TALAAT M, WIENINGER E (1939).  
Effect of clotting and of addition of histamine on its distribution in blood.  
J Physiol. (London) 1939; 96, 130-138
- ARRANG JM, GARBARG M, SCHWARTZ JC (1983).  
Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor.  
Nature. 1983 Apr 28; 302(5911): 832-7.
- ARRANG JM, GARBARG M, SCHWARTZ JC (1987).  
Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H3-receptors.  
Neuroscience. 1987 Oct; 23(1): 149-57.
- ASH AS, SCHILD HO (1966).  
Receptors mediating some actions of histamine.  
Br J Pharmacol. 1966 Aug; 27(2): 427-39.
- AYADA K, WATANABE M, ENDO Y (2000).  
Elevation of histidine decarboxylase activity in skeletal muscles and stomach in mice by stress and exercise.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000 Dec; 279(6): R2042-7.

- BACHERT C (2002).  
The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential.  
*Allergy*. 2002 Apr; 57(4): 287-96.
- BAIRY KL, RAO CM, RAMESH KV, KULKARNI DR (1991).  
Effect of histamine on wound healing.  
*Indian J Physiol Pharmacol*. 1991 Jul; 35(3): 180-2.
- BANI-SACCHI T, BARATTINI M, BIANCHI S, BLANDINA P, BRUNELLESCHI S,  
FANTOZZI R, MANNAIONI PF, MASINI E (1986).  
The release of histamine by parasympathetic stimulation in guinea-pig auricle and rat ileum.  
*J Physiol*. 1986 Feb; 371: 29-43.
- BARCLAY GR, TURNBERG LA (1987).  
Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum.  
*Gastroenterology*. 1987 Jul; 93(1): 91-7.
- BARCLAY GR, TURNBERG LA (1988).  
Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum.  
*Gastroenterology*. 1988 Apr; 94(4): 994-8.
- BARNES PJ (2001).  
Histamine and serotonin.  
*Pulm Pharmacol Ther*. 2001; 14(5): 329-39.
- BAUER O, RAZIN E (2000).  
Mast Cell-Nerve Interactions.  
*News Physiol Sci*. 2000 Oct; 15: 213-218.
- BEALER SL (1999).  
Central Neuronal Histamine Contributes to Cardiovascular Regulation.  
*News Physiol Sci*. 1999 Jun; 14: 100-105.
- BEERDA B, SCHILDER MB, JANSSEN NS, MOL JA (1996).  
The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs.  
*Horm Behav*. 1996 Sep; 30(3): 272-9.
- BERGERON R, SCOTT SL, EMOND JP, MERCIER F, COOK NJ, SCHAEFER AL (2002).  
Physiology and behavior of dogs during air transport.  
*Can J Vet Res*. 2002 Jul; 66(3): 211-6.
- BISCHOFF SC, SCHWENGBERG S, LORENTZ A, MANNS MP, BEKTAS H, SANN H,  
LEVI-SCHAFFER F, SHANAHAN F, SCHEMANN M (2004).  
Substance P and other neuropeptides do not induce mediator release in isolated human intestinal mast cells.  
*Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr; 16(2): 185-93.
- BLACK JW, DUNCAN WA, DURANT CJ, GANELLIN CR, PARSONS EM (1972).  
Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors.  
*Nature*. 1972 Apr 21; 236(5347): 385-90.

BLACK PH, GARBUTT LD (2002).

Stress, inflammation and cardiovascular disease.  
J Psychosom Res. 2002 Jan;52(1):1-23.

BONAZ B, TACHE Y (1994).

Water-avoidance stress-induced c-fos expression in the rat brain and stimulation of fecal output: role of corticotropin-releasing factor.  
Brain Res. 1994 Mar 28; 641(1): 21-8.

BOUCHER WS, LETOURNEAU R, HUANG M, KEMPURAJ D, GREEN M, SANT GR, THEOHARIDES TC (2002).

Intravesical sodium hyaluronate inhibits the rat urinary mast cell mediator increase triggered by acute immobilization stress.  
J Urol. 2002 Jan; 167(1): 380-4.

BOYCE JA (2004).

The biology of the mast cell.  
Allergy Asthma Proc. 2004 Jan-Feb; 25(1): 27-30.

BRADESI S, EUTAMENE H, GARCIA-VILLAR R, FIORAMONTI J, BUENO L (2002a).

Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats.  
Neurogastroenterol Motil. 2002 Feb; 14(1): 75-82.

BRADESI S, EUTAMENE H, FIORAMONTI J, BUENO L (2002b).

Acute restraint stress activates functional NK1 receptor in the colon of female rats: involvement of steroids.  
Gut. 2002 Mar; 50(3): 349-54.

BRANDES LJ, QUEEN GM, LABELLA FS (1998).

Potent interaction of histamine and polyamines at microsomal cytochrome P450, nuclei, and chromatin from rat hepatocytes.  
J Cell Biochem. 1998 Jun 1; 69(3): 233-43.

BREZENOFF HE, GERTNER SB (1972).

The actions of polymyxin B and histamine on ganglionic transmission.  
Can J Physiol Pharmacol. 1972 Aug; 50(8): 824-31.

BUGAJSKI J, GADEK A(1981).

The involvement of central histamine receptors in stress-induced responses of serum corticosterone and free fatty acids and in gastric ulcer development.  
Agents Actions. 1981 Apr; 11(1-2): 151-5.

BUGAJSKI J, GADEK-MICHALSKA A, BORYCZ J, BUGAJSKI AJ, GLOD R (1994).

Histaminergic components in carbachol-induced pituitary-adrenocortical activity.  
J Physiol Pharmacol. 1994 Sep; 45(3): 419-28.

CAMPOS HA, DOMINGUEZ J (1995).

Interaction between noradrenergic and histamine-containing neurons in the rat vas deferens.  
J Pharmacol Exp Ther. 1995 Feb; 272(2): 732-8.

CAMPOS HA, MONTENEGRO M (1998).

Footshock-induced rise of rat blood histamine depends upon the activation of postganglionic sympathetic neurons.

Eur J Pharmacol. 1998 Apr 24; 347(2-3): 159-64.

CAMPOS HA, MONTENEGRO M, VELASCO M, ROMERO E, ALVAREZ R, URBINA A (1999).

Treadmill exercise-induced stress causes a rise of blood histamine in normotensive but not in primary hypertensive humans.

Eur J Pharmacol. 1999 Oct 21; 383(1): 69-73.

CARRASCO GA, VAN DE KAR LD (2003).

Neuroendocrine pharmacology of stress.

Eur J Pharmacol. 2003 Feb 28; 463(1-3): 235-72.

CASALE TB, BOWMAN S, KALINER M (1984).

Induction of human cutaneous mast cell degranulation by opiates and endogenous opioid peptides: evidence for opiate and nonopiate receptor participation.

J Allergy Clin Immunol. 1984 Jun; 73(6): 775-81.

CASTAGLIUOLO I, LAMONT JT, QIU B, FLEMING SM, BHASKAR KR, NIKULASSON ST, KORNETSKY C, POTHOUKAKIS C (1996).

Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells.

Am J Physiol. 1996 Nov; 271(5 Pt 1): G884-92.

CHAVEZ ER, BAYLEY HS (1976).

Amino acid metabolism in the piglet. 2. Influence of fasting on plasma free amino acid concentration and in vivo oxidation of methionine, isoleucine and threonine.

Br J Nutr. 1976 Sep; 36(2): 189-98.

CHO CH, QUI BS, BRUCE IC (1996).

Vagal hyperactivity in stress induced gastric ulceration in rats.

J Gastroenterol Hepatol. 1996 Feb; 11(2): 125-8.

CLARK JD, RAGER DR, CROWELL-DAVIS S, EVANS DL (1997).

Housing and exercise of dogs: effects on behavior, immune function, and cortisol concentration.

Lab Anim Sci. 1997 Oct; 47(5): 500-10.

COLBATZKY F, TOBOLLIK B, HERMANN S W (1991).

Significance and detection of different mast cell populations in the dog.

Tierärztl Prax. 1991 Aug; 19(4): 435-8.

DANIEL A, HONIG CR (1980).

Does histamine influence vasodilation caused by prolonged arterial occlusion or heavy exercise?

J Pharmacol Exp Ther. 1980 Nov; 215(2): 533-8.

- DE MORA F, GARCIA G, FERRER L, ARBOIX M (1993).  
Canine cutaneous mast cells dispersion and histamine secretory characterization.  
*Vet Immunol Immunopathol.* 1993 Dec; 39(4): 421-9.
- DE SIMONE R, ALLEVA E, TIRASSA P, ALOE L (1990).  
Nerve growth factor released into the bloodstream following intraspecific fighting induces mast cell degranulation in adult male mice.  
*Brain Behav Immun.* 1990 Mar; 4(1): 74-81.
- DESS NK, LINWICK D, PATTERSON J, OVERMIER JB, LEVINE S (1983).  
Immediate and proactive effects of controllability and predictability on plasma cortisol responses to shocks in dogs.  
*Behav Neurosci.* 1983 Dec; 97(6): 1005-16.
- DIMALINE R, SANDVIK AK, EVANS D, FORSTER ER, DOCKRAY GJ (1993).  
Food stimulation of histidine decarboxylase messenger RNA abundance in rat gastric fundus.  
*J Physiol.* 1993 Jun; 465: 449-58.
- DIMITRIADOU V, ROULEAU A, DAM TRUNG TUONG M, NEWLANDS GJ, MILLER HR, LUFFAU G, SCHWARTZ JC, GARBARG M (1994).  
Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibres evidenced by histamine H3-receptor modulation in rat lung and spleen.  
*Clin Sci (Lond).* 1994 Aug; 87(2): 151-63.
- DIMITRIADOU V, ROULEAU A, TRUNG TUONG MD, NEWLANDS GJ, MILLER HR, LUFFAU G, SCHWARTZ JC, GARBARG M (1997).  
Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions.  
*Neuroscience.* 1997 Apr; 77(3): 829-39.
- DOUGLAS WW, KANNO T, SAMPSON SR (1967).  
Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture.  
*J Physiol.* 1967 Jan; 188(1): 107-20.
- DUNER H, PERNOW B (1958).  
Histamine and leukocytes in blood during muscular work in man.  
*Scand J Clin Lab Invest.* 1958; 10(4): 394-6.
- DVORAK AM (1997).  
New aspects of mast cell biology.  
*Int Arch Allergy Immunol.* 1997 Sep; 114(1): 1-9.
- DY M, LEBEL B, SCHNEIDER E (1986).  
Histamine-producing cell stimulating factor (HCSF) and interleukin 3 (IL 3): evidence for two distinct molecular entities.  
*J Immunol.* 1986 Jan; 136(1): 208-12.
- ECHTENACHER B, MANNEL DN, HULTNER L (1996).  
Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis.  
*Nature.* 1996 May 2; 381(6577): 75-7.

EHRlich P (1879).

Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten.  
Archiv für Anatomie und Physiologie 1879; 3: 166-9

EIK-NES KB, SAMUELS LT (1958).

Metabolism of cortisol in normal and stressed dogs.  
Endocrinology. 1958 Jul; 63(1): 82-8.

ELENKOV IJ, CHROUSOS GP (1999).

Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease.  
Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 1999 Dec; 13(4): 583-95.

EMPEY LR, FEDORAK RN (1989).

Effect of misoprostol in preventing stress-induced intestinal fluid secretion in rats.  
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1989 Oct; 38(1): 43-8.

ENDO Y, TABATA T, KURODA H, TADANO T, MATSUSHIMA K, WATANABE M (1998).

Induction of histidine decarboxylase in skeletal muscle in mice by electrical stimulation, prolonged walking and interleukin-1.  
J Physiol. 1998 Jun 1; 509 (Pt 2): 587-98.

ENERBÄCK L (1966a).

Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation.  
Acta Pathol Microbiol Scand. 1966; 66(3): 289-302.

ENERBÄCK L (1966b)

Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. II. Dye-binding and metachromatic properties.  
Acta Pathol Microbiol Scand. 1966; 66(3): 303-12.

ENGELAND WC, BYRNES GJ, PRESNELL K, GANN DS (1981).

Adrenocortical sensitivity to adrenocorticotropin (ACTH) in awake dogs changes as a function of the time of observation and after hemorrhage independently of changes in ACTH.  
Endocrinology. 1981 Jun; 108(6): 2149-53.

ENGELAND WC, BYRNES GJ, GANN DS (1982).

The pituitary-adrenocortical response to hemorrhage depends on the time of day.  
Endocrinology. 1982 Jun; 110(6): 1856-60.

ERJAVEC F, LEMBECK F, FLORJANC-IRMAN T, SKOFITSCH G, DONNERER J, SARIA A, HOLZER P (1981).

Release of histamine by substance P.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1981 Aug; 317(1): 67-70.

EUTAMENE H, THEODOROU V, FIORAMONTI J, BUENO L (2003).

Acute stress modulates the histamine content of mast cells in the gastrointestinal tract through interleukin-1 and corticotropin-releasing factor release in rats.  
J Physiol. 2003 Dec 15; 553(Pt 3): 959-66.

FOSS ML, BARNARD RJ, TIPTON CM (1971).

Free 11-hydroxycorticosteroid levels in working dogs as affected by exercise training. *Endocrinology*. 1971 Jul; 89(1): 96-104.

GARCIA A, MARTI O, VALLES A, DAL-ZOTTO S, ARMARIO A (2000).

Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology*. 2000 Aug; 72(2): 114-25.

GARNIER F, BENOIT E, VIRAT M, OCHOA R, DELATOUR P (1990).

Adrenal cortical response in clinically normal dogs before and after adaptation to a housing environment. *Lab Anim*. 1990 Jan; 24(1): 40-3.

GORDON CR, LAVIE P (1985).

Day-night variations in urine excretions and hormones in dogs: role of autonomic innervation. *Physiol Behav*. 1985 Aug; 35(2): 175-81.

GOTTWALD TP, HEWLETT BR, LHOTAK S, STEAD RH (1995).

Electrical stimulation of the vagus nerve modulates the histamine content of mast cells in the rat jejunal mucosa. *Neuroreport*. 1995 Dec 29; 7(1): 313-7.

GOTTWALD T, COERPER S, SCHAFFER M, KOVEKER G, STEAD RH (1998).

The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis. *Wound Repair Regen*. 1998 Jan-Feb; 6(1): 8-20.

GUE M, FIORAMONTI J, FREXINOS J, ALVINERIE M, BUENO L (1987).

Influence of acoustic stress by noise on gastrointestinal motility in dogs. *Dig Dis Sci*. 1987 Dec; 32(12): 1411-7.

GUO Y, MOCHIZUKI T, MORII E, KITAMURA Y, MAEYAMA K (1997).

Role of mast cell histamine in the formation of rat paw edema: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol*. 1997 Jul 23; 331(2-3): 237-43.

HAAS H, PANULA P (2003).

The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Feb; 4(2): 121-30.

HABIB KE, GOLD PW, CHROUSOS GP (2001).

Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001 Sep; 30(3): 695-728; vii-viii.

HENNESSY MB, DAVIS HN, WILLIAMS MT, MELLOTT C, DOUGLAS CW (1997).

Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Physiol Behav*. 1997 Sep; 62(3): 485-90.

- HENNESSY MB, VOITH VL, HAWKE JL, YOUNG TL, CENTRONE J, MCDOWELL AL, LINDEN F, DAVENPORT GM (2002).  
Effects of a program of human interaction and alterations in diet composition on activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in dogs housed in a public animal shelter.  
J Am Vet Med Assoc. 2002 Jul 1; 221(1): 65-71
- HINSON JP, VINSON GP, PUDNEY J, WHITEHOUSE BJ (1989).  
Adrenal mast cells modulate vascular and secretory responses in the intact adrenal gland of the rat.  
J Endocrinol. 1989 May; 121(2): 253-60.
- HOFSTRA CL, DESAI PJ, THURMOND RL, FUNG-LEUNG WP (2003).  
Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells.  
J Pharmacol Exp Ther. 2003 Jun; 305(3): 1212-21.
- HOUGH LB, NALWALK JW, SVOKOS K, LEURS R, TIMMERMANN H (2004).  
Pain-relieving drugs and the brain histaminergic system: multiple analgesic mechanisms from histamine, impropion and cimetidine.  
Inflamm Res. 2004 Mar; 53 Suppl 1: S43-4.
- HUANG M, PANG X, LETOURNEAU R, BOUCHER W, THEOHARIDES TC (2002).  
Acute stress induces cardiac mast cell activation and histamine release, effects that are increased in Apolipoprotein E knockout mice.  
Cardiovasc Res. 2002 Jul; 55(1): 150-60.
- HUANG ZL, MOCHIZUKI T, WATANABE H, KAGOSHIMA M, MAEYAMA K (1998).  
Biphasic elevation of plasma histamine induced by water immersion stress, and their sources in rats.  
Eur J Pharmacol. 1998 Nov 6; 360(2-3): 139-46.
- HUANG ZL, MOCHIZUKI T, WATANABE H, MAEYAMA K (1999a).  
Histamine release induced by immobilization, gentle handling and decapitation from mast cells and its inhibition by nedocromil in rats.  
Jpn J Pharmacol. 1999 Jul; 80(3): 255-62.
- HUANG ZL, MOCHIZUKI T, WATANABE H, MAEYAMA K (1999b).  
Activation of sensory nerves participates in stress-induced histamine release from mast cells in rats.  
Neurosci Lett. 1999 Aug 6; 270(3): 181-4
- IORIO LC, MCISAAC RJ (1966).  
Comparison of the stimulating effects of nicotine, pilocarpine and histamine on the superior cervical ganglion of the cat.  
J Pharmacol Exp Ther. 1966 Mar; 151(3): 430-7.
- IRIE M, NAGATA S, ENDO Y (2002).  
Fasting stress exacerbates classical conditioned histamine release in guinea pigs.  
Life Sci. 2002 Dec 27; 72(6): 689-98.

- ITOWI N, YAMATODANI A, CACABELOS R, GOTO M, WADA H (1989).  
Effect of histamine depletion on circadian variations of corticotropin and corticosterone in rats.  
*Neuroendocrinology*. 1989 Aug; 50(2): 187-92.
- IZUMI H, HOSHI S, MUE S, TAKISHIMA T, SATO H, AOKI T (1984).  
The determination of blood histamine in asthmatic patients with a simple and sensitive method.  
*Tohoku J Exp Med*. 1984 May; 143(1): 79-85.
- JAVED NH, COOKE HJ (1992).  
Acetylcholine release from colonic submucous neurons associated with chloride secretion in the guinea pig.  
*Am J Physiol*. 1992 Jan; 262(1 Pt 1): G131-6.
- JOHNSON D, KRENGER W (1992).  
Interactions of mast cells with the nervous system--recent advances.  
*Neurochem Res*. 1992 Sep; 17(9): 939-51.
- JOHNSON HL, BEAVEN MA, ERJAVEC F, BRODIE BB (1966).  
Selective labeling and release of non-mast cell histamine.  
*Life Sci* 1966; 5, 115-123
- JOHNSTON SD, MATHER EC (1978).  
Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay: clinical absence of diurnal variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests.  
*Am J Vet Res*. 1978 Nov; 39(11): 1766-70.
- JUTEL M, WATANABE T, AKDIS M, BLASER K, AKDIS CA (2002).  
Immune regulation by histamine.  
*Curr Opin Immunol*. 2002 Dec; 14(6): 735-40.
- KAHLSON G, ROSENGREN E (1968).  
New approaches to the physiology of histamine.  
*Physiol Rev*. 1968 Jan; 48(1): 155-96.
- KANAMARU M, IWASE M, HOMMA I (1998).  
Autoregulation of histamine release in medulla oblongata via H3-receptors in rabbits.  
*Neurosci Res*. 1998 May; 31(1): 53-60.
- KARLSTEDT K, NISSINEN M, MICHELSEN KA, PANULA P (2001).  
Multiple sites of L-histidine decarboxylase expression in mouse suggest novel developmental functions for histamine.  
*Dev Dyn*. 2001 May; 221(1): 81-91.
- KEAHEY TM, LAVKER RM, KAIDBEY KH, ATKINS PC, ZWEIMAN B (1984).  
Studies on the mechanism of clinical tolerance in solar urticaria.  
*Br J Dermatol*. 1984 Mar; 110(3): 327-38.

KEMPPAINEN RJ, SARTIN JL (1984).

Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs.

J Endocrinol. 1984 Nov; 103(2): 219-26.

KILIAAN AJ, SAUNDERS PR, BIJLSMA PB, BERIN MC, TAMINIAU JA, GROOT JA, PERDUE MH (1998).

Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum.

Am J Physiol. 1998 Nov; 275(5 Pt 1): G1037-44.

KIRSCHBAUM C, HELLHAMMER DH (1989).

Salivary cortisol in psychobiological research: an overview.

Neuropsychobiology. 1989; 22(3): 150-69.

KITAMURA Y, GO S, HATANAKA K (1978).

Decrease of mast cells in W/W<sup>v</sup> mice and their increase by bone marrow transplantation.

Blood. 1978 Aug; 52(2): 447-52.

KITAMURA Y, GO S (1979).

Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice.

Blood. 1979 Mar; 53(3): 492-7.

KITOH K, KATOH H, KITAGAWA H, NAGASE M, SASAKI N, SASAKI Y (2001).

Role of histamine in heartworm extract-induced shock in dogs.

Am J Vet Res. 2001 May; 62(5): 770-4.

KNOL BW, DIELEMAN SJ, BEVERIS MM, VAN DEN BROM WE, MOLT JA (1992).

Effects of methods used for blood collection on plasma concentrations of luteinising hormone, testosterone, and cortisol in male dogs.

Vet Q. 1992 Dec; 14(4): 126-9.

KRALY FS (1983).

Histamine plays a part in induction of drinking by food intake.

Nature. 1983 Mar 3; 302(5903): 65-6.

KREIS ME, HAUPT W, KIRKUP AJ, GRUNDY D (1998).

Histamine sensitivity of mesenteric afferent nerves in the rat jejunum.

Am J Physiol. 1998 Oct; 275(4 Pt 1): G675-80.

KRISHNA A, BEESLEY K, TERRANOVA PF (1989).

Histamine, mast cells and ovarian function.

J Endocrinol. 1989 Mar; 120(3): 363-71.

KUBE P, AUDIGE L, KUTHER K, WELLE M (1998).

Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques.

Histochem Cell Biol. 1998 Aug; 110(2): 129-35

- KUHN G, LICHTWALD K, HARDEGG W, ABEL HH (1991).  
The effect of transportation stress on circulating corticosteroids, enzyme activities and hematological values in laboratory dogs.  
J Exp Anim Sci. 1991; 34(3): 99-104.
- LEADON DP, MULLINS E (1991).  
Relationship between kennel size and stress in greyhounds transported short distances by air.  
Vet Rec. 1991 Jul 27; 129(4): 70-3.
- LEVENS NR (1990).  
Control of renal function by intrarenal angiotensin II in the dog.  
J Cardiovasc Pharmacol. 1990; 16 Suppl 4: S65-9.
- LORENZ W, SCHAUER A, HEITLAND S, CALVOER R, WERLE E (1969).  
Biochemical and histochemical studies on the distribution of histamine in the digestive tract of man, dog and other animals.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol. 1969; 265(1): 81-100
- LORENZ W, DOENICKE A, REIMANN HJ, THERMANN M, TAUBER R, SCHMAL A, DORMANN P, HENSEL H, HAMELMANN M, WERLE E (1973).  
Plasma histamine determination in man and dog following the infusion of plasma substitutes: models for histamine release under pathophysiological conditions.  
Agents Actions. 1973 Oct; 3(3): 183-4.
- LORENZ W, THERMANN M, MESSMER K, SCHMALL A, DORMANN P, KUSCHE J, BARTH H, TAUBER R, HUTZEL M, MANN G, UHLIG R (1974).  
Evaluation of histamine elimination curves in plasma and whole blood of several circulatory regions: a method for studying kinetics of histamine release in the whole animal.  
Agents Actions. 1974 Dec; 4(5): 336-56.
- LYTINAS M, KEMPURAJ D, HUANG M, BOUCHER W, ESPOSITO P, THEOHARIDES TC (2003).  
Acute stress results in skin corticotropin-releasing hormone secretion, mast cell activation and vascular permeability, an effect mimicked by intradermal corticotropin-releasing hormone and inhibited by histamine-1 receptor antagonists.  
Int Arch Allergy Immunol. 2003 Mar; 130(3): 224-31.
- MACQUEEN G, MARSHALL J, PERDUE M, SIEGEL S, BIENENSTOCK J (1989).  
Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II.  
Science. 1989 Jan 6; 243(4887): 83-5.
- MAIER SF, WATKINS LR (1998).  
Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition.  
Psychol Rev. 1998 Jan; 105(1): 83-107.
- MALAVIYA R, IKEDA T, ROSS E, ABRAHAM SN (1996).  
Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha.  
Nature. 1996 May 2;381(6577):77-80.

MARTINEZ-MIR MI, POLLARD H, MOREAU J, ARRANG JM, RUAT M, TRAIFFORT E, SCHWARTZ JC, PALACIOS JM (1990).

Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and non-human primates.

Brain Res. 1990 Sep 3; 526(2): 322-7.

MARTINS JM, BANKS WA, KASTIN AJ (1997).

Transport of CRH from mouse brain directly affects peripheral production of beta-endorphin by the spleen.

Am J Physiol. 1997 Dec; 273(6 Pt 1): E1083-9.

MASLINSKI C (1975a).

Histamine and its metabolism in mammals. Part I: Chemistry and formation of histamine.

Agents Actions. 1975 May; 5(2): 89-107.

MASLINSKI C (1975b).

Histamine and its metabolism in mammals. Part II: Catabolism of histamine and histamine liberation.

Agents Actions. 1975 Aug; 5(3): 183-225.

MATSUDA H, KANNAN Y, USHIO H, KISO Y, KANEMOTO T, SUZUKI H, KITAMURA Y (1991).

Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells.

J Exp Med. 1991 Jul 1; 174(1): 7-14.

MATSUMOTO I, INOUE Y, TSUCHIYA K, SHIMADA T, AIKAWA T (2004).

Degranulation of mast cells located in median eminence in response to compound 48/80 evokes adrenocortical secretion via histamine and CRF in dogs.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 Oct; 287(4): R969-80.

MCKAY DM, BIENENSTOCK J (1994).

The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract.

Immunol Today. 1994 Nov; 15(11): 533-8.

MIZOBUCHI M, HINENO T, KAKIMOTO Y, HIRATANI K (1993).

Increase of plasma adrenocorticotrophin and cortisol in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated dogs.

Brain Res. 1993 May 28; 612(1-2): 319-21.

MONNIER M, SAUER R, HATT AM (1970).

The activating effect of histamine on the central nervous system.

Int Rev Neurobiol. 1970; 12: 265-305.

MORGANROTH ML, YOUNG EW, SPARKS HV (1977).

Prostaglandin and histaminergic mediation of prolonged vasodilation after exercise.

Am J Physiol. 1977 Jul; 233(1): H27-33.

MORIMOTO T, YAMAMOTO Y, YAMATODANI A (2001).

Brain histamine and feeding behavior.

Behav Brain Res. 2001 Oct 15; 124(2): 145-50.

- MORISSET S, ROULEAU A, LIGNEAU X, GBAHOU F, TARDIVEL-LACOMBE J, STARK H, SCHUNACK W, GANELLIN CR, SCHWARTZ JC, ARRANG JM (2000).  
High constitutive activity of native H<sub>3</sub> receptors regulates histamine neurons in brain.  
Nature. 2000 Dec 14; 408(6814): 860-4.
- MULDOON SM, DONLON MA, TODD R, HELGESON EA, FREAS W (1984).  
Plasma histamine and hemodynamic responses following administration of nalbuphine and morphine.  
Agents Actions. 1984 Oct; 15(3-4): 229-34.
- MUNCK A, GUYRE PM (1986).  
Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress.  
Adv Exp Med Biol. 1986; 196: 81-96.
- MURPHY HM, WIDEMAN CH (1992).  
Vasopressin, corticosterone levels, and gastric ulcers during food-restriction stress.  
Peptides. 1992 Mar-Apr;13(2): 373-6.
- NAKAMURA T, ITADANI H, HIDAKA Y, OHTA M, TANAKA K (2000).  
Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R.  
Biochem Biophys Res Commun. 2000 Dec 20; 279(2): 615-20.
- NAZAR K (1971).  
Adrenocortical activation during long-term exercise in dogs: evidence for a glucostatic mechanism.  
Pflugers Arch. 1971; 329(2): 156-66.
- NECHUSHTAN H, SOREQ H, KUPERSTEIN V, TSHORI S, RAZIN E (1996).  
Murine and human mast cell express acetylcholinesterase.  
FEBS Lett. 1996 Jan 22; 379(1): 1-6.
- NISSINEN MJ, PANULA P (1991).  
Distribution of histamine in developing rat tissues.  
Agents Actions. 1991 May; 33(1-2): 177-80.
- NOLI C, MIOLO A (2001).  
The mast cell in wound healing.  
Vet Dermatol. 2001 Dec; 12(6): 303-13.
- ODENDAAL JS, MEINTJES RA (2003).  
Neurophysiological correlates of affiliative behaviour between humans and dogs.  
Vet J. 2003 May; 165(3): 296-301.
- OHKUBO T, SHIBATA M, INOUE M, KAYA H, TAKAHASHI H (1994).  
Autoregulation of histamine release via the histamine H<sub>3</sub> receptor on mast cells in the rat skin.  
Arch Int Pharmacodyn Ther. 1994 Nov-Dec; 328(3): 307-14.

OHTSU H, TANAKA S, TERUI T, HORI Y, MAKABE-KOBAYASHI Y, PEJLER G, TCHOUGOUNOVA E, HELLMAN L, GERTSENSTEIN M, HIRASAWA N, SAKURAI E, BUZAS E, KOVACS P, CSABA G, KITTEL A, OKADA M, HARA M, MAR L, NUMAYAMA-TSURUTA K, ISHIGAKI-SUZUKI S, OHUCHI K, ICHIKAWA A, FALUS A, WATANABE T, NAGY A (2001).

Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells.

FEBS Lett. 2001 Jul 27; 502(1-2): 53-6.

PALAZZOLO DL, QUADRI SK (1987).

The effects of aging on the circadian rhythm of serum cortisol in the dog.

Exp Gerontol. 1987; 22(6): 379-87.

PANULA P, YANG HY, COSTA E (1984).

Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Apr; 81(8): 2572-6.

PANULA P, KAARTINEN M, MACKLIN M, COSTA E (1985).

Histamine containing peripheral neuronal and endocrine systems.

J Histochem Cytochem 1985 Sep; 33(9): 933-41

PENALVA RG, FLACHSKAMM C, ZIMMERMANN S, WURST W, HOLSBOER F, REUL JM, LINTHORST AC (2002).

Corticotropin-releasing hormone receptor type 1-deficiency enhances hippocampal serotonergic neurotransmission: an in vivo microdialysis study in mutant mice.

Neuroscience. 2002; 109(2): 253-66.

PERDUE MH, MASSON S, WERSHIL BK, GALLI SJ (1991).

Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis.

Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice by bone marrow transplantation.

J Clin Invest. 1991 Feb; 87(2): 687-93.

POLI E, CORUZZI G, BERTACCINI G (1991).

Histamine H<sub>3</sub> receptors regulate acetylcholine release from the guinea pig ileum myenteric plexus.

Life Sci. 1991; 48(13): PL63-8.

POLI E, POZZOLI C, CORUZZI G (2001).

Role of histamine H<sub>3</sub> receptors in the control of gastrointestinal motility. An overview.

J Physiol Paris. 2001 Jan-Dec; 95(1-6): 67-74.

RANGACHARI PK (1992).

Histamine: mercurial messenger in the gut.

Am J Physiol. 1992 Jan; 262(1 Pt 1): G1-13.

RANGACHARI PK (1998).

The fate of released histamine: reception, response and termination.

Yale J Biol Med. 1998 May-Aug; 71(3-4): 173-82.

- REUL JM, ROTHUIZEN J, DE KLOET ER (1991).  
Age-related changes in the dog hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: neuroendocrine activity and corticosteroid receptors.  
J Steroid Biochem Mol Biol. 1991; 40(1-3): 63-9.
- RILEY JF, WEST GB (1953).  
The presence of histamine in tissue mast cells.  
J Physiol. 1953 Jun 29; 120(4): 528-37.
- RIVERA E, DAVIO C, CRICCO G, BERGOC RM (1993).  
Histamine regulation of tumour growth. Role of H1 and H2 receptors.  
In: Histamine in normal and cancer cell proliferation.  
Advances in the Bioscience, Pergamon Press, Oxford 1993; pp.299-317.
- ROBBIE-RYAN M, BROWN M (2002).  
The role of mast cells in allergy and autoimmunity.  
Curr Opin Immunol. 2002 Dec; 14(6): 728-33.
- ROSSI R, DEL PRETE E, SCHARRER E (1998).  
Effects of histamine H1 receptors on the feeding and drinking patterns in pygmy goats.  
J Dairy Sci. 1998 Sep; 81(9): 2369-75.
- RUBINSTEIN R, COHEN S (1985).  
Histamine-mediated acetylcholine release in the guinea-pig ileum.  
Eur J Pharmacol. 1985 May 8; 111(2): 245-50.
- RUITENBERG EJ, ELGERSMA A (1976).  
Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection.  
Nature. 1976 Nov 18; 264(5583): 258-60.
- RUOSS SJ, GOLD WM, CAUGHEY GH (1991).  
Mast cell exocytosis: evidence that granule proteoglycan processing is not coupled to degranulation.  
Biochem Biophys Res Commun. 1991 Aug 30; 179(1): 140-6.
- RUSSELL M, DARK KA, CUMMINS RW, ELLMAN G, CALLAWAY E, PEEKE HV (1984).  
Learned histamine release.  
Science. 1984 Aug 17; 225(4663): 733-4.
- SADOWSKI J, KURKUS J, CHWALBINSKA-MONETA J (1975).  
Plasma hormone and renal function changes in unrestrained dogs exposed to cold.  
Am J Physiol. 1975 Feb; 228(2): 376-81.
- SANCHEZ-LEDESMA MJ, GARCIA-MARCH G, GONCALVES J, ANAYA J, SILVA I, GONZALEZ-BUITRAGO JM, NAVAJO JA, BROSETA J (1990).  
Role of vasoactive substances in the segmentary vasomotor response following spinal cord stimulation. An experimental study.  
Stereotact Funct Neurosurg. 1990; 54-55: 224-31.

SANTOS J, SAPERAS E, NOGUEIRAS C, MOURELLE M, ANTOLIN M, CADAHIA A, MALAGELADA JR (1998).

Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans.

Gastroenterology 1998 Apr; 114(4): 640-8.

SANTOS J, SAUNDERS PR, HANSSEN NP, YANG PC, YATES D, GROOT JA, PERDUE MH (1999).

Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat.

Am J Physiol. 1999 Aug; 277(2 Pt 1): G391-9.

SANTOS J, BENJAMIN M, YANG PC, PRIOR T, PERDUE MH (2000).

Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000 Jun; 278(6): G847-54.

SAPOLSKY RM, KREY LC, MCEWEN BS (1984).

Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain.

Endocrinology. 1984 Jan; 114(1): 287-92.

SAUNDERS PR, KOSECKA U, MCKAY DM, PERDUE MH (1994).

Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine.

Am J Physiol. 1994 Nov; 267(5 Pt 1): G794-9.

SELYE H (1976).

Stress in Health and Disease.

Butterworth, London 1976

SILVERMAN HJ, TAYLOR WR, SMITH PL, KAGEY-SOBOTKA A, LICHTENSTEIN LM, BLEECKER ER (1986).

Prevention of canine anaphylaxis with isoproterenol.

Am Rev Respir Dis. 1986 Aug; 134(2): 243-7.

SLAUGHTER MR, BIRMINGHAM JM, PATEL B, WHELAN GA, KREBS-BROWN AJ, HOCKINGS PD, OSBORNE JA (2002).

Extended acclimatization is required to eliminate stress effects of periodic blood-sampling procedures on vasoactive hormones and blood volume in beagle dogs.

Lab Anim. 2002 Oct; 36(4): 403-10.

SOTER NA, WASSERMAN SI (1980).

Physical urticaria/angioedema: an experimental model of mast cell activation in humans.

J Allergy Clin Immunol. 1980 Nov; 66(5): 358-65.

STANGHELLINI V, MALAGELADA JR, ZINSMEISTER AR, GO VL, KAO PC (1983).

Stress-induced gastroduodenal motor disturbances in humans: possible humoral mechanisms.

Gastroenterology. 1983 Jul; 85(1): 83-91.

STANGHELLINI V, MALAGELADA JR, ZINSMEISTER AR, GO VL, KAO PC (1984).

Effect of opiate and adrenergic blockers on the gut motor response to centrally acting stimuli.

Gastroenterology. 1984 Nov; 87(5): 1104-13.

STASZEWSKA-BARCZAK J, VANE JR (1965).

The release of catechol amines from the adrenal medulla by histamine.  
Br J Pharmacol. 1965 Dec; 25(3): 728-42.

STEAD RH, TOMIOKA M, QUINONEZ G, SIMON GT, FELTEN SY, BIENENSTOCK J (1987).

Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves.  
Proc Natl Acad Sci USA. 1987 May; 84(9): 2975-9.

STEAD RH (1992).

Innervation of mucosal immune cells in the gastrointestinal tract.  
Reg Immunol. 1992 Mar-Apr; 4(2): 91-9.

SUZUKI R, FURUNO T, MCKAY DM, WOLVERS D, TESHIMA R, NAKANISHI M, BIENENSTOCK J (1999).

Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P.  
J Immunol. 1999 Sep 1; 163(5): 2410-5.

TACHE Y, MARTINEZ V, MILLION M, RIVIER J (1999).

Corticotropin-releasing factor and the brain-gut motor response to stress.  
Can J Gastroenterol. 1999 Mar; 13 Suppl A: 18A-25A

THEOHARIDES TC, SPANOS C, PANG X, ALFERES L, LIGRIS K, LETOURNEAU R, ROZNIECKI JJ, WEBSTER E, CHROUSOS GP (1995).

Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect.  
Endocrinology. 1995 Dec; 136(12): 5745-50.

THEOHARIDES TC, LETOURNEAU R, PATRA P, HESSE L, PANG X, BOUCHER W, MOMPOINT C, HARRINGTON B (1999).

Stress-induced rat intestinal mast cell intragranular activation and inhibitory effect of sulfated proteoglycans.  
Dig Dis Sci. 1999 Aug; 44(8 Suppl): 87S-93S.

TRENDELENBURG U (1954).

The action of histamine and pilocarpine on the superior cervical ganglion and the adrenal glands of the cat.  
Br J Pharmacol. 1954 Dec; 9(4): 481-7.

TSUJIMOTO S, KAMEI C, YOSHIDA T, TASAKA K (1993).

Changes in plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels induced by intracerebroventricular injection of histamine and its related compounds in dogs.  
Pharmacology. 1993 Aug; 47(2): 73-83.

TUBER DS, SANDERS S, HENNESSY MB, MILLER JA (1996).

Behavioral and glucocorticoid responses of adult domestic dogs (*Canis familiaris*) to companionship and social separation.  
J Comp Psychol. 1996 Mar; 110(1): 103-8.

- TUNCEL N, GURER F, ARAL E, UZUNER K, AYDIN Y, BAYCU C (1996).  
The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on mast cell invasion/degranulation in testicular interstitium of immobilized and cold stressed and beta-endorphin-treated rats.  
Peptides. 1996; 17(5): 817-24.
- VAN DE KAR LD, BLAIR ML (1999).  
Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion.  
Front Neuroendocrinol. 1999 Jan; 20(1): 1-48.
- VAN HEERDEN J, BERTSCHINGER HJ (1982).  
Serum cortisol concentrations in captive tamed and untamed black-backed jackals (*Canis mesomelas*) and translocated dogs.  
J S Afr Vet Assoc. 1982 Dec; 53(4): 235-7.
- VIAL GC, STABENFELDT GH, FRANTI CE, LING GV (1979).  
Influence of environment on adrenal cortical response to ACTH stimulation in clinically normal dogs.  
Am J Vet Res. 1979 Jul; 40(7): 919-21.
- WAKSHLAG JJ, SNEDDEN K, REYNOLDS AJ (2004).  
Biochemical and Metabolic Changes due to Exercise in Sprint-Racing Sled Dogs: Implications for Postexercise Carbohydrate Supplements and Hydration Management.  
Vet Ther. 2004 Spring;5(1): 52-9.
- WANG LD, WANG M, TODISCO A, GRAND E, DEL VALLE J (2000).  
The human histamine H(2) receptor regulates c-jun and c-fos in a differential manner.  
Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Jun; 278(6): C1246-55.
- WATANABE T, TAGUCHI Y, HAYASHI H, TANAKA J, SHIOSAKA S, TOHYAMA M, KUBOTA H, TERANO Y, WADA H (1983).  
Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis.  
Neurosci Lett. 1983 Sep 9; 39(3): 249-54.
- WATANABE T, TAGUCHI Y, SHIOSAKA S, TANAKA J, KUBOTA H, TERANO Y, TOHYAMA M, WADA H (1984).  
Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker.  
Brain Res. 1984 Mar 12;295(1):13-25.
- WERLE E (1936).  
Über die Bildung von Histamin aus Histidin durch tierisches Gewebe.  
Biochem. Z. 1936; 288: 292-293.
- WESTERINK BH, CREMERS TI, DE VRIES JB, LIEFERS H, TRAN N, DE BOER P (2002).  
Evidence for activation of histamine H3 autoreceptors during handling stress in the prefrontal cortex of the rat.  
Synapse. 2002 Mar 15; 43(4): 238-43.

WILFLINGSEDER D, KLOCKER J, SCHWELBERGER HG (2000).

Inhibition of diamine oxidase activity by heparins.

Inflamm Res. 2000 Apr; 49 Suppl 1: S55-6.

WILSON LM, BALDWIN AL (1999).

Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa.

Microcirculation. 1999 Sep; 6(3): 189-98.

WOLLIN A, WANG X, TSO P (1998).

Nutrients regulate diamine oxidase release from intestinal mucosa.

Am J Physiol. 1998 Oct; 275(4 Pt 2): R969-75.

YAMASAKI Y, SHIMAMURA O, KIZU A, NAKAGAWA M, IJICHI H (1982).

IgE-mediated <sup>14</sup>C-serotonin release from rat mast cells modulated by morphine and endorphins.

Life Sci. 1982 Aug 2; 31(5): 471-8.

YANG H, WU SV, ISHIKAWA T, TACHE Y (1994).

Cold exposure elevates thyrotropin-releasing hormone gene expression in medullary raphe nuclei: relationship with vagally mediated gastric erosions.

Neuroscience. 1994 Aug; 61(3): 655-63.

YU LC, PERDUE MH (2001).

Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress.

Immunol Rev. 2001 Feb; 179: 61-73.

ZICKER SC, ROGERS QR (1994).

Concentrations of amino acids in plasma and whole blood in response to food deprivation and refeeding in healthy two-day-old foals.

Am J Vet Res. 1994 Jul; 55(7): 1020-7.

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael Erhard für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundliche Unterstützung.

Ich danke Herrn Dr. Frank Ahrens für die immer freundliche und kompetente Betreuung der Arbeit.

Dem Laborteam des Institutes für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene, besonders Herrn Hermann Kuchler, Frau Katrin Schuster, Frau Nicole Bucher und Frau Tanja Ertl, danke ich für die tatkräftige Unterstützung und das gute Arbeitsklima.

Frau Dr. Frauke Köhler und Frau Dr. Michaela Schneider, die freundlicherweise die Blutproben der Rettungshunde zur Verfügung gestellt haben, gilt mein besonderer Dank.

Frau Professor Dr. Ellen Kienzle und Frau Dr. Britta Dobenecker vom Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung danke ich für die Bereitstellung der Hunde und die freundliche Unterstützung.

Den Tierpflegern des Institutes für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung, vor allem Frau Nadja Al-Tokmaschi und Frau Gabriele Reder, möchte ich für die gute Betreuung der Hunde und die Hilfe bei den Probeentnahmen besonders danken.

Meinen Eltern, Gundula Knies und Professor Dr. Wolfgang Knies, und meinem Bruder Dr. Bernhard Knies bin ich für die liebevolle Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge sehr dankbar.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die geduldige Unterstützung bedanken